

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592206

研究課題名(和文)変形性関節症の発症機構解明の為に新規動物モデルの確立と関節組織の初期病変の解析

研究課題名(英文) Articular cartilage degradation induced by extensive treadmill exercise is greatly exacerbated by estrogen depletion in mice.

研究代表者

神野 哲也 (Jinno, Tetsuya)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：90343152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症は多因子病でありその発症ならびに変性の進行には様々な要因が考えられている。閉経期におけるエストロゲン欠乏はOA進行に重要な要素であると考えられているがその影響はまだまだ明らかにされていない。今回マウスにおいて閉経期のモデルである子宮摘出と関節内に侵襲を加えることのない強制走行を組み合わせる方法でそれぞれ単独よりも有意に変形性関節症を誘導できることを明らかにした。このことは変形性関節症の発症にmechanical stressだけでなくhormonal effectが強く関わっていることを示唆すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis (OA) is considered to be a multifactorial disease with factors such as chronic inflammation, aging, menopause, obesity, genetic background, and mechanical stress. Estrogen depletion by ovariectomy (OVX) is reported to accelerate cartilage degradation in young female mice. Too much mechanical stress on articular cartilage, which may be caused by overweight, joint instability, or over-exercise, is reported to induce several catabolic factors for articular cartilage. These individual data clearly show that all these factors are involved in the pathogenesis of OA, however, orchestrated effects of these factors in OA progression are still unclear. To analyze the crosstalk between estrogen signal and mechanical stress on articular cartilage homeostasis, we analyzed the severity of cartilage damage after treadmill exercise in OVX mice. Here we reported that degree of articular cartilage degeneration induced by extensive treadmill exercise was greatly exacerbated by OVX.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学&#8226;整形外科学

キーワード：変形性関節症 関節軟骨 メカニカルストレス 卵巣摘除

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(Osteoarthritis, OA)は、慢性の炎症を伴う関節疾患で、関節軟骨の退行性変性および、骨軟骨の増殖性変化を特徴としている。人口に対する変形性関節症の罹患率は、長寿命化が進む先進諸国において近年顕著に増加していることが明らかとなっている。例えば米国では、2005年の統計で2700万人が変形性関節症と診断されており、一年間で入院治療を必要とした患者数は、1993年の32万2千人から2006年の73万5千人へと14年間で倍以上に増加した事がCDC(Centers for Disease Control and Prevention)により報告されている(CDC Prevalence and Most Common Causes of Disability Among Adults. MMWR 58:421-6, 2009)。変形性関節症の最大の愁訴は疼痛である。変形性関節症の進行により関節破壊が進むと、強い痛みにより日常生活、就労に支障をきたし、介護を必要とする例が多くみられることから、変形性関節症の患者数の増加は社会的損失が大きく、今後、高齢化社会に移行していく先進諸国における新たな社会問題となることが懸念されている。

変形性関節症に対する治療指針としては、保存療法(運動療法に疼痛の緩和措置を組み合わせた対症療法)が一般的である。しかしながら、これらの治療法は軟骨の退行変性の原因の特定とその除去を直接目指したものはないため、変形性関節症の進行をある程度抑制する効果が見られても、根本的な解決法(原因療法)とはなっていない。保存療法で十分な効果が得られない場合、すなわち関節組織の変形が進行し疼痛のコントロールが非常に困難な場合には、人工関節置換術の適用となる。現在の人工関節置換術の成績はおおむね満足のいくものであるが、入院治療ならびに長期のリハビリテーションが必要であるため、患者本人及

び社会の経済的損失は多大なものとなっている。

このような点から、変形性関節症に対する効果的な予防法、治療法を開発していくことが火急の課題として求められているわけであるが、その為には、発症の原因ならびに病態の進行機序の理解が必須である。しかしながら、この点に関する系統だった研究は未だ行われていない。変形性関節症は、Kellgren Lawrence の分類に従って関節組織に明らかな病変が確認された場合に確定診断されるが、明らかな関節組織の変性と患者個人が感じる疼痛のレベルに非常に大きな個体差が存在するため、初診時における関節軟骨の変性の程度は千差万別である。そのため、人を用いたスタディでは、変形性関節症の発症や初期の関節組織の変化を同定し、症状がどの様に進行していくかを観察することは難しく、進行の分子メカニズムを系統立てて解析することが非常に困難である。このことから、この問題を解決するためには、ヒトの変形性関節症を効率よく再現できるマウスモデルの確立が有効であると考えられるが、現在までにそのようなモデル系は確立されていない。現在最も用いられているマウスモデルは、前十字靭帯、内側半月板、内側側副靭帯のすべてもしくは一部を外科的に切除し、膝関節の不安定化を誘導するモデルであるが(Kamekura et al, Osteoarthritis Cartilage 13:632-41, 2005 等)、これらモデル系は、関節包ならびに滑膜を損傷し、侵襲による急性の炎症を関節組織に誘導するため、ヒトの変形性関節症の発症ならびに病態の進行を再現する生理的実験動物モデルとは言い難い。

変形性関節症の発症原因の一つとして考えられているものは、筋力の低下に伴う関節の不安定化や異常なメカニカルストレスによる関節軟骨の摩耗亢進である。関節軟

骨基質の破片が誘因となって関節内に炎症が惹起され、結果として退行性変性と疼痛が誘引されると考えられている。軟骨破片による炎症が生じなくても軟骨基質の摩耗の進行により関節周囲組織の負荷の増大や疼痛閾値の低下が生じることで関節周囲痛が生じる可能性が示唆されている。本研究では、この考えに着目し、トレッドミルを用いた運動負荷による関節軟骨の退行性変性モデルの確立を試み、ヒトの変形性関節症の病態との類似性および再現性の検証を行うことを目標の一つとする。

変形性関節症は、多因子疾患であり、閉経や閉経に伴う骨粗鬆症、肥満等はその危険因子として報告されている。そこで本研究では、閉経後の女性に多くみられる変形性関節症(OA)の進行に対して、トレッドミルによる膝関節軟骨へのメカニカルストレスの付加が関節軟骨の退行変性に対して及ぼす効果をあわせて検討する。

本研究で検討予定の動物モデルの最大の特徴は、外科的手法に拠らない点である。よりヒトの病態に近い状態でモデルを作成するため、今まで行うことができなかった関節周囲痛の評価モデルにも応用出来る可能性があり、学術的価値が非常に高いと考える。また、本研究では、動物種としてマウスを用いる。マウスは、卵巣摘除による骨粗鬆症モデルや高脂肪食による肥満モデル等種々の有用な実験モデルをあわせて評価できるだけでなく、遺伝子変異のライブラリーが充実しており、将来的に変形性関節症に関わる遺伝子の生理機能の解析の良いいn vivoモデルとして本実験系を用いることができ今後の発展も期待できる。本研究は、変形性関節症の病態の理解と新規治療法、治療薬の開発に貢献できる可能性がある点で意義があると考えられる。

2. 研究の目的

変形性関節症は、その分子基盤が十分に解明されていない為、発症並びに進行を抑制できる治療法、治療薬は未だ確立されていない。変形性関節症に関する基礎研究を困難としている要因の一つとして、病態を効率よく再現出来る動物モデルが確立されていない点が挙げられる。本研究では、変形性関節症において関節およびその周囲組織に生じる初期の変性の解析を可能とする、非侵襲のマウス変形性関節症モデルの確立を試み、変形性関節症の発症ならびに進行の分子メカニズムを解明することを目的とする。

- 1.運動負荷による関節軟骨の退行性変性モデルの確立と再現性の検証
- 2.代謝異常(閉経後骨粗鬆症)マウスを用いた、変形性関節症の発症との因果関係の検討

3. 研究の方法

(a) 運動負荷による関節軟骨の退行性変性モデルマウスの確立

私たちは、過去の研究でトレッドミルを用いたラットの軟骨損傷モデルの報告を行ってきた。(Sekiya et al., J Orthop Res 27:1088-92, 2009)。この実験結果を参考に、マウスを用いた運動負荷による関節軟骨変性モデルの確立と検証を試みる。

マウスは、特別に記述しない限り、8-10週齢の雌を用いる。運動負荷は室町機械のトレッドミル(model#MK-680R5)を用いる。実験のコントロールとして、同週齢のマウスを同期間ケージ内で飼育したマウスを用いる。マウスをトレッドミルに適応させるため、最初の一週間は12m/minで10分、5日間歩行させる。その次の週から6週間、20m/minで100分、週5日強制走行を行う(合計60km)。試験終了後、左膝は4%PFAにて固定後パラフィン切片を作成し、組織学的検査を行う。右膝関節はIndia

Ink で染色し関節軟骨の損傷をマクロレベルで観察した後 70%エタノールで固定し、マイクロCT(Comscan ScanXmate-E090)を用いて、軟骨下骨の構造の解析を行う。

(b) 代謝異常(閉経後骨粗鬆症)マウスを用いた、変形性関節症の発症との因果関係の検討

変形性関節症のリスクファクターとして報告されている閉経(に伴う骨密度の低下)が運動負荷モデルにおいて関節軟骨の変性をどの程度増悪させるかを評価するため、卵巣摘除マウスを用いて、同様の運動負荷試験を行う。

4. 研究成果

8週齢のメスBalb/cマウスに対して卵巣摘除を施行し、卵巣摘除1週間後より、6週間強制走行させた(20m/min、100分/日、5日/週)。走行終了後、子宮重量の測定とともに、膝関節を組織学的に解析した。卵巣摘除の有無、強制走行の有無で、4群(卵巣摘出のみ、卵巣摘出+走行、偽手術のみ、偽手術+走行、各群n=6)に分けて、関節軟骨の退行変性の重症度を組織学的に比較検討した。

卵巣摘除群では全例子宮標本の重量がコントロール群と比較し有意に軽く、子宮の萎縮が認められ、卵巣摘除が適切に行われたことを確認した。関節軟骨の組織像では、正常コントロールと比較し、卵巣摘除群及び強制走行群では有意な差を認めなかった。しかし卵巣摘除して強制走行させた群では、正常コントロールと比較し有意に軟骨基質の染色性が低下した($p<0.05$)。またこれらは、半月板の変性を伴っていた。

私たちはこれまでラットに強制歩行させると、関節軟骨が早期に変性し、軟骨変性に対する薬剤の関節内投与の効果を検討するのによいモデルであることを報告した。しかしマウスは強制歩行のみでは軟骨変性が得られず、重量を含めた種の違いが影響したと

推察される。今回卵巣摘除と強制走行を組み合わせることにより、関節内に侵襲を加えることなく軟骨変性を起こさせることが可能であった。このことは変形性関節症の発症にmechanical stressとhormonal effectが協動的に関与することを示しており、本研究結果が多因子疾患である変形性関節症の発症機序の解析に有用であることを示唆している。

ヒトにおいて、変形性関節症の罹患率は、白人、黒人、黄色人種等、遺伝的背景や生活様式の差によっても異なることが示されている。そこで、本研究では、卵巣摘除と強制走行のコンビネーションにより確認された関節軟骨の退行変性の重症度が遺伝的背景の差により異なるかを検証するため、同条件の試験をC57Bl/6マウスに対して施行した。

本実験においても卵巣摘除群では全例子宮標本の重量がコントロール群と比較し有意に低く、卵巣摘除が適切に行われたことを確認した。また骨のパラメーターであるBMD, BV/TVに関しては卵巣摘除単独群で他群に比べ有意に低下していた。しかし卵巣摘除して強制走行させた群では、軟骨の染色性や骨パラメーターの低下は認めなかった。

C57Bl/6Jマウスの結果が、Balb/cマウスの結果と異なったことは、遺伝的背景の差による変形性関節症の罹患率の変化を科学的に検証する良いモデル系となることを示唆している。この変化が、エピジェネティックな制御によるものなのか、SNP等の遺伝子の配列情報の差異が原因となっているかについての確証は得られていないが、この点が今後の検討課題である。

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16件、全て査読あり)

1. Aizawa, J., Masuda, T., Hyodo, K., Jinno, T.

- Yagishita, K., Nakamaru, K., Koyama, T., and Morita, S. (2013). Ranges of active joint motion for the shoulder, elbow, and wrist in healthy adults. *Disabil Rehabil* 35, 1342-1349.
2. Futami, I., Ishijima, M., Kaneko, H., Tsuji, K., Ichikawa-Tomikawa, N., Sadatsuki, R., Muneta, T., Arikawa-Hirasawa, E., Sekiya, I., and Kaneko, K. (2012). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium. *PLoS One* 7, e45517.
 4. Hatsushika, D., Muneta, T., Horie, M., Koga, H., Tsuji, K., and Sekiya, I. (2013). Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit massive meniscal defect model. *J Orthop Res* 31, 1354-1359.
 5. Hatsushika, D., Muneta, T., Nakamura, T., Horie, M., Koga, H., Nakagawa, Y., Tsuji, K., Hishikawa, S., Kobayashi, E., and Sekiya, I. (2014). Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage*.
 6. Katagiri, H., Muneta, T., Tsuji, K., Horie, M., Koga, H., Ozeki, N., Kobayashi, E., and Sekiya, I. (2013). Transplantation of aggregates of synovial mesenchymal stem cells regenerates meniscus more effectively in a rat massive meniscal defect. *Biochem Biophys Res Commun* 435, 603-609.
 7. Matsukura, Y., Muneta, T., Tsuji, K., Koga, H., and Sekiya, I. (2014). Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury. *Clin Orthop Relat Res* 472, 1357-1364.
 8. Miyatake, K., Tsuji, K., Yamaga, M., Yamada, J., Matsukura, Y., Abula, K., Sekiya, I., and Muneta, T. (2013). Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 431, 52-57.
 9. Nakamura, T., Sekiya, I., Muneta, T., Hatsushika, D., Horie, M., Tsuji, K., Kawarasaki, T., Watanabe, A., Hishikawa, S., Fujimoto, Y., *et al.* (2012). Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs. *Cytherapy* 14, 327-338.
 10. Okuno, M., Muneta, T., Koga, H., Ozeki, N., Nakagawa, Y., Tsuji, K., Yoshiya, S., and Sekiya, I. (2014). Meniscus regeneration by syngeneic, minor mismatched, and major mismatched transplantation of synovial mesenchymal stem cells in a rat model. *J Orthop Res* 32, 928-936.
 11. Ozeki, N., Muneta, T., Koga, H., Katagiri, H., Otabe, K., Okuno, M., Tsuji, K., Kobayashi, E., Matsumoto, K., Saito, H., *et al.* (2013). Transplantation of Achilles tendon treated with bone morphogenetic protein 7 promotes meniscus regeneration in a rat model of massive meniscal defect. *Arthritis Rheum* 65, 2876-2886.
 12. Sekiya, I., Ojima, M., Suzuki, S., Yamaga, M., Horie, M., Koga, H., Tsuji, K., Miyaguchi, K., Ogishima, S., Tanaka, H., *et al.* (2012). Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res* 30, 943-949.
 13. Suzuki, N., Mizuniwa, C., Ishii, K., Nakagawa, Y., Tsuji, K., Muneta, T., Sekiya, I., and Akazawa, C. (2014). Teneurin-4, a transmembrane protein, is a novel regulator that suppresses chondrogenic differentiation. *J Orthop Res* 32, 915-922.
 14. Suzuki, S., Muneta, T., Tsuji, K., Ichinose, S., Makino, H., Umezawa, A., and Sekiya, I. (2012). Properties and usefulness of aggregates

of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther* 14, R136.

15. Yamaga, M., Tsuji, K., Miyatake, K., Yamada, J., Abula, K., Ju, Y.J., Sekiya, I., and Muneta, T. (2012). Osteopontin level in synovial fluid is associated with the severity of joint pain and cartilage degradation after anterior cruciate ligament rupture. *PLoS One* 7, e49014.

16. Yamauchi, Y., Jinno, T., Koga, D., Asou, Y., Morita, S., and Okawa, A. (2012). Comparison of different distal designs of femoral components and their effects on bone remodeling in 1-stage bilateral total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 27, 1538-1543.

[学会発表](計 17 件)

1. Miyatake K, Tsuji, K., Yamada M, Kahaer A, Matsukura Y, Sekiya I., Muneta T.

Articular cartilage degradation induced by extensive treadmill exercise is greatly exacerbated by estrogen depletion in mice. 2012 Osteoarthritis Research Society International(OARSI), Poster, Barcelona , Spain,2012.4.26.

2. Miyatake K, Tsuji, K., Yamada J, Matsukura Y, Kahaer A, Arai Y, Sekiya I., Muneta T.

Articular cartilage degeneration and synovitis observed in the ovariectomized mice are greatly exacerbated by forced running.

2013 Orthopaedic Research Society(ORS) , poster, Henry B Gonzalez Convention Center, San Antonio, 2013.1.26.

3. Yamada J, Tsuji, K., Miyatake K, Matsukura Y, Kahaer A, Arai Y, Sekiya I., Muneta T.

Forced running (60km in 6wks) reverses bone and articular cartilage degeneration induced by ovariectomy in C57Bl/6 mice.

2013 Orthopaedic Research Society(ORS), Poster, Henry B Gonzalez Convention Center, San Antonio,2013.1.26.

4. 宮武和正、辻邦和、山田淳、Kahaer Abula、松倉遊、関矢一郎、宗田大. 変形性関節症(OA)発症における卵巣摘出と強制走行の影響。第 25 回日本軟骨代謝学会、ポスター発表、名古屋、2012.3.9

5. 宮武和正、辻邦和、山田淳、松倉遊、Kahaer Abula、大川淳、関矢一郎、宗田大. 変形性関節症(OA)発症における卵巣摘除と強制走行の影響。第 27 回日本整形外科基礎学術集会、ポスター発表、名古屋、2012.10.26.

6. 山田淳、辻邦和、宮武和正、松倉遊、Kahaer Abula、新井嘉則、大川淳、関矢一郎、宗田大. C57Bl/6 マウスにおいて 6 週 60km の走行負荷は卵巣摘除後の関節軟骨退行変性を抑制する。第 27 回日本整形外科学会基礎学術総会、口演発表、名古屋、2012.10.27.

7. 山田淳、辻邦和、宮武和正、松倉遊、Kahaer Abula、関矢一郎、宗田大. 変形性膝関節症に対する三次元歩行解析の有用性について。第 5 回日本運動器疼痛学会、ポスター発表、東京、2012.11.17.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神野哲也 (JINNO Tetsuya)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号 : 90343152

(2)研究分担者

辻 邦和 (TSUJI Kunikazu)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・寄付講座准教授
研究者番号 : 20323694

宗田 大 (MUNETTA Takeshi)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号 : 50190864

関矢一郎 (SEKIYA Ichiro)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・教授
研究者番号 : 10345291