

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：33111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17736

研究課題名（和文）軟骨変性をもたらす力学的ストレス強度閾値とメカノセンシング機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Mechanical stress intensity thresholds and mechanosensing mechanisms leading to cartilage degeneration

研究代表者

高橋 英明（Takahashi, Hideaki）

新潟医療福祉大学・リハビリテーション学部・講師

研究者番号：90636250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：変形性膝関節症（OA：Osteoarthritis Knee）の発症にTRPA1チャネルや酸化ストレスが相互に関与しているかについてOAモデルラットを用いて検証を行った。その結果、TRPA1チャネル選択的阻害剤投与群では、OA重症度スコアが大腿骨および脛骨内側面において有意に低値を示したが、完全にOAを防止するには至らなかった。加えて、酸化ストレスの間接的影響を検証するため、尿中の酸化ストレスマーカーを比較検証した結果、阻害剤投与量依存的に酸化ストレスが減少する傾向が認められたが、Ⅱ型コラーゲン発現量との相関関係は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症は、難治性の退行変性疾患であり、一度変性した軟骨組織の修復は困難である。その理由の一つとして、軟骨変性に至る機序が複数要因かつ複数経路あることが指摘されている。今回、われわれは、力学的過負荷により軟骨変性に至る経路の解明に取り組んだ。軟骨変性に至る経路の一端を明らかにすることは、今後のリハビリテーション分野のみならず医学全般に大きく貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：We examined whether TRPA1 channels and oxidative stress are mutually involved in the development of osteoarthritis knee (OA: Osteoarthritis Knee) using a OA rat model. The results showed that OA severity scores were significantly lower in the TRPA1 channel selective inhibitor group in the femur and tibia, however, it did not completely prevent OA. In addition, we compared urinary markers of oxidative stress. The results showed a dose-dependent decrease in oxidative stress, however, there was no correlation with the expression of type II collagen.

研究分野：理学療法学

キーワード：変形性膝関節症 力学的ストレス TRPA1チャネル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(膝 OA: **Osteoarthritis Knee**)は、変性退行性の高齢者に最も多い骨関節疾患の一つである。その原因は、遺伝・年齢・性別・肥満・力学的過負荷など多因子により惹起され関節痛を誘発し **ADL** 低下を招く疾患である。組織レベルでは、関節軟骨の細胞外基質(**ECM: extracellular matrix**)の異化や軟骨細胞のアポトーシスが生じている。アポトーシスは、**Ca<sup>2+</sup>**の過剰流入や酸化ストレスなどにより生じる。

特に軟骨細胞が力学的過負荷を感知するメカノセンサー候補として、これまで **TRPV4** チャンネルが有力視されてきた。しかし、関節過負荷により膝 OA 惹起する動物実験では、**TRPV4** チャンネルをノックアウトしても膝 OA の抑止効果がないことが報告された。

そこで、我々は新たなメカノセンサー候補として **TRPA1** チャンネルに着目した。このチャンネルは、温度・**pH**・低酸素だけでなく、力学的ストレスや酸化ストレスなどを感知するセンサーとして知られており、**Ca<sup>2+</sup>**などの陽イオンを細胞内へと流入させる。近年、ヒト膝 OA の軟骨細胞において、このチャンネルが増加していることが明らかにされている。加えて、薬剤を用いた関節炎モデル動物においても **TRPA1** チャンネルをノックアウトすることにより軟骨変性を抑制することが報告されている。その他、関節軟骨への力学的過負荷は、負荷量依存的に酸化ストレスが増大することが報告されている。

以上のことから、**TRPA1** チャンネルは、力学的過負荷を直接的または力学的過負荷により増大した酸化ストレスを間接的に感知している可能性がある。したがって、力学的過負荷を直接的または間接的に **TRPA1** チャンネルが開くことで **Ca<sup>2+</sup>**を軟骨細胞内に過剰流入させ、軟骨細胞アポトーシスを惹起し軟骨変性に至るといふ仮説を立て検証を行った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、力学的過負荷により膝 OA を惹起する膝 OA モデルラットに対し、**TRPA1** チャンネル選択的阻害剤を投与し、同チャンネルが膝 OA の発症に関与しているかを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

**11** 週齢の **Wistar** 系雄性ラット (**n=24**) の膝関節を対象とした。**1** 週間の予備飼育後、全身麻酔下にて右膝関節の内側半月靭帯を切除する **DMM (Destabilized Medial Meniscus)** 処置を施した。また、左膝関節には、**Sham** 処置を施した。術後、各ラットは **DMSO (Dimethyl sulfoxide)** 投与群と **TRPA1** チャンネル選択的阻害剤である **A-967079 (Wako)** を各投与量別に **0.2mg** 群 (**0.2mg/kg/day**)、**0.4mg** 群 (**0.4mg/kg/day**)、**0.6mg** 群 (**0.6mg/kg/day**) の **3** 群、合計 **4** 群に各 **6** 匹ずつ無作為に振り分けた。各薬剤の投与は、体重測定後に必要量を計算し、毎日同時間帯に皮下投与を実施した。

#### (2) サンプルング

術後 **4** 週後に両膝関節のサンプルングを行った。**DMM** 処置と同様の全身麻酔下にて開腹し、腹部大動脈より **4%** パラフォルムアルデヒドによる灌流固定を施した。その後、**48** 時間の後固定を行い、**10%** エチレンジアミン四酢酸を用いて脱灰を **4** 条件で実施した。十分に脱灰されたことを確認した後、上昇系エタノールによる段階的脱水、**Lemosol (Wako)** による透徹を経てパラフィン包埋し試料を作製した。作製したパラフィンブロックは **6μm** 厚で薄切し、サフラン-**O** 染色および抗型コラーゲンの免疫組織化学染色に供した。

また、酸化ストレスマーカーである **8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)** を計測するにあたり、**DMM** 処置前日と膝関節サンプルング前日に尿採取をした。採取した尿サンプルは、計測まで **-80** にて保存した。

#### (3) 組織学的分析

軟骨成分である糖タンパクを特異的に赤く染める **safranin-O** 染色を施した。染色像は、光学顕微鏡 (**DM1000LED, Leica**) と **USB** カメラ (**WAYCM-NOA2000, レイマー社**) 用い、**40** 倍にて撮影した。撮影した組織画像は、パーソナルコンピューターに取り込み観察した。**OA** 進行度の評価は、**Osteoarthritis Research Society International (OARSI)** が定める **OARSI** スコアを用いた。**OARIS** スコアの算出は、**OA** 重症度を表す **Grade (0~6** ポイント) と **OA** 領域を表す **Stage (0~4** ポイント) の積を用いた。また、**OARSI** スコアの算出には **2** 人の評価者の平均値を求め、**OARSI** スコアの比較には各群の中央値を比較した。

免疫組織学染色は、スライドガラス上の切片を風乾させ、**Lemosol** により脱パラフィンした。エタノールを用いた段階的な加水を経て加水を行った後、**0.01M** リン酸緩衝生理食塩水 (**Phosphate Buffered Saline: PBS**) で **5** 分間の洗浄を **2** 度行った。その後、内因性ペルオキシターゼの失活処理 (**0.3% hydrogen peroxide + methanol**) を室温で **30** 分間行い、**PBS** 洗浄を **3** 度行った。次に、抗原賦活処理 (**1.25% hyaluronidase**) を室温で **60** 分間行い、**PBS** 洗浄を **3** 度行った。ブロックングは、**Normal horse Serum** を用い、室温で **60** 分間のインキュベ

トを実施した。一次抗体には、抗ヒトモノクローナル抗体 (**Anti-hCL antibody**, 協和ファーマケミカル) を使用し、希釈倍率 **1:200** で添加し、**4** で **overnight** した。翌日は、**PBS** 洗浄を **2** 度行い、二次抗体 (**VACTASTAIN® Universal kit**, **Vector Laboratories**) を添加し室温で **30** 分間のインキュベーションをした。その後、**PBS** 洗浄を **2** 度行い、**ABC** 試薬を添加後さらに **30** 分間のインキュベーションをした。**PBS** 洗浄を **2** 度行い、**2** 分間の **DAB** 発色後、蒸留水で発色を中断させた。脱水および透徹後、封入剤を用いてカバーガラスにて封入した。染色を施した膝関節薄切切片は、光学顕微鏡を用いて **200** 倍率で撮影を行った。画像解析ソフト (**Image J**) を用いて関節軟骨部分の染色強度 (**Optical Density: O.D.値**) を解析した。

#### (4) ELISA 法による吸光度測定

凍結保存した尿サンプルは、クレアチニンと **8-OHdG** と測定に供した。クレアチニン測定は、専用の **Assay Kit (Urinary One-Step Creatinine Assay Kit, Detroit R & D, Inc.)** を用いた。**10** 倍希釈した尿サンプルまたは **Standard** 溶液を準備し、**96** ウェルプレートの各ウェルに対し **10 $\mu$ L** を分注した。また、全ての計測は **Duplicate** にて実施した。その後、各ウェルに対し反応液を **140 $\mu$ L** ずつ分注し、室温にて **40** 分間反応後、マイクロプレートリーダー (**Chromate-6, Awareness Technology, Inc.**) で **505nm** における **O.D.値** を測定した。

次に、**8-OHdG** 測定についても、専用の **Assay Kit (DNA Damage ELISA Kit, StressMarq Biosciences Inc.)** を用いた。尿サンプルは、**Standard** 溶液を用い **20** 倍希釈した。尿サンプルおよび **Standard** 溶液は、**96** ウェルプレートの各ウェルに対し **50 $\mu$ L** を分注した。各ウェルに対しは、**8-OHdG** 抗体を **50 $\mu$ L** 添加し、室温にて **1** 時間インキュベーションした。反応終了後、洗浄液にて **4** 回洗浄し、**TMB Substrate** を用い **30** 分間の発色反応を行った。その後、**Stop Solution** を用い発色反応を止め、マイクロプレートリーダーで **450nm** における **O.D.値** を測定した。

#### (5) 統計処理

各群の **OARSI** スコアの中央値、**II** 型コラーゲン **O.D.値** と、**8-OHdG**/クレアチニン **O.D.値** 比 (**8-OHdG** 比) の平均値ならびに標準偏差を各々算出した。**OARSI** スコア、**II** 型コラーゲン **O.D.値**、**8-OHdG** 比共にウィルコクソン符号順位検定を用い、有意水準は **5%** とした。また、**II** 型コラーゲン **O.D.値** と **8-OHdG** 比の相関関係は、**Spearman** の順位相関係数を用いて統計処理を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) OARSI スコア

大腿骨内側面の **OARSI** スコアの比較を図 **1** に示した。各群の中央値は、**Sham** 群が **0.25 (0 - 0.5)**、**DMSO** 群が **14.25 (10 - 19.25)**、**0.2mg** 群が **7.0 (5.75 - 12.75)**、**0.4mg** 群が **6.5 (2.5 - 7.59)**、**0.6mg** 群が **6.13 (3 - 10.36)** であった。統計の結果は、**Sham** 群と比較して、**DMSO** 群、**0.2mg** 群、**0.4mg** 群、**0.6mg** 群の全ての群が有意に高値を示した。また、**DMSO** 群と比較して **0.2mg** 群、**0.4mg** 群、**0.6mg** 群が有意に低値を示した。

脛骨内側面の **OARSI** スコアの比較を図 **2** に示した。各群の中央値は、**Sham** 群が **0.25 (0 - 1)**、**DMSO** 群が **13.63 (10 - 20.75)**、**0.2mg** 群が **7.93 (6.21 - 10.69)**、**0.4mg** 群が **5.89 (4 - 10.25)**、**0.6mg** 群が **4.87 (4.18 - 10.79)** であった。統計の結果は、**Sham** 群と比較して **DMSO** 群、**0.2mg** 群、**0.4mg** 群、**0.6mg** 群の全ての群が有意に高値を示した。また、**DMSO** 群と比較して **0.2mg** 群、**0.4mg** 群、**0.6mg** 群が有意に低値を示した。

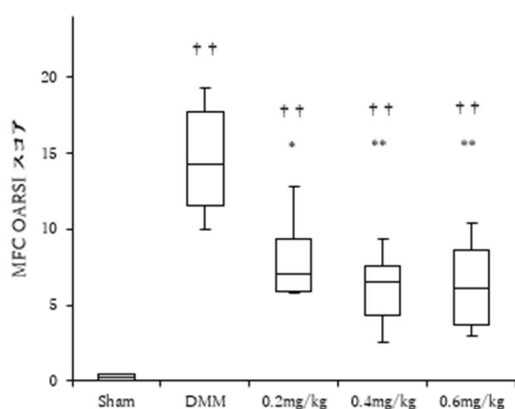


図1 大腿骨内側面における OARSI スコアの比較  
††: p < 0.01 vs. Sham, \*: p < 0.05 vs. DMM, \*\*: p < 0.01 vs. DMM

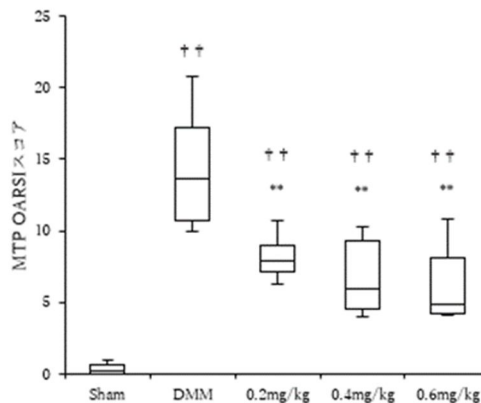


図2 脛骨内側面における OARSI スコアの比較  
††: p < 0.01 vs. Sham, \*: p < 0.05 vs. DMM, \*\*: p < 0.01 vs. DMM

#### (2) II 型コラーゲン発現量

II 型コラーゲンの代表的な組織画像を図 **3** に示した。II 型コラーゲン染色強度を半定量化した結果、各々 **Sham** 群 (**0.090 $\pm$ 0.015**)、**0.2mg/kg** 群 (**0.065 $\pm$ 0.028**)、**0.4mg/kg** 群 (**0.080 $\pm$ 0.017**)、**0.6mg/kg** 群 (**0.104 $\pm$ 0.022**) であった。統計学的有意差は、**DMSO** 群と比較し **0.6mg/kg** 群が有

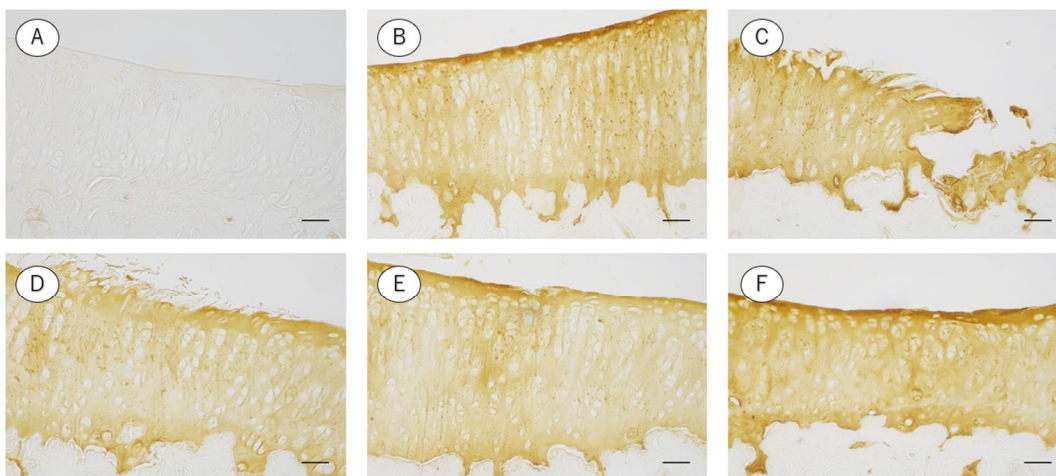


図3. II型コラーゲン免疫組織学染色による脛骨内側面の代表的画像

(A) Negative Control, (B) Sham群, (C) DMSO群, (D) 0.2mg/kg群, (E) 0.4mg/kg群, (F) 0.6mg/kg群 Scale Bar=50μm

意に高値を示した ( $p < 0.05$ ). また, **0.2mg/kg** 群と比較し **0.6mg/kg** 群が有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ). Sham-Control 群と DMSO 群の間には有意差は認められなかったものの, DMSO 群の方が低値を示す傾向がみられた. TRPA1 選択的阻害剤投与群では各群の間においては, 有意差は認められなかったものの, TRPA1 選択的阻害剤投与量依存的に増加傾向がみられた (図 4).

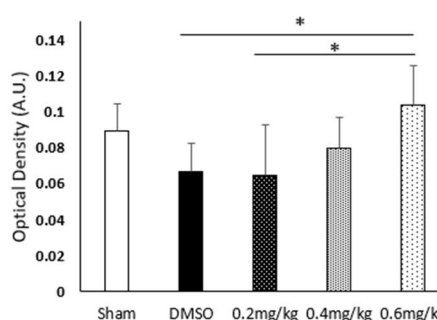


図4 II型コラーゲン免疫染色強度 \* :  $p < 0.05$

### (3) 8-OHdG 比

**8-OHdG** 比の結果は, Basal Control 群 ( $0.290 \pm 0.096$ ), DMSO 群 ( $1.065 \pm 0.407$ ), **0.2mg/kg** 群 ( $0.829 \pm 0.365$ ), **0.4mg/kg** 群 ( $0.623 \pm 0.175$ ), **0.6mg/kg** 群 ( $0.616 \pm 0.184$ ) であった. Basal Control 群と比較して全ての群において有意に高値を示した. また, DMSO 群と比較して TRPA1 選択的阻害剤投与群の間において有意差は認められなかったものの, 減少傾向であった. TRPA1 選択的阻害剤投与群の各群の間において有意差は認められなかったものの, TRPA1 選択的阻害剤投与量依存的に減少傾向であった (図 5).

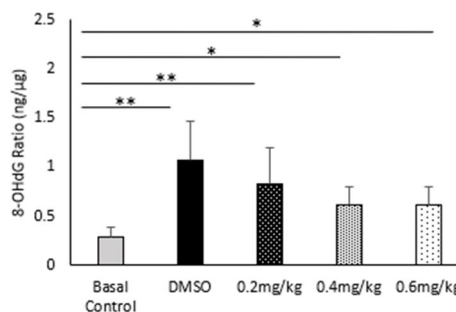


図5 8-OHdG比 \* :  $p < 0.05$  \*\* :  $p < 0.01$

### (4) II型コラーゲンの O.D 値と 8-OHdG 比の相関関係

II型コラーゲン O.D.値と 8-OHdG 比の相関係数は,  $-0.0709$  で有意な相関が認められなかった ( $p=0.74$ ) (図 6).

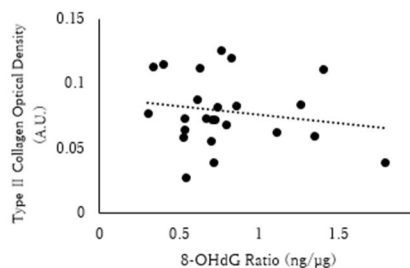


図6 II型コラーゲン発現量と 8-OHdG 比の相関関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------