

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22600002

研究課題名（和文） 変形性膝関節症における疼痛の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文） Osteopontin Level in Synovial Fluid is Associated with the Severity of Joint Pain and Cartilage Degeneration After Anterior Cruciate Ligament Rupture

研究代表者

朱 寧進 (Ju Young-Jin)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10436636

研究成果の概要（和文）：

変形性関節症(OA)に伴う疼痛は、患者の日常生活の活動性及び質を著しく低下させる。本学運動器外科学教室では、膝OAの病態の分子メカニズムを明らかとする目的で膝OAの進行とともに発現量が変動する遺伝子の網羅的解析を行ってきた。その結果、病態の進行とともに関節液中での発現量の増大するタンパクの一つとしてオステオポンチン(OPN)を同定した。本研究期間において、ヒト関節液中のOPN量は、膝受傷後早期に一過性に増大することを明らかとした。また、受傷後1ヶ月以内において、関節液中OPN量は、膝疼痛レベルと有意な正の相関を示すことを明らかとした。関節液中に存在するOPNによる疼痛発症のメカニズムを検討するため、関節の炎症とOPN量との相関を検討した結果、炎症に伴う関節液量の増加と、関節液中OPN濃度に有意な正の相関があることを明らかとした。以上の結果は、関節液中に存在するOPNが関節腔内で炎症性サイトカインとして機能している可能性を示唆している。興味深いことに、膝受傷後1ヶ月以上の、急性炎症の所見がみられない患者由来の関節液を用いた検討では、トロンビン切断型のOPNの量と運動負荷時の関節疼痛の重症度の間に有意な負の相関があることを明らかとした。この結果は、関節液中のOPNが痛みに対する感受性を規定している可能性を示唆しており非常に興味深い。

研究成果の概要（英文）：

Osteopontin (OPN) is an O-glycosylated phosphoprotein which is synthesized in a variety of tissues and cells including chondrocytes and synoviocytes. Accumulating data indicated that OPN is involved in the process of inflammation, immunity, and bone metabolism. OPN knockout mice have already been created and shown that cartilage degradation is accelerated in the absence of OPN. Human studies revealed that OPN protein level increased in the synovial fluid from the patients suffering from OA and RA. These data strongly suggest that OPN is involved in joint homeostasis and in the pathogenesis of arthritis. However, the molecular functions of OPN in these processes are not yet extensively studied. Here we report that synovial fluid OPN level is associated with the severity of joint pain.

This study was approved by the Ethics Committee of this institute. All patients included in this study gave their full, written, informed consent for participation prior to the operative procedure. Tissue samples (synovial fluid and synovial membrane) were obtained from the patients who underwent anterior cruciate ligament reconstruction (ACL-R) from January 2009 till October 2011 in our hospital. OPN mRNA expressed in synovial membrane was quantified by RT-QPCR (Roche, Light Cycler 480, Germany). Total OPN protein levels in synovial fluid were quantified using OPN/OPN N-half ELISA kit (IBL, Japan) and compared them with clinical parameters such as Lysholm score, visual analogue scale (VAS), serum C-reactive protein (CRP) level, and macroscopic observation of cartilage degradation.

As previously reported, OPN mRNA expression level in synovial membrane and OPN protein level in synovial fluid were significantly increased in OA if compared with those of ACL-R.

In the ACL-R group, OPN protein level in synovial fluid was gradually decreased after the injury. We found that OPN protein level in synovial fluid was POSITIVELY associated with the severity of joint pain (VAS). Since OPN acts as a pro-inflammatory cytokines by enhancing migration, survival, phagocytosis, and pro-inflammatory cytokine production of macrophages, we hypothesized that OPN induces joint pain by promoting inflammation in the joint. To test this hypothesis, we investigated the correlation of OPN protein level in synovial fluid with serum CRP level. However, we did not observe any correlation between these two. However, OPN level was positively correlated with the volume of synovial fluid, a marker for joint inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：変形性膝関節症、Osteopontin

1. 研究開始当初の背景

我が国では、人口の高齢化が急速に進み、整形外科の診療対象としても加齢に伴う変性疾患が著しく増加している。この中で脊椎症とともに頻度の高いものが変形性膝関節症(膝OA)である。膝OAは、慢性の炎症を伴う関節疾患で、関節の構成要素の退行性変成により軟骨の破壊と、骨軟骨の増殖性変化をきたす疾患である。関節軟骨の急激な退行性変成の原因としては、遺伝的要因、加齢や、過度の機械的刺激(肥満、腱、靭帯損傷による関節の不安定化、繰り返しの亜脱臼等)等が指摘されている。近年日本で行われた大規模な疫学的研究によると、OAの罹患率は加齢とともに増大し、膝、肘、股関節及び脊椎において、60歳以上では、80%以上の人に確認されている。膝OAの最大の愁訴は疼痛である。OAの進行により関節破壊が進むと、強い痛みにより日常生活に支障を来す例が多くみられることから、膝OAにおける疼痛発症のメカニズムの解明と、その効果的な鎮静法の確立は運動器疾患にたずさわる研究者にとって解決すべき急務の課題である。

膝OAにおける疼痛発症のメカニズムは未だ不明であるが、その原因の一つは関節軟骨の摩耗である。関節軟骨基質の破片が誘因となって関節内に炎症が惹起され、結果として疼痛が誘引されると考えられている。軟骨破片による炎症が生じなくても軟骨基質の摩耗

の進行により関節周囲組織の負荷の増大や疼痛閾値の低下が生じることで関節周囲痛が生じる可能性が示唆されている。

本学運動器外科学教室では、膝OAの病態の分子メカニズムを明らかとする目的で膝OA滑膜において発現量が変動する遺伝子の網羅的解析を行っている。その結果、膝OA滑膜において発現量の増大する遺伝子の一つとしてオステオポンチン(OPN)を同定した。更なる予備解析の結果、膝OA関節液中のOPNタンパク濃度は、疼痛の程度(Knee Society score, pain)と正の相関の傾向があること、すなわち、疼痛の程度の高い患者由来の関節液中により多くのOPNタンパクが存在する傾向があることを見いだした。また、OPN欠損マウスの骨髄より調製したマクロファージは、食作用(ファゴサイトーシス)に伴うNFkBの活性化と炎症性サイトカインの発現量が有意に抑制されていることを見いだした。Marsh等の報告によると、OPN欠損マウスは、熱刺激に対する閾値に関して、野生型マウスと同等であるが、圧痛刺激に対する閾値は有意に高いことが示されている(Neuro Report 18:153-157, 2007)。また、OPNの受容体である□4インテグリン及びCD44は感覚神経において発現が観察されること、特に□4インテグリンは、神経の修復過程において神経突起伸長に関わっていることが示されている(J Neurosci 21:6732-6744,2001., Histochem Cell Biol 110:95-103, 1998)。

以上の予備データ並びに文献的に報告され

ている結果を鑑みて、私たちは、変形性膝関節症における疼痛発症の分子メカニズムとして、

①オステオポンチンが遊走されてきたマクロファージからの炎症性サイトカイン及び疼痛物質の産生を正に制御している、

②OA 変性に伴って増大した滑膜並びに関節液中のオステオポンチンが感覚神経の神経突起伸長を増大させ、結果として疼痛の閾値を下げる、との仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、前項で述べた仮説の検証であり、本研究期間においては、ヒト検体を用いて、関節液中での OPN 量と痛み及び疼痛物質の相関解析を試みた。さらにその結果から疼痛の発生における OPN の分子機能を考察し、痛みの誘導の分子メカニズムを明らかとすることを試みた。

3. 研究の方法

現在本学運動器外科学教室では、倫理委員会の承認及び患者の同意のもと、人工関節置換術、外来関節穿刺時、前十字靭帯再建術により廃棄されるヒト検体（関節液、滑膜、関節軟骨、及び軟骨下骨）を用いて変形性関節症に伴い発現量の変動する遺伝子の網羅的解析を行っている。本研究では、これまでの研究の継続として、更に多くの検体を用いて関節液中の OPN 量と、炎症性サイトカイン、疼痛物質、痛みのスコアとの相関を検討した。痛みのスコアは、Knee Society により規定された痛みの分類法に従って記述する。関節液中の OPN、TNF α 、IL1 β 、IL6 は ELISA 法を用いて常法に従って定量を行った。

本研究では、2009 年 1 月から 2011 年 10 月までに、当科において施行された前十字靭帯再建術施行時に、患者の合意のもと採取された関節液（122 検体、男性 81 検体、女性 41 検体、年齢 14 歳から 48 歳、平均 25 歳）を採取し、OPN 量を測定した。特に OPN に関して、関節液中では全長型(OPN-Full)及びトロンビンによる切断型(OPN-N half)が存在していることが報告されているため、それぞれのタンパク量を独立に ELISA 法により同定を行った。

このうち両側例を除き Lysholm score (pain)、VAS、関節軟骨の関節鏡所見等々の臨床パラメータとの関連を比較検討した。統計学的解析には、Mann-Whitney's U-test、もしくは、Kruskal Wallis test と Steel-Dwass multiple comparison test を用い、相関解析は、Pearson's correlation coefficient test を用いた。P<0.05 を有意差とした。

4. 研究成果

前十字靭帯損傷患者の場合、関節液中の OPN-Full 量は、受傷後の時間経過とともに減少することが明らかとなった。これに対して、OPN-N half 量は、変化が観察されなかった。しかしながら、再建術後 4 日目の関節液で比較したところ、OPN-Full、N half とともに約 10 倍にタンパク量が増大していることが明らかとなった。再建術時に確認した関節軟骨の変性の指標（関節鏡所見）と相関解析を行った結果、関節液中の OPN-Full 量は、外側頸骨粗面の変性と正の相関を示すことを見いだした。次に、関節液中の OPN 濃度と膝疼痛の関連を検討した結果、再建術後 1 ヶ月以内の膝炎症が沈静化する前の期間においては、OPN-Full、N half 共に膝の疼痛の重症度と正の相関を示した。ところが興味深いことに、術後 1 ヶ月以降の患者において、スポーツ時に感じる膝疼痛の重症度は、関節液中の OPN-N half 量と逆相関することが明らかとなった。OPN は、炎症性のサイトカインとしても機能することが示されていることから、炎症のパラメータとの相関解析を行ったところ、OPN は、全身炎症の指標である血中 CRP 値との相関は観察されなかったが、関節局所の炎症の指標となる関節液量と OPN-Full 濃度に正の相関が観察された。

本研究結果は、関節液中に存在する OPN が関節腔内で炎症性サイトカインとして機能している可能性、及び関節疼痛に対する感受性を規定している可能性を示唆しておりその分子メカニズムについて更なる解析を行っている。本研究結果は 2012 年の PLoS One 誌にて発表を行った。

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 11 件、全て査読あり）

- ① Koga, H., Muneta, T., Yagishita, K., Ju, Y.J., Mochizuki, T., Horie, M., Nakamura, T., Okawa, A., and Sekiya, I. (2013). Effect of posterolateral bundle graft fixation angles on graft tension curves and load sharing in double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction using a transtibial drilling technique. *Arthroscopy* 29, 529-538.
- ② Koga, H., Muneta, T., Yagishita, K., Ju, Y.J., and Sekiya, I. (2012a). Surgical management of grade 3 medial knee injuries combined with cruciate ligament injuries. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20, 88-94.
- ③ Koga, H., Muneta, T., Yagishita, K., Ju, Y.J., and Sekiya, I. (2012b). The effect of

graft fixation angles on anteroposterior and rotational knee laxity in double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction: evaluation using computerized navigation. *Am J Sports Med* 40, 615-623.

- ④ Muneta, T., Koga, H., Ju, Y.J., Horie, M., Nakamura, T., and Sekiya, I. (2013). Remnant volume of anterior cruciate ligament correlates preoperative patients' status and postoperative outcome. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 21, 906-913.
- ⑤ Muneta, T., Koga, H., Ju, Y.J., Mochizuki, T., and Sekiya, I. (2012). Hyaluronan injection therapy for athletic patients with patellar tendinopathy. *J Orthop Sci* 17, 425-431.
- ⑥ Muneta, T., Koga, H., Ju, Y.J., Yagishita, K., and Sekiya, I. (2011). Effects of different initial bundle tensioning strategies on the outcome of double-bundle ACL reconstruction: a cohort study. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* 3, 15.
- ⑦ Yagishita, K., Muneta, T., Ju, Y.J., Morito, T., Yamazaki, J., and Sekiya, I. (2012). High-flex posterior cruciate-retaining vs posterior cruciate-substituting designs in simultaneous bilateral total knee arthroplasty: a prospective, randomized study. *J Arthroplasty* 27, 368-374.
- ⑧ Yamaga, M., Tsuji, K., Miyatake, K., Yamada, J., Abula, K., Ju, Y.J., Sekiya, I., and Muneta, T. (2012). Osteopontin level in synovial fluid is associated with the severity of joint pain and cartilage degradation after anterior cruciate ligament rupture. *PLoS One* 7, e49014.
- ⑨ Yamazaki, J., Muneta, T., Ju, Y.J., Koga, H., Morito, T., and Sekiya, I. (2013). The kinematic analysis of female subjects after double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction during single-leg squatting. *J Orthop Sci* 18, 284-289.
- ⑩ Yamazaki, J., Muneta, T., Ju, Y.J., Morito, T., Okuwaki, T., and Sekiya, I. (2011a). Hip acetabular dysplasia and joint laxity of female anterior cruciate ligament-injured patients. *Am J Sports Med* 39, 410-414.
- ⑪ Yamazaki, J., Muneta, T., Koga, H., Sekiya, I., Ju, Y.J., Morito, T., and Yagishita, K. (2011b). Radiographic description of femoral tunnel placement expressed as

intercondylar clock time in double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19, 418-423.

[学会発表] (計 23 件)

1. Tsuji, K., Abula K., Sekiya, I., Economides AN, Rosen V., and Muneta T. Role of Endogenous BMP-7 in Articular Cartilage Homeostasis. International Conference on Bone Morphogenetic Proteins. June 19-23, 2012, Granlibakken Conference Center, Tahoe, CA, USA
2. Tsuji, K. Roles of BMPs during skeletal development and in postnatal bone homeostasis. The 3rd International Conference on Oral Biology (TICOB). May 26-27, 2011, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
3. Tsuji, K. Osteopontin level in synovial fluid is associated with the severity of joint pain and cartilage degradation after anterior cruciate ligament rupture. 久光製薬 海外特別招待講演会(英語) March 7, 2012, 東京ガーデンパレスホテル
4. Tsuji, K., Sekiya, I., Muneta, T. BMP4 Regulates the Hematopoietic Stem Cell Niche Size in Bone Marrow. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) September 16-20, 2011, San Diego, CA USA
5. Tsuji, K., Yamada J., Miyatake K., Abula K., Matsukura Y., Sekiya, I., and Muneta T. Follistatin alleviates synovitis and articular cartilage degradation induced by carrageenan in mice. World Congress on Osteoarthritis (OARSI) April 26-29, 2012, Barcelona's International Convention Center, Barcelona, Spain
6. Miyatake K., Tsuji, K., Yamada J., Abula K., Matsukura Y., Sekiya, I., and Muneta T. Articular cartilage degradation induced by extensive treadmill exercise is greatly exacerbated by estrogen depletion in mice. World Congress on Osteoarthritis (OARSI) April 26-29, 2012, Barcelona's International Convention Center, Barcelona, Spain
7. Suzuki S., Sekiya, I., Tsuji, K., and Muneta T. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal

- stem cells as a source for cartilage regeneration. World Congress on Osteoarthritis (OARSI) April 26-29, 2012, Barcelona's International Convention Center, Barcelona, Spain
8. Yamaga M., Tsuji K., Miyatake K., Yamada J., Sekiya I., and Muneta T. Osteopontin level in synovial fluid is associated with the severity of joint pain. World Congress on Osteoarthritis (OARSI) September 15-18, 2011, Hilton Bayfront, San Diego, CA, USA
 9. Futami I., Ishijima M., Kaneko H., Tsuji K., Tomikawa Nl., Sekiya I., Muneta T., Hirasawa EA., and Kaneko K. Isolation and characterization of multi-potential mesenchymal cells from mouse synovium. World Congress on Osteoarthritis (OARSI) September 15-18, 2011, Hilton Bay Front, San Diego, CA, USA
 10. Yamaga M., Tsuji K., Miyatake K., Sekiya I., and Muneta T. Osteopontin level in synovial fluid is transiently upregulated after joint injury and associated with the severity of knee joint pain. Orthopaedic Research Society February 4-7, 2012, Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA
 11. Yamada J., Miyatake K., Yamaga M., Sekiya I., Muneta T., and Tsuji K. Follistatin alleviates articular cartilage degradation induced by carrageenan. Orthopaedic Research Society. February 4-7, 2012, Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA
 12. Miyatake K., Yamaga M., Sekiya I., Muneta T., and Tsuji K. Human chitinase 3-like protein 2 (YKL39); an osteoarthritis-associated gene which enhances adipogenic differentiation of synovial fibroblasts. Orthopaedic Research Society. February 4-7, 2012, Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA
 13. Ozeki N., Sekiya I., Otabe K., Katagiri H., Okuno M., Tsuji K., Saito T., and Muneta T. BMP-7 treated Achilles tendon transplantation for meniscal defect in a rat model. Orthopaedic Research Society February 4-7, 2012, Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA
 14. Suzuki S., Sekiya I., Tsuji K., and Muneta T. Properties and effectiveness of aggregated synovial mesenchymal stem cells for cartilage regeneration. Orthopaedic Research Society. February 4-7, 2012, Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA
 15. Otabe K., Sekiya I., Kawashima N., Tsuji K., and Muneta T. Properties of mesenchymal stem cells delived from removed teeth. Orthopaedic Research Society. February 4-7, 2012, Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA
 16. Okuno M., Sekiya I., Otabe K., Katagigi H., Ozeki N., Horie M., Koga H., Tsuji K., Yoshiya S., and Muneta T. Syngenic, minor mismatched, and major mismatched transplantation of synovial mesenchymal stem cells in a rat massive meniscal defect model. Orthopaedic Research Society. February 4-7, 2012, Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA
 17. Abula K., Miyatake K., Yamada J., Matsukura Y., Sekiya I., Muneta T., and Tsuji K. BMP7 is prerequisite for postnatal joint homeostasis 第25回日本軟骨代謝学会 2012年3月9日-10日、ウィルあいち
 18. Miyatake K., Tsuji K., Yamada J., Abula K., Matsukura Y., Sekiya I., and Muneta T. A new mouse model for osteoarthritis development; induced by ovariectomy and extensive forced running. 第25回日本軟骨代謝学会 2012年3月9日-10日、ウィルあいち
 19. Yamada J., Tsuji K., Miyatake K., Abula K., Matsukura Y., Sekiya I., and Muneta T. Follistatin alleviates articular cartilage degradation induced by carrageenan. 第25回日本軟骨代謝学会 2012年3月9日-10日、ウィルあいち
 20. 小田邊浩二、関矢一郎、川島伸之、辻邦和、大川淳、宗田大. 歯周組織の間葉系幹細胞による硬組織再生 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011年10月20日-21日、群馬県民会館

21. 鈴木志郎、関矢一郎、辻邦和、荻島創一、大川淳、宗田大. 滑膜間葉幹細胞の軟骨分化を制御する **MicroRNA** の発現解析. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011 年 10 月 20 日-21 日、群馬県民会館
22. 山賀美芽、辻邦和、宮武和正、山田淳、片桐洋樹、大川淳、関矢一郎、宗田大. 関節液中オステオポンチンの関節痛における役割. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011 年 10 月 20 日-21 日、群馬県民会館
23. 宮武和正、辻邦和、山田淳、片桐洋樹、山賀美芽、大川淳、関矢一郎、宗田大. 関節内処置を必要としないマウスの膝関節軟骨変性モデル：卵巣摘出と強制走行の影響. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011 年 10 月 20 日-21 日、群馬県民会館

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朱寧進（JYU NEISHIN）
東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10436636

(2) 研究分担者

辻 邦和（TSUJI KUNIKAZU）
東京医科歯科大学・歯と骨の GCOE 拠点・
特任講師
研究者番号：20323694

宗田 大（MUNETA TAKESHI）
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・
教授
研究者番号：50190864

関矢一郎（SEKIYA ICHIRO）
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・
教授
研究者番号：10345291

麻生義則（ASOU YOSHINORI）
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・

寄付講座教員

研究者番号：50345279

(3) 連携研究者

なし