

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462287

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた変形性関節症の発症の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Coordinate and synergistic effects of extensive treadmill exercise and ovariectomy on articular cartilage degeneration.

研究代表者

神野 哲也 (Jinno, Tetsuya)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：90343152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：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。多因子疾患であるため、発症の機序ならびに増悪のメカニズムの解析は未だ体系化されてるとは言い難い。本研究では、加齢に伴う自然発症のOAを再現できるマウスモデルを確立し、軟骨の退行変性の機序を検討することを主たる目的としている。本研究では、マウスに対して卵巣摘除を行なった後、トレッドミルを用いて強制走行を行い、過度の力学的ストレスを関節軟骨に加えることによって、膝関節に直接的な外傷を加えなくても再現性よくOA様変化を誘導できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Although osteoarthritis (OA) is a multifactorial disease, little is reported regarding the cooperative interaction between these factors on cartilage metabolism. Here we examined the synergistic effect of ovariectomy (OVX) and excessive mechanical stress (forced running) on articular cartilage homeostasis in a mouse model resembling a human post menopause condition. Histological analysis revealed that OVX or forced running respectively had subtle effect on cartilage degeneration. However, the combination of OVX and forced running synergistically enhanced synovitis and articular cartilage degeneration. Interestingly, these results were observed specifically in Balb/c mice, since we did not observe any synergistic effects of OVX and forced running on articular cartilage degeneration in C57Bl/6J mice. Since surgical procedure was not performed on the knee joint directly in this model, this model is useful in addressing the molecular pathogenesis of naturally occurring OA.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性膝関節症 動物モデル 卵巣摘除 トレッドミル 滑膜炎 関節軟骨

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OA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。OA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、OA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、OAに対する効果的な予防法、更に積極的な軟骨の再生医療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。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り、ヒトのOAを効率よく再現できるマウスをはじめとする動物実験モデルの確立は、必要不可欠であると考えている。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、ヒトで多く見られる、加齢に伴う自然発症の変形性関節

症モデルとは言い難い。この問題点を克服することを目的として、私たちは膝組織に対する非侵襲または低侵襲のマウスOAモデルの確立とその再現性の検証を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、膝に対する非侵襲のマウス変形性関節症(OA)モデルの確立を目的として、卵巣摘除を施行したBalb/cマウスに対してトレッドミルを用いた強制走行を施行した場合に生じる、関節軟骨の退行変性の過程を詳細に、組織学的に解析することである。また、本モデルにおいて関節軟骨の退行変性の重症度が、マウスの系統の違いによって異なっていることが明らかとしそれがどのような因子により規定されているかを検討することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究は、本学の動物実験委員会の承認のもとおこなった。8-10週齢のBalb/cマウスを実験に使用した。卵巣摘除(OVX)を行ったマウスに対して週5日、速度20m/min、100分のトレッドミルによる強制走行を6週間行い、滑膜、膝蓋下脂肪体の炎症所見並びに関節軟骨の変性を、組織学的に解析を行なった。また、関節軟骨破壊の程度に及ぼす、遺伝的背景の差を検証する目的で、同様の実験をC57Bl/6Jマウスを用いて行なった。

4. 研究成果

OVX(OVX+CAGE:OVXのみ行い強制走行は行わない)群、並びに強制走行(SHAM+RUN:OVXは行わず強制走行のみ)群では、関節軟骨に対して重篤な退行変性は観察されなかったが、OVXと強制走行を組み合わせた群(OVX+RUN)においては、コントロール(SHAM+CAGE)と比較して顕著な軟骨の退行変性が観察された。

OVX+RUN 群においては、他の群に比較して重篤な滑膜の肥厚並びに滑膜マクロファージ(F4/80)の浸潤が観察された。以上の結果は、OVX、強制走行による過度の力学的負荷は、相乗的に膝関節に対して退行変性を誘導するが、その理由の一つとして関節炎症の重篤化が考えられた。興味深いことに、Balb/c マウスで観察された、これら関節軟骨代謝異常は、C57Bl/6J マウスを用いて検討した結果、再現されなかった。すなわち、OVX+RUN 群におけるサフラニンの染色性の有意な低下と滑膜における有意な肥厚並びにマクロファージの浸潤は 6 週間の強制走行の後で観察されなかった。

OA は多因子疾患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エストロゲンシグナルと軟骨の退行変性との間を直接結びつける分子メカニズムは未だ明らかとされていない。メカニカルストレスによる関節軟骨の摩耗も、OA の発症原因の一つとして考えられているが、一方で、適度なストレスは、軟骨基質の産生を促進することも報告されており、メカニカルストレスの軟骨基質に対するアナボリック、カタボリックのスイッチング機構や閾値は不明である。加えて、これまでの研究から、同種族間においても、遺伝的背景が異なる系統間においては、関節軟骨の代謝に差異が存在していることを示唆するデータを得たことから、このマウスモデルは、OA 発症と増悪の分子メカニズムを検討する上で有用なモデルであると考えている。

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 20 件、全て査読あり)

1: Shioda M, Muneta T, Tsuji K, Mizuno M, Komori K, Koga H, Sekiya I. TNF α promotes

proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. PLoS One. 2017 May 18;12(5):e0177771.

2: Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I, Muneta T. Effects of different cell detaching methods on the viability and cell surface antigen expression of synovial mesenchymal stem cells. Cell Transplant. 2017 Jan 31. in press

3: Ozeki N, Muneta T, Kawabata K, Koga H, Nakagawa Y, Saito R, Udo M, Yanagisawa K, Ohara T, Mochizuki T, Tsuji K, Saito T, Sekiya I. Centralization of extruded medial meniscus delays cartilage degeneration in rats. J Orthop Sci. 2017 May;22(3):542-548.

4: Saito R, Muneta T, Ozeki N, Nakagawa Y, Udo M, Yanagisawa K, Tsuji K, Tomita M, Koga H, Sekiya I. Strenuous running exacerbates knee cartilage erosion induced by low amount of mono-iodoacetate in rats. BMC Musculoskelet Disord. 2017 Jan 25;18(1):36.

5: Taniguchi N, Jinno T, Koga D, Hagino T, Okawa A, Haro H. Cementless Hip Stem Anteversion in the Dysplastic Hip: A Comparison of Tapered Wedge vs Metaphyseal Filling. J Arthroplasty. 2017 May;32(5):1547-1552.

6: Koyano G, Jinno T, Koga D, Yamauchi Y, Muneta T, Okawa A. Comparison of Bone Remodeling Between an Anatomic Short Stem and a Straight Stem in 1-Stage Bilateral Total Hip Arthroplasty. J Arthroplasty. 2017 Feb;32(2):594-600.

7: Hiyama K, Muneta T, Koga H, Sekiya I, Tsuji K. Meniscal regeneration after resection of the anterior half of the medial meniscus in mice. J Orthop Res. 2016 Nov 2. in press

8: Miyatake K, Muneta T, Ojima M, Yamada J, Matsukura Y, Abula K, Sekiya I, Tsuji K. Coordinate and synergistic effects of extensive treadmill exercise and ovariectomy on articular cartilage degeneration. BMC Musculoskelet Disord. 2016 May 31;17:238.

9: Yanagisawa K, Muneta T, Ozeki N, Nakagawa Y, Udo M, Saito R, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Weekly injections of Hylan G-F 20 delay cartilage degeneration in partial meniscectomized rat knees. BMC Musculoskelet Disord. 2016 Apr 27;17:188.

10: Udo M, Muneta T, Tsuji K, Ozeki N, Nakagawa Y, Ohara T, Saito R, Yanagisawa K, Koga H, Sekiya I. Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific

scoring systems. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Jul;24(7):1284-91.

11: Ozeki N, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, Mabuchi Y, Akazawa C, Kobayashi E, Matsumoto K, Futamura K, Saito T, Sekiya I. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Jun;24(6):1061-70.

12: Nakagawa Y, Muneta T, Otabe K, Ozeki N, Mizuno M, Udo M, Saito R, Yanagisawa K, Ichinose S, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Cartilage Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expresses Lubricin In Vitro and In Vivo. *PLoS One*. 2016 Feb 11;11(2):e0148777.

13: Takada R, Jinno T, Koga D, Hirao M, Muneta T, Okawa A. Comparison of wear rate and osteolysis between annealed and remelted highly cross-linked polyethylene in total hip arthroplasty. A case control study at 7 to 10 years follow-up. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2016 Oct;102(6):717-21.

14: Yamada T, Yoshii T, Egawa S, Takada R, Hirai T, Inose H, Kato T, Jinno T, Okawa A. Drain Tip Culture is Not Prognostic for Surgical Site Infection in Spinal Surgery Under Prophylactic Use of Antibiotics. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016 Jul 15;41(14):1179-84.

15: Takada R, Jinno T, Koga D, Yamauchi Y, Asou Y, Muneta T, Okawa A. Limited significance of screening computed tomography after cementless total hip arthroplasty with highly cross-linked polyethylene at 7-10 years of follow-up. *Mod Rheumatol*. 2016 Sep;26(5):757-60.

16: Nakagawa Y, Muneta T, Kondo S, Mizuno M, Takakuda K, Ichinose S, Tabuchi T, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells promote healing after meniscal repair in microminipigs. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Jun;23(6):1007-17.

17: Miyatake K, Jinno T, Koga D, Yamauchi Y, Muneta T, Okawa A. Comparison of Different Materials and Proximal Coatings Used for Femoral Components in One-Stage Bilateral Total Hip Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2015 Dec;30(12):2237-41.

18: Takada R, Jinno T, Koga D, Hirao M, Muneta T, Okawa A. Is Drain Tip Culture Prognostic of Surgical Site Infection? Results of 1380 Drain Tip Cultures in Total Hip Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2015 Aug;30(8):1407-9.

19: Koyano G, Jinno T, Koga D, Hoshino C, Muneta T, Okawa A. Is closed suction drainage effective in early recovery of hip joint function? Comparative evaluation in one-stage bilateral total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2015 Jan;30(1):74-8.

20: Yamada J, Tsuji K, Miyatake K, Matsukura Y, Abula K, Inoue M, Sekiya I, Muneta T. Follistatin alleviates synovitis and articular cartilage degeneration induced by carrageenan. *Int J Inflamm*. 2014;2014:959271.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 神野哲也 . 変形性股関節症診療ガイドライン 改訂の動向 . 第 13 回お茶の水関節症研修会 お茶の水医学会館、東京、2016.01.28

2. 神野哲也 . 日本人大腿骨の形状特性 適合するステム形状は？ 第 46 回日本人工関節学会 グランフロント大阪、大阪、2016.02

3. 関矢一郎、片野尚子、水野 満、大関信武、松本幸恵、堀江雅史、小田邊浩二、小森啓一郎、藤井静花、中川裕介、古賀英之、宗田大 . 滑膜幹細胞による半月板再生 . 第 15 回日本再生医療学会総会、大阪国際会議場、大阪、2016.03.17

4. 宗田 大 . 軟骨欠損を伴う膝外傷 障害からのスポーツ復帰 . 第 42 回九州膝関節研究会 2016皮下 PCAの除痛効果とその有用性 . 第 56 回関東整形災害外科学会、東京カンファレンスセンター品川、東京 2016.03.25

5. Miyoko Ojima, Kunikazu Tsuji, Koji Otabe, Masafumi Horie, Hideyuki Koga, Ichiro Sekiya, Takeshi Muneta. Different methods of detaching adherent cells significantly affect the detection of stem cell antigens in synovial mesenchymal stem cells. OARSI 2016 World Congress on Osteoarthritis, Amsterdam RAI, the Netherlands, 2016.03.31,

6. 神野哲也 . 股関節手術の合併症とリハビリテーション . 第 53 回日本リハビリテーション医学会学術集会、グランドプリンスホテル京都、京都、2016.06

7. 神野哲也 . 関節可動域の評価とリハビリテーション . 第 53 回日本リハビリテーション医学会学術集会、グランドプリンスホテル京都、京都、2016.06

8. 宗田 大 . 膝関節の外傷・障害と私たちの再生医療 . 神奈川県西部運動器疼痛セミナー、レンブラントホテル厚木、神奈川県、2016.06.30

9. 神野哲也 . 人工股関節の動向 -最新の知見をふまえて-. 第 16 回専門リハビリテーション研究会学術大会、鬼怒川ホテル三日月、栃木、2016.07

10. 宗田 大 . 変形性膝関節症の疼痛治療と関節面の温存治療 . 運動器疾患ノ骨・関節フォーラム 千葉会場、ホテルニューオータニ幕張、千葉、2016.07.09

11. 宗田 大 . スポーツ膝外傷・障害からの復帰と滑膜幹細胞移植の効果 . 第 10 回金沢サンセットセミナー、金沢大学病院展望台会議室、石川、2016.09.03

12. 宗田 大 . 私たちの教室で発展させてきた膝関節外科治療と滑膜間葉幹細胞移植 . 第 13 回浦和医師会外科整形外科医会、浦和ロイヤルパインズホテル、埼玉、2016.09.08

13. Miyoko Ojima, Kunikazu Tstuji, Koji Otabe, Masafumi Horie, Hideyuki Koga, Ichiro Sekiya, Takeshi Muneta. Analyses of biologically active substances in synovial fluid which support proliferation of synovial mesenchymal stem cells. International Cartilage Repair Society 2016 Annual Meeting, Naples, Italy, 2016.09.24

14. 尾島美代子、辻邦和、小田遼浩二、堀江雅史、古賀英之、関矢一郎、宗田大 . 滑膜由来間葉系幹細胞の表面抗原解析における細胞剥離法の影響について . 第 31 回日本整形外科学会基礎学術総会、福岡国際会議場、福岡、2016.10.13

15. 宗田大 . ACL 再建術(ハムストリング) . 第 8 回 JOSKAS セミナー カダバーワークショップ、札幌医科大学医学部教育北棟、北海道、2016.10.29

16. 神野哲也 . THA 再置換術・寛骨臼再建 . 第 9 回 OEC アドバンスコース、日本橋ライフサイエンスビル、東京、2016.10.30

17. 神野哲也 . 股関節の解剖 . 第 2 回日本股関節学会教育研修セミナー、大阪国際会議場、大阪、2016.11.03

18. 神野哲也 . セメントレス人工股関節の

固定と骨温存 . 第 34 回西新宿整形外科研究会、京王プラザホテル、東京、2016.12.17

〔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

神野哲也 (JINNO TETSUYA)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授

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・准教授

研究者番号 : 20323694

宗田 大 (MUNETAKESHISHI)

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

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
該当なし