

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09105

研究課題名(和文) EPAを用いた変形性関節症治療への挑戦

研究課題名(英文) Gelatin hydrogels with eicosapentaenoic acid can prevent osteoarthritis progression in vivo in a mouse model

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：EPA含有ゼラチンハイドロゲルは約4週間にわたりEPAの徐放を認め、関節内単回注射群と比較し、より効果的に変形性関節症の進行を予防したと考えられた。

EPAの変形性関節症進行抑制の機序については、炎症のメカニズムとしてIL-1の発現がNF- κ B経路を活性化させ、MMP-3、MMP-13といったサイトカインを放出し、その結果として関節破壊が起こると考えられる。EPAはIL-1の発現を抑制することで、NF- κ B経路の活性化を抑制し、結果として関節破壊を抑制していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症に対する新規治療薬の開発で現在のところ効果的且つ安全性の高い治療法

は無い。EPAは抗酸化剤としての機能だけでなく、近年抗炎症作用も有する報告もあり、多機能を有することが予想されEPAの他疾患への応用も含め機能を解明することが本研究の学術的意義であり、一方でEPAは循環器系やアルツハイマー病などの治療薬としてすでに使用されており、薬としての安全性は担保されているため変形性関節症の治療薬として即戦力になることが期待される点で社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the effect of EPA-incorporating gelatin hydrogels on osteoarthritis (OA) progression in vivo. Ten-week-old male C57BL/6J mice were randomly divided into six groups (six mice each): sham, destabilization of the medial meniscus (DMM), Corn (DMM + corn oil), EPA-I (DMM + corn oil + 3 mg/ml EPA), Control (DMM + control gelatin hydrogels), and EPA-G (DMM + 3 mg/ml EPA-incorporating gelatin hydrogels) groups. Mice were then euthanized 8 weeks after DMM or sham surgery, and subjected to histological evaluation. Histologic score was significantly improved in EPA-G compared to in EPA-I. MMP-3-, MMP-13-, IL-1-, and p-I κ B / -positive cell ratio was significantly improved in EPA-G compared to in EPA-I. However, CD86- and CD163-positive cell ratio was not significantly different between EPA-I and EPA-G. EPA-incorporating gelatin hydrogels can prevent OA progression in vivo more effectively than single injection of EPA.

研究分野：軟骨代謝学

キーワード：EPA ゼラチンハイドロゲル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エイコサペンタエン酸 (EPA) は、オメガ 3 多価不飽和脂肪酸の一種であり、魚油食品、ニシン、サバ、イワシなどから得られる広義の必須脂肪酸である。整形外科分野においても EPA の効果についての研究がされており、EPA は軟骨細胞において IL-1 α 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、オメガ 3 多価不飽和脂肪酸を多く含む食品を摂取することで、変形性膝関節症の進行を予防したという報告がされている。また、我々は過去の研究でマウスの変形性関節症モデルにおいて、EPA が酸化ストレスにより生じる軟骨細胞のアポトーシス、変形性関節症を抑制することを報告しているが、そのためには週 1 回の EPA の関節内注射が必要である。一方、ゼラチンハイドロゲルは、生体内において生物活性をもつ細胞増殖性タンパク質、および遺伝子などの徐放を可能とするドラッグデリバリーシステムであり、整形外科分野においてもゼラチンハイドロゲルの優れた効果が報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、EPA 含有ゼラチンハイドロゲルの変形性関節症進行に対する効果を検証することとした。

3. 研究の方法

In Vivo

乳酸オリゴマーグラフト化ゼラチンによる EPA の水可溶化を行い、EPA ミセルを作製。グルタルアルデヒドによりゼラチン分子を化学架橋させ、水可溶化した EPA ミセルを含有したゼラチンハイドロゲルを作製した。In Vivo 8 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。右膝関節に Sham 手術、もしくは DMM 手術を行い、Sham 群、DMM 群、DMM 手術後に EPA の単回関節内注射を行った EPA-I 群、DMM 手術後に EPA 含有ゼラチンハイドロゲルを関節内に留置した EPA-G 群を作成した。評価項目として、まず EPA 含有ゼラチンハイドロゲルの徐放化試験を行った。ゼラチンハイドロゲルを関節内に留置後 1, 3, 7, 14, 21, 28 日で回収し、高速液体クロマトグラフィーを用いて徐放量を計算した。次に組織学的評価として Safranin-O 染色、HE 染色を行い osteoarthritis research society international (OARSI) score を用いて評価を行った。また免疫組織学的評価として MMP-3, MMP-13, IL-1 β , p-IKK α / β , F4/80, CD86, CD163 の免疫染色を行い、Positive cell ratio, F4/80 score を用いて評価を行った。組織学的評価、免疫組織学的評価は Sham 手術、DMM 手術後 1 週 8 週で回収した組織を用いた。

In Vitro

6 well プレートに正常ヒト膝軟骨細胞 (以下 NHAC) を 3.0×10^5 個ずつ播種し、24 時間培養させた。まず異なる時間 (刺激なし、5 分、10 分、15 分、30 分、60 分) の IL1 β 刺激を行い、タンパクの回収を行い、Western blotting で p-IKK α / β の発現を比較した。次に培養した NHAC に、先の実験で p-IKK α / β の発現が最も強かった時間の IL-1 β 刺激を加え、EPA の共培養の有無でタンパクの回収を行い、Western blotting で p-IKK α / β の発現を比較した。また、培養した NHAC に 24 時間の IL-1 β 刺激を加え、EPA の共培養の有無、さらには濃度の異なる EPA の共培養によって得られたタンパクの回収を行い、Western blotting で MMP-13 の発現を比較した。

4. 研究成果

EPA 含有ゼラチンハイドロゲルの徐放化試験

約 4 週間程度で生体内において EPA が完全に徐放されていることが確認できた。

組織学的評価

Safranin-O 染色

術後 1 週における Sham 群、DMM 群、EPA-I 群、EPA-G 群の平均 OARSI score は各々 0.42, 1.3, 0.67, 0.75 であり EPA-I 群と EPA-G 群で有意差を認めなかった。術後 8 週における Sham 群、DMM 群、EPA-I 群、EPA-G 群の平均 OARSI score は各々 0.96, 3.2, 2.4, 1.2 であり EPA-G 群で EPA-I 群に比べ、有意な変形性関節症の進行の抑制が確認できた。(図 1)

HE 染色

術後 1 週における Sham 群、DMM 群、EPA-I 群、EPA-G 群の平均 Synovitis score は各々 0.83, 5.7, 2.3, 2.2 であり EPA-I 群と EPA-G 群で有意差を認めなかった。術後 8 週における Sham 群、DMM 群、EPA-I 群、EPA-G 群の平均 Synovitis score は各々 1.5, 4.0, 3.8, 1.8 であり EPA-G 群で EPA-I 群に比べ、有意に滑膜での炎症抑制が確認できた。

免疫組織学的評価

MMP-3 については、術後 1 週においては EPA-I 群と EPA-G 群で有意差を認めなかったが、術後 8 週においては EPA-G 群で EPA-I 群に比べ、MMP-3 の発現が有意に抑制された。また MMP-13 においても、術後 1 週においては EPA-I 群と EPA-G 群で有意差を認めなかったが、術後 8 週においては EPA-G 群で EPA-I 群に比べ、MMP-13 の発現が有意に抑制された。IL-1 β に関しては、術後 1 週においては EPA-I 群と EPA-G 群で有意差を認めなかったが、術後 8 週においては EPA-G 群で EPA-I 群に比べ、IL-1 β の発現が有意に抑制された。p-IKK α/β に関しては、術後 1 週においては EPA-I 群と EPA-G 群で有意差を認めなかったが、術後 8 週においては EPA-G 群で EPA-I 群に比べ、IL-1 β の発現が有意に抑制された。F4/80 に関しては、術後 1 週においては EPA-I 群と EPA-G 群で有意差を認めなかったが、術後 8 週においては EPA-G 群で EPA-I 群に比べ、F4/80 の発現が有意に抑制された。(図 2)

M1 マーカーである CD86 に関しては、術後 1 週 8 週ともに EPA-I 群と EPA-G 群で発現に有意差を認めなかった。また、M2 マーカーである CD163 に関しては、術後 1 週、8 週ともに EPA-I 群と EPA-G 群で発現に有意差を認めなかった。

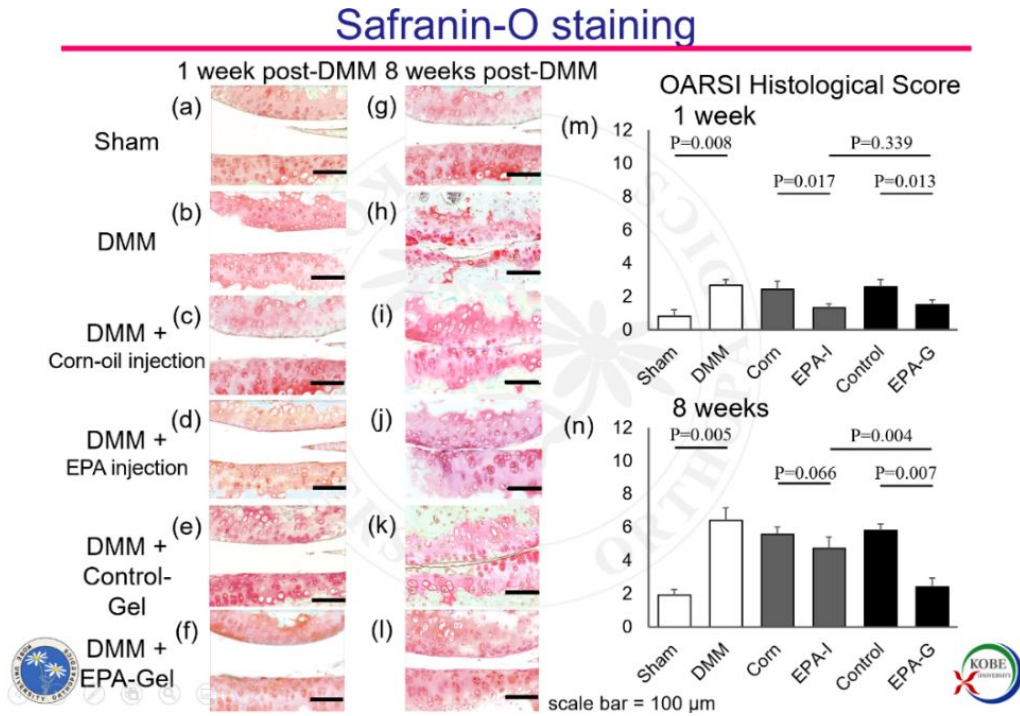
ウェスタンブロット

時間の異なる IL-1 β 刺激に対する、p-IKK α/β の発現については、IL-1 β 刺激を 15 分行った際に、最も p-IKK α/β の発現を認めた。そこで最も p-IKK α/β の発現が増強した、IL-1 β を 15 分刺激した NHAC に EPA の共培養の有無で p-IKK α/β の発現を確認したところ、EPA の共培養を行った群で p-IKK α/β の発現が有意に抑制された。また、IL-1 β を 24 時間刺激した NHAC に EPA の共培養の有無、さらには濃度の異なる EPA での共培養を行った際の MMP-13 の発現を確認したところ、EPA の濃度依存性に MMP-13 の発現が抑制された。(図 3)

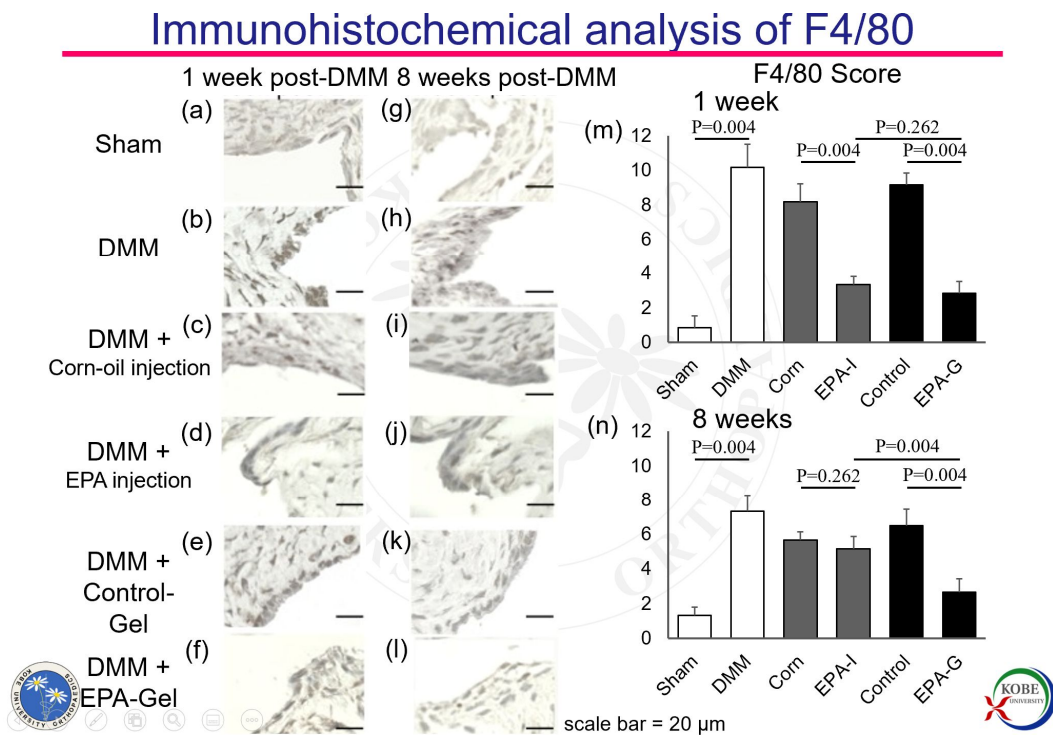
我々の研究では、EPA 含有ゼラチンハイドロゲルは約 4 週間にわたり EPA の徐放を認め、関節内単回注射群と比較し、より効果的に変形性関節症の進行を予防したと考えられた。EPA の変形性関節症進行抑制の機序については、炎症のメカニズムとして IL-1 β の発現が NF- κ B 経路を活性化させ、MMP-3、MMP-13 といったサイトカインを放出し、その結果として関節破壊が起こると考えられる。EPA は IL-1 β の発現を抑制することで、NF κ B 経路

の活性化を抑制し、結果として関節破壊を抑制していると考えられた。

(図 1)

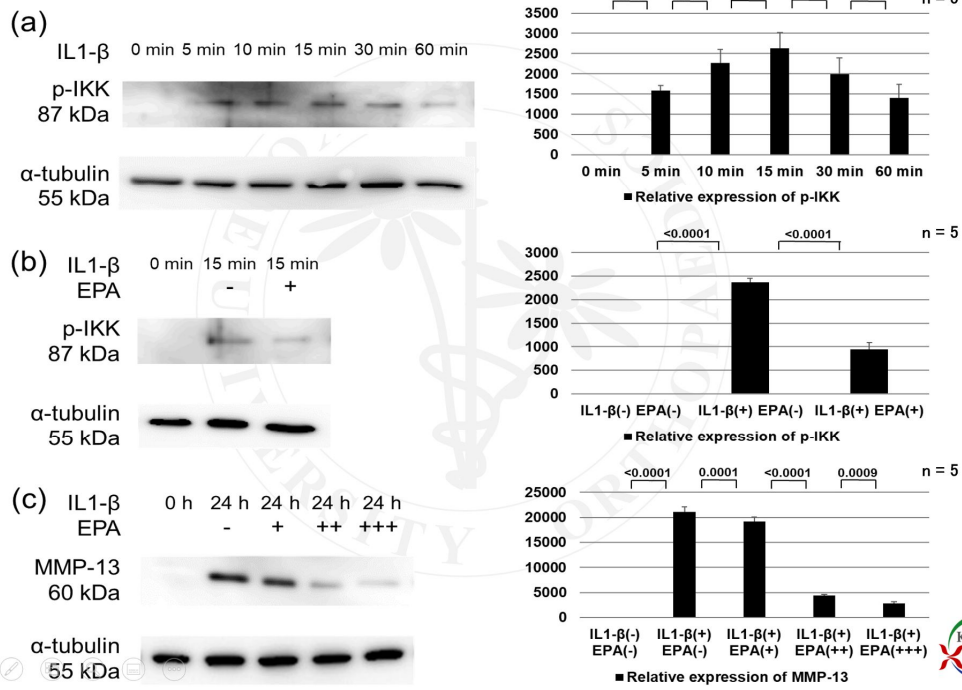


(図 2)



(3)

Western blotting



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 壺坂 正憲
2. 発表標題 エイコサペンタエン酸含有ゼラチンハイドロゲルは変形性関節症進行を抑制する
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 Masanori Tsubosaka
2. 発表標題 Gelatin hydrogels with eicosapentaenoic acid can prevent osteoarthritis progression in vivo in a mouse model.
3. 学会等名 Orthopaedics Reserch Society (ORS) 2020 annual meeting
4. 発表年 2020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
研究分担者	松本 知之 (Matsumoto Tomoyuki) (50546588)	神戸大学・医学部附属病院・講師 (14501)	
研究分担者	橋本 慎吾 (Hashimoto Shingo) (20457089)	神戸大学・医学研究科・特命助教 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	高山 孝治 (Takayama Koji) (80546490)	神戸大学・医学部附属病院・医学研究員 (14501)	

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