

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09083

研究課題名(和文)変形性膝関節症の滑膜炎の機序解明と制御

研究課題名(英文)Regulation and mechanisms elucidation of synovitis in knee osteoarthritis

研究代表者

金子 晴香 (Kaneko, Haruka)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50445516

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)：変形性膝関節症(膝OA)の治療法の開発には、疾患の多岐にわたる分子レベルの病態の理解を進めることが重要である。早期膝OAにおいて、滑膜炎や半月板逸脱に係わる骨棘は、その疾患の発症や進行において、重要な病態であることが明らかになってきた。そこで、滑膜を介して内軟骨性骨化と同様の過程を経て骨棘と成ることからも密接に関連している滑膜炎と骨棘に注目して研究を行った。本研究において、軟骨や滑膜の細胞外基質に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、軟骨分化にも必須であるパールカンが欠損すると早期膝OAの骨棘形成を阻害し、滑膜炎を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康寿命の延伸や介護にかかる医療経済的問題のため、ロコモティブシンドロームの代表疾患である変形性膝関節症(膝OA)の疾患修飾型治療薬の開発は必須であるが未だ開発されていない。本研究の成果は、早期膝OAにおける臨床上の病態進行に係わる重要な因子である滑膜炎および骨棘に焦点をあて、パールカンという関連因子を同定した。このことは、滑膜や骨棘を治療ターゲットとした早期膝OAに対する疾患修飾型治療薬の開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop treatments for knee osteoarthritis (knee OA), it is important to understand the molecular mechanisms of pathophysiology of a wide variety of diseases. In early-stage knee OA, synovitis and osteophytes associated with meniscus extrusion have been shown to be important pathological conditions in the development and progression of the disease. Therefore, we focused our study on synovitis and osteophytes, which are closely related, as osteophytes are formed through a similar process of endochondral ossification via the synovium. We previously reported that perlecan, one of the heparan sulfate proteoglycan (HSPG), is involved in osteophyte formation. In this study, we found that osteophyte maturation was inhibited and synovitis was activated at early stage knee OA by the absence of synovial perlecan in mice.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性膝関節症 滑膜 骨棘 パールカン プロテオグリカン 軟骨下骨 TGF- Smad2

1. 研究開始当初の背景

日本は平均寿命の延伸により超高齢化社会を迎えているが、今後は健康寿命の延伸が課題となっている。健康寿命の延伸の対策の1つに、運動機能低下、ロコモティブシンドロームの予防や適切な治療が挙げられており、ロコモティブシンドロームの代表疾患である膝 OA の介入は有効な対策である。膝 OA に対し、我々は運動療法・鎮痛薬投与・関節内注射など対症療法もしくは、病期進行後の人工関節置換術等の外科手術を行っているが、この現状は数十年変化がない。近年、膝 OA の領域にも軟骨移植等の再生医療が取り入れられつつあるが、本疾患の有病者数は 2500 万人程度と想定されていることから、外科手術や再生医療に頼った治療は医療経済上の問題点となる。これら課題の解決には、膝 OA の疾患修飾型治療薬の開発が必須である。しかし、疾患の多岐にわたる分子レベルの病態の理解はいまだ乏しいことが課題解決の障壁となっている。

膝 OA の病態の主座は軟骨変性および摩耗であるが、半月板変性・断裂や軟骨下骨病変、骨棘形成、滑膜炎も二次的に生じる。膝 OA の臨床症状や機能には軟骨だけでなく、二次的に生じた滑膜炎や骨棘が係わり、滑膜炎や半月板の変化、軟骨下骨病変は膝 OA の進行に関係する (Muraki, *Arthritis Rheum*, 2011; Goldring, *Arthritis Rheum*, 2011)。我々は、滑膜炎と膝 OA の臨床症状は、従来考えられてきた関節軟骨の変性や摩耗の程度以上に相関することを示した (Liu, *Clin Rheumatol*, 2010)。したがって、膝 OA における病態の主座である軟骨のみではなく半月板・軟骨下骨・骨棘・滑膜等にも焦点をあてその病態を解明することにより、膝 OA の分子レベルの病態解明が進み、治療法の解決につながる。

我々は、これまで、末期膝 OA の滑膜に発現する腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターロイキン-6 (IL-6) は重症度と逆相関し、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) は正の相関を示すことを示した (Ning, *Int Orthop*, 2011)。さらに、末期膝 OA の滑膜炎と関連する病態は、軟骨ではなく軟骨下骨病変であることを示した (Yusp, *Osteoarthritis Cartilage*, 2015)。つまり、膝 OA の臨床症状とよく相関する滑膜炎は、関節リウマチで示すような炎症性サイトカインではなく、TGF- β とよく相関し、その滑膜炎は軟骨下骨病変に相関するというを示した。軟骨下骨病変は膝 OA の進行と関連する (Driban, *Arthritis Res Ther*, 2013) ため、滑膜や軟骨下骨に注目して研究することは意義あることである。

一方、細胞外マトリックスとして基底膜と基底膜のない軟骨や滑膜にも発現するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) であるパールカンは軟骨分化に必須な分子であるが (Hirasawa, *Nat Genet*, 1999, 2001)、滑膜パールカンの発現が欠損すると膝 OA の骨棘形成が抑制されることを *in vivo* で示し (Kaneko, *Matrix Biol*, 2013)、滑膜パールカンの欠損により、骨棘の形成過程の初期段階である滑膜間葉系細胞 (MSCs) から TGF- β の刺激による軟骨への分化が抑制されることを *in vitro* において示してきた (Sadatsuki, *J Orthop Res*, 2017)。

以上より、滑膜に発現するパールカんに注目して、膝 OA の滑膜炎と軟骨下骨病変の変化を検討することは膝 OA の分子レベルの病態解明につながる。

2. 研究の目的

本研究では、膝 OA の滑膜におけるパールカンの機能の詳細および滑膜炎と軟骨下骨病変との関連を分子レベルで検討し、膝 OA の滑膜炎を制御しうる分子を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス

パールカン欠損マウスは胎生致死のため、 $\alpha 1$ 型コラーゲンのプロモーター/エンハンサーを用いて軟骨にパールカンを発現するように回復させたパールカントランスジェニックマウスを作成し、このマウスをパールカン欠損マウスと掛け合わせた。これらマウスから生まれるマウスは生存および生殖が可能である。このマウスは関節内では軟骨にのみパールカンを発現し、滑膜にはパールカンを発現せず (パールカン欠損滑膜マウス)、滑膜パールカンの機能解析が可能となる (Xu, *Matrix Biol*, 2010; Kaneko, *Matrix Biol*, 2013)。実験は 10 週齢の雌マウスを用い、コントロールとしては同腹の野生型マウスを用いた。

(2) 膝 OA モデル

内側側副靭帯の切離と内側半月板を切除する膝不安定性による内側 OA モデルを左側に施行した (Kamekura, *Osteoarthritis Cartilage* 2005)。対側には関節包を切開して縫合するのみの偽手術を施行した。評価は術後 7 日で行った。

(3) 組織学的評価

膝関節を 4%パラホルムアルデヒドに 48 時間浸し、固定後、10%エチレンジアミン四酢酸脱灰液にて 10 日間脱灰したのち、パラフィン切片を作成した。3.5 mm 厚の冠軸断面にて膝関節を評価した。染色はサフラニン O ファーストグリーン染色を用いた。膝関節内側コンパートメントを OARSI histopathology initiative の推奨する方法を用いて OA の半定量化を行った (Kamekura, *Osteoarthritis Cartilage* 2005; Glasson, *Osteoarthritis Cartilage* 2010)。軟

骨評価は、構造とプロテオグリカン量の2項目を用い、構造は8段階(0, 0.5, 1-6)、プロテオグリカン量は6段階(0-5)で評価した。骨棘は大きさと成熟度で評価し、サイズは4段階(0-3)。成熟度は5段階(0-4)で評価した。滑膜はヒト滑膜炎のLoeuilleスコアに従い、滑膜表層細胞数・滑膜下層の炎症細胞浸潤・表面フィブリン沈着・新生血管数・線維化・血管周囲浮腫の6項目を各4段階(0-3)で評価した(Loeuille, Arthritis Rheum, 2005)。さらに軟骨下骨変化を4段階(0-3)で評価した(Glasson, Osteoarthritis Cartilage 2010)。

(4) 免疫染色

膝関節 OA モデルのパラフィン切片を用いて、TGF- β 1, Smad2/3 血管内皮細胞増殖因子(VEGF), 血小板/内皮細胞接着分子-1(CD31), 分化抗原群 68(CD68), CC-ケモカイン受容体 7(CCR7)の免疫染色を行った。組織学的に滑膜の染色強度について検討した。

(5) マウス滑膜細胞培養

我々が以前に報告した方法を用いて、マウス膝蓋下脂肪体部に付着している滑膜を採取した(Futami, PLoS One, 2012)。採取した滑膜を細かくしたのち、0.1%コラゲナーゼに15分間反応させ、初代培養細胞を得た。その後継代を行い、4継代目の細胞を以下の実験に用いた。

(6) 滑膜細胞の軟骨誘導

3次元培養である、マイクロマス培養の方法を用いて軟骨誘導を行った。5.0×10⁵ cells/10 μ Lの細胞の細胞塊を作りシャーレ上に静置した。そのマイクロマスを軟骨誘導培地 500 μ l 中で37℃にて培養した。軟骨誘導培地は、高グルコースダルベッコ改変イーグル培地中に10 ng/ml TGF- β 3, 100 nM デキサメタゾン, 50 μ g/ml アスコルビン酸, 40 μ g/ml プロリン, 100 μ g/ml ピルビン酸, 1:100 希釈した ITS premix (Sigma) を用いた。培地は3日に1回交換し、3日の培養を行った。

(7) ウエスタンブロット法を用いた TGF- β 下流シグナルの発現変化

マイクロマス培養にて軟骨誘導した滑膜の TGF- β 下流シグナルである Smad2/3 のリン酸化をウエスタンブロット法にて滑膜パルクンの欠損による影響を解析し、パルクンの補充による、その変化を解析した。

(8) 統計学的解析

多群間比較には分散分析を用い、2群間の比較は独立T検定を行った。有意差5パーセント未満を統計学的有意とした。

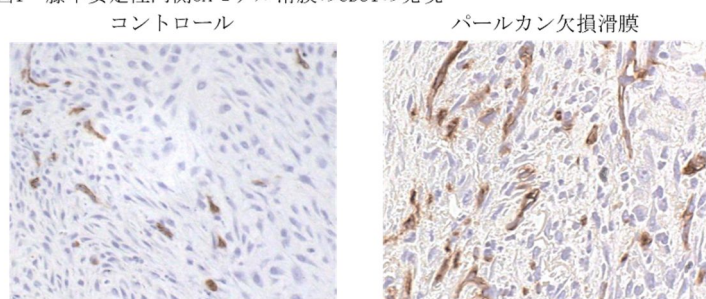
4. 研究成果

(1) 早期膝不安定性内側 OA モデル

コントロールマウスおよび滑膜パルクン欠損マウスに膝不安定性内側 OA モデルを作成すると、偽手術側と比較し、手術施行後7日目において、軟骨変性およびプロテオグリカン量減少そして滑膜炎の変形性膝関節症性変化を呈していた。コントロールマウスとパルクン欠損滑膜マウスを比較すると軟骨変性およびプロテオグリカン量減少、軟骨下骨変化に有意差は認められず、骨棘の大きさにも差はなかったが、骨棘の成熟度に差を認め、パルクン欠損滑膜マウスでその成熟度がコントロールに比べ有意に低かった。しかしながら、すべての滑膜炎スコアはコントロールに比べパルクン欠損滑膜マウスで高値であった。

(2) 滑膜炎

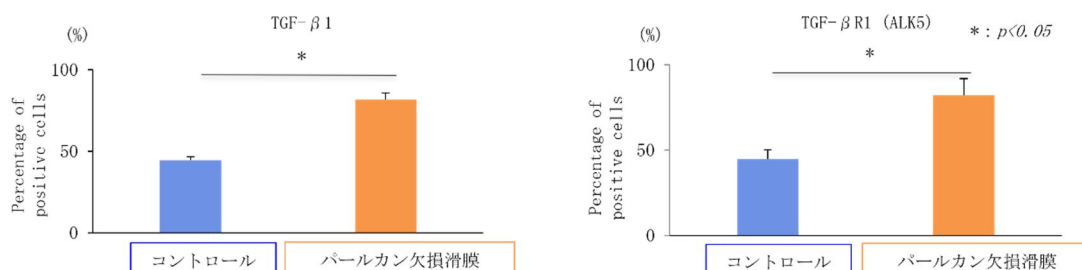
図1 膝不安定性内側OAモデル滑膜のCD31の発現



早期膝不安定性内側 OA モデルの滑膜炎のパルクンの欠損による違いを検討するために免疫染色にて検討した。パルクン欠損滑膜マウスではマクロファージのマーカーである CD68 や CCR7 がコントロールに比べ有意に上昇し、血管新生に関連する CD31(図1)や VEGF および VEGF 受容体の

発現が上昇していた。さらに、パルクン欠損マウスでは滑膜 TGF- β の発現もコントロールに比べ有意に上昇していた(図2)。

図2 膝不安定性内側OAモデル滑膜のTGF- β の発現



(3) TGF- β 下流シグナルの解析

マイクロマス培養にて軟骨誘導した滑膜のウエスタンブロット法で解析した TGF- β の発現もコントロールに比べパールカン欠損滑膜で有意に上昇していた。一方、下流シグナルである Smad2/3 のリン酸化はコントロールに比べパールカン欠損滑膜で有意に低下していた。さらに、そのパールカン欠損滑膜にパールカンを補充すると Smad2/3 のリン酸化の発現が回復した。

以上より、滑膜パールカン欠損マウスでは、早期膝 OA において滑膜炎が活性化され、骨棘の成熟が抑制された。

早期膝 OA における滑膜炎および骨棘形成による半月板の変化は临床上の病態進行に係わる重要な因子であり、その滑膜炎および骨棘形成に係わる因子が同定されたことは「早期膝 OA 治療や予防法」を開発の上で重要な知見につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sadatsuki R, Ishijima M, Kaneko H, Liu L, Futami I, Hada S, Kinoshita M, Kubota M, Aoki T, Takazawa Y, Ikeda H, Okada Y, Kaneko K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Bone marrow lesion is associated with disability for activities of daily living in patients with early stage knee osteoarthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 529-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-018-0950-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shiozawa J, de Vega S, Cilek MZ, Yoshinaga C, Nakamura T, Kasamatsu S, Yoshida H, Kaneko H, Ishijima M, Kaneko K, Okada Y.	4. 巻 190
2. 論文標題 Implication of HYBID (Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization) in Hyaluronan Degradation by Synovial Fibroblasts in Patients with Knee Osteoarthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1046-1058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.01.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 白崎駿, 中田智史, 山下由莉, 金子晴香, 石島旨章, 櫻井英俊, 平澤恵理
2. 発表標題 パールカン遺伝子変異による軟骨異常を解析する細胞モデルの構築
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有田均, 金子晴香, 羽田晋之介, 木下真由子, 定月亮, 二見一平, 根岸義文, 百枝雅裕, 平澤恵理, 石島旨章
2. 発表標題 早期変形性膝関節症の滑膜病変におけるパールカンの機能
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arita H, Kaneko H, Kinoshita M, Hada S, Sadatsuki R, Futami I, Negishi Y, Momoeda M, Liu L, Aoki T, Arikawa-Hirasawa E, Kaneko K, Ishijima M.
2. 発表標題 Role of synovial perlecan in osteophyte formation in early stage knee osteoarthritis.
3. 学会等名 OARSI2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有田均, 金子晴香, 木下真由子, 羽田晋之介, 定月亮, 根岸義文, 百枝雅裕, ;劉立足, 平澤恵理[有川], 金子和夫, 石島旨章.
2. 発表標題 早期変形性膝関節症の骨棘形成における滑膜に発現するperlecanの機能解析.
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子晴香, 石島旨章, 田中智美, 多賀祐喜, 平澤恵理[有川], 田中啓友, 水野一乗, 楠畑雅, 服部俊治, 金子和夫.
2. 発表標題 変形性膝関節症新規バイオマーカー・コラーゲン由来糖鎖修飾ヒドロキシリジンの有効性評価 診断能の検討.
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaneko H, Liu L, Arita H, Aoki H, Negishi Y, Momoeda M, Hada S, Okada Y, Kaneko K, Ishijima M.
2. 発表標題 Pain reduction after high tibial osteotomy was associated with reduction of histological synovitis in patients with knee osteoarthritis; a longitudinal study.
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress (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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------