

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月 31日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591694

研究課題名（和文） 酸化 LDL/LOX-1 系の軟骨変性への関与

研究課題名（英文） Involvement of the oxidized low-density lipoprotein/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 system to joint cartilage degeneration

研究代表者

赤木 将男 (AKAGI MASAO)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：00273441

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、酸化低密度リポ蛋白（酸化 LDL）が軟骨組織の老化変性に関与することを、レクチン様酸化 LDL 受容体-1（LOX-1）knockout（KO）mouse を用いて *in vivo* で明らかにすることである。トレッドミルを用いて CB57/BL6 マウスを強制走行（週3回、2週間に1Km）させると、非侵襲的に変形性膝関節症を生じることが明らかになった。また、これらの変化は走行週数、一回当たり走行距離により調節可能であった。そこで LOX-1 KO mouse を強制走行させ、膝軟骨変性における酸化 LDL/LOX-1 系の関与を明らかにすることを試みたが、両マウスの変形の程度において2週間の走行では有意な差は無かった。次に、6ヶ月、1年、1.5年と長期間自然飼育した wild type と KO mouse の膝軟骨変性を観察した。その結果、飼育開始後1、1.5年において軟骨変性が KO mouse において有意に抑制されていた。さらに、Zymosan 関節内投与による関節炎モデルマウスにおいても、LOX-1 KO により滑膜炎、軟骨変性の抑制が認められ、LOX-1 と関節症変化の関連が示された。以上の結果より、酸化 LDL、および酸化 LDL の受容体 LOX-1 は血管内皮細胞の老化促進因子であるのみならず軟骨細胞の老化変性にも関与を示し、変形性関節症の薬物的治療に新たな可能性を示すことができたと考える。

研究成果の概要（英文）：

Purpose of this study is to demonstrate involvement of the ox-LDL/LOX-1 system to joint cartilage degeneration *in vivo* using LOX-1 knockout (KO) mouse. To develop a nonsurgical murine knee osteoarthritis model, mechanical load is applied by forced running on a treadmill, which was controlled by changing number of forced running periods and running time. Changes in the degeneration score increased significantly in a time- and dose-dependent manner. However, LOX-1 KO did not show significant protective effects in this OA model after 2-week forced running, compared with wild type mice. While, long-term observation (1 and 1.5 year) of the KO mice and wild type mice bred conventionally in cages revealed significant difference in cartilage degeneration. Furthermore, LOX-1 KO suppressed synovitis and cartilage degeneration in zymosan induced arthritis. These results indicate that the ox-LDL/LOX-1 system is involved to joint cartilage degeneration *in vivo*. In conclusion, the ox-LDL/LOX-1 system may play some role not only in endothelial dysfunction of atherosclerosis but also in cartilage degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：医療・福祉、細胞・組織、脂質、トランスレーショナルリサーチ、老化

1. 研究開始当初の背景

肥満・高脂血症・動脈硬化症・糖尿病などの生活習慣病は近年の生活習慣の変化や人口構成の変化により著しく増加している。疫学調査の結果によると、肥満、高脂血症、動脈硬化は変形性関節症の独立した危険因子とされ、これらの生活習慣病と変形性関節症との間には共通の病因・病態があることが示唆されてきた。我々は動脈硬化症の原因物質の一つとされている酸化低密度リポ蛋白（酸化 LDL）に着目し、OA やリウマチ患者の関節軟骨組織における酸化 LDL の存在、軟骨細胞に酸化 LDL の受容体であるレクチン様酸化 LDL 受容体-1（LOX-1）の発現があることを示してきた。また、*in vitro* の実験において、酸化 LDL/LOX-1 系が関節軟骨変性に様々な側面で関与する可能性を示してきた。

2. 研究の目的

酸化低密度リポ蛋白（酸化 LDL）が軟骨組織の老化変性に関与することを、レクチン様酸化 LDL 受容体-1（LOX-1）を用いて *in vivo* で明らかにすることである。すなわち、酸化 LDL、および酸化 LDL の受容体 LOX-1 は血管内皮細胞の老化促進因子であるのみならず軟骨細胞の老化変性にも関与を示し、変形性関節症の保存的および薬物的治療に新たな可能性を示すことである。

3. 研究の方法

(1) 9 週令、オスの CB57/BL6 wild type mice を専用トレッドミルにて強制的に走行させ、OA 軟骨組織を OARSI (Osteoarthritis Research Society International) Score を用いて定量評価する。走行負荷として以下の 2 群を用いた。すなわち、① 経時的変化観察群では、2、4、6、8 週間の走行負荷を加えた。② 走行時間変化群では、短時間走行（1 回 7.5 分、週 3 回走行で 2 週間）と長時間走行（1 回 30 分、週 3 回走行で 2 週間）を行った。連携研究者の沢村達也博士より供与を受けた LOX-1 knockout-mice (background: CB57/BL6) の交配・繁殖を医学部動物実験施設で行い、実験群を作成する。9 週令、オスの wild type mice、および、LOX-1 knockout-mice (background: CB57/BL6) を 1km/2 週で強制的に走行させ、膝関節 OA モデルの組織学的評価を行う。すなわち、HE 染色およびサフラニン O 染色、トルイジンブルー染色組織標本より、OARSI Score、軟骨変性の程度を定量化する。また、OA 軟骨に特徴的な蛋白発現とされている X 型コラーゲン発現

を評価する。LOX-1 knockout mice での軟骨変性の減弱を証明し、酸化 LDL・LOX-1 系の関与を明らかにする。

(2) オスの CB57/BL6 wild type と LOX-1 knockout-mice を 6 ヶ月、1 年、1.5 年と長期間ケージ内で自然飼育し、wild type と knockout-mouse で膝関節の老化・変性に差が生じないかを組織学的 (HE 染色およびサフラニン O 染色) に OARSI Score を用いて評価する。

(3) Wild type と LOX-1 knockout-mice に関節炎誘発物質である Zymosan を関節内投与し、実験的関節炎モデルマウスを作成する。LOX-1 knockout が関節炎による軟骨変性に耐性を与えるかを組織学的に検討する。すなわち顕微鏡下にマウス膝に 20mg Zymosan A/ml saline 0.1mg を注入し、術後 24 時間、3 日後、7 日後に屠殺し組織学的に評価する。

4. 研究成果

(1) トレッドミルを用いて CB57/BL6 マウスに強制走行を行わせると、非侵襲的に変形性膝関節症（膝 OA）を作成できることを明らかにした。すなわち、経時的変化観察群では、走行開始後 2 週間で骨棘形成、外側半月板の肥大化、十字靭帯の変性そして顆間部の狭小化が見られ、4 週間で変化は進行し、外側半月板の骨化がみられた。6 週間では内側半月板の内軟骨性骨化がみられた。走行時間変化群では、短時間走行群では 2 週間で軽度の外側半月板肥大化がみられた。対照的に長時間走行負荷群では外側半月板骨化、内側半月板の内軟骨性骨化、十字靭帯の変性、顆間部の狭小化がみられた (図 1, A: 経時的変化観察群, B: 走行時間変化群)。

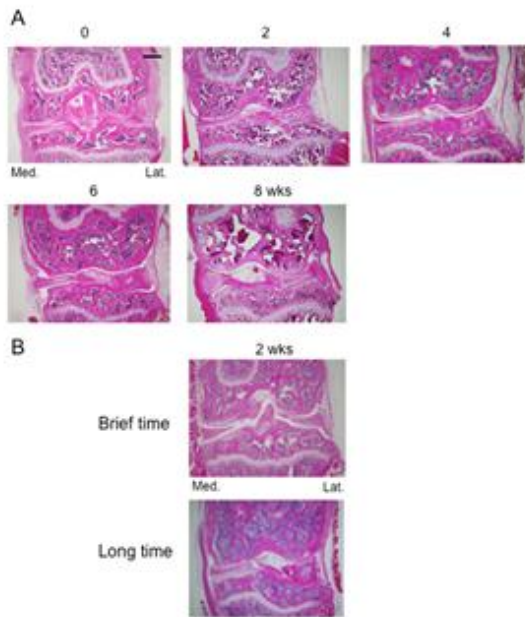


図 1. A: 経時的変化観察群、B: 走行時間変化群の HE 染色の結果

OARSI スコアも、走行週数、走行時間に依存して上昇した (図 2). この変化は、膝外側コンパートメントで顕著であった.

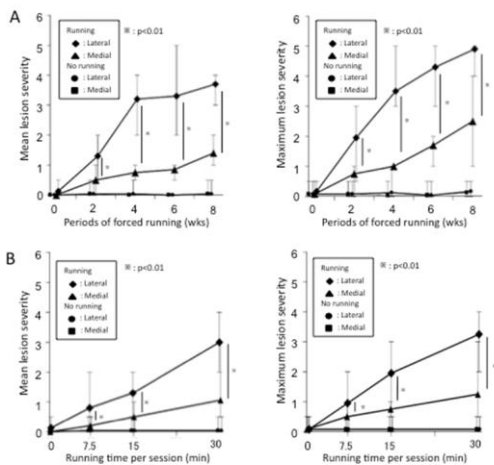


図 2. A: 経時的変化観察群、B: 走行時間変化群の OARSI スコアの変化.

また、免疫染色では、走行週数に依存して II 型コラーゲンの発現が低下し、X 型コラーゲンの発現が増加した.

そこで LOX-1 knockout-mouse を強制走行させ、膝軟骨変性における酸化 LDL・LOX-1 系の関与を明らかにすることを試みたが、両マウスの変形の程度において 2 週間の走行では有意な差を示すことができなかった.

(2) オスの CB57/BL6 wild type と LOX-1 knockout-mice を 6 ヶ月、1 年、1.5 年と長期間ケージ内で自然飼育した結果は、両者とも

経時的な軟骨変性の進行が認められたが、1 年と 1.5 年で、wild type マウスは関節軟骨の変性が有意に高度であった (各群 n=10、 $p < 0.001$ 、図 3).

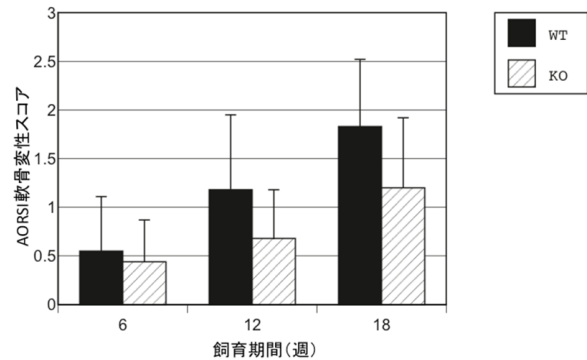


図 3. 長期間ケージ内で自然飼育における軟骨変性の変化 (OARSI スコア)

(3) Zymosan 誘発関節炎モデルマウスにおいても、LOX-1 knockout マウスでは Zymosan 関節内注入後 3 日、7 日後において軟骨変性の有意な抑制が認められ、LOX-1 と関節症変化の関連が示された (各群 n=10、 $p < 0.001$ 、図 3)

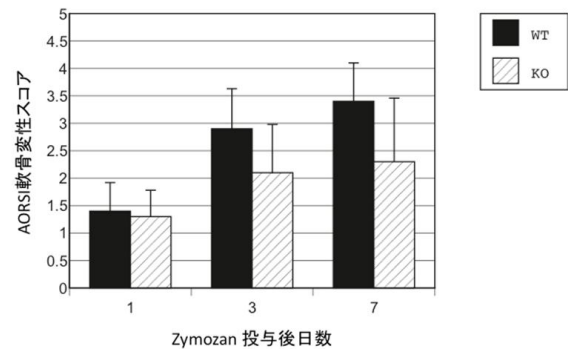


図 4. Zymosan 誘発関節炎モデルマウスにおける軟骨変性の変化 (OARSI スコア)

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 1 件)

①強制走行負荷による非侵襲性マウス変形性膝関節症モデルの作成

橋本和彦 赤木将男

近畿大学医学会雑誌 37 巻 第 1・2 号

11-19 頁 2012 査読あり

〔学会発表〕 (計 7 件)

①異なる野生型マウスでの強制走行負荷による変形性膝関節症様変化の比較検討

橋本和彦 赤木将男 小田豊 濱西千秋

第 26 回日本軟骨代謝学会

2013. 3. 2 大阪

②Zyosan 誘発性関節炎モデルマウスにおけるLOX-1の滑膜炎と軟骨変性に対する関与の検討

小田豊、赤木将男、橋本和彦、濱西千秋

第26回日本軟骨代謝学会

2013. 3. 1 大阪

③CHARACTERISING NON-SURGICAL MURINE KNEE OSTEOARTHRITIS MODEL PRODUCED BY CONTROLLED FORCED RUNNING

Hashimoto K, Akagi M

2012 OARSI World Congress

April 26-29 ,Barcelona Spain

④強制走行負荷によるマウス変形性膝関節症モデルの検討

橋本和彦 赤木将男 岸本英樹 浜西千秋

寺村岳士 小野寺勇太

第25回日本軟骨代謝学会

2012. 3. 9 名古屋

⑤非侵襲性OAモデルマウスと侵襲性OAモデルマウスの比較検討

橋本和彦 赤木将男 岸本英樹 浜西千秋

寺村岳士 小野寺勇太

第26回日本整形外科学会基礎学術集会

2011. 10. 21 前橋

⑥走行負荷でのマウス膝関節変形の検討 (ポスター発表)

橋本和彦 赤木将男 岸本英樹 浜西千秋

第24回日本軟骨代謝学会

2011. 3. 4 福岡

⑦走行負荷でのマウス膝関節変形の検討

橋本和彦 赤木将男 岸本英樹 浜西千秋

寺村岳士 小野寺勇太

第39回日本関節病学会

2011. 11. 12-13 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤木 将男 (AKAGHI MASAO)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：00273441

(2) 研究分担者

朝田 滋貴 (ASADA SHIGEKI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：00330283

橋本 和彦 (HASHIMOTO KAZUHIKO)

近畿大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10635569

(3) 連携研究者

沢村 達也 (SAWAMURA TATSUYA)

国立循環器病センター (研究所)・脈管整理部・部長

研究者番号：30243033

寺村 岳士 (TERAMURA TAKESHI)

近畿大学・医学部・医学部講師

研究者番号：40460901