

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03295

研究課題名(和文)変形性関節症に対する新たな運動療法の確立 - 低酸素によるHIF-1 制御を用いて -

研究課題名(英文) Establishment of a new exercise therapy for osteoarthritis using HIF-1 α regulation by hypoxia

研究代表者

新井 祐志 (Arai, Yuji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50347449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素環境が軟骨代謝に及ぼす影響について *in vivo* で検討した。ラットが正常に飼育可能な低酸素条件を12%に決定した。次にラットOAモデルを作成し、12%酸素下で4週間飼育したが、定常酸素群と有意差は認めなかった。持続的な低酸素環境によるnegative feedbackの影響と考え、間欠的な低酸素環境に変更した。12%酸素および定常酸素に1日おきに入れ替え、計4週間飼育し、膝関節で組織学的検討を行った。軟骨摩耗およびMankin scoreは間欠低酸素群で有意に改善されていた。今後、*in vitro*における検討も含めてさらなる条件設定の検討を進めていく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動療法は変形性関節症(osteoarthritis; OA)に対する有効な保存療法である。また低酸素環境では、低酸素誘導因子hypoxia-inducible factor(HIF)-1 の発現を介して軟骨細胞は恒常性を維持している。低酸素環境下運動療法で、関節軟骨のHIF-1 を賦活化させることにより効率的にOAを予防・治療できるのではないかと考え、まずは低酸素環境の条件の検討を行った。間欠的な低酸素環境において軟骨変性は有意に抑制されていた。今後、*in vitro*における検討および骨格筋に対しても同様にanabolicな効果をもたらすか等の検討を進めていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of hypoxic condition on cartilage *in vivo*. First, we determined 12% oxygen concentration which rats can be bred normally. Next, we bred rats OA model under 12% oxygen or normoxia for 4 weeks, but there was no significant difference. We considered this to be an effect of negative feedback due to sustained hypoxia, so changed to intermittent hypoxia. rats OA model were bred under 12% oxygen and normoxia every other day for a total of 4 weeks, and histological examination of the knee joints. Cartilage wear and Mankin score were significantly improved in the intermittent hypoxia group. We need further investigation of condition settings, including *in vitro* studies.

研究分野：運動器

キーワード：HIF-1 変形性膝関節症 低酸素環境 運動療法

1．研究開始当初の背景

変形性関節症 (osteoarthritis ; OA) は関節軟骨の退行性変化により関節変形をきたし、筋力低下も相まって機能障害をきたす疾患である。運動療法は OA に対する有効な保存療法であるが、OA に伴う疼痛や筋力低下で十分なトレーニングを行うことは難しい。そのため、短時間かつ低負荷で効率的に施行可能な運動療法の開発が求められている。一方、近年では体内での低酸素応答メカニズムの解明により、細胞の生命活動が運動器の分野でも注目され、われわれも十分な知見を積み重ねてきた。低酸素環境では、体内での低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor (HIF) -1 の発現が亢進しており、その下流因子である低酸素応答性の遺伝子発現を介して軟骨細胞は恒常性を維持している。OA では関節内の低酸素環境が破綻していることから HIF-1 は OA の治療の重要なターゲットであり、われわれは、HIF-1 の誘導による関節軟骨の保護効果を明らかにした。また、骨格筋では、HIF-1 を介した分子生物学的な筋力増強作用が明らかになっている。以上より、低酸素環境下では OA により減少した関節軟骨の HIF-1 を賦活化させるとともに、萎縮した骨格筋で HIF-1 の発現を増強させることで、より短時間かつ低負荷な運動療法が施行できると仮説を立てた。この仮説が実現すれば従来の OA に対する運動療法にブレイクスルーを惹き起こす新たな治療戦略になりうると考えた。

2．研究の目的

OA は、X 線学的有病者数が 2500 万人以上と推測されており、高齢化社会の進行とともに今後さらに増加することが予測される。そのため、高齢者の活動能力を維持、増進し、OA を予防できる保存療法の発展が喫緊の課題である。運動療法は簡便、安全、低コストで実践可能なため、社会的ニーズが高い。われわれはこれまで、分子生物学的手法を用いて低酸素に着目したストレス応答機構のメカニズムを探求してきている。低酸素環境には軟骨保護効果、筋力増強作用があるため、低酸素環境における運動療法のメカニズムが明らかとなれば、低酸素を応用したエビデンスに基づいた至適な運動強度や時間が明確となる。われわれはラットの生体内で、軟骨細胞が恒常的に HIF-1 を発現し、トレッドミル走行でその発現が亢進することを明らかにした。一方、筋細胞においても、低酸素環境下およびメカニカルストレスにより HIF-1 を介した筋力増強作用が得られるといった報告がある。以上の背景から、HIF-1 が関節軟骨と骨格筋のメカニカルストレス応答機構にも深く関わっていると推測した。

以上の背景より、本研究の目的は低酸素環境下運動療法で OA により減少した関節軟骨の HIF-1 を賦活化させるとともに、萎縮した骨格筋で HIF-1 の発現を増強させ、短時間かつ低負荷に OA を予防・治療できる運動療法を確立することである。

3．研究の方法

In vivo での検討

(1)低酸素チャンバーの作成および低酸素チャンバー内でのラット飼育

窒素ガス発生装置を用いた酸素濃度を調節可能なチャンバーを独自に作成し、低酸素環境がラットに与える影響を検討した。

6 週齢 wister rat を低酸素チャンバー内で酸素濃度 9% で 1week 飼育した。定常酸素で飼育した rat と比較した際の体重変化、血液検査について評価した。

次に酸素濃度 8% および 12% で 1week 飼育し定常酸素で飼育したラットと比較した際の体重変化、膝関節軟骨での遺伝子発現について評価した。

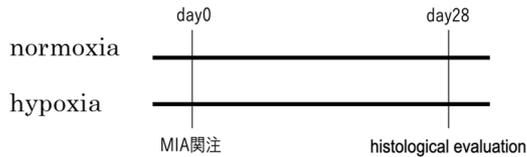
(2)低酸素環境がラット関節軟骨に与える影響の検討

6週齢 wister rat を低酸素チャンバー内で酸素濃度 12%で 2h、6h、12h、24h、48h、96h 飼育し、両膝関節の関節軟骨における低酸素環境下での時間依存的な HIF-1 および HIF-1 の下流因子である VEGF、Aggrecan の遺伝子発現を realtime PCR で評価した。

次に 12%、12h に絞り、遺伝子発現を realtime PCR で評価した。

(3)ラット OA モデルにおける低酸素環境が与える影響の検討

8週齢 wistar rat に MIA0.5mg を関節内投与し、OA model を作成し、低酸素チャンバー内で酸素濃度 12%で 4週間飼育し膝関節を摘出し検討を行った。



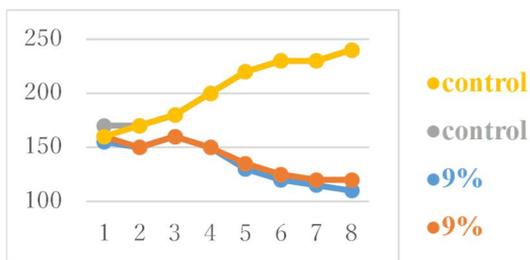
(4)ラット OA モデルにおける間欠的な低酸素環境が与える影響の検討

8週齢 wistar rat に MIA0.5mg を関節内投与し、OA model を作成し、低酸素チャンバー(12%)および定常酸素下に 24h ごとに置き換えた。計 4週間飼育し膝関節を摘出し検討を行った。

4. 研究成果

(1) 定常酸素 (Control) 群と比較して 9%hypoxia 群では体重は著明に減少していた。また血液検査から TG、T-CHO の低下および BUN/Cre 比および電解質の上昇を認めた。体重減少の結果から併せると、9%hypoxia 群で摂餌量、摂水量の問題の可能性と考察した。また hypoxia 群において活動性の低下も認めた。

-体重変化-



-血液検査-

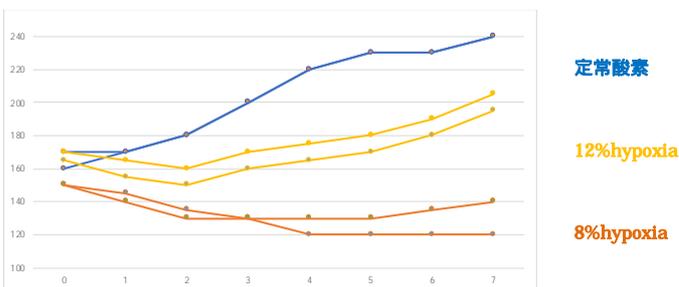
	control	control	9% hypoxia	9% hypoxia	正常値(参考)
TP (g/dL)	5.5	5.3	6.0	6.4	4.8 ± 0.10
ALB (g/dL)	4.1	4.2	4.8	5.2	2.3 ± 0.07
BUN (mg/dL)	25.9	23.4	43.9	28.0	15.6 ± 0.80
CRE (mg/dL)	0.25	0.29	0.36	0.32	0.4 ± 0.04
Na (mEq/L)	142	145	158	150	139.3 ± 0.98
K (mEq/L)	5.4	6.0	5.7	6.2	5.83 ± 0.32
Cl (mEq/L)	99	99	124	114	103.6 ± 1.62
Ca (mg/dL)	11.5	11.6	9.8	10.2	4.76 ± 0.06
IP (mg/dL)	10.4	9.6	8.9	9.6	8.6 ± 0.34
AST (IU/L)	154	124	164	184	84 ± 12.1
ALT (IU/L)	72	77	72	54	33 ± 3.1
LDH (IU/L)	525	446	885	1526	
AMY (IU/L)	1720	1812	394	726	
T-CHO (mg/dL)	85	75	43	56	76 ± 6.7
TG (mg/dL)	72	89	12	26	64 ± 11.3
T-BIL (mg/dL)	0.03	0.02	0.04	0.00	0.15 ± 0.04
GLU (mg/dL)	192	196	124	182	105 ± 4.2

次に 8%hypoxia 群、12%hypoxia 群を定常酸素群と比較した。

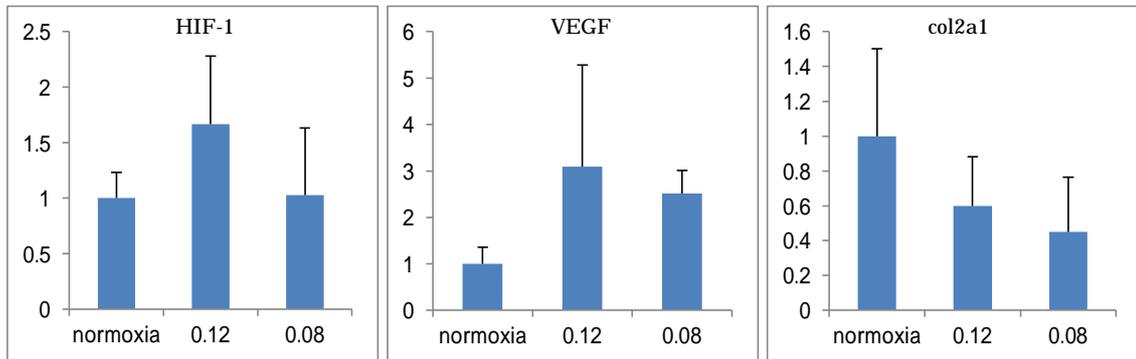
12%hypoxia 群では低酸素環境に順応後、体重は定常酸素群と同様に上昇した。また関節軟骨の PCR では 12%hypoxia 群で HIF-1 および VEGF は上昇していた。

低酸素環境におけるラット飼育の至適濃度を 12%と設定した。

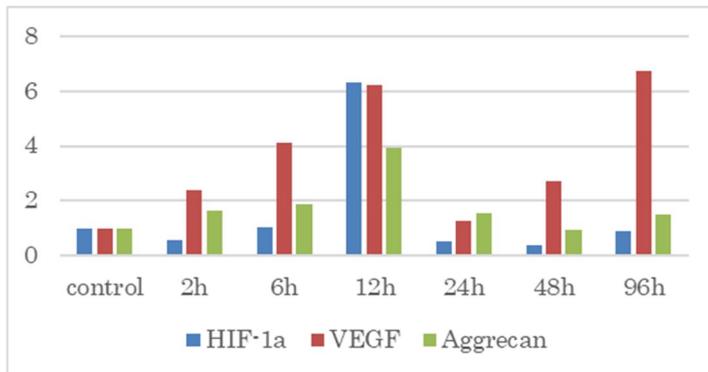
-体重変化-



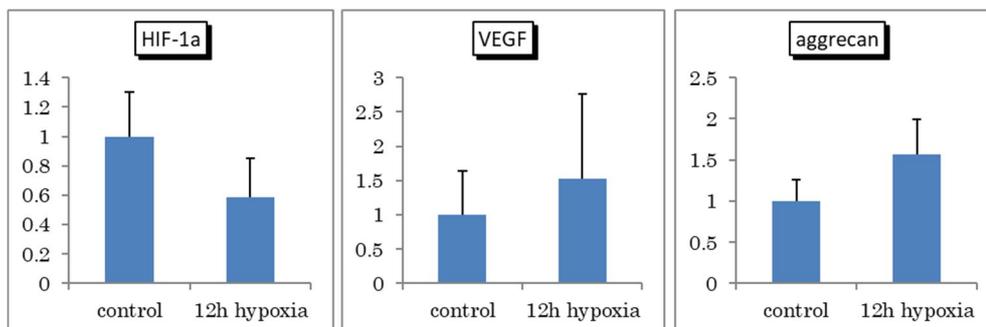
-遺伝子発現-



(2)12%における低酸素環境暴露において 12h で HIF-1 、 VEGF、 ACAN は上昇していた。



12%、12h に条件を絞り、再度検討を行った。HIF-1 の上昇は認めなかったが VEGF、ACAN は上昇傾向であった。HIF-1 に関しては正常ラットでは関節内低酸素環境が破綻していないことによる影響を考慮した。



(3)HIF-1 免疫染色において定常酸素群と 12%hypoxia 群で著変を認めなかった。

原因として持続的な低酸素環境により HIF-1 がダウンレギュレーションされるといった報告があり今回も同様の状況に至ったと考察し、また間欠的な低酸素環境により HIF-1 が漸増するといった報告があるため、間欠的な低酸素環境下での検討を行うこととした。

(4)肉眼的評価（墨汁染色）において間欠的低酸素群(Intermittent Hypoxia:IH)は定常酸素群(Normoxia)と比較して有意に改善していた。

また組織学的検討において IH 群では normoxia 群と比較して軟骨摩耗は抑制されており、軟骨変性のスコアである Modified Mankin score も有意に改善していた

上記結果より、in vivoにおいて間欠的な低酸素環境はHIF-1 および下流因子の発現を介して軟骨保護効果をもたらす可能性がある。今後、in vivoにおけるさらなる条件設定やin vitroにおける検討が必要である。また骨格筋に対しても関節軟骨と同様にHIF-1 の発現上昇を介してanabolicな効果が得られるかの検討が必要である。それらの検討により画期的な低酸素運動療法の道が拓けると確信する。

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 3件）

1. 著者名 Shimomura Seiji, Inoue Hiroaki, Arai Yuji, Nakagawa Shuji, Fujii Yuta, Kishida Tsunao, Shin-Ya Masaharu, Ichimaru Shohei, Tsuchida Shinji, Mazda Osam, Takahashi Kenji	4. 巻 71
2. 論文標題 Mechanical stimulation of chondrocytes regulates HIF-1 under hypoxic conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101574 ~ 101574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2021.101574	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 Kaihara Kenta, Nakagawa Shuji, Arai Yuji, Inoue Hiroaki, Tsuchida Shinji, Fujii Yuta, Kamada Yoichiro, Kishida Tsunao, Mazda Osam, Takahashi Kenji	4. 巻 22
2. 論文標題 Sustained Hypoxia Suppresses Joint Destruction in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis via Negative Feedback of Hypoxia Inducible Factor-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3898 ~ 3898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22083898	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 Kamada Yoichiro, Arai Yuji, Toyama Shogo, Inoue Atsuo, Nakagawa Shuji, Fujii Yuta, Kaihara Kenta, Cha Ryota, Mazda Osam, Takahashi Kenji	4. 巻 24
2. 論文標題 Hypoxia with or without Treadmill Exercises Affects Slow-Twitch Muscle Atrophy and Joint Destruction in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9761 ~ 9761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24119761	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Nakamura K, Inoue A, Kamada Y, Nakagawa S, Cha R, Kaihara K, Arai Y, Mazda O, Takahashi K
2. 発表標題 Sustained hypoxia with treadmill running ameliorates destruction of articular cartilage in a rat model of rheumatoid arthritis
3. 学会等名 70th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中村 恵, 井上敦夫, 下村征史, 新井祐志, 中川周士, 車 龍太, 松田 修, 高橋謙治
2. 発表標題 ラット関節リウマチモデルにおける運動療法が関節軟骨に与える影響の検討
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 中村 恵, 井上敦夫, 中川周士, 車 龍太, 新井祐志, 松田 修, 高橋謙治
2. 発表標題 低酸素環境がラット関節軟骨全層欠損モデルの軟骨修復に与える影響
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 車 龍太, 中川周士, 井上敦夫, 新井祐志, 中村 恵, 貝原健太, 井上裕章, 松田 修, 高橋謙治
2. 発表標題 持続的な低酸素環境によるHIF-1 の発現変化が変形性関節症および関節リウマチに及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoichiro Kamada, Atsuo Inoue, Shogo Toyama, Hiroaki Inoue, Shuji Nakagawa, Yuta Fujii, Kenta Kaihara, Ryota Cha, Yuji Arai, Osam Mazda, Kenji Takahashi
2. 発表標題 Hypoxia with or without treadmill exercises affects slow-twitch muscle atrophy in a rat model of rheumatoid arthritis
3. 学会等名 70th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kei Nakamura, Atsuo Inoue, Shuji Nakagawa, Ryota Cha, Yuji Arai, Osam Mazda, Kenji Takahashi
2. 発表標題 Accelerated cartilage repair under hypoxic conditions in a rat osteochondral defect model
3. 学会等名 2024 OARSI annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kaihara K, Nakagawa S, Inoue A, Arai Y, Fujii Y, Kamada Y, Cha R, Mazda O, Takahashi K
2. 発表標題 SUSTAINED HYPOXIA INHIBITS CARTILAGE DESTRUCTION IN A RAT ARTHRITIS MODEL
3. 学会等名 2022 OARSI annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaihara K, Nakagawa S, Inoue H, Inoue A, Arai Y, Fujii Y, Kamada Y, Cha R, Mazda O, Takahashi K
2. 発表標題 Sustained hypoxia suppresses the production of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial cell via negative feedback of HIF-1
3. 学会等名 2022 ORS annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 貝原健太, 中川周士, 井上敦夫, 新井祐志, 藤井雄太, 鎌田陽一郎, 車 龍太, 松田 修, 高橋謙治
2. 発表標題 持続的な低酸素環境はラット関節炎モデルにおいて軟骨破壊を抑制する
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 Kamada Y, Inoue A, Toyama S, Inoue H, Nakagawa S, Fujii Y, Kaihara K, Cha R, Arai Y, Mazda O, Takahashi K
2. 発表標題 Effect of treadmill running on slow-twitch muscle atrophy in a rat model of arthritis
3. 学会等名 2022 ORS annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kamada Y, Inoue A, Toyama S, Inoue H, Nakagawa S, Fujii Y, Kaihara K, Cha R, Arai Y, Mazda O, Takahashi K
2. 発表標題 Preventive effect of treadmill running on muscle fibrosis in slow-twitch muscle of a rat model of arthritis
3. 学会等名 2022 OARSI annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 貝原 健太、中川 周士、井上 裕章、新井 祐志、藤井 雄太、鎌田 陽一郎、松田 修、高橋 謙治
2. 発表標題 持続的な低酸素環境は HIF-1 のネガティブフィードバックを介して炎症性サイトカインの産生を抑制する
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

1. 発表者名 貝原 健太、中川 周士、井上 敦夫、新井 祐志、藤井 雄太、鎌田 陽一郎、車 龍太、松田 修、高橋 謙治
2. 発表標題 持続的な低酸素環境はラット関節炎モデルにおいて軟骨破壊を抑制する
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022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	松田 修 (Mazda Ozam) (00271164)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	岸田 綱郎 (Kishida Tsunao) (00370205)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	高橋 謙治 (Takahashi Kenji) (30347447)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	中川 周士 (Nakagawa Shuji) (30643382)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

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
---------	---------