組織・細胞共培養モデルにおいて滑膜細胞の炎症反応が
関節軟骨の力学特性に与える影響*山崎 慎也^{*1}, 宮田 昌悟^{*2}Effect on mechanical properties of articular cartilage through inflammatory response
of synoviocytes under tissue and cell co-culture modelShinya YAMAZAKI and Shogo MIYATA^{*2}^{*2} The Department of Mechanical Engineering, School of Science and Technology, Keio University
3-14-1, Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa, 223-8522, Japan

Received 24 September 2013

Abstract

Articular cartilage has a poor ability to regenerate itself, therefore it is important to establish the treatment methodologies for cartilage diseases such as osteoarthritis (OA) or rheumatoid arthritis (RA). In these cartilage diseases, RA is known as an autoimmune disease that causes an unexplained persistent inflammation in synovial tissue. TNF- α (tumor necrosis factor- α) is one of inflammatory cytokine released by synoviocytes which causes cartilage destruction by producing the matrix metalloproteinase. To understand pathology of RA, various studies were performed *in vivo* and *in vitro*. One of the approaches is based on co-culture of cartilage explants and synoviocytes extracted from RA tissue. This co-culture system is superior for evaluating the effect of synoviocytes on cartilage degeneration *in vitro*. However, the studies using co-culture system focused on only biochemical properties. The purpose of this study is to establish the co-culture system to enable the evaluation of biomechanical as well as biochemical properties. The bovine cartilage explants were co-cultured with human synoviocytes from RA patients in the medium containing TNF- α and the mechanical properties of cartilage were evaluated. As the results, it was suggested that the synoviocytes from RA caused the decrease in compressive modulus as well as sGAG content of the cartilage explants.

Key Words : Articular cartilage, Synoviocyte, Co culture, TNF- α , Rheumatoid arthritis, Mechanical property

1. 緒 言

関節軟骨は主に 65-80%もの水分, コラーゲン(主にタイプ II)やプロテオグリカンなどの細胞外基質, 2-3%のわずかな軟骨細胞で構成されている(Hardingham and Fosang, 1992; Kwan, et al., 1984; Mow, et al., 1980). コラーゲンは細胞外基質内で網目構造を形成しプロテオグリカンを固定している. プロテオグリカンはコアタンパクに陰性荷電した硫酸化グリコサミノグリカン(sGAG : sulfated glycosaminoglycans)などの糖が側鎖として共有結合した巨大分子で, 糖のもつ水との親和性により多くの水分を細胞外基質内に保持している. このように細胞外基質と水分の相互作用から, 関節軟骨は粘弾性を有しており, 低摩擦・低摩耗な潤滑を実現している(Mow, et al., 1984). しかしながら, 関節軟骨には神経, 血管, リンパ管が存在しないため自己修復能力が非常に低い. そのため関節リウマチ(RA)などの関節疾患に罹患すると進行度合いに応じて治療が行われる. 関節疾患は軟骨や骨に対し最終的に変性や破壊をひき起こすため QOL(Quality of life)の低下につながってしまう. そのため, 関節疾患においては発症初期段階で進行を抑制することが重要であるが病因が明らかになっていない部分が多く, 根本的治療を行うための方法が確立されていない(Hunziker, 1999, 2000)という難しさがある.

RA は自己免疫疾患として知られており, 病態の中心は滑膜におこる原因不明の持続性炎症である. その本体は増殖性滑膜炎であり, 炎症性滑膜から過剰に産生される炎症性サイトカインが発症, 変性に深く関与している. 正常な状態における関節軟骨ではサイトカインにより軟骨細胞の増殖や細胞外基質の合成と分解のバランスが保

* 論文 No.13-00712 [DOI: 10.1299/transjsme.2014bms0108]

^{*1} 慶應義塾大学大学院 理工学研究科 総合デザイン工学専攻^{*2} 正員, 慶應義塾大学 理工学部 機械工学科 (〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1)

E-mail: miyata@mech.keio.ac.jp

たれているが、RA に罹患した関節では炎症反応が持続したことで放出された TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) や IL(interleukin)などの炎症性サイトカインが多量に存在する。これらのサイトカインにより増殖した滑膜細胞がタンパク分解酵素である MMP-3(matrix metalloproteinase-3)の産生、破骨細胞の分化、活性化を誘導することで軟骨や骨が破壊される。

RA における軟骨の変性や破壊についての研究は広く進められている。基礎段階の研究においては、人体を対象とした実験は行えないため動物実験が行われるが、人の免疫系を模擬することは難しいという問題点があった(涌井, 末水, 2010)。そこでヒトの免疫システムをマウスで再現したヒト化マウスを用いた研究が進められている。ヒト化マウスでは遺伝的な免疫不全状態にあるために異種細胞による免疫拒絶が起こることはない(石川, 2012)。免疫に関与している T 細胞や B 細胞がもともと欠陥しているという特徴から様々な組織の移植を行いやすい SCID マウス(Bendele, 2001; Muller-Ladner, et al., 1996; Neidhart, 2003)やコラーゲン関節炎モデルの DBA/1 マウス(Bendele, 2001)を用いることで、RA を模擬した強制的な自己免疫状態の誘発や TNF- α の過剰産生による関節炎の発症をマウスで実現できると報告されている(岩倉, 2002)。その一方で、ヒト化マウスを用いた実験では複雑な細胞ネットワークを形成するため時間やコストの問題が生じる。さらに、動物実験には研究や臨床応用における倫理の問題が存在する。これらの状況を鑑みて Pretzel らは動物実験に代替し、さらには仔ウシから採取した健全な軟骨組織とリウマチ由来の滑膜細胞を生体外で培養することによる生体外培養モデルを提案している。この生体外培養モデルでは軟骨組織のみの培養と軟骨組織・滑膜細胞の共培養系において IL-1 β , TNF- α の添加による MMP-3 濃度の上昇、プロテオグリカンの損失、タイプ II コラーゲンの発現低下を確認し、共培養においてより顕著な影響が出ていることが報告されている(Pretzel, et al., 2009)。しかしながら、現在まで共培養での軟骨変性モデルに対しては sGAG やコラーゲンなど細胞外基質の生化学的変化に着目した研究が多く力学特性に関する研究は進んでいない。生化学特性と力学特性の関連を解明することが軟骨変性の初期段階のメカニズムを詳しく知ることに繋がると考えられる。

そこで、本研究では RA の初期段階における軟骨変性時の力学特性への影響の解明を目的とした。関節リウマチ由来滑膜細胞と正常軟骨組織の共培養系を構築し、TNF- α を添加することで関節リウマチにおける滑膜細胞の炎症反応を模擬した。さらに、この炎症反応が軟骨の力学特性、生化学特性に与える影響への関連性を調べたので報告する。

2. 実験方法

2・1 軟骨組織と滑膜細胞の共培養モデル

試料は生後 3-6 weeks の仔ウシ膝関節部より軟骨組織片を採集し、無菌状況下で生検トレパンを用いて直径 6 mm, 厚さ 3.8-4.8 mm の円柱状に成型した。試料の培養方法は Pretzel らの研究報告(Pretzel, et al., 2009)を参考に図 1 に示したように行った。初めに 48 well マルチディッシュ内に 2%アガロース溶液(Agarose900, Wako, Ltd., Japan)を流し込み、4°Cで 24 h 静置しゲル化した。静置後、ゲルの中心部を直径 6 mm にくり抜き、静的圧縮試験を行った円柱状の軟骨試料を埋め込んだ。基礎培養液として使用した DMEM(Life Technologies, Corp., USA) + 5% FBS + Antimycotic-Antibiotic を埋め込んだ軟骨試料に滴下し、温度 37°C, 湿度 100%, CO₂ 濃度 5%環境下のインキュベータ内で 1 h 静置した。静置後、軟骨組織に関節リウマチ由来ヒト滑膜細胞(Health Science Research Resources

Fig.1 Experimental setup of co-culture sample.

Bank, Japan)を 4.5×10^4 cells/well になるように播種した。なお、試料群は軟骨組織のみの試料群と軟骨組織に滑膜細胞を播種した共培養試料群の2種類を、使用する培養液の種類によりさらに2種類に分類し全4種類の試料群を用いた。培養液は基礎培養液である DMEM + 5%FBS + Antimycotic-Antibiotic と基礎培養液に炎症性サイトカインである TNF- α (R&D SYSTEMS, Inc., USA)を濃度 20 ng/ml になるように添加した培養液とした。基礎培養液を使用した試料群は、軟骨組織のみの試料群(Control group)と共培養試料群(Control co-group), TNF- α 添加培養液を使用した試料群は、軟骨組織のみの試料群(TNF group) と共培養試料群(TNF co-group)とに分類し、培養はインキュベータ内で 15 days 行った。

2・2 静的圧縮試験

静的圧縮試験は図 2 に示す装置を用いてクリーンベンチ内、室温下で行った。試験は、CO₂ independent Medium(Life Technologies, Corp., USA) + 5% FBS + Antibiotic-Antimycotic 培養液中において側面非拘束の条件とした。試験装置は自動ステージ(SGSP26-50(X), SIGMA KOKI, Co., LTD., Japan)を駆動部に用い、容量 50N のロードセル(LU-5KA, KYOWA ELECTRONIC INSTRUMENTS, Co., LTD., Japan)により荷重の測定を行った。始めに試料厚さを軟骨表面の凹凸や曲面の影響を考慮し、ロードセルの検出値が 0.25 N に達する位置から算出した。インデントが試料表面に接した位置を変位 0 と設定し、静的圧縮試験を行った。また、自動ステージの制御及び荷重のサンプリングは汎用制御ソフトウェア(Lab VIEW, National Instruments, Corp., USA)によって作成した自作プログラムを用いた。

全試料群において試料厚さの測定後、図 3 のようにひずみ速度 0.25%/s, 圧縮ひずみ 20%, 圧縮保持時間 15 min の条件下で応力緩和挙動を観察した。応力緩和挙動を最初に観察した日を day 0 と設定し、15 days の培養を行った後、応力緩和挙動を観察した。測定された応力緩和挙動より応力-ひずみ線図を求め、圧縮ひずみ 10%から 20%の部分での傾きから算出した弾性率、変位 20%保持状態が終わる 30 sec の平均値を平衡応力とし変位で割ることで算出した平衡弾性率を評価した。なお、保持時間はすべての試料において応力値の変化が試験終了直前 30 sec において変化率が 2%以下になるように 15 min に設定している。

さらに、図 4 に示す Standard linear solid model によって表される緩和曲線の式

$$\sigma = E_2 \varepsilon_0 + E_1 \varepsilon_0 \exp\left\{-\left(\frac{E_1}{\eta}\right)t\right\} \quad (1)$$

を用いて curve fitting を行い、瞬間弾性率 $E_1 + E_2$, 遅延弾性率 E_2 , 緩和時間 τ を評価した。なお、緩和時間 τ は粘性率 η を E_1 で除することで算出した。

2・3 生化学評価

15 days の培養を終えた全試料群に対し、軟骨の細胞外基質の主要成分の一つである硫酸化グリコサミノグリカ

Fig.2 Cartilage specimens were compressed by indenter. Force and displacement were recorded by computer.

Fig.3 Stress relaxation behavior is observed under the conditions of 0.25/s strain rate, 20% compression and 15 min holding time.

Fig.4 Linear viscoelastic three-parameter solid model. In this model, E_2 is defined as the equilibrium modulus, $E_1 + E_2$ is defined as the instantaneous modulus and η is defined as the apparent viscosity.

ン(sGAG), 単位体積当たりの細胞数, 水分含有量の定量を行った. 培養 15 days 経過後に湿重量を測定した後, 凍結乾燥機(VA-140S, Taitec, Co., Ltd., Japan)を用いて全試料群を 18 h かけて凍結乾燥した. 乾燥重量を測定し, 湿重量と比較することで試料全体に占める水分の割合である含水率を算出した. 乾燥後の試料をタンパク分解酵素である papain を用いて可溶化した. papain 溶液(125 $\mu\text{g/ml}$ papain, 5 mM cystein-HCl, 5 mM Na₂-EDTA, PBS 溶液)を試料の入ったマイクロチューブに 1500 μl 注入し, 60°C で 6 時間静置した. papain 処理により可溶化した試料に対し, 蛍光分光光度計(FP-750, Jasco, Co., Ltd., Japan)を用いた蛍光検定法 Hoechst fluorometric DNA assay(Kim, et al., 1988)を用いて DNA の総含有量を測定し, 細胞数の定量を行った. 標準液には calf thymus DNA を用い, 蛍光度測定は Ex 365 nm/Em 468 nm の条件で行った. 細胞 1 個当たりの DNA 含有量を 7.7 pg(Kim, et al., 1988)として試料中の総細胞数を算出した. sGAG 含有量の定量には比色検定法 DMMB assay(Farndale, et al., 1986)により shark chondroitin sulfate を標準液として, 波長 595 nm における吸光度測定を行った.

なお, 材料試験が軟骨組織の生化学特性に与える影響を検討するため, 予備実験として Control group の day 0 および day 10 において sGAG 含有量の定量を行った. その結果, sGAG 含有量に 10%程度の低下が確認されたが, 本研究では滑膜細胞の炎症反応が力学特性に与える影響のみを明確にするため, この低下を回避するための成長因子などの添加は実施していない.

2・4 統計分析

得られた実験結果における有意差検定として, それぞれ 2 群間の比較は Student-t 検定, 多群間の比較は Tukey-Kramer 法を用いて検定を行い, 両検定とも p 値 0.05 未満を統計的に有意とした.

3. 結 果

3・1 静的圧縮試験

静的圧縮試験によって観察された応力緩和挙動の代表例を図 5 に, 応力緩和挙動から求めた応力-ひずみ線図より算出した day 0, day 15 における弾性率を図 6(a)に平衡弾性率を図 6(b)に示す. 弾性率, 平衡弾性率はそれぞれ day 0 の値と比較して TNF co-group が 66%, 37%, TNF group が 84%, 71%, Control co-group が 86%, 73%, Control group が 76%, 61%であった. day 15 における弾性率, 平衡弾性率の低下は, TNF co-group が最大で Control co-group が最小であった. また, 図 6(a)より弾性率は TNF co-group のみ day 0 と day 15 の間に有意な差を得た. 一方で図 6(b)より平衡弾性率は TNF co-group, TNF group, Control group の 3 試料群において day 0 と day 15 の間に有意な差を得ることができ, day 15 における試料群間では, TNF co-group と TNF group, TNF co-group と Control co-group の間に有意な差を得た. また, 弾性率, 平衡弾性率ともに Control group よりも TNF group, Control co-group の低下が小さかった.

Standard linear solid model による評価結果を表 1 に示す. 瞬間弾性率 $E_1 + E_2$, 遅延弾性率 E_2 はそれぞれ計測値である弾性率, 平衡弾性率と同様の低下傾向を示した. 緩和時間 τ は全試料群において減少傾向にあり, 特に TNF co-group において他試料群より顕著な減少であった.

3・2 生化学評価

培養終了後のそれぞれの試料群の生化学特性の評価として、水分含有量(図 7a)、細胞密度(図 7b)、sGAG 含有量(図 7c)をそれぞれ示す。図 7a より水分含有量は全試料群において有意な差は見られなかった。図 7b より細胞密度は Control 試料群が最も低い傾向が見られたが有意な差は得られなかった。図 7c より sGAG 含有量は TNF co-group において最も低い値を示した。また、TNF co-group と TNF group の間に有意な差が見られた。

Fig.5 Representative stress relaxation curve of articular cartilage.

Fig.6 (a) Tangent modulus and (b) Equilibrium modulus of the articular cartilage cultured for 0 day and 15 days. The moduli of cartilage cultured with synoviocytes supplemented with TNF- α decreased significantly during 15 days culture. Mean $\pm$ S.D., *, **: significant difference (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

Table 1 Material parameters of articular cartilage from standard linear solid model.

day	group	E_2 [MPa]	$E_1 + E_2$ [MPa]	τ [min]
0	TNF co	0.94 ± 0.25	2.72 ± 0.63	1.39 ± 0.34
	TNF	0.99 ± 0.12	2.73 ± 0.37	1.50 ± 0.40
	Control co	0.92 ± 0.21	2.73 ± 0.60	1.49 ± 0.68
	Control	0.91 ± 0.26	2.71 ± 0.49	1.42 ± 0.13
15	TNF co	0.43 ± 0.17	1.64 ± 0.17	0.76 ± 0.15
	TNF	0.71 ± 0.17	2.24 ± 0.49	1.12 ± 0.56
	Control co	0.66 ± 0.18	2.30 ± 0.56	1.16 ± 0.78
	Control	0.53 ± 0.16	2.01 ± 0.43	0.96 ± 0.18

Fig.7 Biochemical analysis of the cartilage specimens cultured for 15 days *in vitro* ((a) Water content ratio (b) Cell number (c) sGAG content). The sGAG content of cartilage cultured with synoviocytes supplemented with TNF- α decreased significantly during 15 days culture. Mean $\pm$ S.D., ***: significant difference (***: $p < 0.001$)

3・3 相関関係

day 15におけるそれぞれの試料群の sGAG 含有量と弾性率, 平衡弾性率の相関関係を図 8 に示す. 相関関係はピアソンの相関係数によって分析し, p 値 0.05 未満を統計的に有意とした. 図 8 より sGAG 含有量と弾性率, 平衡弾性率との間に相関関係が見られた.

4. 考 察

本研究で用いた軟骨組織と滑膜細胞の共培養法は Pretel らによって提案され, MMP-3 濃度の上昇, プロテオグリカンの損失, タイプ II コラーゲンの発現低下を確認し, 軟骨組織のみの培養よりも顕著な影響が出たと報告されている(Pretzel, et al., 2009). 加えて, TNF- α を添加したリウマチ由来滑膜細胞は培養液中の MMP-3 濃度を上昇させると笠松らが報告している(Kasamatsu, et al., 2010). 本研究では TNF- α を添加した共培養によりプロテオグリカンの一部である sGAG 含有量が減少し, 弾性率, 平衡弾性率が低下することが確認された. また, 表 1 より TNF- α を添加した共培養試料群において瞬間弾性率, 遅延弾性率ともに最も小さくなる傾向にあり, 緩和時間に関しては応力緩和が生じるまでが最も短くなった. これは粘弾性における粘性の寄与が小さくなっていることを意味し, 組織に変性が生じていることによるものと推測される. これらの力学特性の変化から, リウマチ由来の滑膜細胞が炎症反応を生じた結果として MMP-3 濃度の上昇が誘発され軟骨に変性が与えられたと考えられる. 一方で, TNF-group では Control group と比較して sGAG 含有量の減少は見られなかった. 荒木らは軟骨の G

Fig.8 The relationships between mechanical properties and sGAG content of cartilage specimens cultured for 15 days. Positive linear correlations were observed.

AG 合成能は TNF- α の濃度で変化することを確認しており, 100 ng/ml 以上の濃度で GAG 合成能を抑制すると報告している(荒木, 1992). 一方で, 本研究で使用した TNF- α 添加培養液の濃度は 20 ng/ml であり, この濃度で sGAG 含有量が減少しなかったことは先の報告と合致する. 水分含有量に関しては全試料群で有意な差が見られなかったが, 本来 sGAG は大きな抱水能を有しているため sGAG の減少に伴い水分含有量も低下するはずである. しかし, コラーゲン網目構造の破綻やコラーゲンの線維化が生じたために組織が膨潤化し自由水が増加した(森田他, 2002)ことで水分含有量に変化が見られなかったと考えられる.

本研究では軟骨変性時の力学特性への影響の解明を目的とし, 軟骨組織と滑膜細胞の共培養に TNF- α を添加することで軟骨の弾性率, 平衡弾性率が低下することを明らかにした. 弾性率, 平衡弾性率の低下に関する要因として図 8 より sGAG 含有量と弾性率, 平衡弾性率との間に相関関係が見られたが, これは Yan らの研究における弾性率と GAG 含有量の相関関係と同様の傾向(Yan, et al., 2009)が示された. 細胞外基質の変化が力学特性に影響を与えると考えられるが, 水分含有量, 細胞数など生化学特性の評価からわかるようにこれらと弾性率との相関関係は見られなかった. sGAG 含有量についても有意な差は TNF- α を添加した 2 試料群の間でしか確認できなかったことから培養期間を延ばすことにより変性が進んでいくと考えられる. これは今回行った培養が 15 days であり実際の RA の発症期間と比較した際に期間が非常に短いためだといえる. しかしながら, 軟骨組織と滑膜細胞の共培養に TNF- α を添加した試料群に関して, 弾性率の低下を確認し sGAG 含有量が他の試料群と比較して最小だったことから軟骨組織に変性を与えたと考えられる. これにより, TNF- α などのサイトカインが関与しなければ滑膜細胞は軟骨組織に直接変性を与えないことが示唆された. 一方で, Control group においても弾性率の低下が確認された. 本研究では図 1 のように側面を固定して培養を行ったが, 生体内と生体外では浸透圧が異なっている. そのため, 端面から sGAG が溶出したことで弾性率が低下したと考えられる. Control group の力学特性および生化学特性を安定させるためには生体内と同様の環境下で培養を行う必要があるが, sGAG の溶出による低下は全ての試料群で想定されるため TNF- α を介した滑膜細胞の炎症反応が与える影響について検証するには十分な実験系であったといえる.

今回考案したモデルでは生体内における RA の発症過程を正確に再現したとは言い難い. しかしながら, 4 種類の培養試料群をそれぞれ比較することで軟骨変性のメカニズムに関して, TNF- α が軟骨組織に直接変性を与えず滑膜細胞の炎症反応を介して軟骨組織に変性を与えるということを明らかにした. このモデルを用いることで RA の発症, 進行過程における初期段階の軟骨変性を再現できる可能性が示唆された. 軟骨変性時には II 型コラーゲンの減少や MMP-3 濃度の上昇が確認されている(Pretzel, 2009)ため, 今後は MMP-3 濃度の変化, コラーゲンの線維化, 滑膜細胞の増殖性などを調べることでより組織構造に生じる変化を詳細に調査し, 力学特性への影響を関連づける必要がある.

5. 結 言

軟骨組織と滑膜細胞の共培養系を構築して TNF- α を添加することで軟骨に変性を生じさせ、力学特性に影響を及ぼし材料強度の指標である弾性率、平衡弾性率が低下することを明らかにした。材料強度が低下した試料群においては sGAG 含有量の減少も確認された。sGAG 含有量の減少にともない材料強度が低下したことから、軟骨の組織変性時において sGAG 含有量の減少が材料強度の低下に影響を与えることを再現できた。また、TNF- α は軟骨組織に直接的に変性を引き起こすのではなく、滑膜組織を介して変性を与えることも認められた。

文 献

- 荒木崇一, 兎培養肋軟骨細胞におよぼすサイトカインの影響, 北里医学, Vol.22, No.1(1992), pp.29–38.
- Bendele, A. M., Animal models of rheumatoid arthritis, Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, Vol.1, No.4 (2001), pp.377–385.
- Farndale, R. W., Buttle, D. J., and Barrett, A. J., Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Vol.883, No.2 (1986), pp.173–177.
- Hardingham, T. E. and Fosang, A. J., Proteoglycans: many forms and many functions, The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Vol.6, No.3 (1992), pp.861–870.
- Hunziker, E. B., Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?, Osteoarthritis and Cartilage, Vol.7, No.1 (1999), pp.15–28.
- Hunziker E. B., Articular cartilage repair: problems and perspectives, Journal of Biorheology, Vol.37, No.1-2 (2000), pp.163–164.
- 石川文彦, ヒト化マウスを用いたヒト免疫・疾患解析, 生化学, Vol.84, No.3 (2012), pp.216–221.
- 岩倉洋一郎, 関節リウマチモデルマウスと創薬への応用, 日本薬理学雑誌, Vol.120, No.5 (2002), pp.303–313.
- Kasamatsu, A., Satoh, M., Yoshida, T. and Kosaka, T., Response of human fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis to inflammatory stimulation: quality control findings, Tissue Culture Research Communications, Vol.29, No.2 (2010), pp.167–172.
- Kim, Y.J., Sah, R. L., Doong, J. Y., and Grodzinsky, A.J., Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258, Analytical Biochemistry, Vol.174, No.1 (1988), pp.168–176.
- Kwan, M. K., Lai, W. M. and Mow, V. C., Fundamentals of fluid transport through cartilage in compression, Annals of Biomedical Engineering, Vol.12, No.6 (1984), pp.537–558.
- 森田有亮, 富田直秀, 青木秀之, 武田聡, 坂口一彦, 池内健, 軟骨の力学特性におよぼす細胞外基質の影響, 日本機械学会論文集. A 編, Vol.69, No.677 (2003), pp. 84–89.
- Mow, V. C., Holmes, M. H and Lai, W. M., Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review, Journal of Biomechanics, Vol.17, No.5 (1984), pp.377–394.
- Mow, V. C., Kuei, S. C., Lai, W. M. and Armstrong, C. G., Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiments, Journal of Biomechanical Engineering, Vol.102, No.1 (1980), pp.73–84.
- Muller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B. N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R. E. and Gay, S., Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice, The American Journal of Pathology, Vol.149, No.5 (1996), pp.1607–1615.
- Neidhart, M., Seemayer, C. A., Hummel, K. M., Michel, B.A., Gay RE, and Gay S., Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo, Arthritis & Rheumatism, Vol.48, No.7 (2003), pp.1873–1880.
- Pretzel, D., Pohlers, D., Weinert, S. and Kinne, R. W., In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage, Arthritis Research & Therapy, Vol.11, No.1 (2009), R25.
- Scott, B. B., Weisbrot, L. M., Greenwood, J. D., Bogoch, E. R., Paige, C. J. and Keystone, E.C., Rheumatoid arthritis synovial fibroblast and U937 macrophage/monocyte cell line interaction in cartilage degradation, Arthritis & Rheumatism, Vol.40, No.3 (1997), pp.490–498.

- 涌井昌俊, 末水洋志, NOG マウスを用いたヒト化動物モデルの研究展開, 生化学, Vol.82, No.4 (2010), pp.314–318.
- Yan, D., Zhou, G., Zhou, X., Liu, W., Zhang, W. J., Luo, X., Zhang, L., Jiang, T., Cui, L. and Cao, Y., The impact of low levels of collagen IX and pyridinoline on the mechanical properties of in vitro engineered cartilage, *Biomaterials*, Vol.30, No.5 (2009), pp. 814–821.

References

- Araki, T., Four cytokines investigated for their effect on rabbit costal chondrocytes in vitro, *Kitasato medicine*, Vol.22, No.1(1992), pp.29–38 (in Japanese).
- Bendele, A. M., Animal models of rheumatoid arthritis, *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, Vol.1, No.4 (2001), pp.377–385.
- Farndale, R. W., Buttle, D. J., and Barrett, A. J., Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, Vol.883, No.2 (1986), pp.173–177.
- Hardingham, T. E. and Fosang, A. J., Proteoglycans: many forms and many functions, *The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Vol.6, No.3 (1992), pp.861–870.
- Hunziker, E. B., Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?, *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol.7, No.1 (1999), pp.15–28.
- Hunziker E. B., Articular cartilage repair: problems and perspectives, *Journal of Biorheology*, Vol.37, No.1-2 (2000), pp.163–164.
- Ishikawa, F., Creation of in vivo models for human immunity and disease, *The Journal of Japanese Biochemical Society*, Vol.84, No.3 (2012), pp.216–221 (in Japanese).
- Iwakura, Y., Mouse models for rheumatoid arthritis and their use in drug development, *Folia Pharmacologica Japonica/Nippon Yakurigaku Zasshi*, Vol.120, No.5 (2002), pp.303–313 (in Japanese).
- Kasamatsu, A., Satoh, M., Yoshida, T. and Kosaka, T., Response of human fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis to inflammatory stimulation: quality control findings, *Tissue Culture Research Communications*, Vol.29, No.2 (2010), pp.167-172.
- Kim, YJ., Sah, R. L., Doong, J. Y., and Grodzinsky, AJ., Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258, *Analytical Biochemistry*, Vol.174, No.1 (1988), pp.168–176.
- Kwan, M. K., Lai, W. M. and Mow, V. C., Fundamentals of fluid transport through cartilage in compression, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol.12, No.6 (1984), pp.537–558.
- Morita, Y., Tomita, N., Aoki, H., Takeda, S., Sakaguchi, K., and Ikeuchi, K., Effects of extracellular matrix on mechanical properties of articular cartilage, *Transactions of the JSME, Series A*, Vol.69, No.677 (2003), pp. 84–89 (in Japanese).
- Mow, V. C., Holmes, M. H and Lai, W. M., Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review, *Journal of Biomechanics*, Vol.17, No.5 (1984), pp.377–394.
- Mow, V. C., Kuei, S. C., Lai, W. M. and Armstrong, C. G., Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiments, *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol.102, No.1 (1980), pp.73–84.
- Muller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B. N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R. E. and Gay, S., Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice, *The American Journal of Pathology*, Vol.149, No.5 (1996), pp.1607–1615.
- Neidhart, M., Seemayer, C. A., Hummel, K. M., Michel, B.A., Gay RE, and Gay S., Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo, *Arthritis & Rheumatism*, Vol.48, No.7 (2003), pp.1873–1880.
- Pretzel, D., Pohlers, D., Weinert, S. and Kinne, R. W., In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage, *Arthritis Research & Therapy*, Vol.11, No.1 (2009), R25.

- Scott, B. B., Weisbrot, L. M., Greenwood, J. D., Bogoch, E. R., Paige, C. J. and Keystone, E.C., Rheumatoid arthritis synovial fibroblast and U937 macrophage/monocyte cell line interaction in cartilage degradation, *Arthritis & Rheumatism*, Vol.40, No.3 (1997), pp.490–498.
- Wakui, M., and Suemizu, H., Development of humanized models using NOG mice, *The Journal of Japanese Biochemical Society*, Vol.82, No.4 (2010), pp.314–318 (in Japanese).
- Yan, D., Zhou, G., Zhou, X., Liu, W., Zhang, W. J., Luo, X., Zhang, L., Jiang, T., Cui, L. and Cao, Y., The impact of low levels of collagen IX and pyridinoline on the mechanical properties of in vitro engineered cartilage, *Biomaterials*, Vol.30, No.5 (2009), pp. 814–821.