

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K11335

研究課題名（和文）初期変形性膝関節症モデル動物の開発とメカニカルストレス応答メカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of animal models of early osteoarthritis of the knee and elucidation of mechanical stress response mechanisms

研究代表者

浅田 啓嗣 (Asada, Keiji)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授

研究者番号：10440851

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）：再現性の高い生理的な変形性膝関節症（KOA）症状を有するモデル動物を作成することを目的に研究を実施した。膝関節内側半月脛骨靭帯のみを切除する侵襲の少ないモデルの作製を行い、KOA症状を再現する実験条件の検証を進めた。モデルを用いて、ケージ面積の違いが経時的な自発運動の変化と軟骨損傷に及ぼす影響を検討し、術後に大ケージで飼育すると個体差が少ない重度のKOAモデルが作成できた。生理的な関節ストレスで短期間に再現性の高いKOAモデルを作成することが可能なことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節軟骨の退行変性を主症状とする膝OAの治療においては、自己治癒能力の乏しい軟骨組織を人工的に再生し、組織を修復させる研究が進められている。関節軟骨は様々な荷重条件のもとで常に優れた潤滑特性と圧縮特性を有しており、外観上だけでなく、軟骨が有する高度な力学的特性をどこまで再生できるかが課題となっている。本研究は予防的見地に立ち、症状・変形の増悪を防いでいく予防的運動療法確立の基盤となる研究であり、高齢社会において再生医療と並ぶ重要な課題である。予防に効果的な運動負荷とその生理的メカニズムの基盤を確立する本研究は、高騰する医療費の削減と健康寿命の延長に大きく貢献する可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to create an animal model capable of reproducing physiological OA symptoms. A less invasive medial meniscal tibiofibular ligament excision model, in which only the medial meniscal tibiofibular ligament of the knee joint is excised, was created to verify experimental conditions that can reproduce symptoms of OA. The effects of different cage areas on spontaneous movement and cartilage damage over time were examined in a mouse DMM model, and it was found that a severe KOA model with fewer individual differences could be created by keeping the mice in a large postoperative cage. It was suggested that physiological joint stress by changing cages could produce reproducible KOA models in a short period of time.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：メカニカルストレス 変形性膝関節症 モデル動物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(Knee osteoarthritis: 以下膝 OA)は軟骨基質の破壊と疼痛による機能制限をもたらす退行性疾患で、高齢者の増加と長寿化にともない急速に患者数が増加している。我が国では50歳以上で膝に何らかの異常をもつ者が2000万人以上、痛みを伴う膝 OA 患者は820万人以上と推定され(吉村典子, 科研成果報告書, 2011) 介護が必要となり得る重大な疾患のひとつである。加齢に伴う膝関節の変形に関し、膝関節を構成する大腿骨と下腿骨のなす角度が5度以上変化すると進行リスクは4~10倍となることが示されている(Sharma L, et al: JAMA. 2001)。関節軟骨の自己治癒能力は乏しく、このような変形を最小限に留めておくための予防法の確立が急務である。

予防的介入が必要である発症初期の膝 OA においては、炎症性メディエーターが大量発現することが報告されている(Benito MJ, et al.: Ann Rheum Dis. 2005)。後に滑膜の炎症は鎮静化しても、X線像上での病態は悪化していることから、関節内の初期の炎症を抑制することがOAの悪化防止につながる可能性がある。滑膜の炎症が疼痛や関節水腫の発生に関与し、その病態にCGRPやSPなどの神経ペプチドによる神経原性炎症が関与していると考えられているが、滑膜組織と神経組織の相互作用については十分に検証されていない。

上記の解明には発症初期の膝 OA を再現し予防的運動療法の効果を組織学的、生理学的に検証できる動物モデルの開発が必要である。げっ歯類の病態モデルとしては、モノヨード酢酸の膝関節内投与による化学的損傷モデル(Schuelert N, et al, Neurosci Lett .2009)や、半月板あるいは前十字靭帯切断による外科的損傷モデル(Glasson S, et al. Osteoarthritis Cartilage 2007)が汎用されている。しかしながら、化学的損傷モデルや自然発症モデルは、メカニカルストレスによって発症するKOAの病態に適していない。

### 2. 研究の目的

予防的運動療法の効果を検証できる再現性の高い膝 OA 動物モデルを検証するために、以下の目的で研究を実施した。

研究1) 関節不安定化の程度が異なる3種類のマウス膝 OA モデルを作製し、術後の自発運動量(Locomotor activity; 以下, LA)を測定するとともに、モデルによる軟骨損傷の違いからLAに影響を及ぼすか検討すること。

研究2) 関節にかかる負荷が生理的である自発運動による損傷モデルを検討するためにマウス Destabilization of the medial meniscus (以下, DMM) モデルを用いて、ケージ面積の違いが経時的なLAの変化と軟骨損傷に及ぼす影響を検討すること。

### 3. 研究の方法

研究1) 関節不安定化の程度が異なる膝 OA モデルにおける組織学的変化と自発運動量の関係を検証

24週齢のマウスを使用し、(DMM) モデル、Medial Collateral Ligament transection(以下, MCLT) モデル、DMM+anterior cruciate ligament transection; 以下, ACLT) モデルを作成した。術後8週間の通常飼育を行い、対照群と以下項目を比較した。LAの測定には光束センサー式自発運動量測定システム(PanLab社製)を用い、1週間毎に24時間の運動量を測定した。8週後に両膝関節の前額面が観察可能なパラフィンブロックを作成しSafranin-O/Fast Green染色を行い、光学式顕微鏡(Olympus社製, BX53)で観察した。大腿骨軟骨、脛骨軟骨の損傷の程度を組織学的スコア(Glassonら)の方法に準拠で評価した。

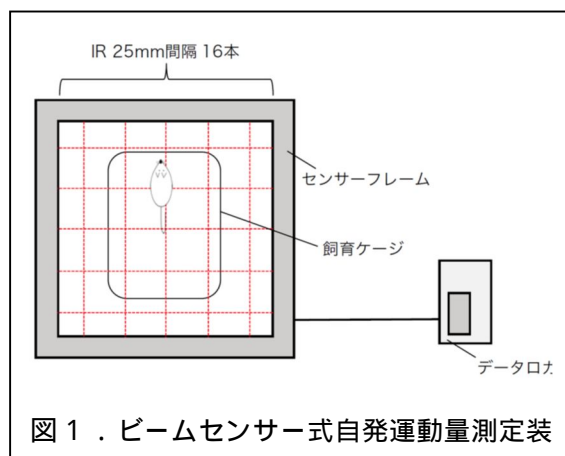


図1. 光束センサー式自発運動量測定装置

研究2) ケージ面積の違いが自発運動量と軟骨損傷に及ぼす影響を検証

24週齢のマウスを対照群とDMMモデル群に分け、さらに通常ケージ(マウス用, クレア社製, CL-0103-2 TPX, 203L×133W×118H)で飼育するDM-S群と、大ケージ(ラット用, クレア社製, CL-0106-2 TPX, 292L×240W×173H)で飼育するDM-L群、通常ケージで飼育するCon-S群と大ケージで飼育するCon-L群で以下の検証を行った。LA測定、組織観察、組織学的スコア評価は研究1と同様に実施した。

## 4. 研究成果

### 研究 1

#### 1) LA の変化

MCLT 群, DMM 群, DMM+ACLT 群は, 対照群と比較して術後 1 週と 2 週時点で LA の有意な減少が認められた ( $p < 0.05$ ). いずれの実験群も術後 3 週以降は徐々に LA の増加が認められ, 実験期間終了時まですべての群間に有意差は認められなかった(図 2).

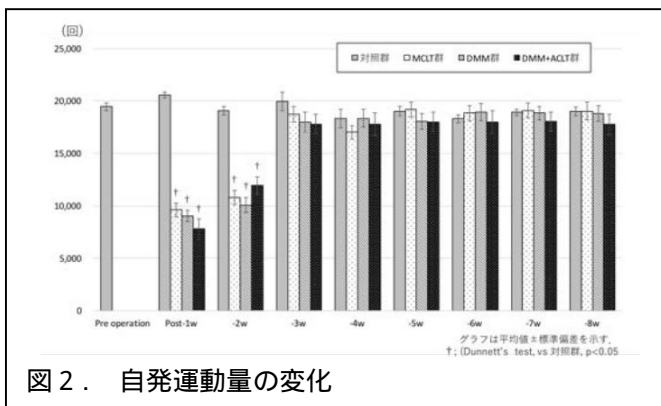


図 2. 自発運動量の変化

#### 2) 組織学的スコア

各群の組織学的スコアの中央値を図 3 に示す. 大腿骨軟骨では, すべての実験群が対照群よりも有意に高値を示し, 実験群間では DMM+ACLT 群は MCLT 群よりも有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ). 脛骨軟骨では, 大腿骨軟骨と同様にすべての実験群が対照群よりも有意に高値を示し, 実験群間では DMM 群および DMM+ACLT 群は MCLT 群よりも有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ).

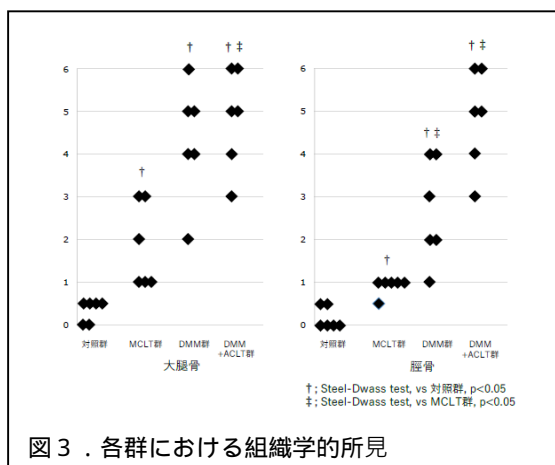


図 3. 各群における組織学的所見

#### 3) 考察

本研究の結果から, 関節不安定化を行った実験群は術後 2 週時点まで LA は減少するものの, 3 週以降は関節不安定化の程度に関係なく対照群と同様に LA は維持されていた. また, 組織学的所見の特徴としては, 関節不安定化の程度に比例して膝 OA による軟骨損傷の程度が甚大になる傾向が得られた. 関節不安定性に比例して軟骨損傷が甚大になる背景には LA が維持されている必要があると思われる. 軟骨損傷が軽度の個体は LA が減少している可能性が考えられる. よって, モデル作製時の手技的な問題に加えて, 術後の LA をある程度統一することで個体差を低減することが可能と思われる.

### 研究 2

#### 1) LA の変化

1 日当たりの LA を表 1 に示す. 全期間を通して Con-L 群は Con-S 群よりも有意に LA が増加していた ( $p < 0.05$ ). DM-S 群と DM-L 群における術後の LA はそれぞれの対照群と比較すると低値を示し, この傾向は術後 8 週まで変化が認められなかった.

DM-S 群は術後 1 週から術後 6 週までは Con-S 群と同程度の LA であったが, 術後 7 週以降は有意に減少した ( $p < 0.05$ ). 一方, DM-L 群は術後 4 週以降で DM-S 群よりも有意に LA が増加した ( $p < 0.05$ ). DM-L 群は Con-S 群および Con-L 群との間に有意差は認められなかった.

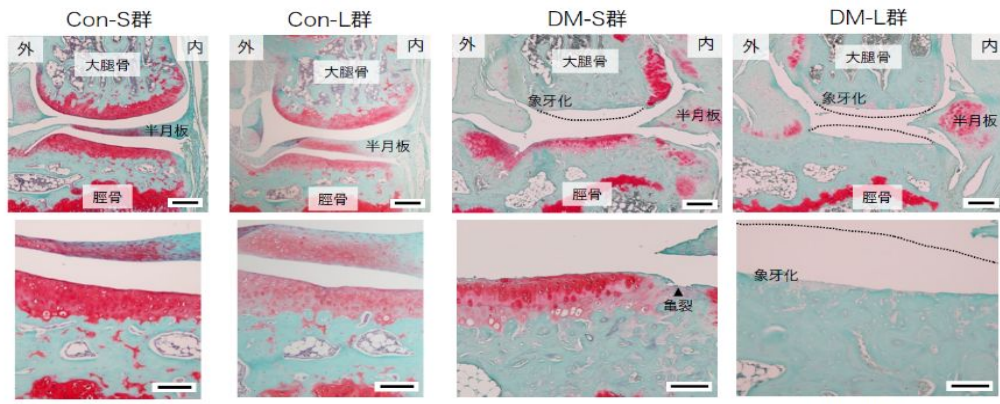
表 1. 自発運動量の経時的変化

	Post-1w	-2w	-3w	-4w	-5w	-6w	-7w	-8w
Con-S群	3,041±156	2,930±187	3,015±215	2,844±155	2,944±213	2,882±157	3,094±146	2,979±191
Con-L群	3,770±239 <sup>a</sup>	3,843±243 <sup>a</sup>	3,570±277 <sup>a</sup>	4,072±287 <sup>a</sup>	3,727±282 <sup>a</sup>	4,028±312 <sup>a</sup>	3,968±294 <sup>a</sup>	3,740±244 <sup>a</sup>
DM-S群	2,712±331	2,703±269	2,638±242	2,744±170	2,570±262	2,642±276	2,732±192 <sup>a</sup>	2,564±230 <sup>a</sup>
DM-L群	3,222±415	3,009±291	3,076±372	3,309±316 <sup>b</sup>	3,401±294 <sup>b</sup>	3,427±284 <sup>b</sup>	3,323±274 <sup>b</sup>	3,152±290 <sup>b</sup>

a; vs Con-S群,  $p < 0.05$ ; b; vs DM-S群,  $p < 0.05$

#### 2) 組織学的所見

Con-S 群と Con-L 群には膝 OA の病変を示す異常所見は認められなかった. DM-S 群と DM-L 群では, 関節軟骨の細線維化や象牙化による軟骨下骨の露出, 軟骨深層への亀裂など KOA の病変を示す所見がすべての標本で認められた. DM-S 群の象牙化は主に大腿骨軟骨に認められたが, DM-L 群は大腿骨と脛骨の双方で認められ, 顆部全体に軟骨下骨の露出が及んでいた(図 4). 組織学的スコアは DM-L 群は DM-S 群よりも有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ).



いずれもSafranin-O/fast green染色  
 上段は40倍 (bar: 200 μm)、下段は100倍 (bar: 100 μm)

図4. 組織学的所見. Con-S群とCon-L群は異常所見を認めなかった。DM-S群は大腿骨内側顆に象牙化が認められ、脛骨内側顆には軟骨表層の細線維化や亀裂が認められた。DM-L群は、大腿骨および脛骨内側顆に象牙化が認められ、軟骨下骨の露出や軟骨深層への亀裂が認められた。

### 3) 結論

本研究の結果から、飼育ケージを大きくした場合はLAが増加すること、術後に大ケージで飼育すると通常ケージで飼育した対照群と同程度のLAが維持されること、術後に大ケージで飼育すると個体差が少ない重度のKOAモデルが作成できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 浅田啓嗣	4. 巻 58
2. 論文標題 メカニカルストレスに対する関節組織の細胞応答と相互作用	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 理学療法ジャーナル	6. 最初と最後の頁 76-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 小島 聖, 浅田 啓嗣	4. 巻 21
2. 論文標題 関節不安定化の程度が異なる変形性膝関節症モデル における 自発運動量と関節軟骨の組織学的変化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 金城大学紀要	6. 最初と最後の頁 65-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 小島聖, 渡邊晶規, 浅田啓嗣	4. 巻 22
2. 論文標題 変形性膝関節症モデルマウスにおけるケージ面積の違いが 自発運動量と軟骨損傷に及ぼす影響	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 金城大学紀要	6. 最初と最後の頁 57-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Kojima Satoshi, Watanabe Masanori, Asada Keiji	4. 巻 32
2. 論文標題 Locomotor activity and histological changes observed in a mouse model of knee osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physical Therapy Science	6. 最初と最後の頁 370 ~ 374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1589/jpts.32.370	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 小島聖、渡邊晶規、浅田啓嗣	4. 巻 20
2. 論文標題 マウス変形性膝関節症モデルにおける自発運動量 と組織学的変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 金城大学紀要	6. 最初と最後の頁 93-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 小島 聖
2. 発表標題 身体的リジリエンスの構築-関節構成体における組織学的な回復の可能性-
3. 学会等名 第11回日本筋骨格系徒手理学療法研究会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小島聖、渡邊晶規、中川拓哉、二谷彩、浅田啓嗣
2. 発表標題 変形性膝関節症モデルマウスに おけるケージ面積の違いが自発運動量と軟骨損傷に及ぼす影響
3. 学会等名 第25回日本基礎理学 療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二谷彩、小島聖、中川拓哉、浅田啓嗣
2. 発表標題 変形性膝関節症モデルマウスにおける大腿 神経損傷の有無と後肢荷重量の関係
3. 学会等名 第25回日本基礎理学 療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅田啓嗣
2. 発表標題 徒手的療法の生理学的作用 ~ 徒手理学療法の再考 ~
3. 学会等名 第7回日本運動器徒手理学療法学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥村 裕, 浅田啓嗣, 高木 都
2. 発表標題 正常ヒト滑膜細胞と関節リウマチ由来ヒト滑膜細胞におけるシェアストレスに対するTRPV4チャネルの関与
3. 学会等名 第29回日本病態生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Okumura, Keiji Asada, Miyako Takaki
2. 発表標題 Effects of calcium-release activated calcium channel on signal transduction of mechanical stimulation to mouse synovial cells cultured in medium containing IL-6.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Kojima, Masanori Watanabe, Keiji Asada, Masahiro Hosoi
2. 発表標題 HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN ARTICULAR CARTILAGE AND LOCOMOTOR ACTIVITY OF EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS MODEL IN MICE
3. 学会等名 WCPT Congress2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanori Watanabe, Satoshi Kojima, Keiji Asada, Masahiro Hosono
2. 発表標題 EFFECT OF LOW-INTENSITY PULSED ULTRASOUND ON PREVENTION OF JOINT CARTIRAGE IN A SURGICALLY INDUCED OSTEOARTTHRITIC RAT MODEL
3. 学会等名 WCPT Congress2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Kojima, Masanori Watanabe, Sayaka Futatsuya, Keiji Asada
2. 発表標題 EFFECT OF VIBRATION ON JOINT CAPSULE OF EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS MODEL IN MICE.
3. 学会等名 ACOMPT 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayaka Futatsuya, Satoshi Kojima, Keiji Mori, Takuya Nakagawa, Masanori Watanabe, Keiji Asada
2. 発表標題 Cartilage Degeneration in Experimental Osteoarthritis Models with Femoral Nerve Injury in Mice.
3. 学会等名 ACOMPT 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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	小島 聖  (Kojima Satoshi)  (30454242)	金城大学・医療健康学部・准教授   (33306)	



6. 研究組織（つづき）

	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	高木 都  (Takaki Miyako)  (00033358)	奈良県立医科大学・医学部・研究員    (24601)	

	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
連 携 研 究 者	奥村 裕  (Okumura Yu)  (10727572)	大阪人間科学大学・保健医療学部 理学療法学科・准教授    (34435)	

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