

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18001

研究課題名（和文）変形性膝関節症の痛みの治療ターゲットの解明

研究課題名（英文）Targets for pain of knee osteoarthritis

研究代表者

阿漕 孝治（Aso, Koji）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：00624991

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）：動物モデルおよびヒト組織を用いて変形性膝関節症（膝OA）の痛みの治療ターゲットを明らかにすることを目的とした。

まず、ラット膝OAモデルを使用して、卵巣切除による骨粗鬆症は軟骨下骨を中心にOAを進行させる可能性を明らかにした。ヒト組織を用いた研究では、MRIで骨髄浮腫を認める骨組織では、以前痛みと関係すると報告した組織学的変化である破骨細胞密度上昇や神経成長因子（NGF）発現が増加することを明らかにした。滑膜の研究では、滑膜炎や血管増生はOA早期から認め、さらに早期OAの方が進行期より滑膜の神経密度がより高かった。以上の結果から、早期膝OAでは滑膜病変がより痛みに関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究によって、膝OAにおいて破骨細胞の活性化は痛みとOA進行に関与し、破骨細胞自体がOAの治療ターゲットになること、MRIで確認できる骨髄浮腫は痛みに関与する組織変化が実際に起こっていること、OAの早期から滑膜炎がOAの痛みなどの病態に重要になることが明らかになった。本邦における膝OAは、2530万人と多くの患者がいるにもかかわらず、膝OAによる変形が患者の主訴である痛みと直結しないなど、その痛みのメカニズムは不明瞭であった。本研究成果が、膝OAの疼痛機序の一助の解明につながり、疼痛機序に基づいた治療ストラテジーの構築に寄与するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify targets for the treatment of pain associated with osteoarthritis of the knee (knee OA) using animal models and human tissues. First, using a rat knee OA model, it was revealed that osteoporosis induced by ovariectomy could potentially progress OA, particularly in the subchondral bone. In studies using human tissues, it was found that bone tissues showing bone marrow lesion on MRI exhibited increased osteoclast density and increased expression of nerve growth factor (NGF), histological changes previously reported to be related to pain. In the study of the synovium, synovitis and angiogenesis were observed from the early stages of OA, with higher nerve density in the synovium at the early stage of OA compared to the advanced stage. These results indicate that synovial lesions are more significant for pain in early knee OA.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性膝関節症 疼痛 骨粗鬆症 炎症

1. 研究開始当初の背景

本邦における変形性関節症(膝 OA)は2530万人と多く、今後の高齢化の加速に伴いさらに増加すると見込まれており、膝 OA による要介護状態を予防することは整形外科医にとって重大使命である。しかし、興味深いことに膝 OA に対して我が国で行われた大規模コホート研究において X 線画像上で膝 OA を認めていても痛みがあるのは800万人であり、膝 OA による変形が患者の主訴である痛みと直結しないことが分かっている (Muraki S, et al. Osteoarthritis and Cartilage 2009)。

そこで申請者は世界最先端の関節痛の研究機関である英国 Nottingham 大学 Arthritis UK Pain centre に留学し、膝 OA の痛みの原因を探求することから開始した。その Pain centre では、献体の膝組織を数十年間蓄積すると同時に、生前の膝痛の有無などの臨床データも保存しているため、膝 OA を認めるが生前に痛みがないことが分かっている献体から組織を採取することが可能である。まず、痛みを有する膝 OA に対して人工膝関節を施行された患者(痛みあり膝 OA 群)から軟骨下骨と滑膜を採取した。さらに、人工膝関節症例と同じ肉眼的軟骨変性度を有し、生前に膝痛がなかったと判明している献体を組織レポジトリの中から選別し(痛みなし膝 OA 群) その軟骨下骨と滑膜を採取した。滑膜および軟骨下骨を組織学的に検討し、両群間で比較した結果、膝痛を有する膝 OA 群では、軟骨下骨における神経血管が通過する小さな骨孔である osteochondral channels における神経成長因子発現、軟骨下骨の TRAP 陽性破骨細胞活性および滑膜炎スコアが有意に高値を示した(K Aso, et al. Arthritis & Rheumatism 2019)。さらに、ヒトおよびラット膝組織を用いて、膝 OA の進行によって骨軟骨移行部における Osteochondral channel 内の感覚神経が増加し、その増加が痛みの増悪に関与することを明らかにした(国際変形性関節症学会 2019 AWARD)。これらの結果は(1)神経成長因子発現と(2)破骨細胞活性、(3)滑膜炎、(4)Osteochondral channel 内の感覚神経増生が膝 OA の痛みに関与する組織学的因子であり、これらが膝 OA の痛みの治療ターゲットになり得ることを意味する。

本研究では、我々が明らかにしてきた膝 OA の痛みの組織学的変化が、MRI 画像での確に捉えることが可能か、またどのような背景をもつ症例にその変化が認められるかを動物モデルおよびヒト組織を用いて解明することで、痛みの治療ターゲットを明らかにする。そのため、ヒト組織を用いて研究 膝 OA において MRI で確認できる Bone marrow lesion の組織学的特徴、研究 膝 OA 進行における滑膜の感覚神経と滑膜炎の変化の研究を、動物モデルを用いた研究では、研究 ラット膝 OA モデルにおける骨粗鬆症が関節症進行に与える影響の研究を立案した。

2. 研究の目的

研究 変形性関節症(膝 OA)において、MRI で指摘できる軟骨下骨の Bone marrow lesion (BML) は痛みと関係する。そこで本研究では、膝 OA の BML を認める軟骨下骨の組織学的な特徴を明らかにすることを目的とした。

研究 膝関節滑膜は神経血管が豊富な組織であり、膝 OA の疼痛発生源として重要であり、さらに滑膜炎・水腫は痛みと OA 進行に関係していると報告されている。我々も、滑膜の組織学的因子を検討した結果、滑膜炎と神経成長因子 NGF 発現が、痛みを有する症候性膝 OA で有意に増加していることを明らかにしてきた。しかし、OA の進行度と滑膜病変と感覚神経の変化、中でも早期膝 OA に関しては不明な点が多い。そこで、本研究では早期膝 OA の滑膜組織と感覚神経の変化を進行期膝 OA および非膝 OA と比較して明らかにすることを目的とした。

研究 高齢女性で多く認める変形性膝関節症(膝 OA)では、骨粗鬆症を合併する症例が多く存在する。我々はヒト組織を用いて軟骨下骨では破骨細胞活性が痛みに関与していることを報告してきた。そこで本研究では、内側半月板切除(MMx)によるラット膝 OA モデルにおいて骨粗鬆症が軟骨下骨破骨細胞活性を含む膝局所組織および疼痛行動に与える影響について明らかにすることである。

3. 研究の方法

研究 BML を有する内側型膝 OA に対して TKA 施行された 20 膝を対象とし、内側脛骨プラトートの BML(+)部分と BML(-)部分さらに外側脛骨プラトートの軟骨下骨を摘出した。骨組織を脱灰し、EH 染色、サフラン O 染色、TRAP 染色、さらに NGF に対する免疫染色を行い、3 群間

で比較した。

研究 早期膝 OA として膝痛を有する KL-grade 0、1 または骨棘所見のみの KL2 で、関節鏡手術の際に grade2 以上の軟骨病変を確認できた症例とし、末期膝 OA として TKA または UKA を施行した KL4 の症例、非膝 OA として痛みがなく ACL 損傷後 3 ヶ月以上経過した ACL 再建症例とした。それぞれの手術時に、膝蓋下脂肪体表面の滑膜を採取した。感覚神経のマーカーとして CGRP 陽性神経を用いた。凍結切片を作製後、CGRP 陽性神経の免疫染色を行い、単位面積あたりの神経密度を計測した。またパラフィン切片作製し、滑膜炎、血管増生、線維化、および NGF 発現を評価した。

研究 12 週齢の雌 Sprague-Dawley ラットを使用し、MMx と卵巣摘出(OVX)を組み合わせた介入を行い MMx および VX 実施の有無により 4 群(shams 手術群、OVX 群、MMx 群、OVX+MMx 群)に分けた。2 週ごとに行動的疼痛評価を行い、足底の痛覚過敏として von-Frey test を、動的荷重時痛評価として Dynamic weight bearing test を行った。術後 8 週で安楽死させ組織学的 OA 評価(軟骨・軟骨下骨・滑膜の OARSI score)、軟骨下骨密度評価および軟骨下骨破骨細胞密度評価を行い 4 群間で比較検討した。

4. 研究成果

研究 内側脛骨プラトーの BML(+)部分では、内側脛骨プラトーの BML(-)部分および外側脛骨プラトーと比較して、有意に炎症細胞浸潤、血管、線維性組織、TRAP 陽性破骨細胞密度および神経成長因子の発現が有意に高かった。破骨細胞はプロトンだけでなく神経成長因子や Netrin-1 などの神経誘導因子を分泌することで痛みの増悪に関与する。炎症細胞浸潤、血管増生、破骨細胞活性や神経成長因子の増加が BML に関連する痛みの増悪に関係すると考えられた。

研究 滑膜組織を観察すると早期膝 OA から滑膜炎を認め、lining cell layer の肥厚、炎症細胞浸潤、血管増生を認めた。さらに末期期になると滑膜炎が強い症例もあるが、線維化が強い症例も認めた。定量化すると、滑膜炎、血管増生は早期および末期膝 OA は非膝 OA と比較して有意に高値であり、線維化は末期膝 OA が早期膝 OA および非膝 OA と比較して優位に高値であった。NGF 発現は、滑膜炎と同様に、早期および末期膝 OA は非膝 OA と比較して有意に高値であった。

感覚神経密度は、非膝 OA 滑膜にも CGRP 陽性神経を認めたが、早期膝 OA では血管増生と随伴して神経も血管周囲に増加していた一方、末期膝 OA の線維化を強く滑膜には神経発現は強くは認めていなかった。定量化すると、早期膝 OA は非膝 OA より有意に感覚神経密度が高くなるが、末期膝 OA になると低下していた。さらに、CGRP 陽性神経は、滑膜炎、血管増生、NGF 発現と有意な相関関係を認めた。本研究の結果、感覚神経密度は末期膝 OA より早期膝 OA が高く、滑膜の血管増生と共に神経の増加も認めていた。実際に、早期膝 OA 滑膜では血管に伴走して増加する神経が確認できる。以上の結果から、滑膜由来の痛みは特に早期膝 OA で重要になると考えられた。

研究 破骨細胞密度、軟骨下骨の OARSI score は OVX+MMx 群で他の 3 群と比較し有意に上昇していた。軟骨下骨密度は OVX 群および OVX+MMx 群で他の 2 群と比較して有意に低下した。行動学的評価では、MMx を実施した 2 群で患肢の荷重比の有意な低下を認めた。ラット膝 OA モデルにおいて卵巣摘出による骨粗鬆症は軟骨下骨の破骨細胞活性の上昇および骨密度低下をもたらす。組織学的にも OA を進行させることが明らかになった。本研究では疼痛行動に及ぼす影響としては骨粗鬆症よりも半月板切除による影響が大きく、骨粗鬆症が膝 OA の痛みへの影響に関しては今後の検討課題である。本研究結果は、Scientific Reports2023 に掲載された。

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 1件）

1. 著者名 Hiroyuki Wada , Koji Aso , Masashi Izumi , Masahiko Ikeuchi	4. 巻 13
2. 論文標題 The effect of postmenopausal osteoporosis on subchondral bone pathology in a rat model of knee osteoarthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29802-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koji Aso, Hiroyuki Wada, Masashi Izumi , Masahiko Ikeuchi
2. 発表標題 Pain-related histological factors in the subchondral bone marrow lesion of osteoarthritic knees
3. 学会等名 ORS2023 米国整形外科研究会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroyuki Wada , Koji Aso , Masashi Izumi , Masahiko Ikeuchi
2. 発表標題 The effect of postmenopausal osteoporosis on subchondral bone pathology in a rat model of knee osteoarthritis
3. 学会等名 ORS2023 米国整形外科研究会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿漕孝治
2. 発表標題 膝OAにおけるBone marrow lesionの疼痛関連分子
3. 学会等名 第49回日本関節病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿漕孝治
2. 発表標題 変形性膝関節症の疼痛メカニズム
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田 紘幸、阿漕孝治
2. 発表標題 ラット変形性膝関節症モデルにおいて骨粗鬆症が関節症進行に与える影響
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田紘幸、阿漕孝治
2. 発表標題 ラット変形性膝関節症モデルにおける骨病変と痛みの関係
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------