

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18465

研究課題名(和文) 関節軟骨の内軟骨性骨化による菲薄化の証明と変形性関節症との関連性

研究課題名(英文) Relationship between thinning of articular cartilage due to endochondral ossification and osteoarthritis

研究代表者

柳樂 慶太(NAGIRA, Keita)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00759516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの膝非脱灰標本の軟骨下骨板を骨細胞の有無にて二層に区別し、変形性関節症(OA)の発症と進行に与える影響を、複数のOAモデルラット(月齢6か月)にて評価した。加齢的OAモデルでは、軟骨表面層損傷よりも軟骨下骨板拡大が先行し、OAスコアも軟骨下骨の方が軟骨よりも早期に上昇した。加齢における軟骨下骨板の無骨細胞層とX線・骨硬化幅には強い相関を認めた。一方、外科的OAモデルでは軟骨表面層損傷と軟骨細胞のアポトーシス亢進が先行し、後に軟骨下骨板が拡大した。これらの変化は軟骨下骨板の血管新生を伴い、軟骨内骨化阻害薬にて抑制されたため、関節軟骨の軟骨内骨化がOAの骨硬化に関連してい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

病態未解明な変形性関節症(OA)の関節軟骨変性・菲薄化機序において、元来、関節軟骨は関節内部からの血液の供給がないため、軟骨内骨化シグナルが生じても骨化することなく軟骨の変性・破壊だけで終わってしまうと考えられていた。

しかし、本研究では軟骨下骨からの血管進入(新生)により、関節軟骨においても軟骨内骨化が進行し、OAの骨硬化は関節軟骨の軟骨内骨化によって生じている可能性が示唆された。以上より、軟骨内骨化の抑制がOAに対する新たな治療標的となりOAの進行を予防する新規治療の開発が期待でき、本研究の学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The subchondral bone plate (Subcho.BP) in non-decalcified specimens was divided into two layers of osteocyte and non-osteocyte region. We evaluated detailed mechanism of changing osteochondral unit in focusing Subcho.BP divided into two layer in two rat models of osteoarthritis (OA).

In the age-related OA model, the thickening of Subcho.BP thickness was earlier than cartilage surface damage. Subchondral bone OA scores also increased earlier than cartilage OA scores. Strong correlation with the thickness of non-osteocyte layer and radiological sclerosis. On the other hand, in the surgical OA model, cartilage surface damage and increased apoptosis of chondrocytes preceded and followed by thickening of the Subcho.BP. These changes were accompanied by increasing angiogenesis in Subch.BP, which was suppressed by endochondral ossification inhibitors. Thus, the endochondral ossification of articular cartilage may continue to progress, suggesting an association with osteosclerosis in OA.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 内軟骨性骨化(軟骨内骨化) 軟骨下骨板 血管新生 軟骨下骨 非脱灰標本

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 (OA) の発症と進行の病態は未だに解明されていない。そのため初期変化は ‘軟骨!?’ それとも ‘軟骨下骨!?’ という議論は未だに続いているが、近年では、軟骨-軟骨下骨複合体の相互作用による変化が注目されている(1)。我々はげっ歯類のOAモデルを用いた軟骨下骨のスコアリングシステム開発の研究にて、関節軟骨の菲薄化と血管新生増加に伴う軟骨下骨板拡大を定量的に捉え報告した(2)。この研究では脱灰標本を用いたが、非脱灰標本では軟骨下骨板は無/有骨細胞層の二層に区別でき、その無骨細胞層には関節軟骨から連続する軟骨柱状配列が存在していた。さらに、同領域は脱灰標本では関節軟骨の石灰化軟骨層に該当したことから、関節軟骨は軟骨内骨化によって菲薄化し、同時に生じる軟骨下骨板の無骨細胞層拡大がOAの発症と進行に関連するという仮説に至った。

軟骨内骨化は胎生期から成長期におこる硝子軟骨が骨組織に置換されることで、成長軟骨板は石灰化を経て骨組織に置き換えられ閉鎖する(3)。一方、関節軟骨は永久軟骨といわれ、関節内部は血液供給がないため軟骨内骨化シグナルが生じても骨化することなく軟骨の変性・破壊だけで終わってしまうと考えられていた(4)。しかし、滑膜からの血流がある辺縁は軟骨内骨化によって骨棘が発生する。近年、OAにおける軟骨下骨からの血管進入(5, 6)、血管新生(7)が報告されている。以上より、関節内部においても軟骨内骨化は進行する可能性があると考えた。

2. 研究の目的

第一の目的は、関節軟骨の軟骨内骨化による菲薄化とOAとの関連性を検証することである。そのため、異なるOAモデルラットにて非脱灰標本の軟骨下骨板・無骨細胞層に注目して軟骨-軟骨下骨複合体の変化を組織学的に解析し、OAの発症と進行に与える影響を評価する。第二の目的は、軟骨内骨化の抑制がOAに対する新たな治療標的となるか検証することである。

3. 研究の方法

雌Sprague-Dawleyラットを用い、(1)~(3)の非脱灰標本 (Villanueva bone stain) および脱灰標本 (サフラニンO染色、免疫染色; Ihh、RUNX2) を作製した (各群n=8)。

(1) 加齢的OA; 月齢1.5~18か月。右は非脱灰標本、左は脱灰標本。

(2) 外科的OA; 右内側半月不安定化 (DMM)、左Sham。術後2~56日目。

(3) 外科的OA+軟骨内骨化阻害薬; 2) + 術当日よりビスモデギブの経口投与25 mg/kg/日。

* 海綿骨形態計測を行う群は、テトラサイクリン(20 mg/kg)とカルセイン(10 mg/kg)の腹腔内注射にてダブルラベリングを行った。麻酔にはイソフルラン+3種混合(メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノール)麻酔薬を用い、安楽死は炭酸ガスにて行った。

【評価項目】

- 各層の幅; 関節軟骨、軟骨下骨板 (有/無骨細胞層)、成長軟骨板幅
- 軟骨形態計測; 表層、中間、深層にわけ各層の軟骨細胞数と空の小腔数、深層の肥大軟骨細胞においては数と面積を定量評価した
- 海綿骨形態計測; 骨端 (軟骨下骨) と骨幹端にて各々骨形態計測
- OA score;) 軟骨OARSI (0-15点)、) 軟骨下骨: 軟骨下骨板、骨量、骨棘 (0-12点)
- X線; 硬化幅

4. 研究成果

(1) 加齢的 OA モデル

月齢 1.5~6 か月；年齢が上がると伴に体重は増加し、成長軟骨板幅は減少した。関節軟骨幅は 1.5 か月から 4 か月齢にかけて薄くなる一方、軟骨下骨板は徐々に拡大した。

月齢 6~18 か月；年齢が上がると伴に体重は増加したが、成長軟骨板幅の有意な減少はなかった。しかし、18 か月齢においては関節軟骨幅の菲薄化と、軟骨下骨板幅の拡大を無・有骨細胞層共に認めた(図 1)。関節軟骨の表層損傷と菲薄化が生じる 12~18 か月以前より、軟骨下骨板が拡大し、血管新生が増加していた。また 18 か月にかけて骨量増加化も生じてきていた。軟骨形態計測では加齢に伴い表層と中間層では徐々に空の細胞小腔を伴いながら細胞数が減少した。一方、深層の肥大軟骨細胞数は増加した。また肥大軟骨細胞面積も 18 か月にかけて増大していた。海面骨骨形態計測では 18 か月にかけて骨代謝は低下しているにも関わらず、18 か月の骨端においては石灰化速度、骨形成速度は伴に骨幹端に比べ増加し、骨梁幅も増加していた。OA スコアは軟骨下骨の方が軟骨よりも早期から上昇した。非脱灰標本・無骨細胞層幅と X 線・骨硬化幅には強い相関を認めた(図 2)。以上より、6 か月以降のラットにおいても関節軟骨の軟骨内骨化は進行し、OA における骨硬化との関連が示唆された。

(2) 外科的 OA モデル

月齢 6 か月(24 週齢)の SD ラットを用い、右膝 DMM/左膝 Sham 手術を行った(各群 n=8)。術後 2 日目の時点で、関節軟骨・最表層の lamina splendens は不整であり、DMM 側の全ての層で軟骨細胞数の減少と空の細胞小腔増加(2 倍)が生じていた。さらに、肥大軟骨細胞面積(μm^2)は DMM 側にて肥大化も有意に抑制されていた。軟骨下骨板にはまだ明らかな変化は認めなかった。術後 14 日目には軟骨損傷は深層まで達しており、菲薄化の進行と血管新生を伴う軟骨下骨板・無骨細胞層幅の拡大も生じ、辺縁の骨棘形成もみられた。軟骨損傷が軟骨下骨の骨形成亢進よりも先行し、その後に軟骨内骨化シグナル亢進に伴う骨硬化が生じていると推察した。

(3) 外科的 OA モデル+軟骨内骨化阻害薬

まず、予備実験として、SD ラットに 0、2.5、12.5、25 mg/kg/day の濃度のビスモデギブを DMM 当日より投与したところ(各群 n=3)、術後 14 日目の膝・非脱灰標本にて明らかに 25 mg/kg/day がその他の濃度より、軟骨-軟骨下骨複合体に生じる OA 変化を予防していた。そのため、(2)と同様に月齢 6 か月(24 週齢)の SD ラットを用い、右膝 DMM/左膝 Sham 手術を行い、術当日より 25 mg/kg/day のビスモデギブ(V 群) or Viechle(C 群)を経口投与し、術後 2、14、56 日目に屠殺し非脱灰標本を作製した(各群 n=6-8)。DMM 術後 2 日目にはすでに生じていた各層の軟骨細胞数減少と空の軟骨細胞小腔増加は V 群においては抑制されていた。また、C 群の術後 14 日目には生じていた DMM 側の軟骨菲薄化と軟骨下骨板・無骨細胞層の拡大は、V 群では術後 56 日目まで生じなかった。また、術後 56 日目の軟骨 OARSI スコアには両群間で有意差を認めた。

以上より、加齢的および外科的 OA モデルにおいて OA の発症と進行に血管新生を伴う軟骨内骨化が関連しており、今後 OA の新たな治療標的となる可能性が示唆された。

【References】

1. R S. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. 2016.
2. Nagira K, Ikuta Y, Shinohara M, Sanada Y, Omoto T, Kanaya H, Nakasa T, Ishikawa M, Adachi N, Miyaki S, Lotz M. Histological scoring system for subchondral bone changes

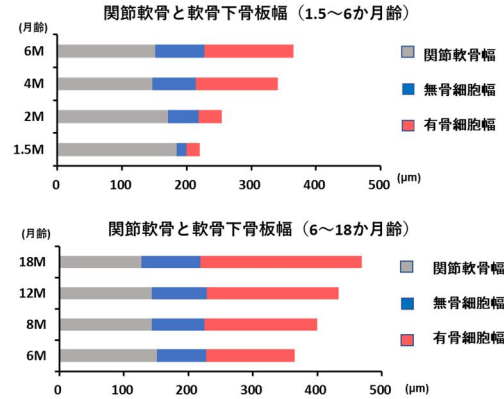
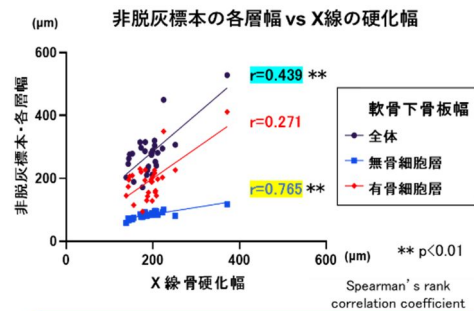


図 1. 関節軟骨と軟骨下骨板の推移



X線の硬化幅と非脱灰標本の無骨細胞層幅には強い相関関係を認めた。

図 2. 非脱灰標本の各層幅と X 線硬化幅の相関

in murine models of joint aging and osteoarthritis. *Scientific reports*. 2020 Jun 22;10(1):10077. eng. Epub 2020/06/24. doi:10.1038/s41598-020-66979-7. Cited in: Pubmed; PMID 32572077.

3. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):332-6. eng. Epub 2003/05/16. doi:10.1038/nature01657. Cited in: Pubmed; PMID 12748651.

4. Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Molecules and cells*. 2008 Feb 29;25(1):1-6. eng. Epub 2008/03/06. Cited in: Pubmed; PMID 18319608.

5. Weinans H, Siebelt M, Agricola R, Botter SM, Pijpers TM, Waarsing JH. Pathophysiology of peri-articular bone changes in osteoarthritis. *Bone*. 2012 Aug;51(2):190-6. eng. Epub 2012/02/22. doi:10.1016/j.bone.2012.02.002. Cited in: Pubmed; PMID 22343134.

6. Su W, Liu G, Liu X, Zhou Y, Sun Q, Zhen G, Wang X, Hu Y, Gao P, Demehri S, Cao X, Wan M. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development. *JCI Insight*. 2020 Apr 23;5(8). doi:10.1172/jci.insight.135446. Cited in: Pubmed; PMID 32208385.

7. Zhen G, Wen C, Jia X, Li Y, Crane JL, Mears SC, Askin FB, Frassica FJ, Chang W, Yao J, Carrino JA, Cosgarea A, Artemov D, Chen Q, Zhao Z, Zhou X, Riley L, Sponseller P, Wan M, Lu WW, Cao X. Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nature medicine*. 2013 Jun;19(6):704-12. eng. Epub 2013/05/21. doi:10.1038/nm.3143. Cited in: Pubmed; PMID 23685840.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳樂慶太
2. 発表標題 Relationship Between Thinning of Articular Cartilage due to Endochondral Ossification and Osteoarthritis
3. 学会等名 OARSI World Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳樂慶太
2. 発表標題 Relationship Between Thinning of Articular Cartilage due to Endochondral Ossification and Osteoarthritis
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳樂慶太
2. 発表標題 軟骨内骨化による関節軟骨菲薄化と変形性関節症との関連性
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------