

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500449

研究課題名 (和文) 関節拘縮による関節軟骨変性メカニズムの解明および  
リハビリテーションの効果

研究課題名 (英文) Elucidation of cartilage degeneration mechanism and rehabilitaton

研究代表者

折口 智樹 (ORIGUCHI TOMOKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90295105

研究成果の概要 (和文)：不動化したラットの関節軟骨において軟骨層の菲薄化、軟骨基質の低下を明らかにし、TUNNEL陽性の軟骨細胞が増加傾向にあること、ならびに軟骨基質の分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現が増強していることを証明した。さらに、軟骨基質への血管増生とともに、VEGFの発現増強、Chondromodulin-1の発現低下を見出した。そして、固定中に持続的 he 動運動を実施することによって、関節軟骨層の菲薄化、軟骨基質の低下に関連するこれらの変化を抑制した。

研究成果の概要 (英文)：We showed that immobilization induced thinning of the articular cartilage and cartilage degeneration. There were increased TUNNEL-positiyve chondrocytes and MMP expression. Vascular channels were appeared in the area between the calcified cartilage zone, in area with balanced expression of HIF-1alpha/VEGF and ChM-1. In addition, these changes were inhibited by continuous passive motion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,960,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション医学

## 1. 研究開始当初の背景

日本は超高齢化社会を迎え、寝たきりの高齢者の対策は最重要課題である。高齢者は転倒・事故や疾病による安静によって拘縮をおこすと、ADLの著明な低下をきたす。そこで、私たちは不動化によって関節の拘縮のほか、

関節周囲筋肉の萎縮などの形態学的変化を明らかにし、廃用症候群をきたすメカニズムについて研究してきた。しかし、関節構成体、特に関節軟骨に対する関節不動化の影響については、軟骨細胞の減少、軟骨基質の破綻、

軟骨内への血管様構造の侵入など、形態学的に検討されているいくつかの報告はあるが、そのメカニズムについての検討はこれまでさほどなされておらず、検討された報告はあってもそのほとんどは非常に古いものである(J Bone Joint Surg, 1960 &1965)。

## 2. 研究の目的

不動化による関節軟骨の変化を免疫学的、分子生物学的視点から解析し、関節軟骨の変性メカニズムについて明らかにする。同一の実験モデルにおいて軟骨の形態と免疫学的、分子生物学的変化を同時に検討する。

また、本研究と関連する研究としては、メカニカルストレスが原因の1つとして考えられている変形性関節症や、逆に無重力状態など非加重状態における関節軟骨の変化に関する研究や、最近盛んに研究が行われている骨リモデリングの研究などが挙げられる。本研究は、それらの病態に対するリハビリテーションの効果発現メカニズムの解明に示唆に富む結果が得られるものと考えられる。

## 3. 研究の方法

先行研究によって関節を固定すると軟骨細胞が減少することが報告されているが(J Rheumatol, 2003)、それがアポトーシスによるものなのか、TUNEL染色によって同定する。そして、そのアポトーシスの発生メカニズムを解明するために、Fas, caspase群, Bclファミリーなどアポトーシス関連分子の発現について免疫組織化学的染色を行う。そして、軟骨基質の発現についても、その構成成分であるコラーゲンやプロテオグリカンの発現について観察する。さらに、それらの分解酵素であるマトリックスマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の発現についても検討する。また、血管様構造の侵入に対して、VEGF、FGF、TGF $\beta$ などの血管新生を惹起する増殖因子の

発現についても検討する。

一方、関節不動化によって惹起される廃用症候群に対する理学療法の効果に関しては、近年、拘縮や筋萎縮の実験動物モデルを用いて検討はじめており(Okita, 2000)、今回は同一実験モデルにおいて関節軟骨に焦点をあてて理学療法の効果を検証する。

## 4. 研究成果

ラットの足関節の不動化による関節軟骨の変化を明らかにし、その変化の発現に関与する因子について免疫組織学的に検討した。8週齢のWistar系雄ラットの両足関節を最大底屈位の状態でギブス固定後、麻酔下で足関節を摘出。足関節の関節軟骨の形態学的変化をヘマトキシリン・エオジン染色ならびに、サフラニン-O染色、トルイジンブルー染色で観察した。さらに、血管増生に関与するHIF-1 $\alpha$ 、VEGF、血管増生を阻止するchondromodulin-1、軟骨組織中の細胞外マトリックスの分解酵素であるMMP-3、MMP-13の発現を免疫組織染色によって検討した。その結果、固定群においては関節軟骨層が菲薄化しており、サフラニン-O染色、トルイジンブルー染色の染色性が低下しており、基質であるプロテオグリカンが減少していることが推測された。そして、軟骨細胞の肥大化と配列の乱れも認められた。しかし、コラーゲンIならびにコラーゲンIIの発現に有意な差を見出すことはできなかった。固定群の軟骨細胞外のマトリックスでは、MMP-3やMMP-9、MMP-13の発現が亢進しており、固定による軟骨層の菲薄化、プロテオグリカンの減少にこれらの蛋白分解酵素が関与していることが示唆された。

また、軟骨下骨層から血管様構造をしたものが侵入していた。軟骨層は通常無血管野であるが、固定群においてHIF-1 $\alpha$ およびVEGF

の発現が増加していた。これらの血管増生因子の発現は軟骨細胞や血管様構造付近において多く認められた。一方、固定群では、関節軟骨、特にその深層において軟骨層への血流を阻害する Chondromodulin-1 の発現が低下しており、軟骨層への血管様構造の侵入に関与しているものと考えられた。

次に、不動化による関節軟骨組織内の軟骨細胞の減少に着目して、軟骨細胞におけるアポトーシスの関与、ならびにアポトーシスに関連する細胞内シグナル伝達経路について検討した。8週齢の Wistar 系雄ラットの両足関節を最大底屈位の状態でギブス固定後、麻酔下で足関節を摘出した。摘出した足関節の軟骨細胞のアポトーシスの発現について、TUNNEL 染色によって検討した。固定群では、コントロール群と比較して脛骨側の関節軟骨において TUNNEL 陽性の細胞が増加傾向にあった。そこで、アポトーシスに関連する Fas、caspase-3、Bcl-2、Bax などの発現について免疫組織学的に検討したが、固定による有意な発現増強は認められなかった。次に、不動化した関節軟骨組織において NF- $\kappa$ B の発現を免疫組織化学的に検討した。固定群では NF- $\kappa$ B の発現ならびにその上流である Akt の発現が増強していた。NF- $\kappa$ B は一般的にアポトーシスを抑制する転写因子として知られているが、一部の細胞においては逆にアポトーシスに対して促進的に働くことが報告されている。一方、AP-1 の発現は固定によって増強されなかった。NF- $\kappa$ B は軟骨基質の分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼの活性化に関与する因子でもあり、不動化による関節軟骨の変性において重要な因子であることが示唆された。

本年度は、不動化による関節軟骨の菲薄化、軟骨基質の低下を抑制するために、固定中に週 5 回、毎日 30 分ずつ、持続的他動運動 (CPM)

を実施した。

1) 軟骨層の菲薄化、軟骨基質の低下ならびに MMP-3, -9, -13 の発現は CPM によって抑制された。

2) 軟骨細胞のアポトーシスも、CPM によって抑制傾向にあった。

3) 関節を固定すると軟骨下骨層から軟骨層へ血管様構造が発現し、骨化を進めることを明らかにした。その際、関節軟骨への血管新生を惹起する増殖因子である VEGF の発現が増強し、逆に血管新生を抑制する

Chondromodulin-I の発現が低下することを明らかにし、さらに、CPM によって改善することを証明した。

以上より、不動化によってもたらされた関節軟骨層の菲薄化、軟骨基質の低下は、MMP 発現抑制とともに CPM によって改善された。そして、軟骨細胞のアポトーシスに対して改善傾向を認めた。また、不動化による軟骨組織の血管新生を伴う骨化も VEGF の発現増強、Chondromodulin-1 の発現低下の改善を介して抑制することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Nakano J, Kato K, Yoshimura T, et al. Immobilization-induced cartilage degeneration is mediated through the expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor and chondromodulin-I, Connect Tissue Res, 査読有, Vol. 50, 2009, 37-45
- ② Okita M, Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, et al. Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle. Ultrasound Med Biol, 査読有, Vol. 35, 2009, 237-244
- ③ 日比野至, 沖田 実, 井上貴行, 坂野裕洋, 細 正博 ラットヒラメ筋内コラーゲンに対する不動の影響 不溶性コラーゲン含有率とコラーゲンタイプ・III アイソ

- フォームの変化, Journal of the Japanese Physical Therapy Association, Vol. 11, No. 1, 2008, 1-6
- ④ Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol*, 査読有, Vol. 94, 2009, 1005-1015
- ⑤ Fujikawa K, Kawakami A, Tamai M, Uetani M, Origuchi T, et al. High serum cartilage oligomeric matrix protein determines the subset of patients with early-stage rheumatoid arthritis with high serum C-reactive protein, matrix metalloproteinase-3, and MRI-proven bone erosion. *J Rheumatol*, 査読有, Vol. 36, 2009, 1126-1129
- ⑥ Ida H, Aramaki T, Nakamura H, Fujikawa K, Origuchi T, et al. Different expression levels of TNF receptors on the rheumatoid synovial macrophages derived from surgery and a synovectomy as detected by a new flow cytometric analysis. *Cyto technology*, 査読有, Vol. 60, 2009, 161-164
- ⑦ 坂野裕洋, 沖田実, 鈴木重行, 井上貴行, 吉田奈央, 沖田実, 他, ギブス固定後の再荷重によるラットヒラメ筋の筋線維損傷に対する温熱負荷の影響, *理学療法学*, 査読有, 36巻, 2009, 33-40
- ⑧ 片岡英樹, 坂野裕洋, 中野治郎, 沖田実, 重力が筋に与える影響, *理学療法*, 査読有, 26巻, 2009, 626-632
- ⑨ 友利幸之介, 中野治郎, 沖田実, 末梢神経損傷による麻痺筋の萎縮予防と筋力増強, *理学療法ジャーナル*, 査読有, 43巻, 2009, 599-606
- ⑩ 友利幸之介, 小砂哲太郎, 古閑友美, 中野治郎, 沖田実, 不動がラットヒラメ筋におけるタイプ I・III コラーゲン mRNA の発現量におよぼす影響, *日本作業療法研究学会雑誌*, 査読有, 12巻, 2009, 11-15
- ⑪ Kawashiri SY, Kawakami A, Ueki Y, Imazato T, Iwamoto N, Origuchi T, et al. Decrement of serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis (RA) patients achieving remission after 6 months of etanercept treatment: comparison with CRP, IgM-RF, MMP-3 and anti-CCP Ab. *Joint Bone Spine*, 査読有, Vol. 77, 2010, 418-420
- ⑫ Tamai M, Kawakami A, Iwamoto N, Kawashiri SY, Fujikawa K, Origuchi T, et al. Comparative study of the detection of joint injury in early-stage rheumatoid arthritis by MRI of wrist and finger joints and physical examination. *Arthritis Care Res*, 査読有, in press
- ⑬ Iwamoto N, Kawakami A, Arima K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, et al. Contribution of an adenine to guanine single nucleotide polymorphism of the matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) promoter region to the production of anticyclic citrullinated peptide antibodies in patients with HLA-DRB1\*shared epitope-negative rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatol*, 査読有, in press
- ⑭ Origuchi T, Iwamoto N, Kawashiri SY, Fujikawa K, Aramaki T, Tamai M, et al. Reduction in serum levels of substance P in patients with rheumatoid arthritis by etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. *Modern Rheumatol*, 査読有, in press
- ⑮ Origuchi T, Kawashiri S, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K. The influence of tocilizumab on the neuroimmune pathways modulating the pathogenesis in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 査読有, Vol. 69, 2010, 683
- ⑯ 沖田実, 基礎医学分野からのストレッチ効果の検証 ストレッチと拘縮改善, *理学療法学*, 37巻, 査読無, 2010, 253-254
- ⑰ 近藤康隆, 坂本淳哉, 片岡英樹, 沖田実, 【セラピューティック・ストレッチング 知っておきたい基礎的事項】セラピューティック・ストレッチングによる組織変化 骨格筋の変化に由来した拘縮の病態に対して, *理学療法*, 査読無, 27巻, 2010, 973-982
- ⑱ 折口智樹, 川尻真也, 岩本直樹, 玉井慎美, 井田弘明, 川上純, 他, インフリキシマブの関節リウマチ患者の炎症所見, 活動性とADLに対する効果, *日本RAのリハビリ研究会誌*, 査読有, 24巻, 2010, 62-64
- [学会発表] (計 10件)
- ① 坂本淳哉, 坂井孝行, 折口智樹, 中野治郎, 片岡英樹, 沖田実, 他. 不動に伴うラット関節軟骨の形態学的変化, ならびに持続的他動運動の影響, 第43回日本理学療法学術大会, 福岡, 2008年5月15日
- ② 坂井孝行, 折口智樹, 坂本淳哉, 片岡英樹, 中野治郎, 沖田実, 他. 不動に伴うラットヒラメ筋の筋線維萎縮の発生メカニズムと間歇的伸長運動の効果に関する検討, 第43回日本理学療法学術大会, 福岡, 2008年5月15日
- ③ 坂本淳哉, 坂井孝行, 折口智樹, 中野治郎, 片岡英樹, 沖田実, 他. 不動に伴うラ

ット軟骨基質の変化、ならびに持続的他動運動の影響, 第44回日本理学療法学会大会, 東京, 2009年5月28日

- ④ 西川正悟、片岡英樹、坂本淳哉、吉田奈央、折口智樹、沖田実、他、進行したラットヒラメ筋の廃用性萎縮に対して熱刺激と荷重を負荷するとその後の進行を抑制できるか, 第44回日本理学療法学会大会, 東京, 2009年5月28日
- ⑤ 片岡英樹、近藤康隆、中野治郎、坂本淳哉、折口智樹、沖田実、他、不動後のラットヒラメ筋におけるタイチンの発現量の変化, 第44回日本理学療法学会大会, 東京, 2009年5月28日
- ⑥ 中野治郎、沖田実、濱上陽平、小田太史、今川弘顕、折口智樹、他、ラット足関節の不動ならびに不動解除後の痛みの推移と骨格筋・皮膚用髄の変化, 第44回日本理学療法学会大会, 東京, 2009年5月28日
- ⑦ 近藤康隆、吉田佳弘、横山真吾、片岡英樹、坂本淳哉、沖田実、他、温熱療法と伸張運動の併用が不動終了後の関節可動域の回復状況とラットヒラメ筋の筋内膜コラーゲン線維網におよぼす影響, 第44回日本理学療法学会大会, 東京, 2009年5月28日
- ⑧ 横山真吾、本田祐一郎、近藤康隆、片岡英樹、坂本淳哉、沖田実、他、関節不動によるラットヒラメ筋のコラーゲンタイプの変化が足関節可動域に与える影響, 第45回日本理学療法学会大会, 岐阜, 2010年5月28日
- ⑨ 本田祐一郎、近藤康隆、横山真吾、濱上陽平、片岡英樹、沖田実、他、不動期間の延長に伴うラットヒラメ筋の筋内膜におけるタイプ I・III コラーゲンの変化, 第45回日本理学療法学会大会, 岐阜, 2010年5月28日
- ⑩ 折口智樹、川尻真也、山崎聡士、岩本直樹、有馬和彦、玉井慎美、他、トシリズマブの関節リウマチ患者のサブスタンス P に対する効果, 第54回日本リウマチ学会総会学術集会, 神戸, 2010年4月22日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

折口 智樹 (ORIGUCHI TOMOKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：90295105

##### (2) 研究分担者

沖田 実 (OKITA MINORU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50244091

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：