

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791642

研究課題名(和文) アデノシン三リン酸代謝に注目した変形性膝関節症の治療と進行度の予測

研究課題名(英文) Treatment and anticipation of progression of osteoarthritis of knee based on adenosin triphosphate pathway

研究代表者

熊橋 伸之 (Kumahashi, Nobuyuki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：00457178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症(膝OA)患者の滑膜細胞において、免疫染色ではP2X7受容体の発現を14例中全例に陽性細胞を認め、その内3例に強陽性細胞を認めた。一方でコントロール群は4例中1例のみ弱陽性細胞が認めただけであり、膝OA患者の滑膜において有意にP2X7受容体が発現していた。さらに陽性群では強陽性群と比較し、有意に膝OAが進行していた。一方、日本白色家兔OAモデルにおいて、対照群(生理食塩水関節内注射)と比較し、HA(分子量90万)関注群、P2X7受容体blocker(oATP)+HA(分子量90万)関注群においては深層の基質の染色性が保たれていた。

研究成果の概要(英文)：In the human OA groups, the synovial cells were stained positive for P2RX7 receptor in all 14 OA patients; 3 were stained strongly positive on immunohistochemical examination. In the control group, the cells in one of four patients stained positively, but only weakly. There was a significant difference in expression of P2RX7 receptor between the two groups. In addition, the group stained positively advanced OA compared to the one stained strongly. In the rabbit OA models, the deep layer of cartilage matrix was stained more strongly in the HA and oATP+HA groups than in the control group.

We conclude that the degree of P2X7 receptor expression in the synovium is associated with OA progression, and that the P2X7 receptor may be involved in the pain mechanism pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：変形性膝関節症 滑膜 アデノシン三リン酸 P2X7受容体 疼痛

1. 研究開始当初の背景

アデノシン三リン酸(以下 ATP)は体内エネルギー物質として有名であるが、近年炎症性物質 (Berenbauf, 2004) や細胞間情報伝達物質 (Graf, 2000) として注目されている。我々は軟骨細胞同士が、ATP からカルシウムを介して情報伝達していることを報告 (Kohno T *et al*, Cell Biochem Funct, 2006) し、さらに成体では修復されない軟骨損傷が胎児ラットでは修復することを報告し、その初期修復過程においては ATP が関与していることを報告した。(Kumashashi N *et al*, Cell Tissue Res, 2004) 一方で関節炎をおこしたラットにおいて皮膚の神経末端の ATP の受容体である P2X7 receptor を選択的に block する薬剤 (oATP) を足部に局注することで疼痛が軽減したとの報告 (Dell'Antonio *et al*, Arthritis Rheuma, 2002) もある。また軟骨細胞においては ATP 受容体である P2Y2 receptor の存在 (Leong *et al*, Biochim Biophys Acta, 1994) も確認されており通常の状態では低いレベルで ATP を放出し、関節内の恒常性 (ホメオスターシス) を保っている。一方で膝 OA 患者における関節内の ATP 代謝や関節液中の ATP と疼痛との関連においては近年不明な点が多かった。そこで我々は膝 OA 患者においてヒアルロン酸製剤を用いることで、関節液中の ATP レベル (μM) と膝痛との関連を報告した (Kumashashi N *et al*, Knee, 2010)。損傷軟骨細胞は細胞内の ATP (mM) を放出し、関節液中の ATP レベルを上昇させている可能性がある。特に疼痛において ATP は pro-inflammatory factor であり、関節内の ATP レベルをコントロールすることは、

膝痛を制圧できる可能性を秘めているといっても過言ではない。さらにラット関節炎の膝において、滑膜にも ATP 受容体である P2X7 受容体が発現しているとの報告から (Seino D *et al*, Pain, 2006) 膝 OA 患者の関節液中の ATP 濃度が上昇することで滑膜内の P2X7 受容体を介し、C fiber がリン酸化され脊髄後根神経節から大脳皮質に信号が伝達し疼痛を感じる回路が考えられる。そこで申請者はヒト OA 患者の滑膜中に P2X7 受容体が発現し、その発現が膝 OA の進行と関連があると仮説を立てて本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、疼痛に關与する滑膜細胞に存在する P2X7 受容体をブロックすることによる軟骨の組織学変化を他の薬剤と比較し明らかにする。さらに膝 OA 群患者の滑膜において疼痛に關与する P2X7 受容体の発現の有無と、膝痛のない患者群と比較し、P2X7 受容体の発現に差があるかどうかを明らかにする。さらに P2X7 受容体の発現の差と膝 OA の進行の程度と関連があるかどうかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

() 日本白色家兎を用いて変形性膝関節症モデル (外側半月板内 1/2 ~ 1/3 部分切除、足底筋腱切離、外側側副靭帯切離) を作製した。その後、分子量 90 万ヒアルロン酸 (HA)、分子量 600 万ヒアルロン酸 (HA)、ATP P2X7 receptor blocker (168 μM oATP, Sigma, A6779-25MG)、ATP P2X receptor blocker (0.5 μM TNP-ATP, Sigma, T4193-1MG)、

分子量 90 万ヒアルロン酸(HA) + ATP P2X7 receptor blocker (oATP)を左関節内にそれぞれ 0.3ml 投与 (1回/週、5 週間連続投与)、分子量 600 万ヒアルロン酸(HA) (1回/週、3 週間連続投与)を左関節内注射し、右膝関節内にはコントロールとして生理食塩水 0.3ml 関節内投与 (1回/週、5 週間連続投与)をそれぞれ左右の膝に同時に行った。関節内注射後 6 週で sacrifice し、両膝を摘出し EDTA にて脱灰後、パラフィン標本を作製し、サフラニン O 染色にて最荷重部の組織学的評価を行った。

() 変形性膝関節症(OA)患者に対し人工膝関節置換術(TKA)を行った OA 群 14 名(男性 1 例、女性 13 例、平均年齢 74 歳)とコントロール群として前十字靭帯再建術後の抜釘患者 2 例、膝棚障害患者 1 例、半月板損傷患者 1 例の計 4 名(男性 3 例、女性 1 例、平均年齢 27 歳)の関節内の増殖した滑膜(膝蓋上嚢、内側または外側 gutter、顆間窩、膝蓋下脂肪体のいずれかから採取)を術中に摘出し、これらの滑膜をパラホルムアルデヒドにて組織の固定を行った。脱灰後パラフィン包埋を行い、組織標本を作製した。疼痛に関与していると報告されている ATP 受容体である P2X7 受容体の発現の有無について免疫染色 (Anti-P2RX7 body produced in Rabbit, Sigma, 1 μ g/ml) を用いて P2X7 受容体の発現の有無の評価を行った。さらに P2X7 受容体の発現の強陽性群と陽性群の間で、膝 OA の進行度、すなわち大腿脛骨角度 (FTA $^{\circ}$) の変化 (| FTA-175 $^{\circ}$ |) との関連について調査した。

4. 研究成果

() コントロール群において、全層の染色性が低下していた(図 1 a)。oATP 群 (図 1 b)、TNP 群 (図 1 c)、分子量 600 万 HA 群 (図 1 e) においてはコントロール群 (図 1 a) 同様全層の染色性が低下していた。一方分子量 90 万 HA 群 (図 1 d)、oATP + 分子量 90 万 HA 群 (図 1 f) においては、深層の染色性が保たれていた。

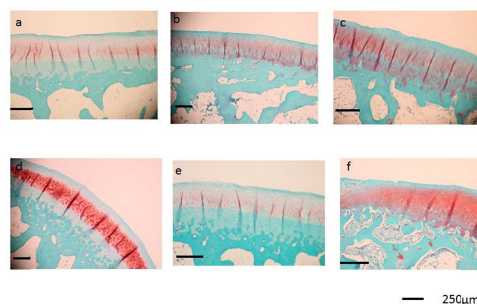


図 1

() 免疫染色結果は、OA (TKA) 群で P2X7 受容体の発現を 14 例中全例が陽性 (図 2 右)、そのうち 3 例が強陽性であった。一方コントロール群は 4 例中 3 例が陰性 (図 2 左)、1 例が弱陽性であり、膝 OA 滑膜においてコントロール群と比較し有意に P2X7 受容体が発現していた ($P=0.0003$, Fisher ' s exact probability test)。さらに P2X7 受容体の陽性群の FTA 変化 ($^{\circ}$) は、 $11.2 \pm 8.6 ^{\circ}$ 、強陽性群 $3.0 \pm 1.0 ^{\circ}$ で、P2X7 受容体陽性群において有意に膝 OA が進行していた ($P=0.03$, Mann-Whitney test、図 3)。

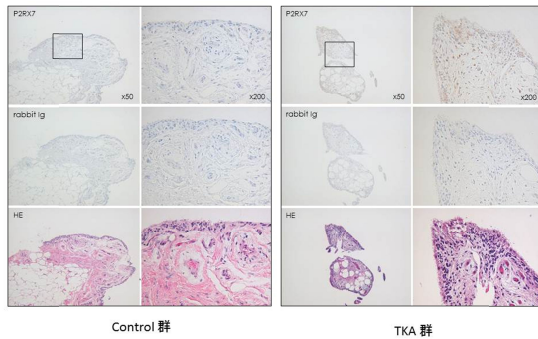


図 2

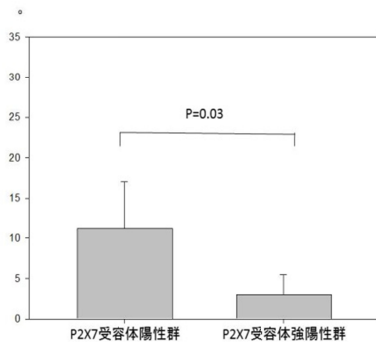


図 3

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊橋 伸之 (KUMAHASHI, NOBUYUKI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：00457178

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

内尾 祐司 (UCHIO, YUJI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：20223547、

桑田 卓 (KUWATA, SUGURU)

島根大学・医学部・助手

研究者番号：80509000