

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：22401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560278

研究課題名(和文) 膝関節異常運動に着目した変形性膝関節症発症過程と軟骨破壊抑制方法を探る

研究課題名(英文) The effect of cartilage degeneration by controlled joint instability in osteoarthritis model

研究代表者

高柳 清美 (Takayanagi, Kiyomi)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：20274061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症の発症には、様々なメカニカルストレスが関連する。しかし、従来のモデルでは、メカニカルストレスが軟骨変性の“独立したリスク因子”であるかは明確でない。我々はこれまで、関節の異常運動に着目し、生体内に及ぼす影響を検証してきた。本研究は、関節不安定性という膝関節の異常運動が軟骨に及ぼす影響を検証した。その結果、異常運動は関節軟骨の変性を促進し、軟骨厚やGAG量の減少、表層のフィブリル化を重症化した。また、炎症メディエーターであるTNF- α やアポトーシス誘導因子であるCaspase-3は、異常運動を制動することでmRNAレベル・タンパクレベルで減少させることが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Joint instability, such as abnormalities of mechanical stress, secondary to ACL injury is the most significant risk factors for osteoarthritis (OA). This study aimed to assess whether joint instability of knee following ligament injury is an independent risk factor for osteoarthritis of the knee joint. We hypothesized that providing biomechanical control following ACL injury may result in the inhibition of cartilage degradation in the articular cartilage. In result, an important contribution of our study was in identifying factors that may delay progression of OA. Joint instability appears to contribute to the progression of articular cartilage degeneration independent of intra-articular conditions, and mechanical factors are independent risk factors for OA. Further studies are required to assess the relationship between the chemical and mechanical responses to injury in the pathogenesis of osteoarthritis.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：変形性膝関節症 メカニカルストレス 関節制動 関節軟骨 TNF- α Caspase-3

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(Osteoarthritis, OA)は、高齢者に多く発症する整形外科疾患であり、リハビリテーション関連の医療費を増加させる。諸家の報告では ACL 損傷や半月板損傷に伴う関節内炎症メディエーターが軟骨変性を進行させるリスクファクターであると報告され、それらを抑制することで軟骨変性の進行を遅延させることが可能である。

一方、関節内損傷に伴って二次的に生じる異常なメカニカルストレスは軟骨変性を慢性的に進行させる要因でもある。特に、ACL 靭帯損傷に伴う関節不安定性は、軟骨変性を進行させる要因である。故に、変形性膝関節症の予防法のひとつとして、膝周囲靭帯損傷に伴う異常なメカニカルストレスを減少させる措置が必要である。

申請者らはその異常な関節運動を関節包外から制動するモデルに成功した。このモデルが変形性膝関節症の発症を予防する一手段となり得る可能性を本申請書で報告する。

2. 研究の目的

メカニカルストレスの中で膝関節の不安定性に伴う運動学的異常に着目し、膝関節内の生物学的ストレス状態が同一かつメカニカルストレスが減少するモデルを用いて、運動学的異常が膝関節軟骨に与える影響を組織学的、生化学的手法を用いて検証した。

3. 研究の方法

(1) 対象

6か月齢のWistar系雄性ラット(日本SLC, 浜松)70匹を用いた。対象は、ACLを外科的に損傷させた脛骨の前方引き出しが過剰に生じている群(ACL-T: Transection群)、外科的にACLを損傷させた後、脛骨の前方引き出しを制動した群(CAJM: Controlled abnormal joint movement群)、外科的手術を行わない通常飼育群(CTR: Control群)の3群に分類した。解析時期は、術後2、4、6、12週目に関節軟骨を採取し、リアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR)法による解析、術後4および12週目に組織学的な解析を実施した。

(2) 手術方法と実験条件

対象動物は、右後肢に外科的な手術を施行した。麻酔後、右膝関節内側を縦切開、関節包を露出し、膝蓋腱内側の関節包から関節内へ侵入した剪刀によってACLを切断した。脛骨の前方引き出しが過剰になっていることを徒手的に確認し、関節包ならびに皮膚を閉創、ACL群を作成した。CAJM群は、同手順でACLを切断後、歯科用ドリルを用いて脛骨内側から外側に向けて骨孔を貫通させた。骨孔に3-0ナイロン縫合糸を大腿骨後方外側から内側にかけてループ状に脛骨の前方引き出しを抑制し、関節包ならびに皮膚を縫合し閉創した。

術後の飼育条件は、ポリカーボネード製ケージ内に2匹ずつ、温度23°Cに設定された本学動物実験舎内で飼育した。昼夜12時間サイクルで明暗管理し、固形飼料と給水は自由摂取可能な条件下のもと、運動制限は設けなかった。

(3) 軟X線撮影

膝関節の軟X線撮影をした(Softex M-60, 神奈川)。撮影条件は電圧28kVp、電流1.5mA、照射時間1秒とした。デジタルイメージセンサーNAOMI(株式会社アールエフ、長野)を用いて、デジタル画像として取得した。

(4) 組織学的解析

術後4、12週間時点で、各群5匹ずつ(合計30匹)を大動脈切断により安楽死させ、右膝関節を採取した。採取した組織は、リン酸緩衝食塩水で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液で浸漬固定した(4, 48時間)。脱灰は、10%エチレンジアミン四酢酸溶液を用いて、冷蔵庫内で60日間の脱灰期間を設けた。脱灰終了後、10%スクロース(4時間)、15%スクロース(4時間)、20%スクロース(12時間以上)溶液に浸潤させるスクロース置換処理を実施した後、OCT compound(サクラファインテックジャパン株式会社、東京)で凍結包埋した。凍結包埋した組織は、クリオスタットCM3050Sを用いて、内側から矢状断で膝関節を14μm厚に薄切し、サフラニン0・ファストグリーン染色を実施した。

分析は、脛骨ならびに大腿骨内側構成体の関節軟骨とした。解析は、Osteoarthritis Research Society Internationalスコアを用いた。染色された組織を50倍率で撮像し、ランダムに番号割り付けをした後、臨床経験3年以上の共同研究者である2名が独立してスコアリングし、平均点をOARSIスコアとして算出した。

また、軟骨厚(前後方部位各3か所の平均値)、グリコサミノグリカンの染色性(前後方部位3か所におけるintensityの平均値)、軟骨表層の乱れ(Roughness)を画像解析ソフトWinRoof Version 7.0.0(三谷商事株式会社、東京)で算出した。

(5) 免疫組織化学染色

保存した切片をPBSで5分間3回の洗浄を実施した。その後、内因性ペルオキシダーゼ活性の抑制のため、3%過酸化水素/エタノール溶液で30分間反応させた。再度PBSで洗浄後、非特異的反応のブロッキングのためにヤギ血清アルブミン/PBS溶液を使用して、室温で30分間反応させた。次に、組織切片をPBSで希釈した一次抗体で反応させた(overnight, 4)。一次抗体は、抗TNF-(dilution 1:250; Bioss, USA)、抗IL-1(dilution 1:250; Bioss USA)、抗Collagen type2(dilution 1:400; Abcam, USA)、抗caspase-3(dilution 1:250; Bioss

USA) を利用した。その後、avidin-biotinylated peroxidase complex 法による反応の後、DAB での発色を行った。

解析は、測定した関節軟骨に対する染色された細胞の割合を画像解析ソフト WinRoof Version 7.0.0 (三谷商事株式会社, 東京) で算出した。

(6) リアルタイム PCR 法

術後 2, 4, 6 週目時点で CAJM 群と ACLT 群の各群 5 匹ずつ (合計 30 匹) をリアルタイム PCR 解析に供した。また、基準となるコントロールは反対側を利用した。右膝関節から注意深く関節軟骨 (脛骨) を採取し、RNA lator を用いて 48 時間浸潤させ、RNA を安定化させた。尚、12 週時点の 10 匹は変性が著しく軟骨組織の採取が困難であったため、解析から除外した。

各サンプルから RNeasy Lipid Tissue Mini Kit の手順に従い、Total RNA 抽出した。抽出された Total RNA の RNA 濃度を測定し、0.15 μ g の Total RNA が含まれる cDNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて合成した。合成された cDNA は、TaqMan プローブ法にて、StepOnePlus を用いてリアルタイム PCR 解析を実施した。ターゲット遺伝子は、関節軟骨の異化因子、同化因子、炎症性メディエータとし、内性コントロールには glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を採用した。

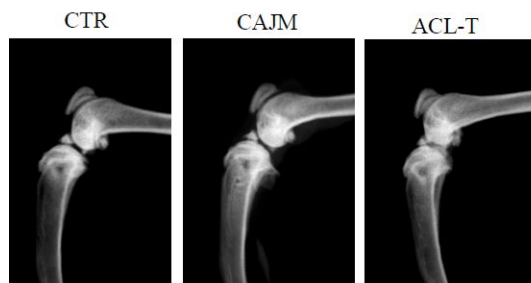
(7) 統計解析

組織学的解析、免疫組織学的分析は、SPSS 23.0J for Windows (日本 IBM, 東京) を用い、3 群間での比較 (一元配置分散分析または Kruskal-Wallis 法) を実施した。また、リアルタイム PCR 法から算出された Ct 値は、比較 Ct 法にて、コントロールを 1 とした場合の相対値を算出した。

4. 研究成果

(1) 軟 X 線撮影

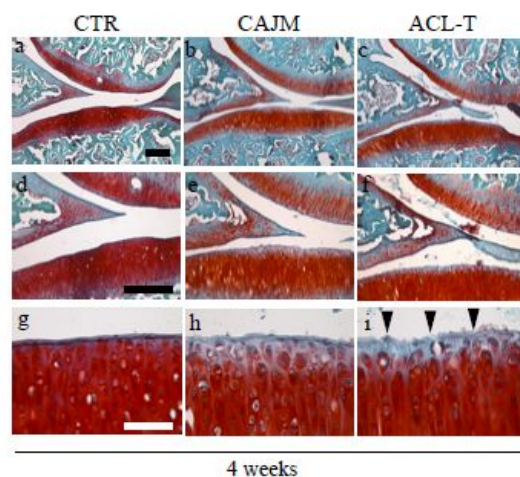
軟 X 線撮像を下図に示した。術後 12 週時点において、ACLT 群で脛骨および大腿骨の辺縁部の透過性が低下し、関節裂隙の狭小化を認めた。一方、CAJM 群においても、膝関節の脛骨および大腿骨の辺縁部の透過性が低下しており、CTR 群と比較し、膝関節の変性が進行していた。ACLT 群と CAJM 群での変化は軟 X 線画像からでは、顕著な差は観察されなかった。



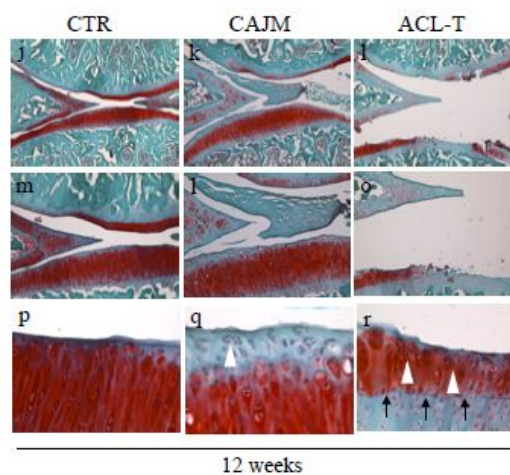
Sagittal View

(2) 組織学的観察ならびに解析

関節軟骨の組織像を図に示した。4 週目時点で、ACLT 群と CAJM 群で軟骨表層のフィブリル化や表層のグリコサミノグリカンの染色性の減少を認めた。一方で、12 週時点では、ACLT 群の関節軟骨厚の減少、表層のフィブリル化、グリコサミノグリカンの染色性が低下し、関節軟骨の変性が著しく重症化した。大腿骨においても、関節軟骨表層のフィブリル化、グリコサミノグリカンの染色性の低下を認め、CTR 群ならびに CAJM 群よりも変性が重症化していた。



4 weeks



12 weeks

軟骨変性スコアは、4 週時点では ACL-T 群と CAJM 群の両群で進行していたが、12 週時点では CAJM 群と比較して ACL-T 群で有意に OA が進行した ($p < 0.001$)。また、12 週時点の ACLT 群では、CAJM 群と比較して関節軟骨厚は有意に薄く ($p < 0.001$)、Roughness においても有意に高値を示した ($p = 0.012$)。グリコサミノグリカンの染色性は 12 週時点で ACLT 群が有意に低値であった ($p < 0.001$)。

(3) 免疫組織化学染色による観察・解析

TNF- α の細胞密度は、4 週目時点で ACL-T 群で有意に増加していた ($p = 0.012$)。一方、

12 週時点の TNF- α 、4 週目ならびに 12 週目時点の IL-1 β における細胞密度は増加しているが、CTR 群と比較して有意差はなかった。Caspase-3 は、4 週目、12 週目時点において、CTR 群や CAJM 群に比較して、CALT 群が有意に発現を認めた ($p < 0.001$)。

(4) リアルタイム PCR 法

関節軟骨における mRNA 発現量は、MMP-13、Caspase-3、TNF- α 、IL-1 β といった、異化や炎症性メディエーターにおいて ACLT 群で増加した。一方で、アグリカンやパーシカン、型コラーゲンなどの同化因子においては、特異的な発現の差は認めなかった。

以上の結果より、関節不安定性の制動することで軟骨の変性を遅延させたことは、軟骨変性に対して運動学的異常がメカニカルストレスとなり、膝関節軟骨の変性を進行させる一因であることが示唆された。

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 3 件)

K. Murata, T. Kokubun, N. Kanemura, A. Nakajima, Y. Morishita, T. Fujino, K. Takayanagi. Influence of knee joint stability and instability in anterior cruciate ligament injury. The 50th Congress of the Japanese Physical Therapy Association, Tokyo Japan. 2015.6

K. Murata, T. Kokubun, N. Kanemura, A. Nakajima, Y. Morishita, T. Fujino, K. Takayanagi. Study of the effect of joint stability on articular cartilage and biomarkers using the rat osteoarthritis model. 9th World Congress of the International Society of Physical and Rehabilitation Medicine, Berlin Germany. 2015.6

村田健児, 金村尚彦, 国分貴徳, 森下佑里, 鬼塚勝哉, 藤野努, 高柳清美. 異常関節運動の制動が関節軟骨に対する組織学的な効果. 第 34 回関東甲信越ブロック理学療法学会. 山梨. 2015 年 9 月

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高柳 清美 (Kiyomi Takayanagi)
埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科・教授
研究者番号：20274061

(2) 研究分担者

金村 尚彦 (Naohiko Kanemura)
埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科・准教授
研究者番号：20379895

国分 貴徳 (Kokubun Takanori)
埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科・助教
研究者番号：10616395