

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：22401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17984

研究課題名(和文) 関節不安定性が及ぼす関節軟骨変性カスケードの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the articular cartilage degeneration cascade caused by joint instability

研究代表者

村田 健児 (Murata, Kenji)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・助教

研究者番号：30792056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症はメカニカルストレスなどにより軟骨組織の変性や磨耗、関節周囲を取り囲む滑膜炎、関節辺縁部の軟骨内骨化を誘発し骨棘を特徴とする。変性を進行させる一要因として関節不安定性がメカニカルストレスとなり、運動学的情報を関節軟骨が探知し、細胞内への情報伝達やその応答を行う一連のメカノバイオリジカル機構が軟骨変性に寄与していると考えている。本研究では関節不安定性が異なる動物モデルを開発し、新たな視点から関節軟骨とメカニカルストレスとの関係を見出してきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症は国内でも罹患者の多い運動器疾患であるが、その原因や対処法については不明瞭な点も多い。そのなかで、関節不安定性に着目し、関節不安定性がメカニカルストレスの一要因として、軟骨変性を引き起こす可能性を報告した。このことは、関節のぐらつきを止めることで軟骨変性を抑制できる可能性を示し、今後のリハビリテーション分野における治療指針や予防方法を考える上で一助となることとが期待される

研究成果の概要(英文)：Articular cartilage is maintained in balance between the breakdown and synthesis of cartilage tissue. Previous studies have shown that joint instability is a key factor in the prevention of the onset and progression of knee osteoarthritis. Moreover, inflammatory cytokines and chondrocyte-degrading enzymes, which contribute to the degradation of cartilage were suppressed in inhibited joint instability models

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：変形性膝関節症 関節不安定性 関節軟骨

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症 (Knee Osteoarthritis: 以下 OA) は膝関節の疼痛と機能障害を主症状とする運動器疾患である。潜在的な OA を含めると本邦の罹患者数は推定 2000 万人以上とされ、重症化すると日常生活活動や生活の質 (QOL) の著しい低下を招く。OA 発症の一要因としてメカニカルストレスの増加が関連していることは周知の事実であるが、なかでも OA 患者は立ち上がりや歩行中に関節不安定性を自覚していることが近年報告されている<sup>1)2)</sup>。

生体組織や細胞は、外界からのメカニカルストレスを感受し、我々の生活する環境変化に絶えず適応している。このメカニカルストレスに対する細胞内への情報伝達やその応答は、近年、メカノバイオロジイと呼ばれる新たな研究領域となっている。関節軟骨においても、外界からのメカニカルストレスを感受し、情報伝達を行うメカノバイオロジカル機構によって、軟骨の荷重緩衝機能を維持している。しかし、関節軟骨がどのような力学的情報を探知し、細胞内へ情報伝達を行っているか、また、軟骨変性への関与について、未だ不明な点が多い。従来から体重の増加が、変形性関節症を進行させる要因であることは感覚的に理解されてきた。しかし、近年、関節の「緩さ」に伴うメカニカルストレスが軟骨変性に深く関連していると科学的に報告されている<sup>3)4)</sup>。これは、軟骨細胞に剪断ストレスを加えると細胞生存能が低下するという *in vitro* での報告と一致していることから、関節の「緩さ」という力学的情報を介して、細胞内へ異常な情報伝達を引き起こされていると推察できる。すなわち、関節の「緩さ」や「硬さ」という異なる身体的条件を再現する新たなモデルを開発することで、関節環境の変化が軟骨に及ぼすメカノバイオロジカル機構の解明が可能であると考えた。

その手段として、従来の膝関節前十字靭帯を損傷させ不安定性を惹起した後に関節包外から制動する新たな関節制動モデルを開発した<sup>5)</sup>。申請者はこの新たなモデルを利用し、OA の発症には関節不安定性が関与していることを実験的に検証した。

## 2. 研究の目的

我々は「関節の緩さ」を関節不安定性と定義し、関節不安定性が異なる新たなラットモデルを開発することで運動学的視点から関節軟骨の変性メカニズムを検証することを目的とした

## 3. 研究の方法

### (1) 実験プロトコル

11 週齢の Wistar ラット (Clea Japan、東京都、日本、体重  $239.3 \pm 31.5$ g) 94 匹を 2 群に無作為に割り付けた。関節不安定性を制動した群 (Controlled abnormal movement: CAM) は、前十字靭帯 (ACL) を手術による切断後に脛骨の前方不安定性を制動した。SHAM 群は、従来の ACL 手術で脛骨の前方不安定性を誘導したまま飼育した。前十字靭帯を断裂は、膝蓋骨内側より縦切し、剪刀を関節内に侵入することで前十字靭帯を断裂させた。関節制動術は先行研究に従い、歯科用ドリル NSK アルチメイト XL を用いて脛骨内側から脛骨外側に向けて開孔し、骨孔に 4-0 ナイロン糸を脛骨内側から脛骨外側に貫通させ、ループ状に大腿骨後顆の外側から内側にかけて緊縛した。前方への関節不安定性を制限した後、関節包と皮膚を閉創した。

### (2) 生体における関節不安定性ならびに脛骨・大腿骨の位置異常

実験動物について、術後 8 週時点で制動の効果を評価するために軟 X 線装置 M-60 を利用して、膝関節を撮像した。撮影肢位は、膝関節屈曲 90 度とし、管電圧 28kV、電流 1mA、露光時間 1 秒と設定した。撮像したデータは、デジタル画像センサー NAOMI を利用して、デジタル化された。各サンプルにおいて、関節の不安定性を 5 段階 (0-4) で評価した

### (3) 関節不安定性の違いにおける膝関節組織への影響

軟骨変性、滑膜炎、および骨棘形成を分析するために、4 週間および 8 週間で凍結切片を作成した。切片は矢状面 (厚さ  $16 \mu\text{m}$ ) で切断し、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。軟骨変性は Mankin システム<sup>6)</sup>、滑膜炎は Osteoarthritis Research Society International (OARSI) スコアリングシステム<sup>7)</sup>、骨棘形成は Little et al.らの報告と同様にスコアリングした<sup>8)</sup>。組織学的検査は、他のすべてのサンプル情報を盲検化した共同実験者 2 名によって評価された。

免疫組織化学染色は TGF- $\beta$ 、BMP-2、II 型コラーゲン、および I 型コラーゲンについて ABC 法を用いて可視化し、染色性を半定量的に解析した。また、免疫蛍光染色は、p-Smad2/3 抗体、抗 p-Smad1/5 抗体ならびに Dylight 488 (希釈 1:200) で発色し、撮像した。免疫蛍光発現の密度を Image J ソフトウェアを用いて定量した。

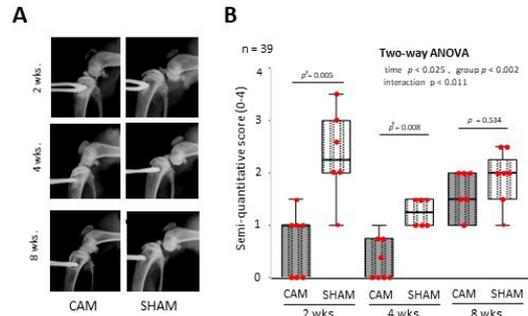
### (4) 滑膜におけるタンパク質解析

2 週間後、4 週間後、8 週間後滑膜組織からタンパク質を抽出した。タンパク質濃度は BCA 法を用いて測定した。その後、TGF- $\beta$  および BMP-2 のタンパク質濃度を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 関節不安定性ならびに脛骨・大腿骨の位置異常

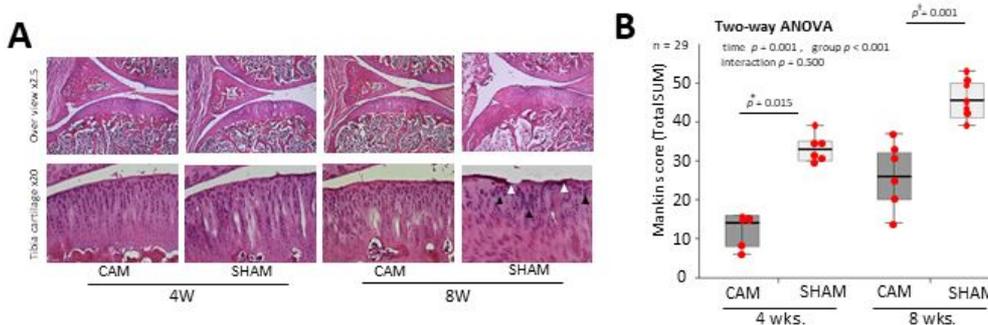
前方関節不安定性スコアは、術後2週間 (CAM、1 [0-1]; SHAM、2.25 [2-3];  $p = 0.005$ 、95%CI (0.77-2.60)) および術後4週間 (CAM、0 [0-0.75]; SHAM、1.25 [1-1.5];  $p = 0.008$ 、95%CI (0.20-2.25)) において、CAM群の方がSHAM群に比べて有意に低かった。



##### (2) 関節不安定性の違いにおける軟骨組織への影響

SHAM群では4週目と8週目に軟骨の劣化が認められ、表面のフィブリル化に加え、クラスター細胞や無細胞軟骨、軟骨下骨への浸潤が確認された (図A)。膝の組織学的 Mankin スコアは、4週目 (33 [30-35] vs. 14 [9.5-15.5];  $p < 0.015$ 、95%CI (8.65-28.01)) と術後8週目 (48 [42-51] vs. 26 [21-31];  $p < 0.001$ 、95%CI (11.97-33.50)) でSHAM群の方がCAM群に比べて有意に高かった (図B)。

TGF- $\beta$  の発現は、4週目にはCAM群よりSHAM群の方が有意に高かった (14.3 (10.2-18.3) % vs 6.4 (4.8-8.0) % ;  $p = 0.004$ 、95%CI (2.44-13.29))、8週目の時点でSHAM群とCAM群に有意差はなかった (10.0 (5.8-14.2) % vs. 6.5 (4.6-8.5) % ;  $p = 0.445$ 、95%CI (-2.49-9.37))。一方、BMP-2発現については、両群間で有意差は認められなかった。



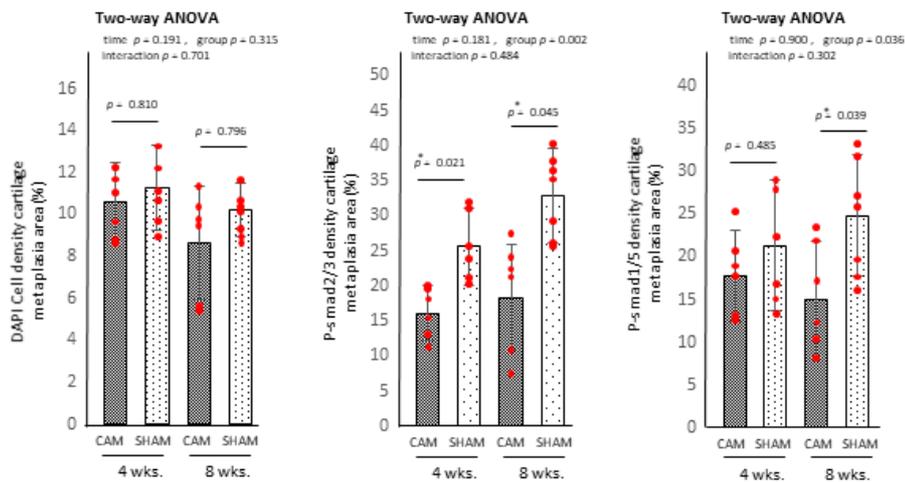
##### (3) 滑膜組織と骨形成 (骨棘) への影響

滑膜は4週目から8週目まで、CAM群ではSHAM群に比べて細胞層数が減少し、滑膜組織の増殖が抑制されていた。しかし、4週目に観察した場合、SHAM群では組織の肥厚、細胞層の増加、炎症性細胞の浸潤が認められた。炎症所見のスコアは、8週目にSHAM群がCAM群に比べて有意に高かった。8週目の時点では、SHAM群はCAM群に比べてOARSI炎症所見のスコアが上昇していた (CAM、2 [2-3]、SHAM、3 [3-4]、 $p = 0.008$ 、95%CI (0.29-2.60))。

骨棘については術後8週目の骨棘スコア (図6B) は、CAM群の方がSHAM群よりも有意に低かった (Total; 5.5 [5-8] vs. 12.5 [12-14];  $p = 0.001$ 、95%CI (1.61-5.00))。特に、成熟度 (成熟度; CAM、2 [2-3]; SHAM、5.5 [5-6];  $p = 0.001$ 、95%CI (1.85-4.09)) では両群間に差はなかったが、サイズ (サイズ; CAM、3.5 [3-5]; SHAM、7 [6-8];  $p = 0.002$ 、95%CI (4.02-8.69)) では両群間に統計的に有意な差があった。

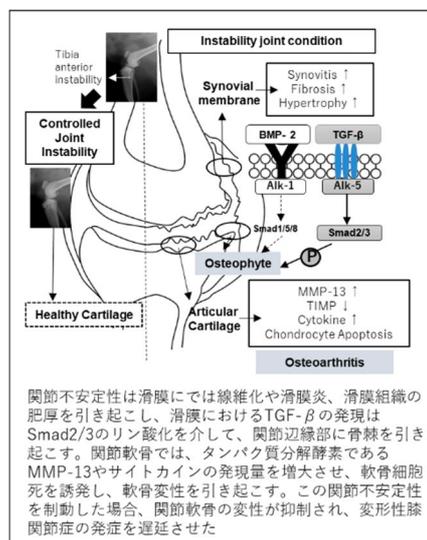
##### (4) 滑膜組織と骨形成 (骨棘) のメカノセンシング

骨棘形成因子のなかでもBMP-2やTGF- $\beta$  1、ならびに下流シグナルであるsmad2/3やsmad1/5/8について関節不安定性の制動がmRNAレベルでは滑膜でsmad1/5/8やsmad2/3の発現を抑制し、特にTGF- $\beta$  1-smad2/3シグナルにおいては、関節不安定性モデルにおいてメカニカルストレスを強く感知する脛骨後方の軟骨化生部に顕著な差を認めた。関節不安定性というメカニカルストレスは、TGF- $\beta$  1-smad2/3シグナリングを主に骨棘の形成を促進し、変形性膝関節症を進行させる分子生物学的情報に変換されている可能性を示唆した。



### (5)まとめ

関節軟骨は軟骨組織の分解と合成のバランスを適切に保たれている。これまでの研究において、関節不安定性は変形性膝関節症の発症や進行の予防には炎症性サイトカインや軟骨分解酵素といった軟骨基質分解に寄与する因子を抑制した(図)。一方で、関節軟骨の潤滑機構を担うヒアルロン酸やルプリリンを中心とする軟骨基質の維持・合成因子の制御は変形性膝関節症の発症や予防にとって重要である。一般的な保存療法の一つであるヒアルロン酸の関節内注入療法と同じように、関節不安定性を制動することによって関節内の潤滑機構を維持できること、更にはそのメカノセンシングを明らかにすることで変形性膝関節症の発症要因の解明、延いては真の治療や予防方法の開発へ発展する可能性がある。そのなかでも、関節軟骨の低摩擦潤滑機能を担うルプリリンは遺伝子転写制御領域に存在するcAMP 応答配列 CREB を活性化する事で発現が増加することが報告されており、今後検証を進めていく。



月刊 細胞11月号：関節不安定性が膝関節構成体に及ぼすメカノセンシング, 村田健児より引用

### 引用文献

- 1) Knoop J, van der Leeden M, van der Esch M, et al. Association of lower muscle strength with self-reported knee instability in osteoarthritis of the knee: Results from the Amsterdam Osteoarthritis Cohort. Arthritis Care and Research 2012
- 2) Gustafson JA, Gorman S, Fitzgerald GK, et al. Alterations in walking knee joint stiffness in individuals with knee osteoarthritis and self-reported knee instability. Gait Posture 2016;43:210-5.
- 3) Egloff C, Sawatsky A, Leonard T, et al. Effect of muscle weakness and joint inflammation on the onset and progression of osteoarthritis in the rabbit knee. Osteoarthritis and Cartilage 2014;22:1886e93
- 4) Tochigi Y, Vaseenon T, Heiner AD Effect of muscle weakness and joint inflammation on the onset and pro Instability dependency of osteoarthritis development in a rabbit model of graded anterior cruciate ligament transection. J Bone Joint Surg 2011;93:640e7,
- 5) Kokubun T, Kanemura N, Murata K, et al. Effect of changing the joint kinematics of knees with a ruptured anterior cruciate ligament on the molecular biological responses and spontaneous healing in a rat model. The American Journal of Sports Medicine 2016;44:2900-10.
- 6) Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, et al. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. Osteoarthritis and Cartilage 2010;18:S24-34.
- 7) Santangelo KS, Pieczarka EM, Nuovo GJ, et al. Temporal expression and tissue distribution of interleukin-1 in two strains of guinea pigs with varying propensity for spontaneous knee osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 2011;19:439-48.

8) Little CB, Barai A, Burkhardt D, et al. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis and Rheumatism* 2009;60:3723-33.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田健児, 岡優一郎, 加納拓馬, 国分貴徳, 鬼塚勝哉, 森下佑里, 小曾根海知, 桑原希望, 西元淳司, 藤原秀平, 中島彩, 高柳清美, 金村尚彦
2. 発表標題 変形性膝関節症動物モデルにおける関節運動の正常化がBMP-2/Smad mRNA発現量に及ぼす影響
3. 学会等名 第37回関東甲信越ブロック理学療法士学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----