

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：22401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19417

研究課題名（和文）関節不安定性に基づく関節軟骨の潤滑機構破綻メカニズムの解明

研究課題名（英文）Functional degradation mechanism of lubrication mechanism of articular cartilage based on joint instability

研究代表者

村田 健児（Murata, Kenji）

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・助教

研究者番号：30792056

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）：関節軟骨の変性を主病変とする変形性膝関節症（膝OA）について、予防法に関する効果的な手段はまだ確立されていない。この課題に対して、関節のぐらつき、すなわち不安定性が関節軟骨変性や滑膜炎を悪化させ、膝関節内のヒアルロン酸や軟骨構成タンパク質であるグリコサミノグリカンを減少させることを明らかにした。これらを予防するために、不安定性膝後の滑膜炎阻害剤を用いた治療の結果、膝関節の滑膜炎を抑制し、さらに滑膜細胞への直接的な炎症抑制効果も示した。この成果は、関節の不安定性は滑膜炎誘発し、軟骨への変性を導く可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

身体にとって、“硬いが悪い”というわけではなく、適切な硬さが我々の関節には求められる機能である。この適切な硬さが靭帯の損傷やホルモンバランス、加齢によって保てなくなった場合、関節には炎症や疼痛などのネガティブな影響が出現する可能性がある。そのような場合、膝関節の不安定を抑制するために装具療法が効果を発揮することも、我々のシステムティックレビューから明らかにしている。

現在、これまでの成果をもとに、ヒトの軟骨変性過程に類似する新たな変形性膝関節症モデルを作成している。このモデルの軟骨組織のシークエンス解析を進めており、軟骨組織に対する機械的ストレスの影響をより具体的に示すことを目標としている。

研究成果の概要（英文）：Joint instability is associated with various joint conditions, including osteoarthritis (OA) and inflammation, and we developed a model that determines the role of knee instability. The present study showed that joint instability exacerbated articular cartilage degeneration and decreased HA and GAGs protein expression in the synovial membrane. Stable joints are pivotal for synovial membrane and cartilage stability. Moreover, synovitis induced by joint instability can be inhibited by using a TGF- $\beta$ 1 inhibitor. Our results also showed that the effects of TGF- $\beta$ 1 inhibitors on joints may suppress synovial inflammation.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：変形性膝関節症 関節不安定性 ヒアルロン酸 関節軟骨

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症 (Knee Osteoarthritis: 以下 OA)は膝関節の疼痛と機能障害を主症状とする運動器疾患である。潜在的な OA を含めると本邦の罹患者数は推定 2000 万人とされ、重症化した OA 患者は日常生活活動や QOL の低下を招く。OA 発症の一要因としてメカニカルストレスの増加が関連していることは周知の事実であるが、具体的なメカニカルストレスの量や種類に関しては研究が進められている。近年、関節不安定性が軟骨変性に関連深いことが基礎研究で報告されるとともに、臨床研究では OA 患者は立ち上がりや歩行中に関節不安定性を自覚していることが報告されている。このことから、関節内に生じている関節不安定性がメカニカルストレスとして探知され、分子生物学的情報に変換されると仮説をたて、関節不安定性と OA の関連性について動物を用いた基礎的研究が必要である。

その手段として、従来の膝関節前十字靭帯を損傷させ不安定性を惹起した後に関節包外から制動する関節制動モデルを開発し、OA の発症には関節不安定性が関与していることを報告した。しかし、OA 発症や予防にとって重要とされる軟骨基質の維持のために必要な潤滑性や合成因子については検証できていない。なかでも、ルブリシンやヒアルロン酸は関節軟骨表層の摩擦低減及び保護作用を有し、関節潤滑性に寄与している重要なムチン型糖たんぱく質である。関節不安定性を制動することによって関節内の潤滑性を維持できるかどうか、更にはそのメカノセンシングを明らかにすることで運動学的視点から OA 発症ならびに予防に関する一要因を解明できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、関節不安定性を制御したモデルにおいて軟骨変性が抑制されるかどうか、TGF- $\beta$  阻害による軟骨変性が抑制できるか、線維芽細胞を用いた滑膜炎における TGF- $\beta$  1 の役割を明らかにすることを目的にヒアルロン酸 (HA) やグリコサミノグリカン(GAGs) などの軟骨維持因子を調査した。

## 3. 研究の方法

### 1) *in vivo* 実験デザインと手術方法

10 週齢 Wistar 系雄性ラット 56 匹をランダムに 4 つの実験群に分類し、前十字靭帯切断手術による関節不安定性誘発した ACLT 群と誘発された関節不安定性を制動する CATI 群から異なる不安定性モデルを作製した。さらに、両モデルは TGF- $\beta$  1 受容体キナーゼ阻害剤注射 (SB-431542, Cayman Chemical) が投与される群 (with inhibitor)、または PBS が投与される群 (without inhibitor) に分類された。術後 4 週間および 8 週間で全ラットの右膝関節を解析用に採取した。

外科的手術方法は、先行研究に従い実施し、TGF- $\beta$  1 受容体キナーゼ阻害剤注射は、DMSO (富士フィルム和光純薬) 溶液に 25  $\mu$ g/mL 濃度で溶解させ、膝関節内に 100  $\mu$ l 量を週 1 回投与した。なお、すべての動物プロトコルは、ARRIVE ガイドラインに準拠し、倫理委員会の承認を得て実施した。

### 2) 可動域測定と力学試験

可動域 (ROM) および脛骨前方不安定性は、X 線装置 (Softex Inc.) で膝関節の最大屈曲・伸展を撮影し、ImageJ を用いて大腿骨と脛骨の位置から算出した。脛骨前方不安定性は、0.2N 定量バネを用いて前方牽引状態で測定した。

### 3) 組織学的解析

凍結切片を利用して、脛骨と大腿骨を組織学的に観察評価した。軟骨変性は、Osteoarthritis Research Society International (OARSI) のスコアリングシステムを用いて評価した。軟骨、滑膜、骨棘は、1 サンプルを 3 部位、評価者は盲検化して評価した。

### 4) 免疫蛍光染色

関節軟骨の潤滑性を評価するために、ルブリシンを評価した。ウサギポリクローナル抗ルブリシン抗体を over night インキュベート後、二次抗体 Dylight 649 mouse anti-goat (Thermo Fisher Scientific) で 1 時間インキュベート、核染色は DAPI (Vector, Burlingame, USA) を利用した。BZ-X700 顕微鏡 (Keyence) で撮像し、軟骨のルブリシン密度は ImageJ ソフトウェアを用いて定量化した。

### 5) 滑膜におけるタンパク質分析

滑膜中のヒアルロン酸、インターロイキン (IL)-1 $\beta$ 、腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  1、コラーゲン I 型と III 型を ELISA で測定した。半月板と骨組織を除いた滑膜組織は、タンパク質抽出試薬 (T-PER, Thermo Fisher Scientific) 中でホモジナイズして総蛋白質サンプル (n = 5/群) を BCA 法で調製した。TGF- $\beta$  (88-50680-22, Thermo Fisher Scientific)、HA (Hyaluronan Quantikine

ELISA Kit、R&D Systems)、IL-1 $\beta$  (88-6010-22, Thermo Fisher Scientific)、TNF- $\alpha$  (88-7340-22, Thermo Fisher Scientific)、コラーゲンIII型 (MBS2509319, MyBioSource)、コラーゲン I 型(MBS262647, MyBioSource)で評価した。また、硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)は、BlyscanTM Glycosaminoglycan Assay Kit を用いて測定した(B1000, Biocolor Ltd.)。

#### 6) 滑膜からのラット線維芽細胞の抽出

8 週齢 Wistar 系雄性ラットの膝関節滑膜から滑膜由来線維芽様細胞を分散した。6well dish で播種し、5%CO $_2$ 、37°Cの加湿下で培養し、実験には第 2 継代細胞を利用した。各細胞は IL-1 $\beta$  (1ng/mL) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.)、TGF- $\beta$  1 (10 ng/mL) (Peprotech)、また SB-431542 (10  $\mu$ M) (Cayman Chemical) を用いて滑膜由来線維芽様細胞応答を調査した

#### 7) リアルタイム PCR 法

mRNA 発現量は、リアルタイム逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)により評価した。Total RNA は、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて、細胞から抽出した。cDNA は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて合成した。TaqMan gene expression assay により、標的遺伝子 (Il6:Rn01410330\_m1、Prg4:Rn01490812\_m1、Has1:Rn01455687\_g1、Has2:Rn00565774\_m1、Colla1: Rn01463848\_m1、Col3a1:Rn01437681\_m1) について、比較 ct 法で  $\beta$ -actin を利用した正規化により定量した。

#### 8) 培地中の GAGs 定量

BlyscanTM Glycosaminoglycan Assay Kit (B1000, Biocolor Ltd.) を用いて、培地中の GAG を測定した。培地を 13000xg で遠心後、ペレットを除去し、上清を回収した。各培養液の分析には合計 100  $\mu$ L の培地を使用し、評価した。

#### 9) 線維芽細胞のタンパク質解析

滑膜線維芽細胞中のタンパク質は、RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific, JPN) で採取した。BCA 法でタンパク質濃度を評価し、TGF- $\beta$  (88-50680-22, Thermo Fisher Scientific)、HA (Hyaluronan Quantikine ELISA Kit、R&D Systems)、IL-1 $\beta$  (88-6010-22, Thermo Fisher Scientific)、TNF- $\alpha$  (88-7340-22, Thermo Fisher Scientific)、III型コラーゲン(MBS2509319, MyBioSource) および I 型コラーゲン(MBS262647, MyBioSource) で、定量化した。

#### 10) 統計解析

統計解析は、IBM SPSS Statistics 25 (IBM Japan) を用い、Shapiro-Wilk test を用いて正規性の検定後、一元配置または二元配置分散分析、Kruskal-Wallis 検定を用い、各パラメータに対する各群の影響を判定した。後検定は、Tukey 法、Bonferroni 法を採用した。

### 4. 研究成果

#### 1) 関節可動域と前方不安定性 (Fig. 1)

CATI 群では、4 週及び 8 週でわずかに屈曲可動域が制限されたが、伸展可動域については両群に差を認めなかった。前方不安定性については、4 週及び 8 週において ACLT 群で有意に不安定性が増加した。

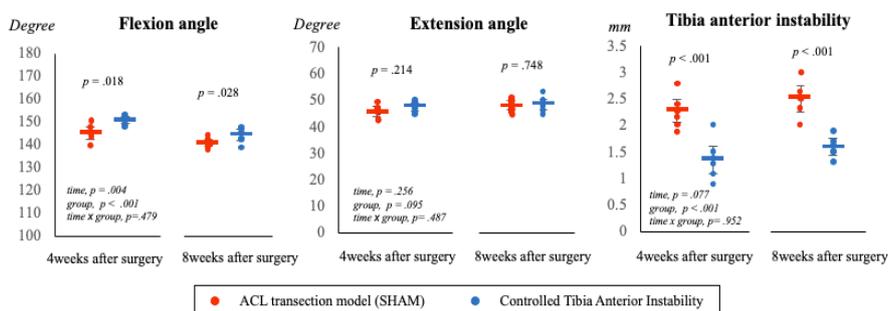


Fig. 1. Tibia anterior instability and Range of motion, osteophytes analysis using soft X-ray. Data are presented as median and 25th/75th percentile (Kruskal-Wallis test, post-hoc Bonferroni correction) or as means and 95% CI (One-way ANOVA, post-hoc Tukey test).

#### 2) 関節軟骨の変性と前方不安定性との相関 (Fig. 2)

4 週および 8 週において、OARS1 スコアは、ACLT 群が CATI 群および INTACT 群に比べて有意に高かった。関節内に注射をしても、軟骨変性と不安定性の傾向は変わらなかった。OARS1 スコ

アと関節不安定性量は強く関連していた。

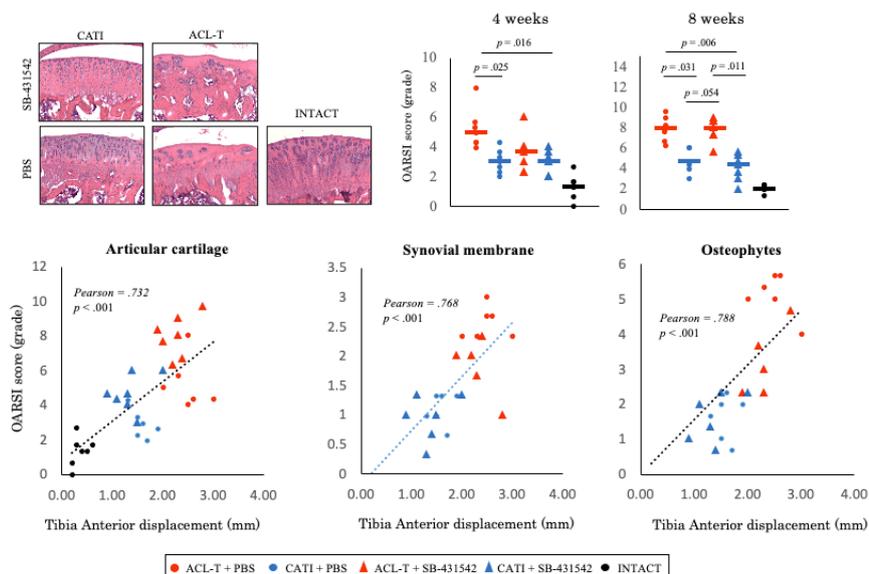


Fig.2. Histological sections of the cartilage, osteophytes, and synovium stained with Hematoxylin and eosin and OARSIS scores for histological osteoarthritic findings. Dot plot have shown extending from the 25th and 75th percentiles containing the median. Data used that Kruskal-Wallis, post-hoc Mann-Whitney U test, and Bonferroni correction.

### 3) 関節軟骨のルブリシン発現 (Fig. 3)

関節軟骨の潤滑性に関連するルブリシン(表層部タンパク質)は、ACL-T 群はいずれも、CATI 群に比べ、表層部のルブリシン陽性軟骨が減少し、関節内注射の影響に統計学的な有意差を認めなかった。ルブリシンスコアと関節不安定性量は負の相関を認めた。

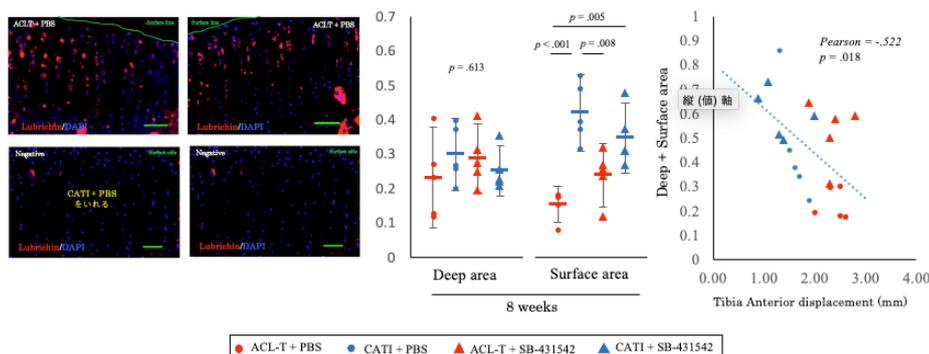


Fig. 3. IHC staining of lubricin in the articular cartilage and its density are shown, and shown correlation diagram of each histological score and joint instability. To sum up, the joint instability decreased the lubricin in surface cartilage. Data are presented as means and 95% CI (One-way ANOVA, post-hoc Bonferroni correction).

### 4) 滑膜のコラーゲンタンパク質量発現量 (Fig. 4)

ACL-T 群は、他群と比較して I 型コラーゲン量が有意に増加した。阻害剤注入によって未投与群と比較して、I 型コラーゲン量が抑制され、滑膜の I 型コラーゲン量は関節不安定性の程度と相関した。III型コラーゲン量においては、グループ間で有意差は認められなかったが、コラーゲン III型発現は I 型コラーゲン同様に、関節不安定性の程度と相関した。

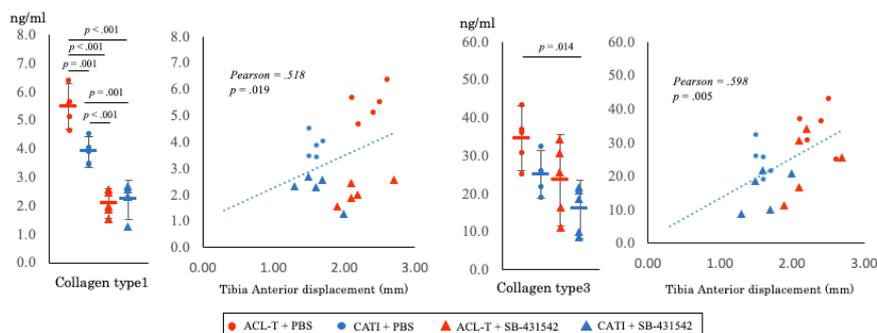


Fig. 5. Collagen type1 protein expression was determined by ELISA in each experimental synovial membrane tissue. Moreover, correlation of protein expression ELSA level and joint instability was shown. ELISA level. Collagen

type3 protein is the same. Data are presented as means and 95% CI (One-way ANOVA, post-hoc TuKey).

### 5) 滑膜における HA および GAGs 発現 (Fig. 5)

HA は、CATI 群で有意に高く、関節不安定性の程度と負の相関を示した。GAGs の発現を比色法で評価したところ、ACL-T 群と比較して CATI 群で高い値を維持した。

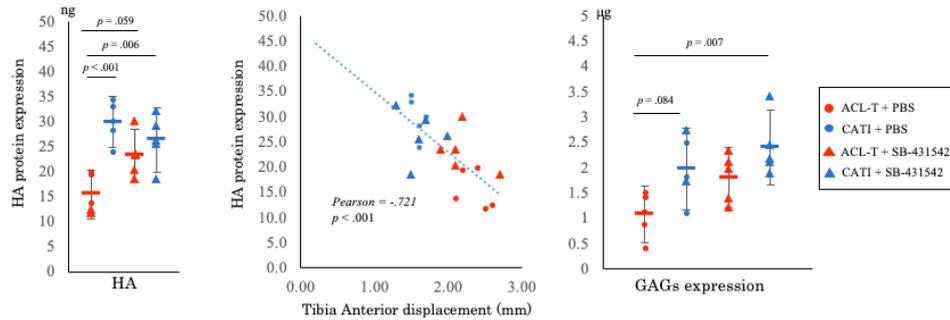


Fig. 5. HA protein expression was determined by ELISA in each experimental synovial membrane tissue. Moreover, correlation of protein expression ELISA level and joint instability was shown. ELISA level. GAGs protein is the same. Data are presented as means and 95% CI (One-way ANOVA, post-hoc Turkey).

### 6) 滑膜由来線維芽細胞のリアルタイム PCR (Fig. 6)

IL-1 $\beta$  の添加により、IL-6 mRNA の発現レベルが有意に増加し、PRG4、HAS1、HAS2 が減少した。一方、これらの結果は TGF- $\beta$  1 の影響が少なく、滑膜由来の線維芽細胞は、IL1- $\beta$  および TGF- $\beta$  1 が独立して制御される可能性がある。また、TGF- $\beta$  1 阻害剤はコラーゲンを大幅に減少させたが、炎症などの他の要因には影響を及ぼさなかった。

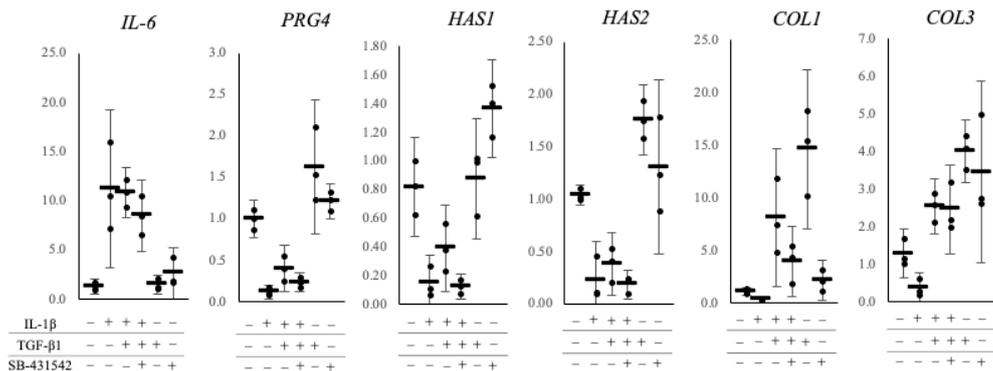


Fig.6. Fibroblast after treatment mRNA expression. The figure showed relative value using  $\Delta\Delta Ct$  methods. Statistical analysis was performed using delta Ct values using GAPDH and actin housekeeping. Statistical details are given in the additional table.

### 7) 滑膜由来線維芽細胞のタンパク質発現 (Fig. 7)

TGF- $\beta$  を含む培地では、TGF- $\beta$  を含まない培地と比較して、コラーゲン I 型および III 型および HA が増加した。これに TGF- $\beta$  1 阻害剤を添加するとコラーゲン発現量が減少した。

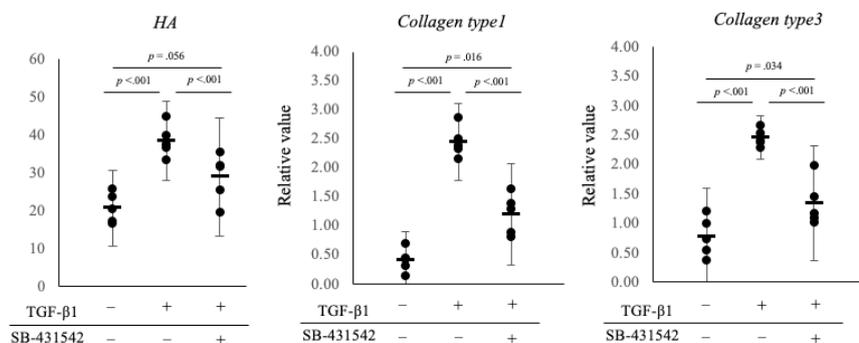


Fig.7. ELISA results for the expression of protein in the synovial membrane about to analysis role TGF- $\beta$ . Data are presented as means (black bar) and 95% CIs (One-way ANOVA, post-hoc Tukey).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kawabata S., Murata K., Nakao K., Sonoo M., Morishita Y., Oka Y., Kubota K., Kuroo A., Kita S., Nakagaki S., Arakawa K., Kokubun T., Kanemura N.	4. 巻 4
2. 論文標題 Effects of exercise therapy on joint instability in patients with osteoarthritis of the knee: A systematic review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage Open	6. 最初と最後の頁 100114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ocarto.2020.100114	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 Sora Kawabata, Kenji Murata, Hiroataka Iijima, Kouki Nakao, Riku Kawabata, Hidenobu Terada, Takuma Kojima, Chiharu Takasu, Takuma Kano, Naohiko Kanemura	4. 巻 54
2. 論文標題 Ankle instability as a prognostic factor associated with the recurrence of ankle sprain: A systematic review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Foot.	6. 最初と最後の頁 101963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foot.2023.101963.	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 川端空, 藤原秀平, 喜多俊介, 加納拓馬, 山際美紀, 熊谷雄基, 松本拓也, 片桐将, 萩台保之, 庄野仁美, 小泉弘明, 村田健児
2. 発表標題 変形性膝関節症患者における関節不安定性に寄与する身体的特徴
3. 学会等名 第30回埼玉県理学療法学会, 埼玉
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原秀平, 喜多俊介, 加納拓馬, 山際美紀, 熊谷雄基, 松本拓也, 片桐将, 萩台保之, 庄野仁美, 川端空, 小泉弘明, 村田健児
2. 発表標題 変形性膝関節症患者における股関節・足関節の関節可動域の調査
3. 学会等名 第30回埼玉県理学療法学会, 埼玉
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榊田拓真, 喜多俊介, 川端空, 村田健児
2. 発表標題 装具療法が変形性膝関節症患者の関節不安定性に及ぼす影響-システマティック・レビューによる検討-
3. 学会等名 第30回埼玉県理学療法学会, 埼玉
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Murata, Yuuichiro Oka, Takuma Kano, Takanori Kokubun, Naohiko Kanemura
2. 発表標題 Suppression of tibia anterior instability after anterior cruciate ligament injury prevents muscular atrophy factors
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田健児, 岡優一郎, 加納拓馬, 森下佑里, 黒尾彩, 荒川航平, 中垣澄香, 小曾根海知, 峯岸雄基, 国分貴徳, 金村尚彦
2. 発表標題 関節不安定性の制動における滑膜の炎症性サイトカインを抑制効果について
3. 学会等名 第29回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川端空, 中尾幸暉, 村田健児, 森下佑里, 園尾萌香, 喜多俊介, 久保田圭介, 岡優一郎, 黒尾彩, 金村尚彦, 国分貴徳
2. 発表標題 変形性膝関節症患者の関節不安定性に着目した運動療法の効果-システマティック・レビューによる検討
3. 学会等名 第29回埼玉県理学療法学会
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 K Murata, Y Oka, K Onitsuka, T Kokubun, A Nakajima, K Arakawa, S Nakagaki, N Kenamura
2 . 発表標題 Controlling joint instability after anterior cruciate ligament transection inhibits the transforming growth factor-beta-mediated osteophyte formation
3 . 学会等名 Osteoarthritis Research Society International 2020 World Congress ( 国際学会 )
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Sora Kawabata, Takuma Kojima, Kazuki Takeshita, Hidenobu Terada, Chiharu Takasu, Naohiko Kanemura, Kenji Murata
2 . 発表標題 Excessive mechanical stress enhances mechanical stress sensitivity of cartilage through the mechanosensitive ion channel PIEZO2
3 . 学会等名 Osteoarthritis Research Society International 2023 World Congress. Denver. USA ( 国際学会 )
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 A novel model that increases mechanical stress on articular cartilage without invasiveness into the joint
2 . 発表標題 Sora Kawabata, Takuma Kojima, Hidenobu Terada, Chiharu Takasu, Naohiko Kanemura, Kenji Murata
3 . 学会等名 Osteoarthritis Research Society International 2023 World Congress. Denver. USA ( 国際学会 )
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Roles of piezo2 channel for stretch response in chondrocytes
2 . 発表標題 Kenji Murata, Takuma Kojima, Sora Kawabata, Kenta Sone, Yuichiro Oka, Chiharu Takasu, Hidenobu Terada, Naohiko Kanemura
3 . 学会等名 Osteoarthritis Research Society International 2023 World Congress. Denver. USA ( 国際学会 )
4 . 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 村田 健児・金村 尚彦・川端 空・小島 拓真	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 55
3. 書名 Medical Science Digest 予防を科学する：炎症細胞社会学	

1. 著者名 村田 健児・川端 空・高須千晴・金村 尚彦	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 90
3. 書名 BIO Clinica メカニカルストレス - 疾患の理解と治療法開発の新視点 -	

〔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
---------	---------