

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10494

研究課題名(和文)変形性膝関節症における滑膜を標的とした病態解明とその応用による疾患制御

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of knee osteoarthritis targeted for synovium and its application for regulation of the disease

研究代表者

石島 旨章 (ISHIJIMA, Muneaki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70365576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症(膝OA)の研究は、その主たる病変である関節軟骨に焦点を当てられてきたが、本研究では従来重視されてこなかった骨棘とその形成の基となる滑膜に焦点を当てた。そして臨床研究では、膝OAの痛みを中心とした症状は滑膜炎と関連すること、重症化した際の滑膜炎はMRI上の軟骨病変の程度よりも軟骨下骨病変と関連することを明らかにした。また、基礎研究では、骨棘の形成機序となる、滑膜の間葉系細胞が軟骨分化して骨へと変化するその初期変化の分子生物学的機序について、ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンによる軟骨分化に必須の転写因子の制御についての新知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We have examined the role of synovium for the pathophysiology of knee osteoarthritis (OA), while it has been mainly focused on the role of cartilage in this field. In the clinical research, we have revealed that synovitis, which is well correlated with clinical symptom of patients with knee OA, is associated with MRI-detected subchondral bone changes, but not cartilage damage, in patients with end-stage knee OA. We also have obtained by the basic research that perlecan in synovium plays a critical role for the regulation of Sox9 gene expression, which is a master gene for cartilage differentiation, in the synovial mesenchymal cells.

研究分野：変形性膝関節症の病態解明と効率的治療の実践

キーワード：変形性膝関節症 痛み 滑膜 骨棘 半月板逸脱 パールカン 高位脛骨骨切り術 人工膝関節置換術

1. 研究開始当初の背景

本邦における変形性膝関節症(膝 OA)の罹患患者数は、単純レントゲンにおける Kellgren-Lawrence 分類の 2 度以上では約 2,500 万人であり、これに疼痛を伴う膝 OA は約 800 万人と推定されている(東大 ROAD スタディー)。このことは超長寿社会において、本疾患の罹患患者数の多さを表すと同時に、日常臨床で用いる診断ツールである単純レントゲンによって本疾患を評価することの限界をも表している。

現在、平均寿命と健康寿命の差として表現される、介護もしくは支援を要する期間が約 10 年存在する。ロコモティブシンドローム(ロコモ)は、この原因の最も頻度の高い運動器慢性加齢性疾患により移動機能の低下を招く状態を包括する概念を表す目的で創られた。このロコモに関して、我々には 2 つの課題が課されている(健康日本 21 第 2 次)。第一は、国民への周知による運動器の機能低下の早期の気付きと対策を促すものであり(具体的には平成 34 年までに「ロコモ認知度 80%の達成」)、第二は「腰と足の痛みへの対策」である。膝 OA はロコモの主要責任疾患の一つであり、痛みを主とした臨床症状への対策が求められている。そのためには、未だエビデンスに乏しい、臨床症状と病態の関連についての理解の促進が急務である。

我々は、基礎研究では膝 OA の骨棘形成の病態解析を、そして臨床研究では、膝 OA 患者の臨床症状を検討してきた経緯があり、膝 OA の病態、特に滑膜炎、と疼痛をはじめとした臨床症状との関連について、検討を重ねてきた。

[基礎研究 1] Kaneko, Ishijima, et al, *Matrix Biol*, 32, 178-187, 2013

軟骨と滑膜に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカン・パルカンのうち、滑膜パルカンのみ欠損したマウスに膝 OA を誘導すると、骨棘形成が抑制されることを示した。

[基礎研究 2] Futami, Ishijima, et al, *PLOS One*, 7, e4551, 2012

遺伝子マウスを用いた滑膜の基礎研究を可

能とするため、体重 20g 程度のマウスの膝関節から滑膜を採取し、マウス滑膜間葉系細胞(mMSCs)を分離・培養する方法を確立した。

[臨床研究 1] Ishijima, et al, *Arthritis Res Ther*, 13, R22, 2011

膝 OA バイオマーカー候補を用い初期膝 OA の疼痛と病態の関連を検討し、疼痛のある初期膝 OA では軟骨分解マーカー(血清 C2C, 尿中 CTX-II)と滑膜炎マーカー(血清ヒアルロン酸)が亢進した。

[臨床研究 2] Liu, Ishijima, et al, *Clin Rheumatol*, 29, 1185-1190, 2010

末期膝 OA にて TKA を受けた患者の組織学的解析による滑膜炎及び Gd-MRI による滑膜炎の程度と JKOM スコアとの相関から、末期膝 OA の臨床症状は滑膜炎と相関することを示した。

[臨床研究 3] Ning, Ishijima, et al, *Int Orthop*, 35, 831-38, 2011

初期・中期そして末期膝 OA から採取した滑膜における、IL-1, TNF- α , cox-2 の発現量は、重症化とともに増加することなく、逆に減少した。一方、TGF- β の発現量は増加した。

[臨床研究 4] Kubota, Ishijima, et al, *J Orthop Sci*, 15, 641-46, 2010

MRI による膝 OA 関節内病変は、WORMS 法に従い(OAC 2004) 軟骨病変、軟骨下骨の骨髓異常陰影(BMLs)、軟骨下骨陥凹、骨嚢腫、骨棘、半月板病変、靭帯、滑膜炎の 8 病変を捉える。本研究では、疼痛を伴う膝 OA では BMLs を初期でも約 50%、中～末期では約 90% に認めた。

[臨床研究 5] Shimura, Ishijima, et al, *Osteoarthritis Cartilage*, 21, 1179-84, 2013

多変量解析から、初期膝 OA の疼痛影響因子は、滑膜炎を反映する血清 IL-6 であり、末期では下肢アライメント指標(AAA)となった。これより、膝 OA の疼痛の責任因子は、病期によって異なることを示した。

[臨床研究 6] Hada, Ishijima, et al, *Osteoarthritis Cartilage*, 22, 1583-849, 2014

MRIT2 マッピング法を用いて、初期膝 OA において関節軟骨の変性と摩耗は、相対する関節軟骨面では大腿骨側が脛骨側より先に進行することを明らかにした。

上記一連の我々の研究並びに近年急速に進む膝 OA の病態に対するエビデンスから、基礎研究においては骨棘形成の機序の更なる解明とその制御の試み、臨床研究においては疼痛を主とする臨床症状と病態、特に滑膜炎との関連について、末期膝 OA でもこれを立証すること、が重要であると考えに至った。

2. 研究の目的

本申請では、上記の過去の研究成果をふまえ、基礎及び臨床の両面でさらに研究を進めていく。

骨棘形成が ADL 障害と関連する因子であることが明らかとなり (Muraki et al, *Arthritis Rheum* 2011)、滑膜からの軟骨分化は、膝 OA において骨棘形成という病理学的側面とともに、一方では、軟骨再生のための大変よいリソースでもある (Sekiya et al, *Arthritis Rheum* 2012)。そこで基礎研究では、滑膜に存在する間葉系幹細胞 (MSCs) からの軟骨分化過程におけるパールカンの機能解析を、マイクロアレイを用いて滑膜からの軟骨分化制御のための基礎的知見を得ることを目指す。特に、MSCs からの軟骨分化における Sox9 遺伝子発現制御機序の解明をその制御について検討する。

さらに臨床研究としては、ここまで進めてきた病態と臨床症状の関連についての研究発展をさらに進めていく。特に、上記の如く我々の過去の解析から、膝 OA における疼痛を主とした臨床症状は、滑膜炎の状態と相関する。しかし、IL-1, TNF- α , cox-2, IL-6 といった炎症性サイトカインは、病期進行とともに増加するのではなく、逆に減少する (Ning, Ishijima et al, *Int Orthop*, 2011)。そして膝 OA の疼痛は、重症化すると炎症によるものよりも生体力学的負荷に伴う因子によって疼痛程度が大きく影響されることになる (Shimura, Ishijima et al, *Osteoarthritis Cartilage*,

2013)。膝 OA によって発生する病態において、下肢アライメントを含めた生体力学的異常との関連が示唆される病変は、MRI にて検出される骨髄異常陰影 (BMLs) である (Kubota, Ishijima et al, *J Orthop Sci*, 2009; *Osteoarthritis Cartilage*, 2012)。以上をふまえ、本研究の臨床研究では、「膝 OA の疼痛を主とした臨床症状は、関節内の滑膜炎に相関する。特に末期膝 OA では、骨髄異常陰影 (BMLs) が疼痛を含めた臨床症状に関連する。」という仮説を立て、その検証を主に行っていく。

3. 研究の方法

本研究は、以下の体制にて実行した。

【臨床研究】

末期膝 OA の滑膜炎と関連する病態の解析：末期膝 OA の臨床症状と関連する病態の解明を目指した。人工膝関節置換術など手術に至った膝 OA 患者の造影 MRI 及び組織学的に評価する滑膜炎の程度と、3TMRI 画像を whole organ magnetic resonance imaging score (WORMS) 法にて半定量化した形態学的変化と関連する病態を検討した。

【基礎研究】

滑膜に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカン・パールカンによる軟骨分化制御：滑膜のパールカンの発現がないマウスの滑膜を採取及び培養し、軟骨分化誘導直後の滑膜間葉系細胞 (mSMCs) における Sox9 をはじめとした軟骨分化のマスター遺伝子の発現を、分化誘導しない mSMCs、及び骨及び脂肪分化誘導直後の mSMCs と共にマイクロアレイを用いて解析し、mSMCs からの軟骨分化誘導におけるパールカンの機能を検討した。

4. 研究成果

【臨床研究1】

末期膝 OA にて TKA を受けた 40 名を対象に、膝関節内の滑膜炎の程度と、MRI による膝 OA 関節内病変の半定量法である WORMS 法に従

い、軟骨病変、軟骨下骨骨髄異常陰影(BML)、軟骨下骨陥凹(SBA)、骨嚢腫(SBC)、骨棘、半月板病変、靭帯、滑膜炎の8病変について、その重症度を半定量化することで、滑膜炎と関連する膝OAの病態を検討した。対象者の手術を受ける際の患者立脚型機能評価尺度であるJKOMスコアには、100点満点中約30点から95点まで幅があるが、WORMSで評価した関節軟骨損傷須スコアや半月板、そして骨棘などはJKOMスコアとの間に関連を認めなかった。しかし、軟骨下骨の病変であるBML、SBAそしてSBCがそれぞれJKOMスコアと相関を認めた。以上より、末期膝OAの臨床症状と関連する滑膜炎の程度は、軟骨下骨病変の程度と関連することが明らかとなった。

[臨床研究2]

末期膝OA患者が手術を受けるリスク因子を検討した以前の報告では、単純X線で評価した膝OAの重症度評価はリスク因子とはならず、臨床症状の中の、疼痛ではなくADL制限がリスク因子であった(*J Bone Miner Metab* 2014)。今回は、病態の評価を単純X線ではなくMRIを用いて手術を受けるリスク因子と関連する病態を検討した。そしてMRIでは軟骨病変や軟骨下骨病変ではなく、骨棘スコアがリスク因子であることを示した。

[臨床研究3]

疼痛を有する初期から末期の膝OA患者の「うつ状態」の程度を検討し、初期では疼痛とうつ状態の程度が相関したのに対し、進行期以降はこの関連が認められなかった。一方で、血清IL-6は初期から末期膝OA患者のうつ状態と相関した。IL-6は、膝OAの滑膜炎で発現が認められるが、炎症のある膝関節以外には脳幹からも様々な刺激で発現が亢進することが知られている。今回血清IL-6と膝OA患者のうつ状態の関連という、血清IL-6の膝OAにおける新たな機能が示唆された。

[基礎研究]

膝関節内では滑膜でヘパラン硫酸プロテオグ

リカン・パールカンが発現しないマウスを用い、その滑膜をマイクロマス法にて軟骨分化誘導した。パールカンを発現する対象群では、軟骨分化のマスター遺伝子のSox9と2型コラーゲンの発現を認め、豊富な軟骨基質に富む軟骨様組織ができる。一方、パールカン欠損にてSox9と2型コラーゲンの発現が抑制され、軟骨様組織の形成が阻害された。さらに、これにパールカンを追加することで軟骨様組織形成が再現された。以上から、膝OAの骨棘形成に似た過程をin vitroで再現したモデルにおいて、滑膜パールカンが必須の役割を担うこと、そしてパールカンを用いることによるその制御の可能性を示した。

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31件)

1. Sadatsuki R, Kaneko H, Futami I, Kinoshita M, Nonaka R, Culley KL, Otero M, Hada S, Goldring MB, Yamada Y, Kaneko K, Arikawa-Hirasawa E, Ishijima M. Perlecan is required for the chondrogenic differentiation of synovial mesenchymal cells through regulation of Sox9 gene expression. *J Orthop Res*, 35, 837-46, 2017. (査読有) doi: 10.1002/jor.23318
2. Shimoda M, Yoshida H, Mizuno S, Hirozane H, Horiuchi K, Yoshino Y, Hara H, Kanai Y, Inoue S, Ishijima M and Okada Y. HYBID (hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization, KIAA1199) controls endochondral ossification through hyaluronan metabolism. *Am J Pathol*. 187: 1162-76, 2017 (査読有) doi: 10.1016/j.ajpath.2017.01.005
3. Shimura Y, Kurosawa H, Tsuchiya M, Sawa M, Kaneko H, Liu L, Makino Y, Nojiri H, Iwase Y, Kaneko K, Ishijima M. Serum interleukin 6 levels are associated with depressive state of the patients with knee osteoarthritis irrespective of disease severity.

- Clin Rheumatol. 36: 2781-87, 2017
(Correspondent) (査読有) doi:
10.1007/s10067-017-3826-z
- Hada S, Ishijima M, Kaneko H, Kinoshita M, Liu L, Sadatsuki R, Futami I, Yusup A, Takamura T, Arita H, Shiozawa J, Takazawa Y, Ikeda H, Aoki S, Kurosawa H, Okada Y, Kaneko K. Association of medial meniscal extrusion with medial tibial osteophyte distance detected by T2 mapping MRI in the patients with early-stage knee osteoarthritis. Arthritis Res Ther. 19: 201, 2017 (Correspondent) (査読有) DOI: 10.1186/s13075-017-1411-0
 - Yusup A, Kaneko H, Liu L, Ning L, Sadatsuki R, Hada S, Kamagata K, Kinoshita M, Futami I, Shimura Y, Tsuchiya M, Saita Y, Takazawa Y, Ikeda H, Aoki S, Kaneko K, Ishijima M. Bone marrow lesions, subchondral bone cysts and subchondral bone attrition are associated with histological synovitis in patients with end-stage knee osteoarthritis: A cross-sectional study. Osteoarthritis Cartilage, 23, 1858-64, 2015 doi: 10.1016/j.joca.2015.05.017

[学会発表] (計 95 件)

- 有田均, 金子晴香, 石島旨章, 羽田晋之介, 木下真由子, 定月亮, 二見一平, 塩澤淳, 平澤恵理, Yoshihiko Yamada, 金子和夫: パールカンにより制御される滑膜間葉系細胞の遺伝子の網羅的解析: 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017 年 10 月 26 - 27 日, 沖縄
- アニワルジャン・ユスブ, 石島旨章, 金子晴香, 劉立足, 羽田晋之介, 木下真由子, 塩澤淳, 有田均, 高澤祐治, 池田浩, 金子和夫: 末期変形性膝関節症における軟骨下骨の構造変化と滑膜の TGF- β シグナル活性化との関連: 第 90 回日本整形外科学会学術総会, 2017 年 5 月 18-21 日, 仙台
- Arita H., Kaneko H., Ishijima M., Ishibashi M., Liu L., Shiozawa J., Hada S., Kinoshita M., Yusup A., Aoki T., Nagao M., Takazawa Y., Ikeda H., Kaneko K. Osteoarthritis

Research Society International (OARSI) 2017, 2017 年 4 月 27 日-30 日, LasVegas, USA

- Hada S., Ishijima M., Kaneko H., Liz L., Kinoshita M., Arita H., Shiozawa J., Yusup A., Takazawa Y., Ikeda H., Kusunose K., Okada Y., Kaneko K. The degeneration of medial meniscus detected by T2 mapping MRI according to the severity of medial knee osteoarthritis. Osteoarthritis Research Society International (OARSI) 2017, 2017 年 4 月 27 日-30 日, LasVegas, USA
- 木下真由子, 金子晴香, 石島旨章, 定月亮, 二見一平, 羽田晋之介, 有田均, 塩澤淳, 平澤恵理, 山田吉彦, 金子和夫. パールカンによる滑膜間葉系細胞からの軟骨分化制御. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016 年 10 月 13-14 日, 福岡

[図書] (計 2 件)

- 伊藤宣, 石島旨章, 岡崎賢: 変形性関節症, シリーズ骨の話, ミネルブア書房, 2017 年 1 月初版, 350 頁
- Ishijima M, Saita Y, Kaneko H, Kinoshita M, Kaneko K. The geometry of lower extremity and atypical femoral fractures. Osteoporosis in Orthopaedics-Assessments and therapeutic options, 103-134, Shimada Y., Miyakoshi N. (Eds.), 257 頁, Springer 2016

6. 研究組織

- (1)研究代表者
石島 旨章 (ISHIJIMA, Muneaki)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 70365576
- (2)連携研究者
金子 和夫 (KANEKO, Kazuo)
順天堂大学・医学研究科・教授
研究者番号: 50311981
- (3)連携研究者
平澤 恵理 (HIRASAWA, Eri)
順天堂大学・医学研究科・教授
研究者番号: 50245718