

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 2月29日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591949

研究課題名（和文） 高脂血症薬（スタチン）を用いた、変形性膝関節症に対する治療の試み

研究課題名（英文） The anti-inflammatory effects of statin on osteoarthritis

研究代表者

松田 秀一（MATSUDA SHUICHI）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：40294938

研究成果の概要（和文）：

両膝前十字靭帯切離を施行した日本白色家兎 32 羽を用いて、片側の膝関節にスタチンを関節内投与し、対側の膝関節はコントロール群として比較した。関節内投与を週に 1 回、計 6 回行い、組織学的、生化学的に評価した。コントロール群の膝では、中等度から高度の軟骨細胞の消失などの重度の軟骨変性を認めたが、スタチンを関節内投与した群では、コントロール群と比較して組織学的な軟骨変性は軽度であり、軟骨変性抑制効果を認めた。

研究成果の概要（英文）：

Thirty-two mature rabbits that underwent bilateral anterior cruciate ligament transection (ACL) received six consecutive weekly intra-articular injections of mevastatin. The knee joints were assessed by morphological, histological and biochemical methods. Intra-articular injection of mevastatin significantly reduced cartilage degradation, as assessed by morphological and histological examinations. During the development of experimental OA, intra-articular administration of **statin** reduces cartilage degradation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：整形外科学、関節外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：変形性関節症、関節軟骨、スタチン

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症に対する有効な予防法はなく、多くの高齢者の QOL の向上のためにも、有効な治療薬の開発が待たれている。変形性関節症の進行の原因としては、関節内の炎症によって軟骨細胞や滑膜細胞より産生が促進される Matrix metalloproteinase (MMP)

などの軟骨破壊物質による軟骨基質分解と、軟骨細胞の機能低下に伴う軟骨基質産生の低下が主原因と考えられている。そのため、変形性関節症治療のターゲットとしては軟骨基質分解を抑制することと軟骨基質産生を促進させることが重要であり、多くの研究が行われている。本研究で使用する HMG-CoA

還元酵素阻害薬（スタチン）はメバロン酸経路を阻害することでコレステロールの産生を抑制するため、高脂血症薬としてのコレステロール低下作用の研究が行われてきた。近年、スタチンにはコレステロール低下作用の他に抗炎症作用（Abeles AM et al. *Arthritis Rheum.* 2006 Feb;54:393-407.）や BMP-2 などの成長因子の発現を促進する作用（Mundy G et al. *Science.* 1999 Dec 3;286:1946-9.）があることが国内外の研究結果より明らかとなり、炎症性疾患（関節リウマチなど）、骨粗鬆症などを対象に研究の幅が広がっている。そこで我々は変形性関節症治療薬としての可能性を検討するため、先行実験として家兔変形性関節症モデルに対してスタチンの関節内投与を行い、軟骨変性抑制作用を確認した。今後、臨床で変形性関節症治療薬として HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）を使用するためにはその軟骨変性抑制効果のメカニズムや、至適濃度、投与する際の担体などを検討する必要がある。

2. 研究の目的

変形性関節症は、進行性の軟骨変性により、関節機能を著しく障害する有痛性疾患であり、高齢者の 50%以上が罹患し、QOL 低下の原因となる難治性の疾患である。10 年後には 4 人に 1 人が 65 歳以上となる高齢化社会を迎えるにあたり、その患者数は増加の一途をたどることが予想される。変形性関節症の治療は末期例では金属製の人工関節を用いた手術を要する。しかし、手術療法には身体への侵襲や術後感染、人工関節のゆるみ、磨耗による再手術などの問題がある。それゆえ、変形性関節症の治療は、早期よりその進行を防止するための保存的治療が重要となるが、有効な治療法は確立されていない。近年、高脂血症薬として世界的に臨床で使用されている HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）は培養条件下において、変形性関節症の病気進行の原因である軟骨細胞や滑膜細胞より放出される軟骨破壊物質を抑制することが実験的に示されている。本研究の目的は HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）の関節内投与によって、従来の対症療法にはない、変形性関節症の進行を予防できる効果を明らかにし、またそのメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）の関節内投与によって、変形性関節症の進行を抑制できる効果を明らかにするため、変形性関節症動物モデルを使用し、組織学的、免疫組織学的手法で実験、評価を行う。そのメカニズムの解明のために、動物モデルの軟骨組織、滑膜組織から抽出した mRNA や関節液、変形性関節症患者の軟骨細胞、滑膜細胞、間葉系幹細胞を用いて、分子生物

学的手法で検討する。

(1) 家兔変形性関節症モデルの作成と HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）の関節内投与の効果の形態学的、組織学的評価

成熟日本白色家兔を 30 羽用いる。家兔を全身麻酔下に両膝を展開する。前十字靭帯の切離を行い、脛骨の前方動揺性を確認後、各層縫合を行い、変形性関節症モデルとする。

（Pelletier JP et al. *Arthritis Rheum.* 2003 Jun;48(6):1582-93.）週一回、計 6 回ずつ、片側膝には Mevastatin (sigma) + 生理食塩水を濃度 0.01mg/ml、0.1mg/ml、1mg/ml の 3 群に分けて関節注射する。対側膝にはコントロール群として生理食塩水のみを関節注射し、6 週間後に比較、評価を行う。評価方法は墨汁染色による関節軟骨変性の程度の肉眼的形態学的評価をスコア化する。また、ホルマリンにて固定後、組織切片としたのちに、軟骨特異的細胞外マトリックスである GAG を染色する Safranin-O 染色で関節軟骨の組織学的スコア化を行い、統計学的に評価する。同時に軟骨に特異的な II 型コラーゲンの免疫染色も行い、コラーゲン線維の変性の程度も比較する。以上により、HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）の至適関節内投与濃度を決定する。3 群に分けたスタチンの濃度にて効果が確認できない場合はさらに濃度を 10mg/ml、100mg/ml と高く設定することや、別の変形性関節症モデル（薬剤誘導性）を使用すること、他種動物で行うことで対応する。

(2) HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）の軟骨変性抑制作用のメカニズムの検討

メバロン酸経路は HMG-CoA が還元され、Mevalonate となった後にいくつかの中間産物を経て最終産物であるコレステロールになるカスケードである。中間産物である Farnesyl-PP と Geranylgeranyl-PP はイソプレノイドと呼ばれ、Rho や Ras などの低分子 G 蛋白の修飾を行っており、スタチンの多面的作用に深く関与しているとされている。

（Takemoto M et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Nov;21:1712-9.）日本白色家兔の滑膜細胞の培養液中にスタチンと同時に Mevalonate (sigma)、Farnesyl-PP (sigma)、Geranylgeranyl-PP (sigma) を投与することでスタチンの作用への影響を調べる。RT-PCR で遺伝子発現を、ELISA にて培養液中へのタンパクの産生を評価する。いずれかの中間産物の投与でスタチンの作用の変化が認められれば、さらに特異的に siRNA や阻害薬を用いて低分子 G 蛋白の機能制御を行い、スタチンの軟骨変性抑制作用の分子生物学的なメカニズムの解明を行う。

4. 研究成果

(1) 家兔変形性関節症モデルの作成と HMG-CoA

還元酵素阻害薬（スタチン）の関節内投与の効果の形態学的、組織学的評価

高脂血症治療薬であるスタチンを関節内に注射することによって関節軟骨の変性を抑制できることを、家兎を用いて検討を行った。

両膝前十字靭帯切離を施行した日本白色家兎 32 羽を、メバスタチンの関節内投与量の違いで、無作為に次の 3 群に分けた：0.01mg/mL (n=8), 0.1mg/mL (n=16), 0.5mg/mL (n=8)：メバスタチンは各濃度になるように生理食塩水に希釈し、体重あたり 0.2mL/kg を片側の膝関節に関節内投与し、対側の膝関節には生理食塩水のみを投与しコントロール群として比較した。関節内投与を週に 1 回、合計 6 回行い、組織学的、免疫組織学的、生化学的に評価した。結果としては、コントロール群の膝では、軟骨の完全な欠損や中等度から高度の軟骨細胞の消、サフラニン 0 での染色低下などの柔道の軟骨変性を認めた（図 1、2）。一方、メバスタチンを 0.1mg/mL と 0.5mg/mL の濃度で関節内投与した両群では、コントロール群と比較して、組織学的な軟骨変性は軽度であり、軟骨変性抑制効果を認めた。しかしながら、メバスタチンを 0.01mg/mL の低濃度で投与した群では、対側膝のコントロール群と比較して Mankin スコアに有意差を認めなかった（図 3）。メバスタチンは脂溶性で濃度依存的に細胞内に拡散し、競合的にメバロン酸経路を阻害するためスタチンの効果的な作用には、あるレベル以上を阻害できるスタチン濃度が必要であると考えられた。

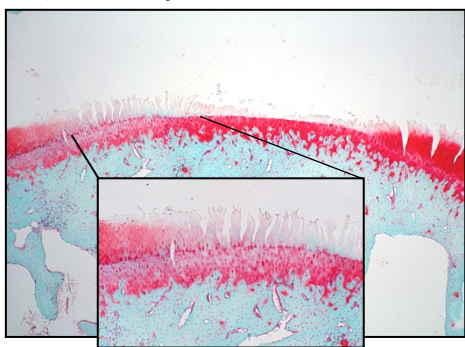


図 1：コントロール群の組織像

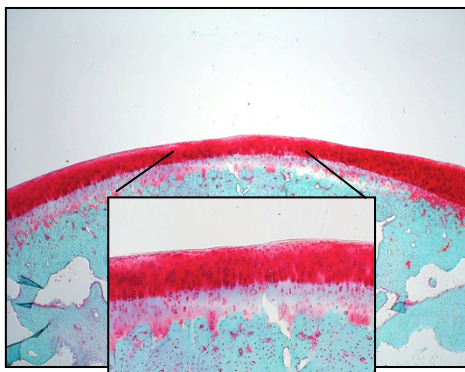


図 2：スタチン(0.1mg)投与群の組織像

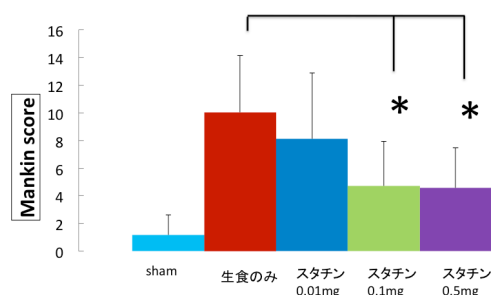


図 3：スタチンの効果

(2) HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）の軟骨変性抑制作用のメカニズムの検討

スタチンが滑膜細胞における MCP-1 および MMP-3 の産生を抑制するか、in vitro での実験を行った。家兎の滑膜細胞において、メバスタチン 0, 1, 10, 50 μ M 含有のメディウムで前処置の後 IL-1 β を加え、MCP-1 および MMP-3 の遺伝子発現、蛋白生成を RT-PCR、ELISA でそれぞれ評価した。50 μ M のメバスタチンの群で、MCP-1 と MMP-3 の遺伝子発現が抑制されており、蛋白生成も有意に抑制されていた。またヒト変形性関節症の滑膜細胞において、50 μ M のシンバスタチンで前処置を行った後 IL-1 β を加え、FFP および GGPP を添加することによる MCP-1 の変化を計測した。シンバスタチンによる MCP-1 の抑制効果は、FFP を添加しても抑制されたままであったが、GGPP を添加することで抑制がなくなかった。さらに、RhoA kinase inhibitor (Y27632) の添加による前処置の後 IL-1 β を加え、MCP-1 の変化を ELISA で計測した。RhoA kinase inhibitor を添加したものでは、MCP-1 は濃度依存性に抑制された。IL-1 β 刺激による変形性関節症滑膜細胞において、スタチンは、プレニル化、特にゲラニルゲラニル化の過程を阻害することによって MCP-1 および MMP-3 を抑制することが可能であった。本研究より、Rho/Rho kinase 経路の抑制が、スタチンによる MCP-1、MMP-3 の抑制過程に関与している可能性が考えられた。

変形性関節症治療薬の開発は国内外において盛んに行われているが、その多くは生体内では不安定な蛋白製剤やウイルスによる遺伝子導入などを用いた研究であり、臨床で使用するには安全性などの問題が残る。本研究で使用するスタチン製剤はすでに臨床で内服薬として安全性が確認されており、世界中で使用されている薬剤のため、その変形性関節症への有効性が確認できた場合、臨床応用しやすいという利点がある。また、本研究においては、一つの薬剤で軟骨基質分解を抑制することと軟骨基質産生を促進させることの両方を目的とすることができる

既存の研究より明らかであり、多方面からの検討が可能である点も特色である。既存の世界的に臨床で使用されている高脂血症薬であるスタチン製剤の新たな作用に注目し、全く違う分野の疾患である変形性関節症の治療に役立てようとする試みは、極めて独創的な研究であると考えられる。本研究の結果により、スタチンを用いた変形性関節症に対する効果的な治療が可能になることが示唆された。日本だけでも約2,000万人いるとされる変形性関節症の患者に対して、安全面、コスト面において有効な治療が可能となり、社会的な貢献が非常に大きいものと考えられる。現在まで、変形性関節症の保存的治療は除痛などの対症療法がほとんどであり、有効な治療は存在していないため、新しく軟骨保護作用のある薬剤を開発することは高齢化社会へ向けて、高齢者のQOLの向上、医療費の削減などにおいても非常に有用な研究だと考えられ、臨床応用へ向けて研究を進めて行くべきものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Fukagawa S, Leardini A, Callewart B, Wong PD, Desloovere K, Matsuda S, Bellemans J. Age-related changes in kinematics of the knee joint during deep squat. *The Knee*. 査読有り、in press.
2. Tashiro Y, Uemura M, Matsuda S, Okazaki K, Kawahara S, Hashizume M, Iwamoto Y. Articular cartilage of the posterior condyle can affect rotational alignment in total knee arthroplasty. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 査読有り、in press.
3. Fukagawa S, Matsuda S, Tashiro Y, Hashizume M, Iwamoto Y. Posterior Displacement of the Tibia Increases in Deep Flexion of the Knee Joint. *Clin Orthop*. 査読有り、468:1107-1114, 2010.
4. Akasaki Y, Matsuda S, Nakayama K, Miura H, Fukagawa S, Iwamoto Y. Mevastatin reduces cartilage degradation in rabbit experimental osteoarthritis through inhibition of synovial inflammation. *Osteoarthritis and Cartilage*. 査読有り、17:235-243, 2009.

[学会発表] (計6件)

1. Akasaki Y, Matsuda S, Kawahara S,

Iwamoto Y. Inhibition of geranylgeranylation reduces MCP-1 production in IL-1 β -stimulated human synoviocytes. *Orthopedic Research Society 2012, 2012.2.4, San Francisco, USA*

2. 松田秀一. 変形性膝関節症における最近のトピックス(招待講演). 福岡労災保険指定病院協会学術講演会. 2011.5.24, 福岡市
3. 中山功一, 松田秀一、他. ADRC を用いた骨軟骨再生 (招待講演). 第24回軟骨代謝学会. 2011.3.5, 福岡市
4. 川原慎也, 松田秀一、他. II-1 β 刺激滑膜細胞において、スタチンはイソプレノイドの合成を阻害することで MCP-1 と MMP-3 の産生を抑制する. 第24回軟骨代謝学会. 2011.3.4, 福岡市
5. 松田秀一. 変形性膝関節症治療の up-to-date(招待講演). 第67回 DOC 研究会. 2010.9.2, 福岡市
6. Akasaki Y, Matsuda S, Nakayama K, Fukagawa S, Miura H, Iwamoto Y. Statins prevent production of monocyte chemoattractant protein-1 and matrix-metalloproteinase-3 in IL-1 stimulated synoviocytes through inhibition of protein isoprenylation. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, February 22-25, 2009, Las Vegas, USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 秀一 (MATSUDA SHUICHI)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：40294938

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：