

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09305

研究課題名(和文)変形性関節症における力学的負荷に対しスクレロスチンが関節軟骨に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of sclerostin in osteoarthritic articular cartilage under the mechanical loading

研究代表者

熊谷 研 (KUMAGAI, Ken)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10468176

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)：変形性膝関節症(膝OA)の関節内において力学的環境が病態に及ぼす影響とスクレロスチン発現との関連について調査した。高位脛骨骨切り術により膝関節内の力学的環境が改善されると、OAに関連するマーカーの発現が減少し、Wnt/ β -cateninシグナルのアンタゴニストであるスクレロスチンの発現が増加した。このことから、関節軟骨に対する力学的負荷軽減によるOAの病態改善にスクレロスチンが関連することが示唆された。しかしながら、関節軟骨に対する力学的負荷が直接的にWnt/ β -cateninシグナルへ及ぼす影響については不明であり、今後さらなる調査が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、スクレロスチンは膝OAの関節内における力学的負荷に反応して発現し、OAの病態に重要な役割を果たしている可能性が示された。このメカニズムは関節軟骨に対する力学的負荷が炎症性サイトカイン放出や軟骨異化作用を惹起することに関連すると考えられ、今後の研究や臨床応用につながると考えられる。今後は、関節軟骨への力学的負荷とスクレロスチン発現との関係についてさらに調査を進め、OAの進行予防と治療戦略の開発につなげていくことが課題となる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between the effect of the mechanical environment on the pathology of knee osteoarthritis (OA) in the joint and the expression of sclerostin. When the mechanical environment in the knee joint was improved by high tibial osteotomy, the expression of markers related to OA decreased and the expression of sclerostin, an antagonist of Wnt/ β -catenin signaling, increased. This suggests that sclerostin is involved in improving the pathology of OA by reducing mechanical load on articular cartilage. However, the direct effect of mechanical load on articular cartilage on Wnt/ β -catenin signaling is unknown, and further investigation is required.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(膝 OA)は多くの人が罹患し、日常生活動作に大きく影響するにもかかわらず、現在行われている治療は対症療法が主体であり、関節軟骨の変性予防や修復・再生といった本質的な治療技術は未だ確立されていない。本疾患の発症や進行の機序などについての詳細なメカニズム解明が新規治療法の発展に不可欠と考えられる。OAの発症や進行に関する分子メカニズムはいくつか報告されているが、正常な関節軟骨では起こらない「病的な軟骨内骨化」が関与する点に着目し、軟骨内骨化を抑制できればOAの発症や進行を予防できる可能性があると考えた。形態形成を制御する分泌糖蛋白である Wnt は軟骨内骨化に重要な役割を果たすことが知られ、主要伝達経路である β -catenin 依存性のシグナルは軟骨細胞の終末分化を促進し、OAの発症や進展に関与すると考えられている。これまで、Wnt のアンタゴニストであるスクレロスチンに焦点をあて研究を行ってきた。スクレロスチンは早期軟骨分化を促進し、増殖軟骨を維持する一方、後期軟骨分化を抑制し、最終分化の石灰化を阻害する。上記の作用がOAのような力学的負荷が加わる環境下でも確認されるかは不明である。近年 OA の関節軟骨にもスクレロスチンが発現することが報告されているが、その役割については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では膝 OA の発症や進行に関するメカニズムとして、力学的負荷と関節軟骨における Wnt/ β -catenin シグナルを介した軟骨内骨化過程の関与に着目した。「OA のような過剰な力学的負荷が加わる環境下において、スクレロスチンは軟骨内骨化を抑制し、関節軟骨を維持するように作用するか」について検証することを目的として調査を行った。

3. 研究の方法

(1)高位脛骨骨切り術(HTO)術前後における関節液中のスクレロスチンおよび各種関節マーカーの調査

HTO の症例は内反変形を伴い、術前は過剰な力学的負荷が内側コンパートメントに集中するが、下肢アライメントの矯正により術後は関節内の力学的な環境が最適化され臨床症状が改善する。術前、術後(抜釘時)に関節液を採取し、ELISA 法にて各種関節マーカーおよびスクレロスチンの濃度を測定した。

(2)OA 由来軟骨細胞に対する力学的負荷が軟骨分化および Wnt 関連シグナル発現に及ぼす影響の調査

ヒト OA 由来軟骨細胞を軟骨分化誘導培地にて単層培養し、力学刺激培養装置にて伸展の力学的負荷(ストレッチ)をかけ、リアルタイム RT-PCR にて軟骨分化関連マーカーおよび Wnt シグナル関連マーカーの発現を半定量的に評価した。

(3)軟骨細胞分化における炎症性サイトカインの及ぼす影響およびスクレロスチンによる抑制効果の調査

OA の膝関節内では力学的負荷とともに炎症性サイトカインが病態に影響を及ぼす。特に後期軟骨分化に着目し、*in vitro* にて軟骨細胞の培地に 3 週間から IL-1 β (10 ng/ml)を添加し、軟骨内骨化促進への影響とスクレロスチンによる抑制効果について、リアルタイム RT-PCR で評価した。

4. 研究成果

(1)HTO 症例関節液の SOST および関節マーカーの変化(表 1)

下肢アライメントは術前内反から術後外反に矯正された。それに伴い、SOST の濃度は増加し、炎症性サイトカインおよび MMP などの軟骨異化に関連するマーカーが減少した。

(2) OA 軟骨細胞に対するストレッチ負荷の効果(表 2)

力学的負荷に応じて軟骨分化関連マーカーの増加がみられたが、Wnt シグナル関連マーカーの有意な変化はみられなかった。

(3) 軟骨細胞に対する IL-1 β の影響とスクレロスチンによる抑制効果(表 3, 4)

IL-1 β により後期軟骨分化のマーカーと Wnt シグナル関連マーカーの発現が増加した。これらの発現はスクレロスチンの添加により抑制された。

表 1 HTO 術後における関節液中のスクレロスチンおよび各種関節マーカーの濃度

	Pre-op	Post-op	P value	Mean difference (95% CI)	% change
Sclerostin (pg/mL)	640.6±210.4	1066.6±289.7	<0.001	432.8 (358.4, 507.3)	73.8±41.7
IL-1β (pg/mL)	1.4±1.3	1.3±1.2	0.919	0.1 (-0.4, 0.6)	-2.9±26.3
IL-6 (pg/mL)	745.6±571.1	300.2±256.0	<0.001	445.4 (300.7, 590.1)	-49.1±36.0
IL-8 (pg/mL)	89.7±49.9	52.1±22.9	<0.001	37.6 (25.1, 50.2)	-30.2±30.8
IL-10 (pg/mL)	0.80±1.41	0.7±1.6	0.341	0.1 (-0.4, 0.5)	-17.5±85.2
TNF-α (pg/mL)	12.93±6.54	12.7±6.8	0.731	0.2 (-0.9, 1.3)	-1.7±17.0
MMP-2 (ng/mL)	46.43±31.30	25.7±12.7	<0.001	20.8 (11.4, 30.1)	-31.1±38.2
MMP-3 (ng/mL)	525.13±172.68	343.3±97.7	<0.001	181.8 (117.8, 245.9)	-26.3±34.4
MMP-9 (ng/mL)	4.49±3.93	4.7±5.5	0.731	0.2 (-1.2, 1.5)	1.6±30.3
MMP-13 (ng/mL)	361.08±185.17	242.2±185.4	<0.001	118.9 (51.9, 185.7)	-30.8±41.7
VEGF (pg/mL)	1694.72±919.74	894.4±536.7	<0.001	800.3 (595.1, 1005.7)	-42.5±24.6
COMP (ng/mL)	13278.49±2532.1	11622.6±2962.2	<0.001	1655.8 (942.7, 2368.9)	-13.7±18.8

表 2 OA 軟骨細胞に対するストレッチ負荷の効果 (対照との mRNA 発現量比較)

	SOX9	ACAN	Col2	CTNNB	AXIN2	RUNX2
ストレッチ 4 時間	1.38±0.17	1.14±0.22	1.44±0.44	1.09±0.09	1.13±0.16	0.98±0.08
ストレッチ 8 時間	1.65±0.17	1.33±0.22	1.38±0.12	0.95±0.11	0.97±0.05	0.95±0.04

表 3 軟骨細胞に対する IL-1β 添加が分化に及ぼす影響とスクレロスチンによる抑制効果 (対照との mRNA 発現量比較)

	Sox9	Runx2	Col2a1	Col10a1	Adamts5	BMP2
IL-1β	0.2±0.01	0.40±0.10	0.05±0.01	0.23±0.03	3.52±0.36	3.48±0.98
IL-1β+Sclerostin	0.4±0.12	0.80±0.10	0.52±0.12	0.95±0.14	2.78±0.05	1.30±0.41

表 4 軟骨細胞に対する IL-1β 添加が Wnt シグナルに及ぼす影響とスクレロスチンによる抑制効果 (対照との mRNA 発現量比較)

	LRP5	LRP6	Axin1	Axin2	Wnt3a	Ctnnb
IL-1β	0.72±0.11	1.15±0.16	2.03±0.13	1.45±0.03	3.36±0.85	1.81±0.07
IL-1β+Sclerostin	0.55±0.07	1.05±0.08	1.78±0.05	0.74±0.28	2.17±0.23	1.52±0.06

(4)まとめ

膝関節内の力学的負荷とスクレロスチンの発現が関連することが示唆された。しかしながらこの機序は直接的なものではなく、力学的負荷によってもたらされた炎症性変化に伴う可能性が考えられた。OA における力学的負荷とスクレロスチンの役割については未だ不明な点が残されており、さらなる調査が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kumagai K., Fujimaki H., Yamada S., Nejima S., Matsubara J., Inaba Y.	4. 巻 29
2. 論文標題 Changes of synovial fluid biomarker levels after opening wedge high tibial osteotomy in patients with knee osteoarthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.joca.2021.03.013	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0件

〔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
---------	---------