

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10472

研究課題名(和文)変形性関節症におけるEPAの治療薬としての有効性検討

研究課題名(英文)The influence of gelatin hydrogel including eicosapentaenoic acid on the osteoarthritis progression in vivo.

研究代表者

林 申也 (Hayashi, Shinya)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20437487

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)：EPA(エイコサペンタ塩酸)は自然界においてニシン、サバなどに含まれる抗酸化物質として健康食品などにも含まれることで知られている。一方変形性関節症の発症要因として酸化ストレスが関係することが報告されている。我々はEPAによる抗酸化作用が変形性関節症の進行を抑制できないかと考えた。そこでマウス変形性関節症モデルを作成し、EPAを投与することで関節症進行の抑制効果を検討した。結果、EPAは変形性関節症変化で起こる炎症反応の増強を抑制、さらに軟骨細胞の細胞死を抑制することにより関節症性変化を抑制することが考えられた。変形性関節症治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Eicosapentaenoic acid (EPA) is an antioxidant and omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acid that reduces the production of inflammatory cytokines. We previously reported that EPA treatment inhibited chondrocyte apoptosis and MMP expression induced by oxidative stress in vitro, and prevented osteoarthritis (OA) progression in vivo. The purpose of this study is to investigate the effect of gelatin hydrogel including EPA on the OA progression in vivo. Thirty-six male C57BL/6J mice were randomly divided into 6 groups (n = 6 mice each): sham, DMM, DMM injected with corn oil, DMM injected with corn oil and EPA, DMM with control gelatin hydrogel and DMM with gelatin hydrogel including EPA. Corn oil or corn oil with EPA was injected once into the knee joint at timing of DMM surgery. We investigated the effect of gelatin hydrogel including EPA on the OA progression in vivo. The gelatin hydrogel including EPA prevented OA progression more effectively than single injection of EPA in vivo.

研究分野：整形外科

キーワード：EPA 軟骨 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢者の増加とともに変形性関節症などの著しい関節障害を有する患者は増加の一途をたどっている。これらの患者は疼痛による歩行障害などのために重篤な肢体障害を来す。そのため、患者のADLやQOLは著しく低下し、社会的、経済的影響は甚大である。このような変形性関節症に対する手術的治療として人工関節置換術は非常に良好な成績を収め、確立されたものとなっているがその反面、人工関節ゆるみなどの合併症もあり、患者への侵襲、負担も大きい。

現在のところコンセンサスの得られた効率的な保存的治療は無い。よって軟骨変性に対し安全かつ効率的な治療を開発することは非常に社会的に重要である。エイコサペンタエン酸 (EPA) は 3 多価不飽和脂肪酸の一種であり、広義の必須脂肪酸です。ニシンやサバ、イワシなどの自然界から採取される。EPA の働きとして免疫、凝血反応、炎症などを引き起こす、 $\omega$ -6 系統 (Arachidonic acid 等) を制御することが報告されており、現在心血管系疾患、動脈硬化、高脂血症、アルツハイマーなどの治療薬として使用されています。EPA と軟骨代謝に関する報告も散見され、EPA は軟骨細胞において IL-1 由来の炎症性サイトカイン、MMP 等の発現を抑制するといった報告や、3 多価不飽和脂肪酸の経口摂取により関節軟骨の変性が抑制されたとの報告がある。我々はこれまでに、マウス関節症モデルを作成し膝関節内に注射で EPA を投与すると、軟骨細胞アポトーシスの抑制、さらに MMP-13 などの基質分解酵素の発現抑制により関節症の進行を抑制したということ報告しているが、基質分解酵素が抑制さ

れたかの機序は検証できていない。一方徐放性ゲルに関して gelatin hydrogel により薬剤投与の徐放化が可能となり、この hydrogel を用いることで現在までシンバスタチン含有の gelatin hydrogel を ACL 再建部位に投与すると tendon-bone healing が促進した、という報告や自家骨単独をウサギ尺骨偽関節部に移植しても骨癒合は得られなかったが、自家骨に BMP-2 と  $\beta$ -TCP 含有の gelatin hydrogel を併用で移植すると骨癒合が得られたという報告など gelatin hydrogel の有効性が証明されている。我々は、これまでに軟骨細胞にメカニカルストレスを加えると p53 を介したアポトーシスが亢進し、p53 の発現を抑制することによりストレス応答性のアポトーシスを制御できたことを報告してきた (Hashimoto et al. Arthritis Rheum, 2007)。さらにその上流のシグナルである p38 MAPkinase についても着目し、heat shock などのストレスを軟骨細胞に加えると p38 MAPkinase を介したアポトーシスが亢進し、p53 と同様に p38MAPkinase の発現を抑制するとストレス応答性のアポトーシスを制御できたことを報告してきた (Takebe et al. Int J Mol Med, 2011)。さらに p53 関連の分子として、p53R2 や Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) などが MAPkinase, AKt のリン酸化を介して変形性関節症軟骨組織における MMP-3, MMP-13 の発現制御に関与することを発見しそれぞれ報告してきた (Kawakita et al. Osteoarthritis Cartilage, 2012) (Iwasa et al. J Orthop Res, 2014)。以上のように我々は変形性関節症の軟骨組織において、軟骨細胞のアポトーシス制御と Type II collagen,

aggrecan などの軟骨基質の分解制御の両面で、関節症予防の方法を様々な分子に着目することで研究を行ってきた。

EPA の働きとして、先の項目で述べたように軟骨基質分解酵素である MMPs の発現を調整する働きや、抗酸化剤としての軟骨細胞のアポトーシス制御に関する作用なども予想されることから、EPA の効果として軟骨細胞のアポトーシス制御と軟骨基質の分解制御の両面が考えられ、変形性関節症に対する治療薬としての有効性を検討することに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は変形性関節症の進行に対する EPA 含有徐放 gel の抑制効果及び、関節症進行抑制の機序を検討することである。

## 3. 研究の方法

C57BL/6J マウスの右膝に変形性関節症を誘発する DMM 手術を施行し、DMM 手術のみの群、手術後毎週関節内に EPA を注射する群、手術時に関節内に hydrogel のみを封入する群、EPA 徐放ゲルを封入する群を作成しました。DMM 手術後 8 週間で組織を回収し、組織学的評価を行い変形性関節症の進行の程度を比較した。

組織学的評価として Safranin-0 staining 染色を行い Mankin 's score を計測した。

さらに軟骨基質分解酵素として MMP-13 を、炎症との関連を調べるために F4/80, IL-1 , IKK のリン酸化を免疫組織染色で検討した。

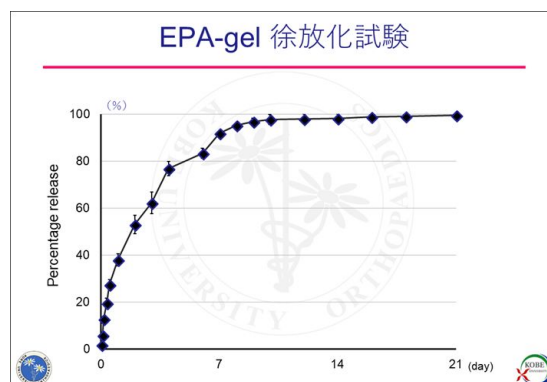
## 4. 研究成果

まず徐放化試験を行い徐放パターンを評価したところ、約 7 日で 80%程度が放出されたが、14 日でも引き続き徐放されていた (図

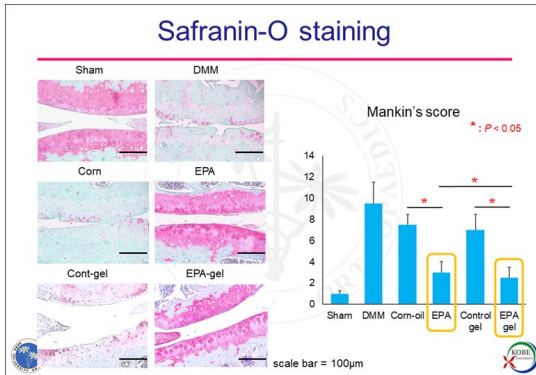
1)。

コントロールゼラチンハイドロゲル群に比較して EPA 含有ゼラチンハイドロゲル群では 8 週で OA 変化の抑制、具体的には 8 週時点において EPA 群では有意に OARSI score の低減を認めた (図 2)。F4/80, IL-1 , IKK のリン酸化など炎症性マーカーの抑制、軟骨基質分解酵素である MMP-13 の発現抑制 (図 3) を認めた。ゲル群と単回注射投与群を比較するとゲル群において 8 週で有意に上記抑制された。1 週においても滑膜の炎症性変化の抑制 (Synovitis score)、さらに炎症性マーカーはすべての項目においてコントロール群に比較して EPA 投与群で抑制された。これらの結果より、EPA は変形性関節症変化で起こる炎症反応の増強を抑制することにより関節症性変化を抑制することが考えられた。

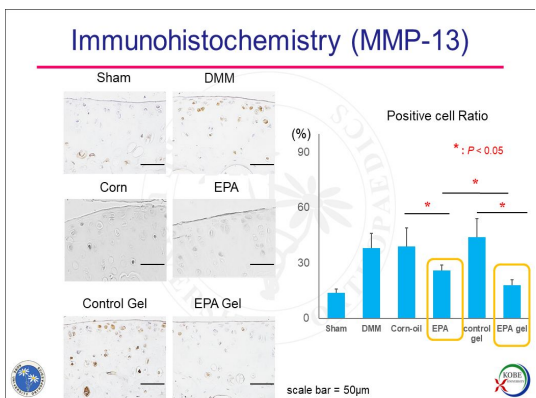
(図 1)



(図 2)



(図 3)



## 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 1 件)

Tsubosaka M, Hayashi S, Kihara S, Nagata J, Kuroda Y, Takeuchi K, Haneda M, Kirizuki S, Takayama K, Hashimoto S, Matsumoto T, Tabata Y, Kuroda R, The influence of gelatin hydrogel including eicosapentaenoic acid on the osteoarthritis progression in vivo. The 64 th annual meeting Oropaedic Research Society, 2018 New Orleans, USA Mar-13 2018

〔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〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 申也 (HAYASHI, Shinya)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 2 0 4 3 7 4 8 7