

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34448

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07485

研究課題名(和文) 廃用性関節拘縮におけるRA系の役割：高齢者ADL維持への新戦略

研究課題名(英文) Role of the RA system in disuse joint contracture: a new strategy to maintain ADLs in the elderly

研究代表者

川畑 浩久 (Kawahata, Hirohisa)

森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：30454680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、レニン-アンジオテンシン(RA)系が軟骨細胞の増殖分化を調節することや、関節拘縮における滑膜組織の線維化に低酸素誘導因子HIF-1 が関与することを報告した。そこで今回関節拘縮におけるRA系の関与について検討したところ、線維化した滑膜組織内にアンジオテンシン(Ang)II 1型受容体(AT1R)の発現細胞が広く分布し、AT1R遺伝子の発現も上昇していた。また、Ang IIを投与すると可動域制限と滑膜組織の線維化が進展するが、AT1R阻害剤(Olmesartan)の投与によりこれらは改善することが示された。これらの結果から関節拘縮の病態進展にRA系が強く関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の超高齢社会においてロコモティブシンドロームが注目されているが、関節疾患は関節包の退行性変化による関節拘縮を引き起こすことから、その予防・改善がきわめて重要となる。しかし、現状では温熱療法や運動療法などの対処療法が行われているのみで、病態メカニズムを基盤とした関節機能改善には至っていない。本研究では関節拘縮におけるRA系の関与について検討し、アンジオテンシン(Ang)IIが滑膜組織の線維化と可動域制限を促進することや、Ang II受容体阻害薬はこれらを改善することを示した。この結果は関節拘縮の病態進展へのRA系の関与と、高血圧を有する高齢者に対する関節機能の維持に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously described that the renin-angiotensin (RA) system regulates chondrocyte proliferation and differentiation and that the hypoxia-inducible factor HIF-1 is involved in the synovial fibrosis of joint contractures. In the present study, we investigated the involvement of the RA system in joint contracture. We observed that angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-expressing cells were widely distributed in the fibrotic synovial tissues caused by the development of contractures, and that AT1R gene expression was also enhanced. In addition, Ang II administration resulted in limited range of motion and progressive fibrosis of the synovial tissue. Furthermore, AT1R inhibitor (Olmesartan) administration improved range of motion restriction and fibrosis. These results suggest that the RA system is strongly involved in the pathogenesis of joint contractures.

研究分野：実験病理学

キーワード：関節拘縮 滑膜組織 線維化 レニン・アンジオテンシン(RA)系 アンジオテンシンII (AngII) Ang I 1型受容体(AT1R)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年の超高齢社会においてロコモティブシンドロームが注目されているが、関節疾患は関節包の退行性変化による関節拘縮を引き起こすことから、その予防・改善がきわめて重要となる。しかし現状では、温熱療法や運動療法などの対処療法が行われているのみで、病態メカニズムを基盤とした関節機能改善には至っていない。そこで本研究により、関節拘縮における滑膜組織の線維化と可動域制限をアンジオテンシン (Ang) II が促進することや、Ang II 受容体阻害薬がこれらを改善することを示すことができれば、関節拘縮の病態進展への RA 系の関与を明確にし、高血圧を有する高齢者の関節機能の維持において、RA 系を考慮した予防・治療方法の開発につながることを期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究は、関節拘縮における病態進展に RA 系が関与しているかを解明することを目的として、関節不動化モデルをもちいて検討する。また同モデルにおける滑膜組織の線維化に対して Ang II があたえる影響についても検討し、あわせて関節不動化モデルに AT1R 阻害剤である ARB (olmesartan) を投与することで、滑膜組織の線維化を制御できるかについても検討する。これらにより、血圧調節機構を軸とした関節拘縮の病態進展における分子メカニズムを明らかにすることで、RA 系を考慮した新たな関節拘縮の予防・治療概念を提唱する。

## 3. 研究の方法

### (1) 関節拘縮の病態進展における AT1R の発現

C57BL6/J マウス 8 週齢雄の後肢膝関節をテーピングにて完全屈曲位 (屈曲 135°) とし、関節不動化モデルを作成し関節拘縮を発生させた。不動後 1 週および 2 週目に関節可動域 (ROM) を測定した後、膝関節組織を採取し、滑膜組織の組織学的変化を解析するため、ヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織化学的染色を行った。また、滑膜組織における AT1R の遺伝子発現状況を解析するために total RNA を抽出し、Real time-PCR 法を行った。なお不動化前 (Pre 群) を対照群とした。

### (2) 関節拘縮の病態進展における Ang II の関与と ARB の影響

関節不動化モデル (Fix 群) に osmotic pump をもちいて Ang II (1,000ng/kg/min) を持続投与 (Fix + Ang II 群) した。また Ang II 持続投与と同時に AT1R 阻害剤である olmesartan (3mg/kg/day) を投与 (Fix + olm 群) した。それぞれ不動化 1 週および 2 週目に ROM を測定した後、膝関節組織を採取し、滑膜組織の組織学的変化を解析するため、ヘマトキシリン・エオジン染色および Sirius Red 染色を行った。なお、Sirius Red 染色後に画像解析ソフト (Image J, NIH) をもちいて線維化領域の面積を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 関節拘縮の病態進展における AT1R の発現

関節不動化モデルの ROM は経時的に制限されており、2 週間には著明に制限されていた (図 1)。その際の滑膜組織では経時的に線維性組織が増生しており、2 週目には著しい線維化を認めた。また線維化を生じた滑膜組織において、滑膜内皮から深層まで広い範囲に AT1R 発現細胞が分布していた (図 2)。さらに AT1R 遺伝子発現は 1 週および 2 週とも有意に上昇していた (図 3)。

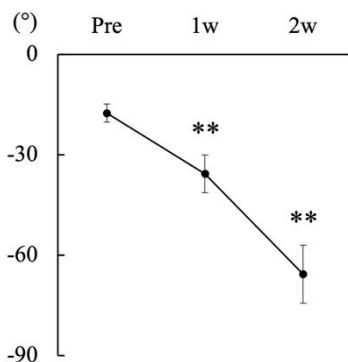
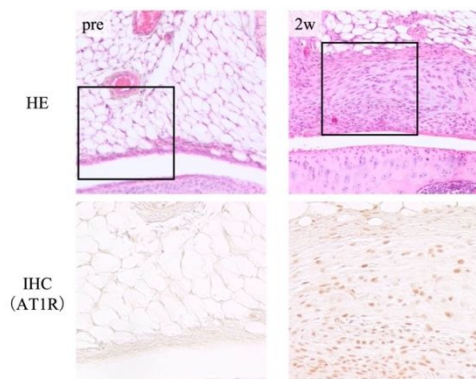


図 1 関節不動化による関節可動域の変化

1 週、2 週とも有意に ROM 制限が進展している。 (\*\*p<0.01, vs pre)

図 2 滑膜組織における AT1R 陽性細胞の分布 (IHC)



関節不動化 2 週目の滑膜組織において AT1R 陽性細胞が広範囲に分布している。(上段: HE 染色 (×100), 下段: IHC (anti AT1R antibody, ×200))

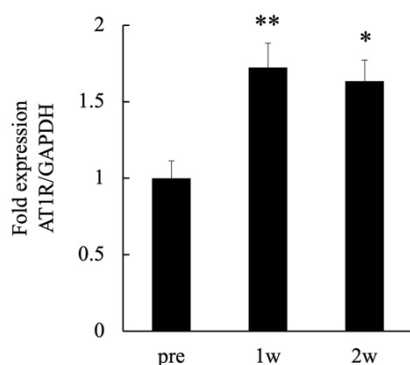


図 3 滑膜組織における AT1R の遺伝子発現状況

不動化 1 週、2 週ともに滑膜組織で有意に AT1R 遺伝子の発現が上昇している。 (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , vs pre (各群  $n=5$ ))

### (2) 関節拘縮の病態進展における Ang II の関与と ARB の影響

関節不動化モデルマウスに対する ROM を測定したところ、不動化 2 週目において Fix + Ang II 群は Fix 群に比べ、強く制限されていたが、Fix + olm 群では ROM 制限は Fix 群と同程度まで軽減していた (図 4)。また滑膜組織の線維化について組織学的に解析したところ、線維化領域の面積は Pre 群に比べいずれの群も線維化面積は増加していたが、その程度は Fix 群、Fix + Ang II 群でより増加していた。また、Fix + olm 群では Fix 群、Fix + Ang II 群よりも有意に線維化面積が減少していた (図 5-a, b)。

これらのことから、関節拘縮における滑膜組織の線維化進展に RA 系が強く関与することが示唆された。

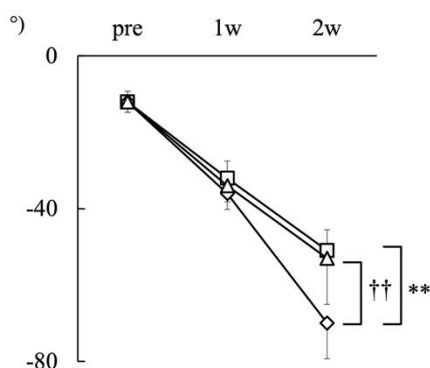


図 4 不動化モデルならびに Ang II、olmesartan 投与による ROM の変化

Fix + Ang II 群において 2 週目で ROM が著しく制限されている。

(□: Fix 群、○: Fix + Ang II 群、◇: Fix + olm 群、\*\* $p < 0.01$  Fix 群 vs Fix + Ang II 群、† $p < 0.01$  Fix + olm 群 vs Fix + Ang II 群 (各群  $n=5$ ))

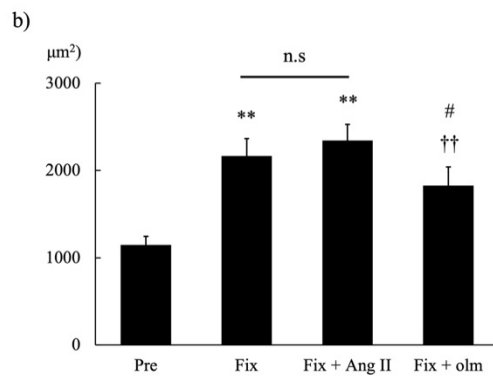
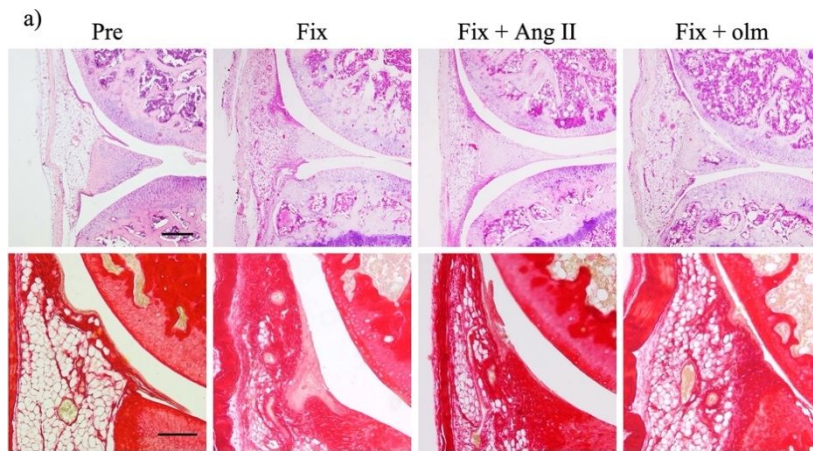


図5 関節不動化による滑膜組織の線維化に Ang II、olmesartan 投与があたえる影響（不動化2週後）

a) 滑膜組織の線維化進展と Ang II、olmesartan 投与の影響

Fix 群、Fix + Ang II 群で線維化領域が増大している。（上段：HE 染色（Scale bar=100 μm）、下段：Sirius Red 染色（Scale bar=50 μm））

b) 線維化領域の面積

Fix 群、Fix + Ang II 群ともに線維化領域が著しく増大しているが、Fix + olm 群ではこれらに比べ線維化面積は有意に減少している。

（\*\* $p < 0.01$  vs. Pre、#  $p < 0.05$  vs Fix 群、†† $p < 0.01$  vs Fix + Ang II 群（各群 n=5））

倫理的配慮：森ノ宮医療大学動物実験倫理審査承認（承認番号 2019A001）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 北川 崇, 平川 佳祐, 北野 雅之, 川畑 浩久, 工藤 慎太郎
2. 発表標題 変形性膝関節症における膝蓋下脂肪体の線維化と低酸素状態の関連性
3. 学会等名 第4回日本整形内科学研究会学術集会 / 第2回日本ファシア会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kitagawa T, Kawahata H, Tsutsumi M, Kudo S
2. 発表標題 Relationship between Hypoxia and progression of fibrosis in infrapatellar pat pad with knee osteoarthritis.
3. 学会等名 16th Congress of the EACA (European Association of Clinical Anatomy (国際学会))
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤慎太郎, 北野雅之, 北川崇, 川畑浩久
2. 発表標題 変形性膝関節症モデルラットにおけるFascia由来の可動域制限と低酸素の関係
3. 学会等名 第3回日本整形内科学研究会学術集会・第1回日本ファシア会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawahata H, Aoki M, Ogihara T
2. 発表標題 Effect of angiotensin II on metabolism of chondrocytes and degeneration of articular cartilage in osteoarthritis.
3. 学会等名 Premium Hypertension Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	青木 元邦  (Aoki Motokuni)  (00346214)	森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授    (34448)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------