

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02927

研究課題名(和文) 軟骨下骨脆弱性の関節軟骨変性へ与える影響および骨形成薬の軟骨変性抑制効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of subchondral fragility on cartilage degeneration, and the preventive effect of parathyroid hormone on cartilage degeneration.

研究代表者

松田 秀一 (Matsuda, Shuichi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40294938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症のラットに対して軟骨下骨微小骨折の影響を検討したが、軟骨下骨への侵襲のみでは明らかな変形性関節症の発症を認めなかった。しかし既存変形性関節症+軟骨下骨微小骨折軟骨下骨微小骨折モデルでは、軟骨下骨の著しい骨吸収を認め、副甲状腺ホルモン製剤投与で、軟骨下骨の回復と、変形性関節症の進行の軽減が認められた。軟骨下骨微小骨折のラットでは軟骨における炎症性サイトカインなどの遺伝子発現の更新が見られ、変形性関節症モデルラットでは軟骨下骨においての遺伝子発現の変化も見られた。また、軟骨下骨病変の直上において、著しい軟骨の変性を認め、MRI、CTなどの画像検査でも軟骨下骨病変は確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨下骨の損傷では、軟骨に遺伝子変化がおり、軟骨の損傷では軟骨下骨に遺伝子変化が起こることが確認された。また、骨へ作用する副甲状腺ホルモン製剤の投与で、軟骨下骨の状態が改善することで、軟骨の状態も改善することがわかった。軟骨下骨の病変を画像検査で確認できることも確認できた。軟骨に直接作用する薬剤存在しないが、軟骨下骨には薬剤介入が可能であるため、軟骨下骨への薬剤的アプローチは可能であり、軟骨下骨の形態的变化と変形性関節症との関連性について、研究を続けている。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of subchondral bone microfracture on osteoporotic rats, and found that invasion of the subchondral bone alone did not cause obvious osteoarthritis. However, in the preexisting osteoarthritis + subchondral bone microfracture subchondral bone microfracture model, significant bone resorption of subchondral bone was observed, and administration of a parathyroid hormone preparation resulted in recovery of subchondral bone and a reduction in the progression of osteoarthritis. Rats with subchondral bone microfractures showed updated gene expression of inflammatory cytokines and other genes in cartilage, and rats with osteoarthritis models also showed changes in gene expression in subchondral bone. In addition, significant cartilage degeneration was observed directly above the subchondral bone lesion, and the subchondral bone lesion was confirmed by imaging studies such as MRI and CT.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 骨粗鬆症 関節軟骨 軟骨下骨

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、加齢に伴い関節軟骨が変性し疼痛を伴う疾患であり、病期が進行すると外科的治療が必要になることも多い。現在まで関節軟骨の変性のメカニズムについての研究は多くなされてきたが、近年の臨床研究の結果から、関節周囲の骨の脆弱性および微小骨折の発生が関節症進行に寄与する可能性が指摘されはじめている。

変形性関節症の病態は、これまで「関節軟骨の加齢に伴う変性によるもの」と断ぜられ、関節軟骨をターゲットとした研究が進められてきた。しかし関節軟骨は細胞成分が少なく細胞活性も乏しいことなどから、関節軟骨の変性を抑制し、また関節軟骨を広範囲に再生することは容易ではないことが明らかになっている。軟骨変性を防ぐ遺伝子や薬剤の研究がこれまで盛んに行われてきたが、未だに実用化された治療法はないのが現状である。

一方、関節軟骨を支える「骨」については、これまであまり注目されていなかった。軟骨の変性が進んだ結果として軟骨下骨の硬化が起こることは既知であったが、ここ数年で軟骨下骨の変化自体が変形性関節症の発症や進行に与える影響について知見が得られつつある(Kerns et al. 2014, Arthritis Rheumatol)。我々も、家兎に作成した変形性膝関節症に bisphosphonate を投与することで、軟骨変性が抑制されることを報告した(Shirai et al. 2011, J Orthop Res)。実際に Fu らは bisphosphonate を投与した変形性膝関節症患者において人工膝関節のリスクが減じたと報告している(Fu et al. 2017, J Bone J Surg am)。しかし、軟骨下骨の脆弱性や微小骨折が、どのようにして変形性関節症の発症や進行に影響を与えるのか十分明らかになっていない。特に *in vivo* の実験系を用いた直接的な研究は少なく、軟骨下骨への介入の臨床的意義について多くの疑問が残されている。

我々は先行研究において、ラットの変形性関節症モデルを用いて、軟骨下骨に微小骨折を起こすことにより、関節軟骨変性が増悪することを示した。しかし何故軟骨下骨の微小骨折が軟骨変性を増悪させるかは分かっておらず、軟骨下骨と軟骨の間のクロストークのメカニズムは解明されていない。この分子生物学的なメカニズムを解析することで新たな治療薬開発の可能性を探りたい。さらに骨粗鬆症薬の全身投与のみならず、軟骨下骨に局所的に薬剤を投与することで、関節軟骨変性をどの程度抑えられるのかを調査することで、軟骨下骨が変形性関節症治療の有効なターゲットになり得るのかを問いたいと考える。

本研究においては、動物モデルを用いて、全身性の骨粗鬆症ならびに軟骨下骨の微小骨折が関節軟骨変性に与える影響とそのメカニズムについて調べ、骨形成薬による軟骨変性の抑制効果について検討する。高齢化が進み変形性関節症の患者数は増加しており、薬物により悪化を抑制することができれば患者個人のみならず医療経済全体に対する大きな利益になると考える。

2. 研究の目的

変形性関節症の学術的な研究は、疫学的な研究や、関節軟骨の変性の進行メカニズムについての研究が主体であったが、関節軟骨を支える軟骨下骨が関節軟骨に与える影響についての報告はわずかである。近年その重要性はいくつかの疫学研究によって明らかにされつつあり(Laslett et al. 2013, Ann Rheum Dis)、今後注目すべき研究分野である。また、骨粗鬆薬が変形性膝関節症の症状を抑えたという報告はあるが、そのメカニズムについては明らかになってはいない。

本研究の目的は、全身性の骨粗鬆症の変形性関節症への影響を検討するだけでなく、軟骨下骨に微小な損傷を与え、軟骨下骨の質的变化が変形性関節症の発症および増悪に影響を及ぼすかどうかについて検討するところにある。また局所的に投与した薬剤の効果を検討することも可能である。関節軟骨そのものに損傷を与えず軟骨下骨のみに損傷を与えることにより、その影響を独立して評価できる実験系であり、このような試みは今までなされておらず、直接的で臨床に応用可能な知見が得られることが期待される。更に骨形成促進薬などの薬剤による治療効果が認められれば、今まで抗炎症作用、鎮痛作用が中心であった変形性膝関節症の薬物治療においてパラダイムシフトがもたらされる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 全身性の骨粗鬆症が軟骨下骨微小骨折による軟骨変性に与える影響の解明、および治療薬による関節軟骨変性の予防に対する探索的解析

全身性骨粗鬆症の変形性関節症に与える影響の解明

両側卵巣切除を行い12週間待機することにより、全身性の骨粗鬆症モデルを作成する。骨粗鬆症モデル作成後12週での椎体及び脛骨近位での骨形態計測を行い骨粗鬆症の程度を確認する。このモデルに、脛骨近位端内側の軟骨下骨部位に関節面と平行に骨孔を0.5mmのmicrodrillを用いて7カ所作成し、膝関節軟骨下骨微小骨折モデルを作製して、軟骨及び軟骨下骨の形態学的変化、遺伝子発現の変化を解析する。a) Sham 群, b) 軟骨下骨微小骨折群を作成して検討を行う。術後6,12週後に膝関節を採取する。軟骨及び軟骨下骨の形態学的変化、遺伝子発現を評価し、全身性の骨粗鬆症がある状態で、軟骨下骨微小骨折が変形性関節症の発症もしくは増悪に与える影響を解析する。a)とb)群に差が見られれば、c)閉経後骨粗鬆症群, d)閉経後骨粗鬆症+軟骨

下骨微小骨折群も作成して検討する。また、骨形成促進薬およびその他の薬剤による骨粗鬆症治療が、変形性関節症の発症、病態進行に与える効果検証ため、両側卵巣切除後 12 週間待機し全身性の骨粗鬆症を生じさせ、その後 rPTH1-34 投与+3 週後に軟骨下骨微小骨折施行群(発症予防モデル群)も検討する。

(2) 脛骨軟骨下骨微小骨折モデルの作製、軟骨下骨微小骨折が軟骨下骨・軟骨の形態学変化・遺伝子発現に与える影響の解析

脛骨軟骨下骨微小骨折により、軟骨下骨の骨強度の不均一性が生じるとともに軟骨細胞、特に軟骨-軟骨下骨境界部付近の細胞に MMP-13、Col10a1、Runx2 等の変形性関節症関連遺伝子発現の増加と SOX9、Col2a1、Aggrecan などの軟骨の恒常性維持・基質産生に関わる遺伝子およびタンパク質発現の変化が起き、変形性関節症性変化が生じるのではないかと仮定する。

軟骨下骨微小骨折モデルの作製・形態学および組織学的変化の観察

脛骨近位端内側の軟骨下骨部位に関節面と平行に骨孔を 0.5 mm の microdrill を用いて 7 力所作成し、膝関節軟骨下骨微小骨折モデルを作製する。このモデルを経時的に観察することにより、変形性膝関節症の病態進行過程における脛骨近位端部の形態学的変化を解析する。a) Sham 群、b) 軟骨下骨微小骨折群、c) 既存変形性関節症モデル(内側側副靭帯切除+内側半月板切離モデル)、d) 既存変形性関節症モデル+軟骨下骨微小骨折追加群の 4 群を作成する。術後 3, 6 週後に膝関節を採取し、 μ CT で膝関節を撮影する。軟骨下骨の骨微細構造のパラメータ解析を、3D data analysis software (VG Studio Max3.0) を使用して行う。組織学的には TRAP 染色にて破骨細胞数及び骨吸収面を計測し、ALP 染色にて骨芽細胞の評価を行う。また、既存変形性関節症モデル+軟骨下骨微小骨折追加群に PTH を加えて、軟骨下骨の形態異常が薬剤によって介入されるかについて検討を行う。

軟骨下骨微小骨折後に特異的に発現する分子の網羅的解析

分子生物学的手法により発現遺伝子の網羅的解析を行う。凍結切片から軟骨、及び軟骨下骨の各々の RNA を抽出し、cDNA 合成・蛍光標識後に Affymetrix 社製 GeneChip® Gene 2.0 ST Array を用いて、TGF- β 1、MMP-13、RANKL、OPG、Col10a1、HIF-2 β 、IL-1 β 、Runx2、VEGF など変形性膝関節症関連遺伝子を含めた網羅的な遺伝子発現のプロファイリングを行う。発現の局在、産生の変化を免疫染色にて評価し、軟骨下骨損傷後に経時的に発現が変化する特異的な遺伝子群を解明する。特に発現が変化した遺伝子に対しては cDNA を用いた real-time PCR を行い mRNA 発現量の変化を再度確認する。

4. 研究成果

(1)

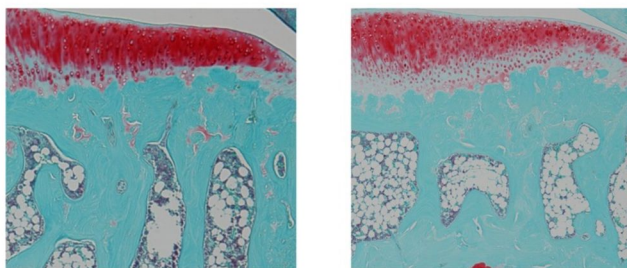
全身性骨粗鬆症の影響により閉経後骨粗鬆症+軟骨下骨微小骨折群で閉経後骨粗鬆症群に比べて変形性関節症の進行の悪化が見られるかを、マイクロ CT を用いた計測と、組織染色を用いた形態学的検索で検討した。まず 13 週齢のラットを用いて検討を行なった。マイクロ CT では閉経後骨粗鬆症群で骨梁数減少傾向が見られ、閉経後骨粗鬆症+軟骨下骨微小骨折群ではやや骨梁肥厚が見られたが、軟骨直下の皮質骨には差は見られなかった。組織学的染色では骨粗鬆症群と閉経後骨粗鬆症+軟骨下骨微小骨折群で表層に軽度の染色性の低下があるも毛羽立ちや亀裂・欠損等は認めず、閉経後骨粗鬆症+軟骨下骨微小骨折群で変形性関節症の進行の悪化は観察されなかった。

13週齢のメスのラットに両側OVXを行い3カ月経過後

に手術介入手術後、さらに12週経過後で回収

OVX+Sham

OVX+SBF



関節軟骨：いずれも表層に軽度の染色性の低下有り、毛羽立ちや亀裂・欠損等は認めず

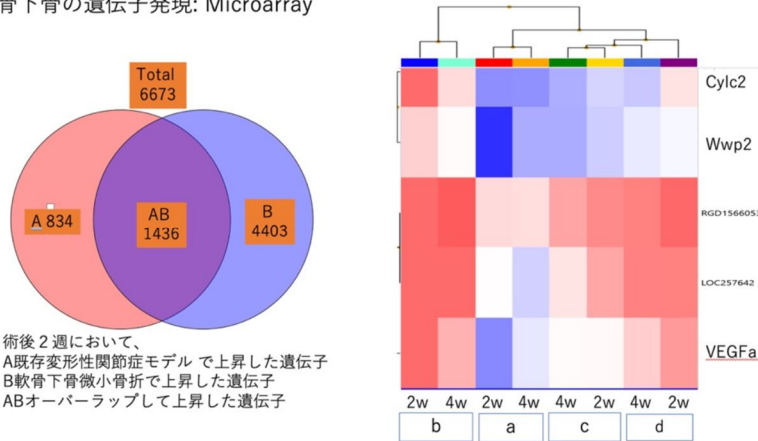
ラットの週齢の少なさによる影響を考慮して、続いて 6 ヶ月齢のラットを用いて同様の検討を行なったが、閉経後骨粗鬆症+軟骨下骨微小骨折群で変形性関節症の進行の悪化は観察されなかった。これまでの検討で全身骨粗鬆症の影響が乏しかったことから、両側卵巣切除+c)閉経後骨粗鬆症群、d)閉経後骨粗鬆症+軟骨下骨微小骨折群の検討や、rPTH1-34 投与+3 週後に軟骨下骨微小骨折施行群の検討は行わなかった。

(2)

術後3週で軟骨下骨微小骨折群においては、軟骨下骨における Bone volume/total volume (BV/TV)他、trabecular thickness(Tb.Th)の上昇、trabecular number (Tb.N)の低下などの軟骨下骨の変化を認め、一方で既存変形性関節症モデルではBV/TV、Tb.Thの低下など認めた。6週においては、既存変形性関節症モデル+軟骨下骨微小骨折追加群で他群に比べて有意なBV/TVの上昇、Tb.Thの上昇などの変化を認めた。この軟骨下骨の骨形態計測における変化は、PTH投与により有意にレスキューされた。組織学的にも既存変形性関節症モデル+軟骨下骨微小骨折追加群で変形性関節症の著しい進行を認め、軟骨下骨にも mast cell の増加が見られたが、PTH投与により変形性関節症の進行、mast cell の増加とともに軽減した。

軟骨下骨微小骨折群群においては、2週、4週ともに軟骨において炎症性サイトカインであるTNF、IL-1、IL-6や蛋白分解酵素であるmmp1、mmp13の上昇を認め、軟骨下骨の病変が軟骨の遺伝子発現に影響を与えていることがわかった。また、軟骨の恒常性を維持するのに重要なWwp2や、血管新生を促すVEGFa遺伝子の上昇が見られた。軟骨下骨においても、軟骨下骨でも軟骨下骨微小骨折群、既存変形性関節症モデル+軟骨下骨微小骨折追加群においてVEGFa遺伝子の上昇を認めた。軟骨下骨の定量的PCRでもVEGFaや低酸素状態で発現するHIF1Aが有意に高値であった。

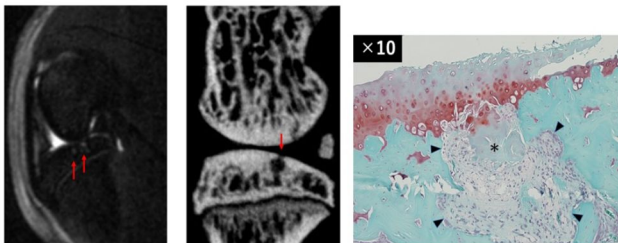
軟骨下骨の遺伝子発現: Microarray



a) Sham群, b) 軟骨下骨微小骨折群、c) 既存変形性関節症モデル(内側側副靭帯切除+内側半月板切離モデル), d) 既存変形性関節症モデル+軟骨下骨微小骨折追加群

変形性関節症と骨粗鬆症における軟骨下骨の変化を検討するため、卵巣切除骨粗鬆症ラットモデルを用いて Sham群、既存変形性関節症モデル群を作成し、 μ CT、MRIを用いて評価を行なったところ、4週では大きな変化は認めなかったが、8週、12週においては軟骨下骨にMRIのT2強調画像で高信号の病変、 μ CTで骨嚢胞様(赤矢印)の病変が脛骨軟骨下骨に出現し、軟骨下骨病変の直上において、軟骨の著しい変性を認めたことから、軟骨下骨の形態的变化と変形性関節症との関連が示唆された。

術後8週の骨粗鬆症+既存変形性膝関節症モデル群



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito M, Nishitani K, Ikeda H, Yoshida S, Iwai S, Ji X, Nakahata A, Ito A, Nakamura S, Kuriyama S, Yoshitomi H, Murata K, Aoyama T, Ito H, Kuroki H, Kakizuka A, Matsuda S.	4. 巻 10
2. 論文標題 A VCP modulator, KUS121, as a promising therapeutic agent for post-traumatic osteoarthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 20787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77735-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Y, Ito H, Ishikawa M, Fujii T, Furu M, Azukizawa M, Okahata A, Tomizawa T, Kuriyama S, Nakamura S, Nishitani K, Yoshitomi H, Matsuda S.	4. 巻 36
2. 論文標題 Subchondral bone fragility with meniscal tear accelerates and parathyroid hormone decelerates articular cartilage degeneration in rat osteoarthritis model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 1959-1968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.23840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 繁央, 西谷 江平, 伊藤 宣, 斉藤 元央, 森田 悠吾, 中村 伸一郎, 栗山 新一, 松田 秀一
2. 発表標題 下肢動脈石灰化は、両変形性膝関節症のリスクファクターとなる
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 繁央, 西谷 江平, 斉藤 元央, 富澤 琢也, 森田 悠吾, 村田 浩一, 中村 伸一郎, 栗山 新一, 伊藤 宣, 松田 秀一
2. 発表標題 変形性膝関節症における関節内遺伝子発現と患者立脚型評価との関連
3. 学会等名 第35回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斉藤 元央, 西谷 江平, 池田 華子, 伊藤 宣, 岩井 祥子, 季 翔, 村田 浩一, 青山 朋樹, 黒木 裕士, 垣塚 彰, 松田 秀一
2. 発表標題 新規VCP ATPase阻害剤であるKUS121は小胞体ストレス応答抑制を介した軟骨細胞死抑制作用により関節軟骨保護作用を有する
3. 学会等名 第35回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田繁央, 西谷江平, 斉藤 元央, 仁頃 一也, 岡島 章憲, 小豆澤 勝幸, 中村 伸一郎, 栗山 新一, 伊藤 宣, 松田秀一
2. 発表標題 動脈石灰化は、多関節変形性関節症のリスク因子となる。
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田秀一
2. 発表標題 変形性膝関節症の病態と治療戦略
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田 侑吾, 伊藤 宣, 石川 正洋, 布留 守敏, 小豆澤 勝幸, 岡島 章憲, 栗山 新一, 中村 伸一郎, 西谷 江平, 吉富 啓之, 松田 秀一
2. 発表標題 軟骨下骨の脆弱性は半月板断裂とともに軟骨変性を増加させ、副甲状腺ホルモン製剤の投与は軟骨変性を軽減する
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田秀一
2. 発表標題 変形性膝関節症の病態と治療戦略
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西谷江平、松田秀一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 156-161
3. 書名 変形性膝関節症	

〔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
研究分担者	伊藤 宣 (Ito Hiromu) (70397537)	京都大学・医学研究科・特定教授 (14301)	
研究分担者	西谷 江平 (Nishitani Kohei) (70782407)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------