

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03053

研究課題名(和文) 力学的負荷改善による変形性関節症進行抑制に寄与する因子の解明及び新規治療法の探索

研究課題名(英文) Elucidation of factors contributing to the inhibition of osteoarthritis progression by improving mechanical loading and search for new treatment methods

研究代表者

松田 秀一 (Matsuda, Shuichi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40294938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症に対する高位脛骨骨切り術(HTO)前と1年後の関節内の生物学的環境の変化を調査した。マイクロアレイでHTO後に炎症関連遺伝子の低下と、マクロファージのM1からM2への極性の変化が示唆され、real time PCRおよび、免疫染色により炎症性サイトカインの低下とM2マクロファージへの極性の変化が確認された。メカニズムとして、HTOによりアライメントが適正化され、微小軟骨片が減少し、滑膜マクロファージ内での炎症の抑制とマクロファージ極性の変化が生じていた。HTO後の内反アライメント残存は、関節内炎症の遷延に関連し、適切な手術が重要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで変形性膝関節症において、関節内炎症が改善可能であるのか未知であった。本研究により膝関節のアライメントを適正化することにより、関節内の炎症が可逆的であることが初めて明らかになった。現時点で変形性関節症に対して、病状の進行を止める薬剤は存在せず、一度変形性関節症を発症すると徐々に進行するのみである。本研究によりHTOによるアライメントの適正化が、変形性膝関節症の寛解を目指す可能性のある治療であることが確認された。変形性膝関節症は患者数が非常に多く、健康寿命に大きく影響する疾患であるため、本研究はその治療に対する有意義な発見であり、大きな社会的意義を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated changes in the biological environment in the knee joint before and one year after high tibial osteotomy (HTO) for osteoarthritis. Microarray analysis indicated a decrease in inflammation-related genes and a change in macrophage polarity from M1 to M2 after HTO. Realtime PCR and histological immunostaining confirmed a decrease in inflammatory cytokines and a change in polarity to M2 macrophages. The mechanism of this change was that HTO provided appropriate alignment which brought reduction of cartilage debris, suppression of inflammation in synovium, and change in macrophage polarity. Moreover, residual varus alignment after HTO was associated with prolonged intra-articular inflammation. This means that appropriate alignment after HTO is important.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 手術 マクロファージ 炎症 サイトカイン アライメント

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、関節軟骨の加齢による退行性変化に力学的負荷の増大が加わり、関節軟骨の摩耗を生じ、関節の疼痛および変形をおこし、日常生活に支障をきたす疾患である。膝関節の場合は、大腿脛骨関節の内側コンパートメントに変性が生じることが多く、病状が進行してくると徐々に内反変形が進んでいき、いわゆる **O** 脚の状態になる。そうなりと力学的負荷は更に内側コンパートメントに集中するが、変形の進行と共に荷重負荷があまりかからない外側コンパートメントの変性も進んでくる。ということは変形性膝関節症の病態進行には力学的負荷の直接の影響だけではなく、力学的負荷による炎症性メディエーターなどの影響は無視できないが、そのメカニズムは十分に解明されていなかった。

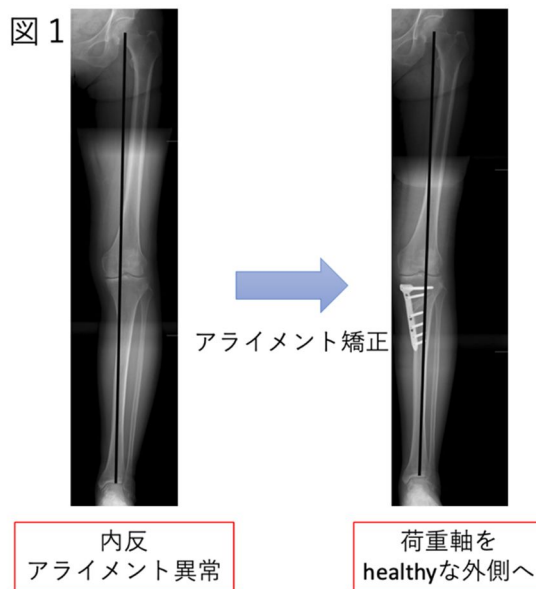
当初も現在でも変形性関節症の軟骨を修復させる薬剤は存在せず、症状の緩和する治療があるのみである。研究開発当初の治験としては、**Nerve growth factor** を抑制し症状と身体機能を改善させる第 3 相試験が終了していた。しかし現在でも未だ認可はされていない。この治療法では病態は改善されず、変形性関節症の病態への介入の難しさが、症状緩和の方向へ研究が向かっている原因と考える。海外では **Wnt** 阻害薬、他家軟骨細胞治療などの治験が行われているが、実用化に至ったものは存在しない。変形性関節症の病態は、完全に解明されたとは言い難く、加齢・解剖的要因・関節不安定性・微小な炎症など様々原因が混在するため、全ての病態に対して改善する治療が難しい状況であった。

2. 研究の目的

本研究においては、高位脛骨骨切り術 (**HTO**) 前後の関節内の状態の変化に着目した。**HTO** は内反アライメントを外反アライメントに変えることにより、症状を改善し変形の進行を予防することができる手術である (図 1)。術前と術後 1 年の関節滑膜の組織、関節液を詳細に検討することにより、力学的環境が劇的に変化したことによる関節内の炎症の変化のメカニズムが把握できるのではないかと考えた。

力学的負荷の悪化に伴う関節内の炎症の悪化という、関節症を進行させる方向への解析はこれまで行われているが、力学的負荷の改善という関節を守る方向への変化が関節内に起きた場合に、軟骨や滑膜にどのような生物学的な変化が起こるのかは未だ詳細には解析されていなかった。実際の臨床のサンプルを用いることで、関節滑膜、関節軟骨においてどのような因子が主たる役割を果たしているかが明らかになる。そしてその役割について詳細な解析を行い、抑制的な作用を加えることで病気の進行を遅らせることができれば、新たな創薬にも結びつく可能性があると考えた。

力学的負荷が滑膜組織の遺伝子発現を変化させ、変形性関節症の増悪に寄与しているという仮説に基づき、主たる役割をもつ因子を探索し、役割を検討することで、局所の力学的負荷により関節全体に変形が広がるメカニズムを解明することが目的であった。



3. 研究の方法

合計 50 例の **HTO** 患者をリクルートできた。手術時、術後約 1 年の抜釘時に滑膜、関節液を採取した。臨床成績として **Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)** を評価した。まず 1 年時のデータが揃った 31 名 (男性 12 名、女性 19 名、平均年齢 61 歳) で解析を行った。初期の 5 例から、質の高い **RNA** を採取できた 3 名を選びマイクロアレイ解析を行った。31 名全員の滑膜から **mRNA** を抽出し、術前から術後 1 年の遺伝子発現変化を検討した。滑膜組織の凍結切片を作成し、**HE** 染色切片の滑膜炎スコアによる解析と、免疫蛍光染色による検討をおこなった。関節液については **ELISA** 法により術前、術後の炎症性サイトカインや、蛋白分解酵素などの液性因子の変化を検討した。また、一部症例において関節液中の軟骨片をカウントし、術前術後の変化を調査した。人工膝関節置換術患者から採取した軟骨を凍結破砕することで軟骨片を作成し、ヒトプライマリー骨髄球由来マクロファージと、ヒトプライマリー滑膜線維芽細胞を軟骨片で刺激して、細胞内の遺伝子発現の変化、タンパク分泌の変化と、マクロファージの極性の変化を観察した。**KOOS** と術後の遺伝子発現の相関について、**Spearman** 相関係数を用いて調査した。また、遅れて抜釘した 5 例を含めて術前、術後の遺伝子発現と下肢アライメントの関係を調査した。

4. 研究成果

マイクロアレイにおいて、**DEG (Differentially Expressed Gene)** の検討を行った(図2)。1年後に有意に減少した遺伝子には炎症性サイトカイン **IL1B, IL6** やマトリックスメタロプロテアーゼの **MMP1, MMP3** や、炎症に関連する転写因子の **JUN, FOS** などが挙げられた。マクロファージ極性には炎症性の **M1** マクロファージ、抗炎症性の **M2** マクロファージがあるが、上昇した **DEG** に **M2** マクロファージ関連の **CCL18** が、低下した **DEG** に **M1** マクロファージ関連の **CCL3** が挙げられた。**DEG** の **Gene Ontology (GO)** を解析すると、**cellular response to tumor necrosis factor, neutrophil chemotaxis, cellular response to IL-1, chemokine-mediated signaling pathway, inflammatory response, monocyte chemotaxis** の発現低下が見られた。

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) パスウェイ解析では、炎症に関連する **Toll-like receptor signaling pathway, Rheumatoid arthritis, TNF signaling pathway** などの炎症関連 **pathway** が有意に低下し、**M2** マクロファージ関連の酸化リン酸化のパスウェイが上昇していた。**Real time PCR** での滑膜遺伝子発現解析では、炎症性サイトカイン(**IL1B, IL6**)の低下、抗炎症型マクロファージ(**M2**) 関連遺伝子(**IL1RA, IL10, CCL18, CD206**)の上昇を認めた。滑膜組織染色で **synovitis score** は有意に改善し、免疫蛍光染色では、**M1** マクロファージのマーカーである **CD80** 染色の減少と、**M2** マクロファージのマーカーである **CD206** 染色の増加が見られた。トータルマクロファージのマーカーとして **CD68** をとり、**CD68** 陽性細胞に対する比を検討すると、**M1** マクロファージ陽性細胞が有意に減少し、**M2** マクロファージ陽性細胞が有意に増加した。関節液の **ELISA** で、低下している液性因子は **IL-1B** のみであった。

高位脛骨骨切り術時および抜釘時の関節液中の軟骨片を定量化した結果、高位脛骨骨切り術後には軟骨片減少を認めた。ヒト末梢血由来プライマリーマクロファージを高位脛骨骨切り術後の関節液、ヒト軟骨片で刺激したところ、関節液刺激ではマクロファージの遺伝子発現は変化なく、軟骨片刺激によって **M1** マクロファージへの極性化が見られた。また、軟骨片刺激によりプライマリーマクロファージの炎症性サイトカイン (**IL1B, IL6**) 遺伝子発現と、**M1** マクロファージマーカーである **CD80** の発現亢進が見られた。ヒト滑膜線維芽細胞は軟骨片刺激において炎症性サイトカイン遺伝子の上昇は認めなかった。軟骨片刺激による炎症性サイトカインのタンパク発現では、プライマリーマクロファージにおいて **IL-1B, IL-6, TNF** が上昇し、ヒト滑膜線維芽細胞では **IL-6** のみが上昇した。

KOOS は高位脛骨骨切り術後、有意に改善し、抜釘時 **KOOS** は、**M2** マクロファージ関連遺伝子の **CCL18** ($r = 0.40$)、**CD206** ($r = 0.36$) の発現と正の相関が(図3)、**M1** マクロファージ関連遺伝子の **CD80** の発現と負の相関があった($r = -0.36$)。

36例においてのアライメントと関連の検討では、%機能軸 (**WBLR**) と炎症性サイトカイン発現は、**IL1B** ($r = -0.43, p < 0.01$)、**IL6** ($r = -0.41, p = 0.01$) において負の相関を認めしたが、**TNF** ($r = -0.04, p = 0.82$) とは相関を認めなかった。**IL6** が改善するための術後 **WBLR** のカットオフ値は **WBLR = 52%** で

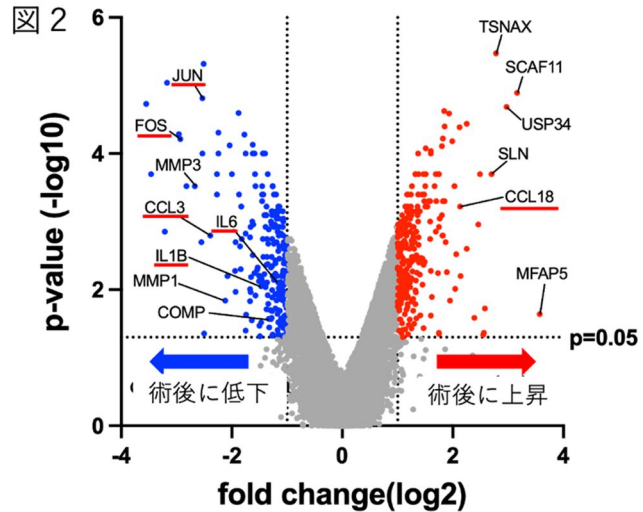


図3

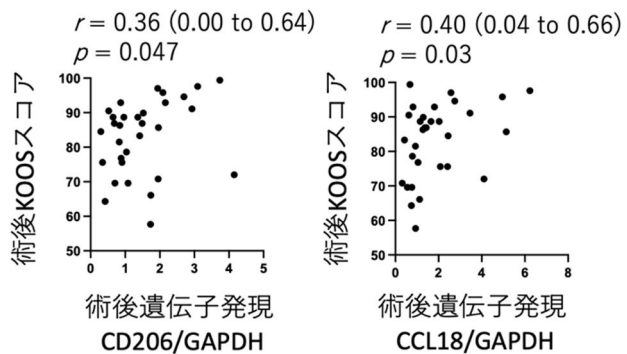
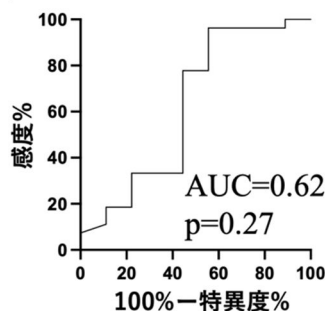
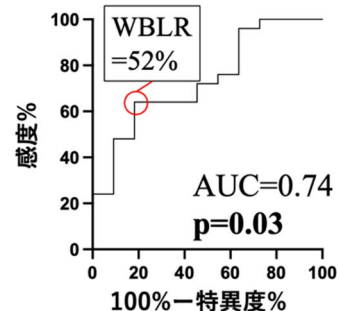


図4 IL1Bの改善に対するROC



IL6の改善に対するROC



あった(図4)。抜釘時には **WBLR** が 52%以下の群では **WBLR** が 52%以上の群に比べて **IL1B** ($p=0.03$)、**IL6** ($p=0.02$)の発現が有意に高値であり、術後 **KOOS** 各スコアはいずれも有意に低値であった。

これらの結果から、**HTO** は軟骨片産生を抑制し、マクロファージの極性を **M1** から **M2** 優位とし、関節滑膜における炎症を改善させることにより、症状および滑膜の炎症を軽減することが示された。高位脛骨骨切り術による下肢アライメントの変化が、変形性膝関節症における関節内環境の生物学的改善をもたらす可能性が示唆された。また、**HTO** 手術手技において、適切な術後アライメントをとることが、術後の関節内炎症の抑制に重要なファクターであることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yabe Taisuke, Nishitani Kohei, Yoshida Shigeo, Yamawaki Yusuke, Morita Yugo, Kobori Yu, Nakamura Shinichiro, Kuriyama Shinichi, Matsuda Shuichi | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Larger bone marrow lesion volume before medial open-wedge high tibial osteotomy correlates with better improvement of clinical scores in patients with knee osteoarthritis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy | 6. 最初と最後の頁 3646-3654 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00167-022-07134-9 | 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 Yoshida Shigeo, Nishitani Kohei, Yoshitomi Hiroyuki, Kuriyama Shinichi, Nakamura Shinichiro, Fujii Takayuki, Saito Motoo, Kobori Yu, Murakami Akinori, Murata Koichi, Ito Hiromu, Ueno Hideki, Matsuda Shuichi | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 Knee Alignment Correction by High Tibial Osteotomy Reduces Symptoms and Synovial Inflammation in Knee Osteoarthritis Accompanied by Macrophage Phenotypic Change From M1 to M2 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Arthritis and Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 950-960 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.42424 | 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 Yoshida Shigeo, Nishitani Kohei, Yamamoto Yosuke, Ito Hiromu, Saito Motoo, Morita Yugo, Nakamura Shinichiro, Kuriyama Shinichi, Matsuda Shuichi. | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Association between Quantitative Lower Limb Arterial Calcification and Bilateral Severe Knee Osteoarthritis. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Mod Rheumatol | 6. 最初と最後の頁 1059-1065 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2020.1868120. | 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 1件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 矢部泰右、西谷江平、栗山新一、中村伸一郎、吉田繁央、森田悠吾、山脇佑介、伊藤宣、松田秀一。 |
| 2. 発表標題 変形性膝関節症に対する高位脛骨骨切り術において、Bone Marrow Lesionの体積が術前後の臨床スコアに関連する。 |
| 3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西谷江平、吉田繁央、栗山新一、中村伸一郎、松田秀一。 |
| 2. 発表標題 高位脛骨骨切り術における術前のBone marrow lesionの体積が、術後の臨床スコア改善に関連する。 |
| 3. 学会等名 JOSKAS-JOSSM 2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉田 繁央、西谷 江平、小堀 悠、藤井 貴之、村田 浩一、中村 伸一郎、栗山 新一、吉富啓之、伊藤 宣、松田 秀一。 |
| 2. 発表標題 高位脛骨骨切り術による下肢アライメント矯正は、関節滑膜における炎症を改善し、滑膜マクロファージの極性をM1からM2優位とする。 |
| 3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西谷江平、矢部泰右、栗山新一、中村伸一郎、松田秀一。 |
| 2. 発表標題 高位脛骨骨切り術における、術前のBone marrow lesionが術前後の臨床スコアに関連する。 |
| 3. 学会等名 第9回日本Knee Osteotomy フォーラム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yu Kobori, Shigeo Yoshida, Kohei Nishitani, Shinichi Kuriyama, Shinichiro Nakamura, Takayuki Fujii, Koichi Murata, Hiromu Ito, Hiroyuki Yoshitomi, Shuichi Matsuda. |
| 2. 発表標題 High tibial osteotomy reduces symptoms and synovial inflammation in knee osteoarthritis by changing macrophage polarization to pro-healing phenotype. |
| 3. 学会等名 13th Biennial ISAKOS congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉田 繁央, 西谷 江平 小堀 悠, 中村 伸一郎, 栗山 新一, 伊藤 宣, 松田 秀一. |
| 2. 発表標題 脛骨骨切り術による下肢アライメント矯正は、膝関節内生物学的環境を改善させる. |
| 3. 学会等名 日本スポーツ整形外科学会2023 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉田繁央, 西谷江平, 吉富啓之, 村田浩一, 藤井貴之, 小堀悠, 中村伸一郎, 栗山新一, 松田秀一. |
| 2. 発表標題 高位脛骨骨切り術後の内反アライメント残存による関節内環境への影響 |
| 3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohei Nishitani, Shigeo Yoshida, Shinichiro Nakamura, Shinichi Kuriyama Shuichi Matsuda. |
| 2. 発表標題 Under-correction was associated with residual proinflammatory gene expressions after high tibial osteotomy. |
| 3. 学会等名 2024 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会) |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 5. 西谷江平, 吉田繁央, 吉富啓之, 藤井貴之, 小堀悠, 村田浩一, 中村伸一郎, 栗山新一, 伊藤宣, 松田秀一. |
| 2. 発表標題 高位脛骨骨切り術による下肢アライメント矯正により滑膜マクロファージの極性はM1からM2優位に変化し関節内炎症が改善する. |
| 3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 松田秀一 |
| 2. 発表標題 変形性膝関節症の治療戦略 |
| 3. 学会等名 第16回日本運動器疼痛学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2023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 | 伊藤 宣 (Ito Hiromu) (70397537) | 公益財団法人大原記念倉敷中央医療機構 (臨床医学研究所 臨床医学研究開発部)・クリニカルサイエンスリサーチグループ・研究員 (85308) | |
| 研究分担者 | 西谷 江平 (Nishitani Kohei) (70782407) | 京都大学・医学研究科・助教 (14301) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|