

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 清松 悠

学位論文名 変形性関節症モデルにおける診断的応用を目的とした
第二次高調波発生 (SHG) イメージングによる
軟骨変性過程の定量的評価

学位論文の要約

本研究では、軟骨変性の評価法を確立するための基礎的な検討を目的とし、関節軟骨基質の SHG イメージングを行った。

全身の細胞核が蛍光で確認できる H2B-GFP マウスを用いて、靭帯切除により変形性関節症 (osteoarthritis OA) を誘発する動物モデル (変形性関節症モデル) を作成した。このモデル系と、自然発症に近い軟骨変性を観察するため C57BL/6 若年マウスと老齢マウスを、2 光子励起顕微鏡を用いて観察した。変形性関節症モデルを観察することにより軟骨細胞と軟骨基質の変化を評価することに成功した。肉眼的には変化が著明ではない状態であっても、SHG イメージングでは関節軟骨表面の不整像、また軟骨基質の microcrack、信号強度の増強が観察された。さらに画像解析ソフトを用いて、SHG シグナルの surface rendering、GFP シグナルの spot rendering を行い、定量解析を行った。SHG シグナル (軟骨基質) 体積当たりの GFP シグナル (軟骨細胞核) 数は、OA 側では Control 側に比較し、有意に減少していた。SHG シグナル強度の変動係数 (CV) は、OA 側では Control 側に比較し、有意に増加していた。各々の SHG シグナル強度の標準偏差 (SD) をみると、OA 側が Control 側に比較し有意に増加している群と、OA 側が Control 側と比較しほぼ同等もしくは、やや減少している 2 群に分類できた。組織像を観察すると、OA 側の SD が Control 側に比較し有意に増加している群では、さらに 2 群に分類できた。1 群は、線維軟骨の増生を認め、他方の 1 群では軟骨下骨の露出を認めた。OA 側の SD が Control 側と比較しほぼ同等もしくは、やや減少している群では、軟骨層の菲薄化、硝子軟骨の異所性増生を認めた。

若年マウスと老齢マウスの観察では、老齢マウスにおける軟骨変性を SHG シグナルの増強として捉えることができた。変形性関節症モデルと同様、画像解析ソフトを用い定量評価を行ったところ、若年マウスでは SD、CV ともにほぼ一定であったが、老齢マウスではばらつきを認めた。老齢マウスにおいて SHG シグナルの増強を認めたサンプルでは SD、CV 共に高値を示した。変形性関節症モデルにおいて、組織標本で確認された線維軟骨増生や軟骨下骨の露出は SHG イメ

ージングの定量解析で、SD、CV に反映された。関節表面の不整像や硝子軟骨の異所性増生は SD、CV に反映されなかったが、SHG イメージの 2D 画像で確認できた。また老齢マウスにおける軟骨変性は SHG シグナルの増強として捉えることができた。定量解析では、老齢マウスは Control としての若年マウスは、定量解析では、変性軟骨 SD、CV 共に高値を示した。一方、若年マウスでは、SD、CV ともにほぼ一定であった。これらの結果は、SHG イメージングと画像解析ソフトを用い、SD や CV に cut off 値を定め、変形性関節症の診断に応用することが可能であることを示唆するものである。

SHG イメージングの最大の利点は、非侵襲的であり、また染色を必要とせず、組織深部到達性である。したがって、この手法は、生体組織または器官の画像化に適している。SHG シグナルは、主に細胞外のコラーゲン線維から放出されるので、直接、細胞外マトリックスの構造及び組成の変化を反映することができる。本研究では、SHG テクスチャパターンにより、硝子軟骨、線維軟骨、骨の組織を判別することができた。

関節軟骨の SHG イメージングに基づく多光子励起顕微鏡での観察は、OA よる組織病理学的変化を特徴づけるために理想的な手法である。SHG 強度の分布パターンの定量的及び統計的分析は、これらの組織病理学的な検証に有用であることが明らかにした。したがって、SHG イメージングは、変形性関節症の早期診断や、治療の標的分子の同定、新規治療法の開発に繋がるのが期待される。また、今後ヒト検体での検証、関節鏡への SHG イメージングの応用等を検討している。なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文を投稿済である。

主論文: Kiyomatsu H, Oshima Y, Saitou T, Hikita A, Miyazaki T, Miura H, Iimura T, Imamura T: Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application.

Biomedical optics express Vol. 6, Iss. 2, pp. 405-420 (2015)

DOI 10.1364/BOE.6.000405