

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462286

研究課題名(和文) 血友病性関節症の新しい治療法開発に関する研究

研究課題名(英文) Development of new therapy for hemophilic arthropathy

研究代表者

廣瀬 旬 (Hirose, Jun)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00456112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血友病Bモデルマウスに膝関節内出血を惹起することにより血友病性関節症モデルを作成して解析を行った。時間経過とともに関節破壊が進行することをマイクロCTおよび組織像にて確認した。免疫染色などを行うことにより炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6の発現が上昇していることが確認され、これが関節炎症の一因と考えられた。また、穿刺した膝関節の滑膜に破骨細胞が存在し、滑膜細胞が破骨細胞分化に必須の因子であるRANKLを発現していることも明らかとなった。

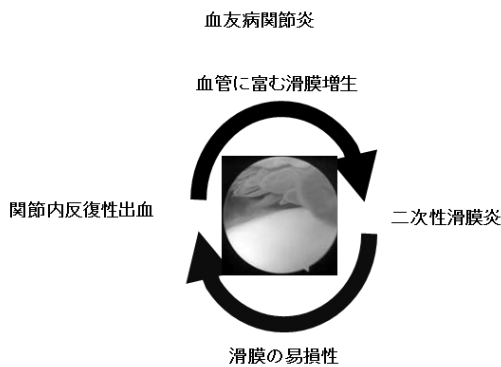
研究成果の概要(英文)：We made a hemophilic arthropathy model by inducing knee internal hemorrhage to hemophilia B model mice and analyzed them. We confirmed that joint destruction progressed with a time course by micro CT and histology. It was confirmed that TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 which were inflammatory cytokines increased by performing immunostaining. These results suggest that the increase of inflammatory cytokines is a potential cause of inflammation in hemophilic arthropathy. Osteoclasts were present in the synovium of the punctured knee and it was found that synovial cells expressed RANKL which is the factor indispensable for osteoclasts differentiation.

研究分野：整形外科学

キーワード：血友病性関節症 血友病 モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

血友病は先天性の凝固異常症の中でも最も頻度が高い疾患であり、幼少期より関節内・筋肉内・頭蓋内などの特に身体の深部に出血を繰り返す。補充療法の発達した現在においても血友病性関節症による関節の痛みや可動域制限などの機能障害は血友病患者の日常生活動作 (ADL) および生活の質 (QOL) を大きく制限する。血友病性関節症のメカニズムについてはいまだ不明な点も多いが、関節内出血を繰り返すことにより、ヘモジデリンによる直接の軟骨障害および、免疫反応により引き起こされる関節炎により関節構造体に不可逆性の損傷が生じることにより血友病性関節症が進行する。



関節リウマチの関節炎においては増殖した滑膜が interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosis factor- (TNF-) などの炎症性サイトカイン, MMP (matrix metalloproteinase) やカテプシンなどのプロテアーゼを産生し、これらが骨・軟骨の破壊に関与していると考えられるが、血友病患者の出血後に滑膜炎を起こした関節においても TNF-、IL-1、IL-6 などのいわゆる炎症性サイトカインの発現が亢進していることが報告されており (Haemophilia 14:3, 2008、J Bone Joint Surg Br 80:540, 1998) 血友病性関節症の進行メカニズムには関節リウマチの関節破壊のメカニズムと多くの部分で共通していると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では、血友病 B モデルマウスにおいて関節内出血を惹起した後、時間経過を追っ

て関節の変化を画像的 (Xp、MRI) および組織学的に検討することにより、血友病性関節症の進展過程を詳細に検討する。また、炎症を起こした滑膜を採取して RNA を抽出し、この RNA を逆転写した cDNA を DNA マイクロアレイに提出して関節炎局所における発現遺伝子のプロファイルを解析する。さらに、出血を惹起させた関節に抗 TNF 抗体や抗 IL-6 抗体などの抗サイトカイン製剤を注入することにより、関節症の進行を防止できるかどうかを検討することを目的とした。

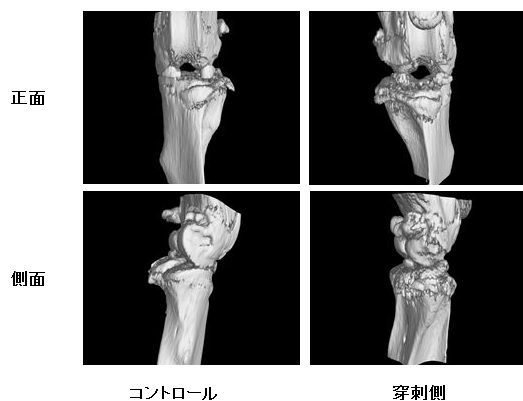
## 3. 研究の方法

第 凝固因子に遺伝子変異を有する 12 週齢の血友病 B モデルマウスおよびコントロールの野生型マウスにイソフルレンにて麻酔をかけ、後肢膝関節部の剃毛を行った。右膝蓋骨の下縁より 30 ゲージ針を用いて関節内の穿刺を行って関節内出血を惹起した。左膝関節は穿刺を行わずコントロールとした。穿刺後、時間経過を追ってレントゲン写真およびマイクロ CT を撮影して関節症の進行を確認した。また、穿刺後、1 日後、14 日後、30 日後に膝関節を含めて大腿骨および脛骨を摘出した。この組織はレントゲン撮影を行った後に固定・脱灰を行い、薄切標本を作成した。組織は hematoxylin and eosin (H&E) 染色や Alcian blue 染色、Safranin-O 染色などを行い、顕微鏡下に観察して関節症進行の程度を評価した。さらに、組織切片を Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行うことにより破骨細胞を検出し、破骨細胞の血友病性関節症の進行への関与についても検討した。作成したマウス膝関節の組織切片に TNF-、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインに対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、これらの発現状況を組織レベルで確認した。さらに、関節炎を生じた膝関節より滑膜組織を採取し、

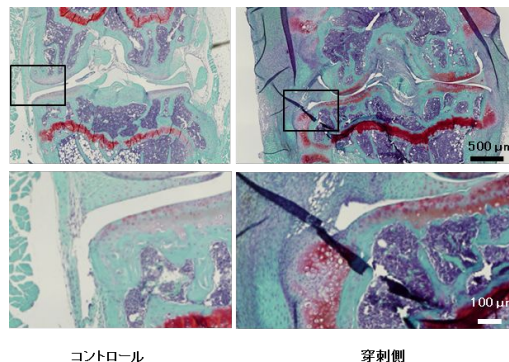
ここから RNA の抽出を行った。この RNA から逆転写を行って cDNA を合成し、real-time PCR を行うことにより炎症性サイトカインや破骨細胞分化因子である RANKL などの発現を確認した。

#### 4. 研究成果

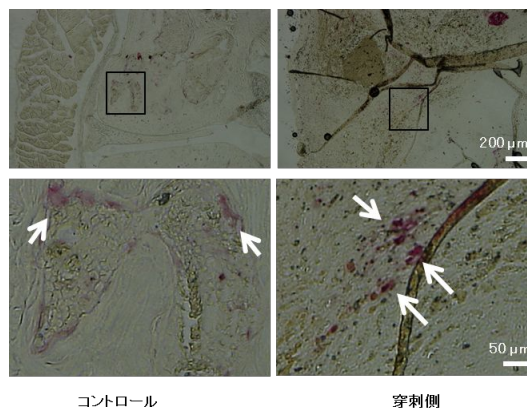
血友病 B モデルマウスの右膝を 30G 針で穿刺することにより関節内出血を惹起した。穿刺をしない左膝をコントロールとして用いた。穿刺を行った右膝は関節内出血により著明に腫脹し、関節横径を経時的に計測したところ穿刺後 4 週間程度は腫脹が継続していた。穿刺後 2 週間および 5 週間後に膝関節のレントゲン撮影を行ったところ、2 週間ではほとんど変化が見られなかったが、5 週間では関節裂隙の狭小化や骨棘の形成といった関節症変化が認められた。さらに 5 週間後の膝 CT を撮影したところ、コントロールと比較して穿刺側に著明な関節破壊が起こっていることが確認された。



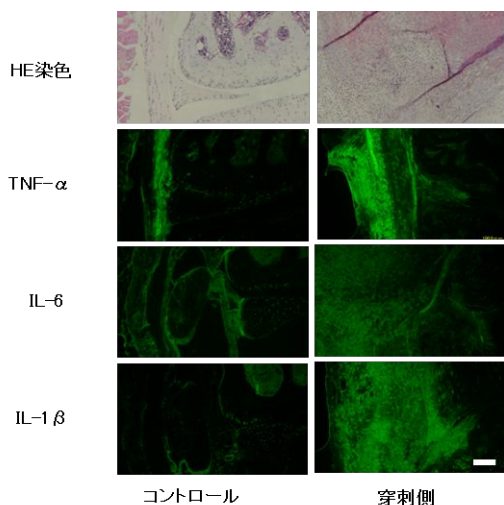
穿刺後 2 週間の膝から組織切片を作成して HE 染色を行ったところ、関節内に多数の炎症性細胞が浸潤している像が得られた。サフラニン O にて染色を行ったところ、関節の辺縁に骨棘と考えられる異所性の軟骨形成が認められた。また、関節内の他部位においても異所性の軟骨が認められた。



滑膜炎による関節破壊をきたす疾患の代表である関節リウマチにおいては破骨細胞が骨破壊の主役を担っていることが分かっている。そこで、関節内出血後の膝組織切片において破骨細胞を特異的に染色する TRAP 染色で行ったところ、通常では破骨細胞が存在しない滑膜に破骨細胞が存在することが確認された。



次に、関節内で実際に炎症性サイトカインの発現が亢進していることを確認するため、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 に対する抗体を用いて膝関節の組織切片の免疫染色を行ったところ、肥厚した滑膜においてこれらの発現が著明に亢進していることが明らかとなった。



また、破骨細胞分化に必須の分子である RANKL に対する免疫染色を行ったところ、こちら滑膜において発現が亢進していることが確認された。ここまでの研究で血友病性関節症の発症・進行における炎症性サイトカインおよび破骨細胞の関与が示唆された。

今後引き続き行っていく予定である。また、抗 RANKL 抗体であるデノスマブの全身投与による関節破壊抑制効果の確認や関節内出血後の関節滑膜において生じる免疫反応についても今後、詳細に解析を行っていく予定である。

#### 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 3 件)

Takedani H, Hirose J et al. Major orthopaedic surgery for a haemophilia patient with inhibitors using a new bypassing agent. Haemophilia. Sep;22(5):e459-61, 2016

Hirose J, Takedani H et al. Total hip arthroplasty and total knee arthroplasty in a patient with congenital deficiency of plasminogen activator inhibitor-1. Haemophilia. May;22(3):e237-9, 2016

Tokuyama N, Hirose J et al. Individual and combining effects of anti-RANKL monoclonal antibody and teriparatide in ovariectomized mice. Bone Rep. Jan 21;2:1-7, 2015

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

廣瀬 旬 (HIROSE, Jun)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号： 00456112

##### (2) 研究分担者

長村 登紀子 (NAGAMURA, Tokiko)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号： 70240736

竹谷 英之 (TAKEDANI, Hideyuki)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号： 90206996