

多光子励起顕微鏡を用いた軟骨潤滑下コラーゲン表層分子膜の機能評価

Functional Evaluation of the Molecular Film on Collagen Surfaces during Cartilage Lubrication via Multiphoton Microscopy

同志社大（院）・生（学）*福屋 美咲 同志社大（院）・生（学生非）小林 永

同志社大・生（非）森田 有亮 同志社大・生（正）山本 浩司

Misaki Fukuya*, Haruka Kobayashi*, Yusuke Morita**, Koji Yamamoto**

*Doshisha University Graduate School, ** Doshisha University

1. 諸言

関節軟骨は関節表面を覆う組織であり、優れた潤滑特性を有している。この潤滑特性には軟骨表層に発現・吸着した分子が重要な役割を果たしており、近年は脂質やタンパク質、糖などの相互作用がもたらす水和潤滑が注目されている。しかし、潤滑に寄与する表層分子が完全に明らかになっていくわけではなく、関節軟骨における潤滑メカニズムを解明するためにも、潤滑に関与する新規分子を含めた軟骨表層分子を評価可能な系が必要である。特に、潤滑に関与する軟骨表層分子の形成する分子膜の構成や構造、あるいはそれらの摩擦下における挙動は重要である。lubricinやヒアルロン酸（HA）、リン脂質の形成する水和層においては、コラーゲン層を基盤するモデルが提唱されていることから⁽¹⁾、潤滑に関与する軟骨表層分子は直接・間接的に関わらず、摩擦環境下においてコラーゲン層との相互作用に関与すると考えられる。しかし、これまでに摩擦環境下において、コラーゲン層上の軟骨表層分子に関する摩擦挙動は明らかになっていない。従って、先行研究で広く用いられている蛍光顕微鏡を用いた分子イメージングに加えて⁽²⁾、摩擦環境下におけるコラーゲン層とその上層部の分子機能を評価可能な系の構築が必要である。そこで、本研究では摩擦環境下において、第二高調波を用いたコラーゲン層と共焦点観察によるマルチイメージングを行うことで、潤滑に関与する軟骨表層の分子動態を評価可能な系の開発を目指した。

2. 方法

2.1 摩擦試験装置の開発

摩擦環境下におけるコラーゲン層上の分子機能を評価するため、共焦点及び多光子励起が可能な顕微鏡下で軟骨組織の摩擦界面を観察可能なシステムを構築した。概要図を Fig. 1 に示す。本装置はバランスおよび板ばねを用いて試料に垂直荷重を付与し、ステッピングモーターによってポリカーボネート・ガラス複合材の摩擦対面を回転させることで、組織試料に一定方向の撓動が加えられる機構とした。また、dish を 37 度に保温可能なヒーターを底面に設置し、摩擦試験中の温度を一定に維持した。摩擦力と垂直荷重は板ばねに取り付けられたひずみゲージにより算出した変位とばね定数により計測した。

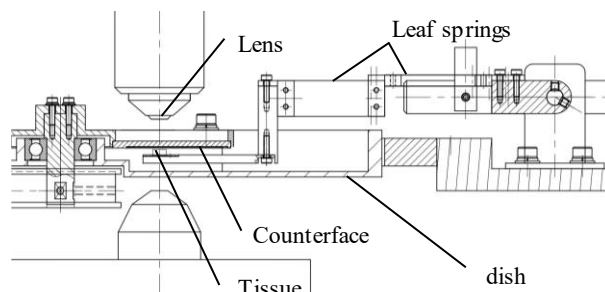


Fig. 1 Schematic diagram of the experimental apparatus for measuring functions.

2.2 HA の蛍光染色

本研究では開発した装置を用いて、水和層の形成に関与することが知られる HA のコラーゲン層上における機能について評価した。HA は Ryan ら⁽³⁾の手法を参考に 960 kDa 以上のものを使用し染色を行った。はじめに、HA を蒸留水で 1.25 mg/mL に溶解し、DMSO に Aminofluorescein (A0306、東京化成工業)を加え、濃度 10 mg/mL の溶液とした。希釈液に Acetaldehyd と Cyclohexy isocyanide を 0.04 v/v%加え、25°Cで 16 h 静置した後、希釈液とエタノール/グアニジン塩酸塩溶液を 14:1 で混合し、-20°Cで一晩静置させることで、HA を沈殿させた。沈殿物を 5 mg/mL で PBS に溶解したのち、透析カセット (87736, Thermo Fisher Scientific) を PBS で満たした 500 mL ビーカーに浸漬させた。常温で 2 時間静置後、バッファー交換をし、一晩静置した。透析後、3.5 mg/mL となるように PBS で希釈して使用した。

2.3 組織試験片

組織試料は生後約 10 ヶ月、体重約 100 kg の食用豚後足膝関節の軟骨から生検トレパンで採取し、直径 5 mm に成型した。HA 溶液に 30 分間浸漬後、PBS に 30 分間浸し、軟骨組織に HA を吸着させ、組織試験片とした。Control 群は HA 非添加軟骨組織とした。

2.4 摩擦試験条件

試験前に dish に潤滑液 (albumin 2 mg/mL, γ -globulin 0.35 mg/mL 混合 PBS) を 85 mL 注入し、組織試験片を装置に取り付けた。摩擦試験は撓動速度 0.25 mm/s、垂直荷重 100 mN、緩和時間 2 分のもと実施した。共焦点撮影は、撓動距離 0 m, 0.4 m, 1 m において行った。HA 染色に用いた Aminofluorescein は励起波長 490 nm, 蛍光波長 525 nm

の条件で検出した。コラーゲン層は第二高調波（Second Harmonic Generation: SHG）を用いて、820 nm の波長で励起し、410 nm の波長で観察した。観察深度は 200 μm とした。

3. 結果・考察

HA 添加軟骨と Control 群の摩擦係数の時間経過を Fig. 2 に示す。摩擦初期には HA 添加群において比較的低い摩擦係数が確認されたものの、摺動距離の増加とともに摩擦係数が増加した。また、摺動距離 0 m, 0.4 m, 1 m における共焦点画像を Fig. 3 に示す。摩擦前では HA 分子が軟骨表層全体を覆っている様子を確認した。摺動距離の増加とともに表層 HA は剥離し、摺動距離 1 m の段階で添加した HA はほぼ残存していない状況であった。また、三次元画像の矢状断面からコラーゲン表層における HA 膜厚を計測した結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 から摺動距離の増加とともに、膜厚が顕著に減少する傾向が見られた。特に、摺動距離 0.4 m から 1 m における膜厚の減少が $1.71 \pm 2.22 \mu\text{m}$ であるのに対して、摺動距離 0 m から 0.4 m にかけての膜厚減少は $2.65 \pm 3.47 \mu\text{m}$ 減少しており、摩擦初期における表層 HA 膜厚の減少が顕著である傾向が見られた。また、軟骨組織を上面から観察した際のコラーゲン層の露出率を算出した結果、摺動距離の増加とともにコラーゲンの露出率が増加する傾向が見られた（Data not shown）。これらのことから、摩擦初期においては吸着した HA 層が摩擦低減に寄与しているが、吸着群、Control 群ともに摩擦係数が増加するタイミングは同様であり、Fig. 3 の結果から HA 層の剥離が関与していると考えられる。また、コラーゲン層は摩擦対面に凝着し、摩擦係数を増加させることが知られている⁽⁴⁾。このことから、摩擦初期には軟骨表層に形成された HA 層がコラーゲンと摩擦対面の直接接触を防いだものの、表層 HA の摩耗とともに、摩擦界面にコラーゲン構層が露出し、ガラス対面に凝着して摩擦係数が増加したと考えられる。摩擦終盤には HA 添加軟骨において Control 群よりも高い摩擦係数が確認された。この要因の一つとして、摩擦試験の終盤にコラーゲン層が露出していたことを踏まえると、内因性の HA や HA と相互作用している分子が外部添加した HA とともに剥離した可能性が考えられる。HA は lubricin と相互作用することで粘性ゲル膜を形成し、優れた潤滑特性をもたらすことが報告されている⁽⁵⁾。また、lubricin は軟骨表層にとどまるために必要なドメイン構造を有しており、コラーゲン層上における lubricin や HA 動態を検討することで、潤滑機構に関する新たな知見を得られることが期待される。

4. 結言

軟骨組織における表層コラーゲン上の HA 分子動態を潤滑下で評価可能なシステムを開発し、摩擦過程における HA 分子の膜厚変化やコラーゲン層の露出率に関する定量評価が可能となった。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 25K01150 の助成を受けたものです。

文献

- (1) Klein, J., et al., Nature Communications, Vol. 6, No. 6060, (2015), pp. 1-6.
- (2) Ivan, K, et al., Engineering Science and Technology, an International Journal, Vol. 34, (2022).
- (3) Ryan, M. et al., Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Vol. 116, (2012), pp. 7-12.
- (4) Stefan, Z., et al., Journal of Biomechanics, Vol. 47, No. 3, (2014), pp. 659-666.
- (5) Israelachvili, J, N. et al., Biomacromolecules, Vol. 14, No. 5, (2013), pp. 1669-1677.

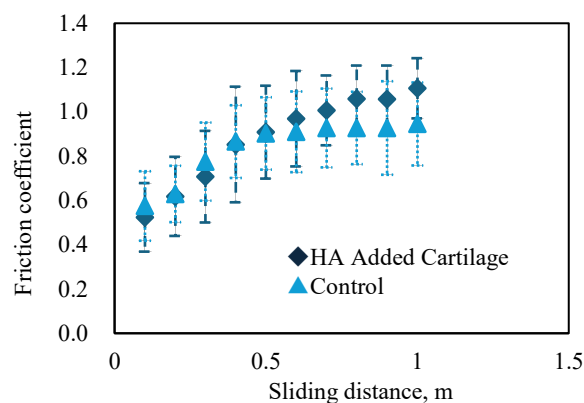


Fig. 2 Changes in the friction coefficient.

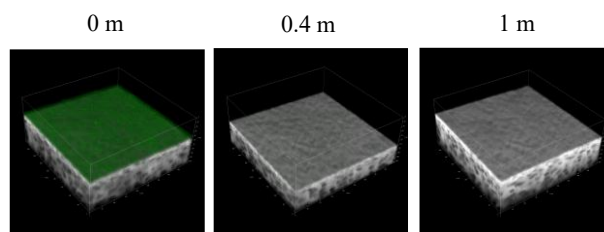


Fig. 3 Confocal and SHG images of the HA film on the surface of cartilage tissue under lubrication.

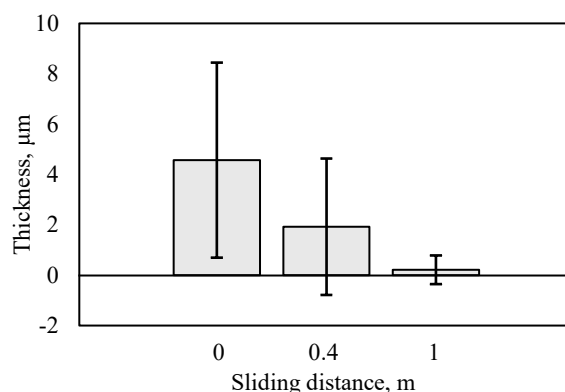


Fig. 4 Changes in surface HA film thickness with increasing sliding distance.