

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592224

研究課題名(和文)変形性関節症の新しい関節マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of new joint markers for osteoarthritis

研究代表者

齋藤 知行 (SAITO, Tomoyuki)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30170517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：関節マーカーを用いて変形性関節症の病態解明と治療効果の客観的な評価を行うことが本研究の目的である。変形性膝関節症に対するヒアルロン酸の関節内注射により、臨床症状および各関節マーカーの改善が確認された。特にIL-6濃度の減少は炎症の抑制効果を示唆するものであり、IL-6はOAの病態や治療効果判定のマーカーと成り得る可能性がある。変形性関節症患者の滑膜組織中に血管および血管新生関連因子の発現増加が確認され、病態への関与とともに関節マーカーとしての有用性も示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate pathogenesis of osteoarthritis and to evaluate therapeutic efficacy using joint markers. Clinical status and joint markers were improved by intra-articular injection of hyaluronic acid for patients with osteoarthritis of the knee. Reduction of IL-6 suggests inhibitory effect of hyaluronic acid on inflammation and IL-6 seems to be a novel joint marker to assess progression and therapeutic efficacy for osteoarthritis. Increased number of blood vessels was shown in synovial tissue and increased expressions of angiogenesis-related factors were investigated. These factors contributing to progression of osteoarthritis are also possible joint markers for osteoarthritis.

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：変形性関節症 関節マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性関節症(OA)の発症や進行の病態把握は従来X線、MRI等の画像診断によって行われてきたが、近年、関節液、血液、尿中の関節構成体に由来する関節マーカーによる診断、評価が試みられている。病態の解明とともに治療効果の客観的な評価を行う場合、関節マーカーは有効な手段と考えられる。

(2) 現在臨床的に行われているOA治療は、消炎鎮痛剤投与などの対症療法や、関節機能再建のための人工関節置換術などが主体であり、関節軟骨の変性予防や修復・再生といった本質的な治療技術は未だ確立されていない。その中でヒアルロン酸の関節内注射は、関節軟骨の保護作用を有する治療法であり、OAの進行予防と病態の改善効果が期待されている。そのメカニズムを解明するにあたり、関節マーカーなど客観的な評価手段が必要と考えられる。

(3) これまで我々の研究グループは、関節マーカー開発のため、OAおよび類似疾患における関節液の解析を行ってきた。特発性膝骨壊死(ON)および変形性膝関節症での血管新生因子発現を比較し、両者の病態の違いを考察した。膝関節液中のangiogenin(ANG)濃度はON群がOA群に比べ有意に高値であり、vascular endothelial growth factor(VEGF)濃度はOA群がON群より有意に高かった。また、OA群のANG濃度とVEGF濃度には有意な相関が認められた。さらに今回、OAの滑膜における関節マーカーの候補としてSemaphorin3A(Sema3A)に注目した。Sema3Aは神経反発軸索因子として同定されたタンパクであるが、血管新生の抑制作用をもつことが報告されている。OAの滑膜における血管新生との関連については不明である。

## 2. 研究の目的

(1) ヒアルロン酸注射の効果について、関節マーカーを用いて客観的に評価することが目的である。治療前後での変化を統計学的に評価することで、薬剤の効果と軟骨保護作用のメカニズムについて検討した。

(2) OA患者の滑膜組織におけるSema3Aの発現について調査し、血管新生との関連について明らかにすることが目的である。関節リウマチ(RA)患者由来の滑膜組織と比較することで関節マーカーとしての可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 変形性膝関節症による膝痛を有する患者39例(43膝(女28、男11))を対象とした。全例、週1回の膝関節穿刺とヒアルロン酸の関節内注射を連続5週行った。初回と最終回

(5回目)に穿刺した関節液について、関節液の量、関節液中のヒアルロン酸(HA)、コンドロイチン4硫酸(C4S)、コンドロイチン6硫酸(C6S)、ケラタン硫酸(KS)、IL-6、粘度を測定した。膝痛の臨床症状評価法はJOAスコアを用いた。

(2) 人工膝関節置換術施行時にOA患者23例およびRA患者30例より滑膜組織を採取した。組織標本作製のため、採取した滑膜組織を10%ホルマリンで固定した後、アルコール脱水処理を行い、パラフィンに包埋した。組織切片を薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびCD34、VEGF165、Sema3A、Neuropilin1(NRP1)の免疫染色を行った。組織中の血管の局在と各マーカーとの関連について調査した。また、採取した滑膜組織からRNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを作製し、real-time polymerase chain reaction(PCR)法にてVEGF165、Sema3Aの相対的mRNA発現量を調査した。

## 4. 研究成果

(1) 平均年齢66歳、BMI23.7kg/m<sup>2</sup>、X線学的評価は平均立位FTA178°、横浜市大式OA進行度分類はgrade1:15膝、grade2:26膝、grade3:1膝、grade4:1膝であった。IL-6は初回の平均3733pg/mlから最終回の平均457pg/mlに有意に減少した(p<0.05)。C4Sは平均17.5nmol/mlから平均16.0nmol/mlに有意に減少した(p<0.05)。C6Sは平均59.7nmol/mlから平均50.2nmol/mlに有意に減少した(p<0.05)。KSは初回と最終回で有意差はなかった。粘度は49.6mPa・Sが72.5mPa・Sへ有意に増加した(p<0.05)。関節液量は平均14.2mlから平均7.2mlに有意に低下した(p<0.05)。HAは平均1.4mg/mlから平均1.6mg/mlに増加した。JOA scoreは投与前平均68点から最終投与後89点へ有意に改善した。

ヒアルロン酸の関節内注射により、臨床症状は改善し、各関節マーカーの改善も確認された。また、OA患者では関節液中のIL-6が増加することが報告されているが、本研究において、OA膝関節液中のIL-6濃度はHA注射により減少したことから、HAは炎症の抑制効果も有することが示唆されたとともに、IL-6はOAの病態や治療効果判定のマーカーと成り得る可能性があると考えられた。

(2) OA滑膜における血管新生とSema3A発現

### 血管形成とVEGFの発現

OAの滑膜組織において、管腔構造を有するCD34陽性血管が多数みられた。これは同様にRAの滑膜組織でも確認された。ただし、血管数はOAと比較してRA群で有意に増加していた。さらに、OAの滑膜組織において、VEGF165陽性細胞を確認した。しかしながらVEGF165mRNA発現量をRA患者由来の

滑膜と比較した結果、有意な差はみられなかった。

#### Sema3A の発現

OA の滑膜組織において、Sema3A 陽性細胞を免疫染色にて確認した。Sema3A の発現は主に lining layer にみられた。同様に NRP1 の発現も lining layer に確認された。Sema3A, VEGF165, NRP1 の発現細胞の部位は一致しており、これらの細胞に対して Sema3A と VEGF165 が NRP1 に競合的に結合をしている可能性が示唆された。Sema3A の相対的 mRNA 発現量は RA 患者由来の滑膜と比較して OA 患者由来の滑膜において有意に発現増加がみられた。

#### 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 12 件)

1. Saito T, Kumagai K, Akamatsu Y, Kobayashi H, Kusayama Y. Five- to ten-year outcome following medial opening-wedge high tibial osteotomy with rigid plate fixation in combination with an artificial bone substitute. *Bone Joint J.* 2014 96-B:339-44. (査読有り)
2. Kobayashi H, Akamatsu Y, Kumagai K, Kusayama Y, Ishigatsubo R, Muramatsu S, Saito T. The surgical epicondylar axis is a consistent reference of the distal femur in the coronal and axial planes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014 DOI10.1007/s00167-014-2867-y (査読有り)
3. Takagawa S, Nakamura F, Kumagai K, Nagashima Y, Goshima Y, Saito T. Decreased semaphorin3A expression correlates with disease activity and histological features of rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:40. (査読有り)
4. 熊谷研, 齋藤知行: 高位脛骨骨切り術 (High Tibial Osteotomy : HTO). *整形外科 SURGICAL TECHNIQUE*, 2013; 3: 527-541. (査読無し)
5. Kumagai K, Sakai K, Kusayama Y, Akamatsu Y, Sakamaki K, Morita S, Sasaki T, Saito T, Sakai T. The extent of degeneration of cruciate ligament is associated with chondrogenic differentiation in patients with osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20:1258-67. (査読有り)
6. Kumagai K, Takeuchi R, Ishikawa H, Yamaguchi Y, Fujisawa T, Kuniya T, Takagawa S, Muschler GF, Saito T.

Low-intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing by stimulation of recruitment of both local and circulating osteogenic progenitors. *J Orthop Res.* 2012;30: 516-21. (査読有り)

7. Kobayashi H, Mitsugi N, Mochida Y, Taki N, Akamatsu Y, Aratake M, Ota H, Ishii K, Harigane K, Ideno T, Saito T. Mid-term results of stryker® scorpio plus mobile bearing total knee arthroplasty. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2012;4:38. (査読有り)
8. Akamatsu Y, Mitsugi N, Hayashi T, Kobayashi H, Saito T. Low bone mineral density is associated with the onset of spontaneous osteonecrosis of the knee. *Acta Orthop.* 2012; 3:249-55. (査読有り)
9. Akamatsu Y, Mitsugi N, Taki N, Kobayashi H, Saito T. Medial versus lateral condyle bone mineral density ratios in a cross-sectional study: a potential marker for medial knee osteoarthritis severity. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64:1036-45. (査読有り)
10. Takeuchi R, Ishikawa H, Kumagai K, Yamaguchi Y, Chiba N, Akamatsu Y, Saito T. Fractures around the lateral cortical hinge after a medial opening-wedge high tibial osteotomy: a new classification of lateral hinge fracture. *Arthroscopy.* 2012 ;28:85-94. (査読有り)
11. 熊谷研, 齋藤知行: 誌上シンポジウム 高位脛骨骨切り術の適応と限界 Opening wedge 法. *臨床整形外科*, 2012; 47: 1171-1175. (査読無し)
12. 齋藤知行, 熊谷研: 専門医のための疾患・外傷診療ガイド 変形性膝関節症(特発性骨壊死を含む). *関節外科 10 月増刊号*, 2012; 31: 266-271. (査読無し)

[学会発表](計 6 件)

1. 熊谷研, 赤松泰, 小林 秀郎, 草山 喜洋, 石ヶ坪 諒, 村松 俊太郎, 齋藤知行: 低出力超音波パルス (LIPUS) 刺激が Sclerostin 発現と骨形成に与える影響. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 幕張, 2013 年 10 月 17 日
2. 熊谷研, 草山喜洋, 赤松泰, 酒井尚雄, 齋藤知行: 変形性膝関節症における十字靭帯の変性は靭帯細胞の軟骨分化に関連する. 第 86 回日本整形外科学会学術総会, 広島, 2013 年 5 月 24 日
3. 熊谷研, 稲葉裕, 松尾光祐, 針金健吾, 雪澤洋平, 草山喜洋, 長岡亜紀子, 齋藤知行: 滑膜切除術を併用した人工膝関節

置換術が関節リウマチの疾患活動性に及ぼす影響. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 京都, 2013 年 4 月 19 日

4. Kumagai K, Sakai K, Kusayama Y, Akamatsu Y, Saito T, Sakai T. The extent of degeneration of cruciate ligament is associated with chondrogenic differentiation in patients with osteoarthritis of the knee. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Antonio, 2013, January 28.
5. 熊谷研, 稲葉裕, 松尾光祐, 針金健吾, 雪澤洋平, 草山喜洋, 長岡亜紀子, 藤崎真理, 齋藤知行: 生物学的製剤投与下関節リウマチ患者骨組織における TNF- $\alpha$  および IL-6 発現の免疫組織学的評価. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012 年 10 月 26 日
6. Kumagai K, Akamatsu Y, Kobayashi H, Kusayama Y, Ishigatsubo R, Muramatsu S, Koshino T, Saito T. Histological abnormality of subchondral structure in spontaneous osteonecrosis of the knee. 7th Congress of the Asia Pacific Knee Society (APKS), New Delhi, India, 2012, October 4.

〔図書〕(計 3 件)

1. 齋藤知行, 熊谷研: 変形性膝関節症における保存的治療の限界・手術的治療の適応. 変形性膝関節症の運動療法ガイド. 日本医事新報社, 164-8, 2014.
2. 齋藤知行, 熊谷研: 高位脛骨骨切り術 (opening wedge 法). 変形性膝関節症の運動療法ガイド. 日本医事新報社, 169-175, 2014.
3. 熊谷研, 齋藤知行: 変形性膝関節症による痛み; 治療の実際. 運動器の痛みプライマリケア 膝・大腿部の痛み, 南江堂, 227-233, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 知行 (SAITO, Tomoyuki)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 30170517

(2) 研究分担者

熊谷 研 (KUMAGAI, Ken)  
横浜市立大学・医学部・講師  
研究者番号: 10468176

草山 喜洋 (KUSAYAMA, Yoshihiro)  
横浜市立大学・附属病院・助教  
研究者番号: 40618203

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

George F Muschler  
Cleveland Clinic, Orthopaedic Research  
Center, Director (USA)