

平成30年6月8日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04955

研究課題名(和文) 軟骨下骨の脆弱性に着目した変形性関節症発生・増悪機構の解明及び新たな治療法の開発

研究課題名(英文) A research targeting subchondral bone fragility to prevent osteoarthritis progression

研究代表者

松田 秀一 (Matsuda, Shuichi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40294938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症(KOA)における軟骨下骨(SCB)の病態生理学的役割について調べる目的で、ラット脛骨SCBにおける部分損傷(SCBI; subchondral bone injury)がKOAの発症、もしくは進行に与える影響について調べた。ラットの膝内側側副靭帯切除および膝内側半月板を切離しKOAを誘発する手術に加えてSCBI手術を行ったところ、軟骨変性スコアは有意に悪化した。また、このモデルに骨形成促進薬であるテリパラチドを投与すると、軟骨変性スコアの改善を認めた。以上の結果より、骨形成薬を投与し軟骨下骨の脆弱性の治療を行うことにより、軟骨変性の進行を予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to investigate the influence of subchondral bone fragility (SBF) on the progression of the knee osteoarthritis by using a novel rat model, and to examine the preventive effect of parathyroid hormone (PTH) on cartilage degeneration. The combination of SBF and meniscal tear led to the abnormal subchondral bone microarchitecture, compared with meniscal tear alone. Moreover, SBF with meniscal tear enhanced articular cartilage degeneration and increased the expression of MMP-13 and type X collagen, compared with meniscal tear alone. The administration of PTH decreased the number of mast cells in the subchondral bone and improved the microstructural parameters of the subchondral bone, and delayed the progression of articular cartilage degeneration. These results suggest that SBF is one of the factors underlying the osteoarthritis development, and that the administration of PTH is a potential therapeutic treatment for preventing OA progression.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性膝関節症 軟骨 軟骨下骨 骨粗鬆症 骨形成薬

1. 研究開始当初の背景

関節痛は 65 歳以上の日本人の自覚症状のうち第二の頻度でみられ、変形性関節症はそのほとんどの原因と目される common disease である(平成 19 年国民生活基礎調査より)。現在我が国の患者数は 2000 万人以上、有症状者は 700~1000 万人と想定されている。

変形性関節症の発症メカニズムおよび病態は、これまで長い間、「関節軟骨の加齢」と断ぜられ、また治療法も各種の保存的治療および外科的治療に限定されてきた。しかし近年、精力的な研究により、その遺伝学的背景、関節軟骨変性の詳細な分子メカニズムなどが徐々に明らかにされてきている。我々も関節軟骨の変性にプロスタグランジン E2 が重要な役割を果たしていることを示し(Nishitani et al, 2010)、関節軟骨に含まれる 2 型コラーゲンの断片が炎症を惹起し、さらにサイトカインを誘導して変性を増悪させる負のサイクルについても報告を行ってきた(Yasuda et al 2002, Kobayashi et al 2005)。しかし関節軟骨の特殊な構造ゆえ、また細胞成分が少なく、細胞活性も乏しいことなどから、一旦変性した関節軟骨の悪化を抑制し、また広範囲に及んだ関節軟骨を再生することは、これまでの研究成果によっても、必ずしも容易ではないことが明らかになっている。

一方、関節軟骨を支える「骨」については、これまであまり注目されていなかった。古くは Radin らにより(J Orthop Res 1986)、軟骨下骨の骨強度の不均一性が起こり、荷重がかかった際の軟骨への shear stress を惹起し、軟骨破綻を来すと報告された。その後あまり注目を集めていなかったが、ここ数年で変形性関節症の発症や進行、症状の増悪に与える軟骨下骨の影響について徐々に知見が得られつつある(Kwoh 2012, Neogi et al 2013, Kerns et al 2014)。我々も、家兎に作成した変形性膝関節症に bisphosphonate を投与することで、軟骨変性が抑制されることを報告した(Shirai et al 2011)。実際に、Laslett らは bisphosphonate を投与した膝 OA 患者における 4 年以上の経過観察において、投与群で疼痛が減じたと報告している(Ann Rheum Dis 2013)。しかしいまだに間接的な証拠が多く、軟骨下骨の脆弱性や微小骨折が、どのようにして、またどの程度変形性関節症の発症や進行に影響を与えるのか十分明らかになっていない。特に in vivo の

実験系を用いた直接的な研究は少なく、臨床的意義について多くの疑問が残されていた。

2. 研究の目的

本研究は「関節軟骨下骨の脆弱性が変形性関節症の発症および増悪に寄与しており、同部の骨強化により発症と増悪を抑制することが可能である」との仮説に基づき、以下の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) ラットの膝において、局所的に軟骨下骨に微小な骨破壊を作成し、 μ CT、組織学的評価などを用いて解析を行ない、どのような形態変化、遺伝子発現が生じ、関節軟骨の変性をもたらしているかにつき明らかにする。
- (2) 既存の変形性関節症モデル(ラットの半月板切離モデル)において、軟骨下骨微小骨折が変形性関節症の増悪に影響するかについて明らかにする。 μ CT、免疫染色等を用い、硬組織学的解析などを行なう。
- (3) 既存の変形性関節症モデルに軟骨下骨微小骨折を加えた状態で、骨形成促進薬を投与し、変形性関節症の頻度、程度が減少・軽減するかどうかを明らかにする。解析には(1)、(2)と同様の手法を用いる。

3. 研究の方法

(1) 脛骨軟骨下骨微小骨折モデルの作製

SD ラットの脛骨軟骨下骨の内側に 0.5mm 径のドリルを 7 カ所刺入し、局所の軟骨下骨微小骨折モデルを作製した。骨孔作製後、単純レントゲン、 μ CT にて刺入部位、方向を確認する。作成群としては、sham operation 群、軟骨下骨微小骨折モデル群(SBF)、内側半月板切離群(MMT) SBF+MMT の 4 群(各群: 10 個体)を作成した。

(2) 脛骨軟骨下骨微小骨折による軟骨および軟骨下骨の組織学的変化の解析

術後 3,6 週目に膝関節を採取し、局所の軟骨下骨微小骨折が及ぼす影響を経時的、形態学的に調査した。まず μ CT(voxel size:10 μ m)で膝関節を撮影する。まず軟骨下骨の骨密度と骨梁構造の変化は 3D data analysis software(CT-analyzer Skyscan)を使用して評価を行なった(Botter et al. Osteoarthritis Cartilage, 2009)。骨近位部の軟骨下骨を解析するために、脛骨内側荷重部の 2.0 mm の前後幅の範囲を解析部位に指定した。骨密度(BV/TV)、骨梁幅(Tb.Th)、

骨梁数 (Tb.N)、骨梁間隔 (Tb.Sp) を、VG Studio Max 2.0 を用いて解析した。

続いて組織切片を作成し、ヘマトキシリン / エオジン染色、サフラニン O 染色を行い、関節面表層の軟骨変性をスコアリングし評価する (Gerwin et al. Osteoarthritis Cartilage, 2010)。また、軟骨損傷の深度及び範囲は OARSI の Cartilage degeneration score を用いて経時的にスコアリングして評価し、軟骨下骨の形態学的変化との対比を行う (Gerwin et al. Osteoarthritis Cartilage, 2010)。

術後 6 週の切片に対して、MMP-13 と X 型コラーゲンの免疫染色を行った。切片はヒアルロニダーゼで賦活化し、さらに過酸化水素で処理された。Cas block でブロッキング後に、切片は抗 MMP-13 抗体及び抗 X 型コラーゲン抗体と一晩反応させた。さらに、二次抗体と反応させ、diaminobenzidine solution で発色後、ヘマトキシリンで染色を行った。軟骨細胞における MMP-13 と X 型コラーゲンの発現率は、脛骨内側部の 0.5 mm の幅での MMP-13 及び X 型コラーゲン陽性軟骨細胞の割合として計測した。

(3) 軟骨下骨への骨粗鬆症治療による変形性膝関節症の発症、病態進行に与える効果検証

軟骨下骨微小骨折モデル及び骨粗鬆症モデルに対し、実臨床で使用されている骨形成促進薬である PTH を投与した。このモデルを経時的に観察し、変形性膝関節症の発症要因である軟骨下骨微小骨折の軟骨、軟骨下骨変性への病態に与える影響を組織学的に解析した。作成群としては、SBF+MMT+生食群、SBF+MMT+PTH の 4 群 (各群：5 個体) を作成し、(2) と同様の解析を行う。

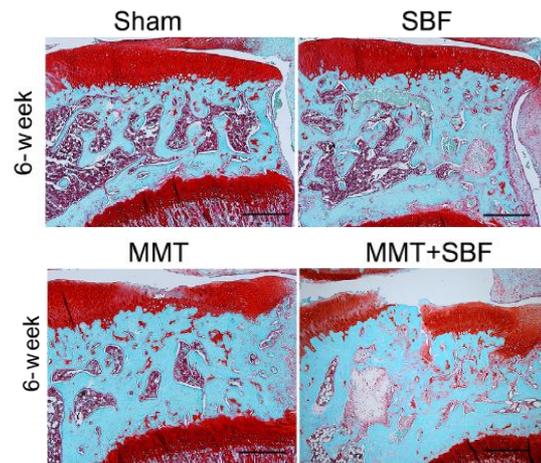
PTH の骨代謝への影響を調べるために、骨形成マーカーとして osteocalcin 及び骨吸収マーカーとして type I collagen C-telopeptide (CTX-1) の濃度をラット血中で解析した。

4. 研究成果

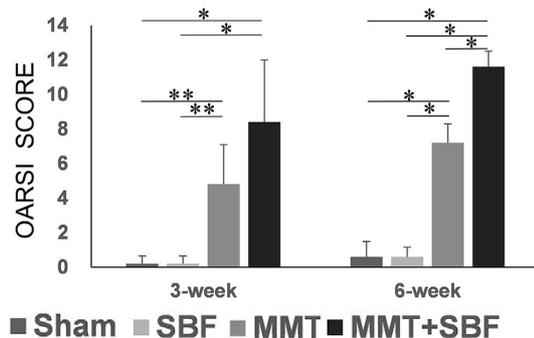
SBF 群と MMT+SBF 群において、術後 3 週で骨孔の残存を部分的に認めただが、それは術後 6 週後では修復されていた。SBF 群では、軟骨下骨の微細構造はわずかにのみ変化しており、Sham 群と比較しわずかに Tb.Th が増加し Tb.N が減少していた。MMT+SBF 群では、術後 6 週で脛骨内側の荷重部で明らかに異常な軟骨下骨の微細構造を認めた。この群では、MMT 群と比較し、

BV/TV、Tb.Th は高くなっており、Tb.N は低くなっていた。

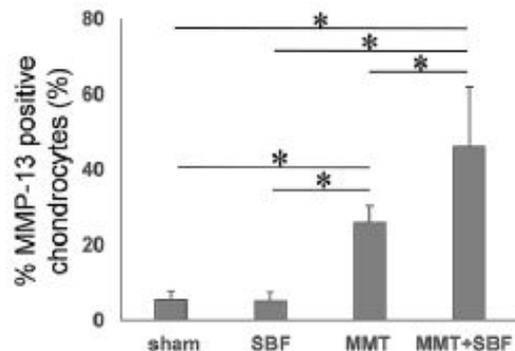
SBF 群では、軟骨の表層は平滑で Sham 群と同様の結果であった。MMT 群と MMT+SBF 群では、軟骨の損傷は時間経過に伴い増加していた。MMT 群と比較し、MMT+SBF 群ではより高度の軟骨変性を認めた。

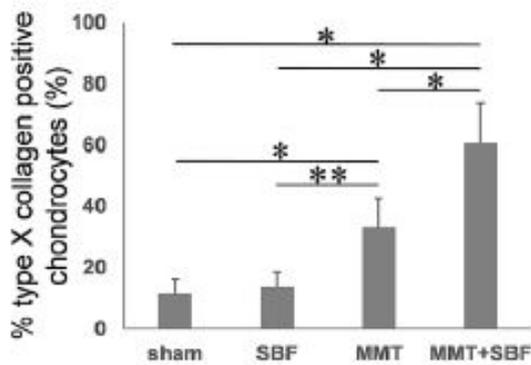


OARSI スコアは術後 6 週で有意に高値となっていた。術後 3 週でも同様に高値となっていたが、その差は統計学的に有意では無かった。

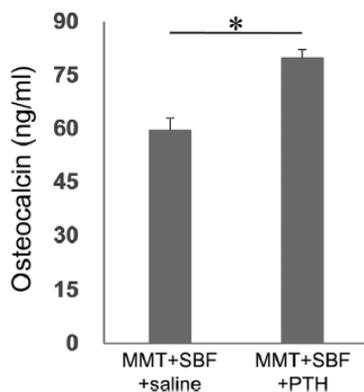


Sham 群と SBF 群では、MMP-13 と X 型コラーゲンは軟骨においてわずかに検出されたが、有意な差は無かった。MMT 群と MMT+SBF 群では、MMP-13 と X 型コラーゲンは軟骨で多く認められた。MMT 群と比較し、MMT+SBF 群では MMP-13 と X 型コラーゲンの発現率は有意に高くなっていった。

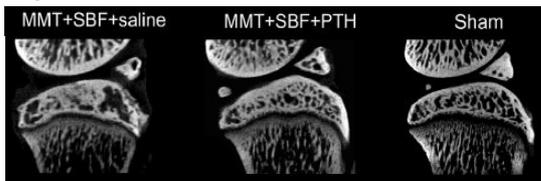




PTH の 6 週間投与は、生食の投与に比較してラット血中の osteocalcin を増加させた。CTX-1 はわずかに減少していたが、その差は有意では無かった。

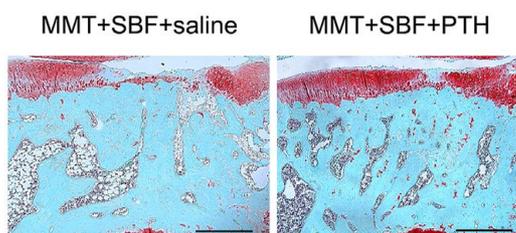


MMT+SBF+saline 群では、術後 6 週で明らかに異常な海綿骨を脛骨内側荷重部軟骨下骨において認めたが、MMT+SBF+PTH 群では、軟骨下骨の海綿骨構造は比較的保たれていた。

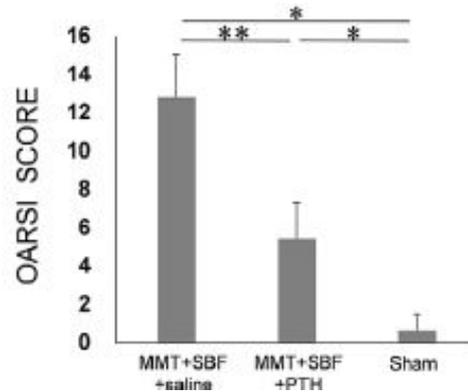


生食投与群では、異常に高い BV/TV、Tb.Th、及び異常に低い Tb.N を認めたが、PTH の投与はこれらのパラメーターを改善していた。

さらに、サフラニン O/ファストグリーン染色において、MMT+SBF+PTH 群の軟骨変性は、MMT+SBF+saline 群と比較して軽度であった。



MMT+SBF+PTH 群の OARSI のスコアは、MMT+SBF+saline 群に比較して有意に低値であった。



本研究は、半月板断裂と軟骨下骨脆弱性が組み合わされると軟骨変性がより進行すること、また、PTH の投与による軟骨下骨脆弱性の治療は軟骨変性の進行を遅らせることができることを直接示した初めての研究である。これらの結果は、軟骨下骨の脆弱性は、軟骨変性進行に関わる一つの要因であり、PTH の投与が OA 進行を抑制する治療選択肢の一つとなる可能性を示唆している。OA 進行を抑制する理想的な治療薬を開発するため、さらなる研究が必要である。

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1件)

Morita Y, Ito H, Ishikawa M, Fujii T, Furu M, Azukizawa M, Okahata A, Tomizawa T, Kuriyama S, Nakamura S, Nishitani K, Yoshitomi H, Matsuda S. Subchondral bone fragility with meniscal tear accelerates and parathyroid hormone decelerates articular cartilage degeneration in rat osteoarthritis model. J Orthop Res [Epub ahead of print], 2017, 査読あり、doi: 10.1002/jor.23840

[学会発表](計2件)

Morita Y, Ito H, Matsuda S, 他 10 名、Subchondral bone fragility increases articular cartilage degeneration in combination with meniscal tear in rat osteoarthritis model. Orthopaedic Research Society 2018 Annual meeting, March 10-13, 2018, New Orleans, LA, USA

松田秀一、変形性膝関節症の病態と治療戦略、第 32 回日本整形外科学会基礎学

術集会、2017.10.27、宜野湾市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 秀一 (MATSUDA, Shuichi)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：4 0 2 9 4 9 3 8

(2)研究分担者

伊藤 宣 (ITO, Hiromu)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：7 0 3 9 7 5 3 7