

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16761

研究課題名（和文）膝蓋下脂肪体の線維化の抑制を主な作用機序とする新規変形性関節症治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of a novel disease modifying anti-osteoarthritis drug

研究代表者

雨宮 正樹（Amemiya, Masaki）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・特任助教

研究者番号：00848442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：変形性関節症(OA)の最大の愁訴は慢性的な膝疼痛である。当教室では、モノヨード酢酸(MIA)の関節内注射により惹起したラット膝関節炎症モデルを用いて、膝蓋下脂肪体(IFP)の線維化が、膝遷延痛の発症に深く関与することを報告した。さらに、IFPの線維化が生じる前にC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)を予防的に関節内投与することで、遷延痛の発症並びに関節軟骨の退行変性を抑制できることを示した。本研究では、CNPはIFPの線維化が生じた後に投与しても遷延痛の抑制効果を示すか、外傷性OAのモデルにおいてもCNPは薬理作用を示すか、及び、CNPの薬理作用発現の分子機序の解析の3項目に関して検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、CNPのDMOADsとしての開発の可能性を考察することを主たる目的とする。本研究は、私が現在所属している教室で蓄積されたデータを基に開始された研究であり、独自性は確保されている。また、本研究計画が達成された場合、CNPは世界初のDMOADsとして、創薬開発に進める可能性があり、社会的に大きな影響を与えうる研究に発展できる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Fibrosis of infrapatellar fat pad (IFP) is closely related to articular cartilage degeneration and persistent pain in knee osteoarthritis (OA). We have reported that C-type natriuretic peptide (CNP) inhibited both cartilage degeneration and persistent pain in a rat knee arthritis model. Based on these results, we examined three aspects in this study: whether CNP exhibits inhibitory effects on persistent pain even when administered after fibrosis of IFP occurs, whether CNP is effective in a traumatic OA model, and the analysis of the molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of CNP. We showed that intra-articular injection of CNP has therapeutic effects on persistent pain alleviation when administered after fibrotic changes of IFP has occurred. We also showed that CNP alleviated persistent pain in a rat traumatic OA model. Total RNA Sequencing analyses indicated that CNP has inhibitory effects on the IL6-STAT3 signaling pathway in synovial cells.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 疼痛 CNP 線維化

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症 (膝 OA: Knee Osteoarthritis) は関節軟骨、半月板及び関節周囲組織の損傷または変性を主体とする慢性疾患で、骨棘の形成と関節裂隙の低下を特徴とする。我が国におけるコホート研究 (ROAD Study: Research on Osteoporosis/ Osteoarthritis Against Disability, 東京大学 22 世紀医療センター)によると、X線画像上で膝 OA と診断される患者数は、2009 年時点で約 2500 万人と見積もられている。膝 OA の最大の愁訴は膝疼痛である。上述の ROAD Study では、膝 OA 患者の中で有症状者は約 800 万人、全体の約 30%程度と推定されている。膝の慢性疼痛は、患者の日常生活動作 (ADL: Activity of Daily Living) 及び生活の質 (QOL: Quality of Life) を大幅に低下させるため、超高齢化社会に突入した我が国においては喫緊の課題である。現在の膝 OA の保存加療は、膝関節周囲機能の改善 (膝安定性の向上) を目的とした運動療法、教育、体重管理を基本として、消炎鎮痛剤の内服または関節内注射による疼痛管理が主体となっている。しかしながら、これらは膝 OA の病因に基づく原因療法では無いため、症状の緩和はある程度期待できても病態の進行を完全に食い止めることは出来ない。

私達は、モノヨード酢酸 (MIA: monoiodoacetic acid) の関節内注射によるラット関節炎モデルを用いて、急性炎症に伴う疼痛が遷延痛へと移行していくプロセスの解析を行っており、これまでに以下の様な知見を得ている。

- ① Wistarラットの膝関節内に0.2mgのMIA(Monoiodo-acetic acid)を関節内注射した場合、一過的に滑膜炎が惹起され、約7日間程度で炎症反応の消退が観察される(低容量モデル)。これに対し、1.0mgのMIAを関節内に注射すると、2週間後においても持続的な炎症所見が得られた(高容量モデル; Udo et al. Osteoarthritis Cartilage 24, 1284-1291, 2016)。
- ② 上記モデルで疼痛回避行動(Incapacitance test: MIA投与側とコントロール側の荷重差を測定)を計測したところ、低容量モデルでは、炎症の消退(MIA投与後5-7日後)とともにMIA投与側の荷重の回復がみられたが、高容量モデルでは、長期間の荷重低下、すなわち遷延痛が観察された(Hoshino et al. BMC Musculoskelet Disord. 19(1), 291, 2018)。
- ③ 組織学的解析を行ったところ、遷延痛が生じるタイミングで急激なIFP(Infra-patellar fatpad; 膝蓋下脂肪体)の線維化が観察された(Inomata, K. et al., BMC Musculoskelet Disord. 20(1), 8, 2019)。
- ④ 関節炎症の消退期に生じる遷延痛の発症には、軟骨変性は必ずしも必須ではなくIFPの線維化のみで十分であった(Onuma et al. J Orthop Res. 38(6), 1296-1306, 2020)。
- ⑤ 関節炎症後に観察されるIFPの線維化は、あらかじめCNP(C-type Natriuretic Peptide)を関節内に投与(予防的投与)することで抑制出来、CNPの投与により、遷延痛の発症と関節軟骨の退行変性が抑制出来た(An et al. Osteoarthritis Cartilage 29:380-388, 2021)。CNPは、血管平滑筋に対して線維化抑制効果があることが既に示されているペプチドホルモンである。ラットMIA関節炎高容量モデル(1.0mgの関節内注射)を用いて関節炎を誘導後、線維化が生じる直前のDay 4, 6, 8にCNP(1 $\mu$ g)を関節内投与したところ、IFPの線維化が抑制できた。更に継時的にIncapacitance test(Weight Bearing Test)を行ったところ、CNP投与後にMIA投与側の荷重量の回復が観察された。特に14日目以降は、実験開始時と同等まで疼痛レベルが改善することが明らかとなった。さらに、day14における関節軟骨の組織学的解析を行ったところ、関節軟骨の退行変性が顕著に抑制されることが明らかとなった。

以上の結果は、CNP が OA の症状と病態の両方を同時に改善する薬剤(DMOADs)として創薬開発できる可能性を示している。

## **2. 研究の目的**

本研究では、CNP の OA への応用を実現化するにあたって解明すべき下記の「学術的問い」に関して検討を行う。

1. 膝遷延痛並びに関節軟骨の退行変性に対するCNPの治療的投与の効果検証
2. 外科的OAモデルに対するCNPの薬理効果の検討
3. CNPの薬理効果の分子機序の解析

本研究では、上記の3項目に関して検討を行い、CNP の DMOADs としての開発の可能性を考察することを主たる目的とする。本研究は、私が現在所属している教室で蓄積されたデータを基に開始された研究であり、独自性は確保されている。また、本研究計画が達成された場合、CNP は DMOADs として、創薬開発に進める可能性があり、社会的に大きな影響を与えうる研究に発展できる可能性があると考えている。

## **3. 研究の方法**

### **3-1. 膝遷延痛並びに関節軟骨の退行変性に対するCNPの治療的投与の効果検証**

当教室の先行研究においては、MIA の予防的投与による IFP の線維化抑制が OA の症状と病態の両方を改善できることを示した。しかしながら実際の臨床現場では、ある程度病態の進行した状態に対する改善効果を示すことが非常に重要であると考えられる。そこで、本研究項目では、MIA ラット関節炎モデルにおいて IFP の線維化が観察された後に、治療的に CNP を関節内注射し、膝遷延痛並びに関節軟骨の退行変性の抑制効果の評価を行う。具体的にはラット膝関節に 1.0mg の MIA を注射後、IFP の線維化が顕著に観察される Day8 より CNP を 6 回(1 $\mu$ g)投与して、継時的に Incapacitance test 並びに関節軟骨の組織学的評価を行う。また、IFP 領域にも着目し、CNP が線維化した組織を元の脂肪組織に戻す薬理効果があるかにも注目して解析を行う。

### **3-2. 外科的OAモデルに対するCNPの薬理効果の検討**

これまでのデータは、すべてラット MIA 関節炎モデルを用いて行った実験より得られた知見である。MIA 関節炎モデルは、膝疼痛の研究に広く用いられているモデル系であるが、急速に IFP の線維化が生じるため、ヒトの OA の病態を反映しているモデルとは必ずしも言い難い。そこで、ヒト外傷性 OA の病態に比較的近いとされている内側半月板不安定化モデル(DMM)を用いて、

- (a) OAの進行とともにIFPの線維化が観察されるか、
- (b) IFPの線維化の進行に従ってラットの疼痛回避行動が観察されるか、
- (c) CNPの関節内注射によりこれらモデルにおいてもIFPの線維化抑制と疼痛の緩和、関節軟骨の退行変性抑制が観察されるか、

の検証を行った。

### **3-3. CNPの薬理効果の分子機序の解析**

CNP は、血管平滑筋細胞において線維化を抑制する効果が報告されているが、IFP の線維化抑制効果は私たちが初めて明らかとした知見である。その分子機序を明らかとする目的で、遺伝子発現解析を行う。ラット滑膜線維芽細胞に CNP(1 $\mu$ g)を作用させた後に Total RNA Sequencing 解析を行い、CNP により発現量の変化した遺伝子の差分解析を行う。

## 4. 研究成果

### 4-1. 膝遷延痛並びに関節軟骨の退行変性に対するCNPの治療的投与の効果検証

項目 3-1 に記述した実験計画に則り、MIA 関節炎モデルに CNP を治療的に投与した効果の検証を行った。すなわち、ラット膝関節に 1.0mg の MIA を注射後、IFP の線維化が顕著に観察される Day8 より 6 日間、CNP を 1 $\mu$ g/膝で毎日関節内投与を行ったところ、day18 日以降に、Incapacitance test において患側肢の荷重量の有意な増加が観察された。しかしながら、組織学的解析から、一旦生じた IFP の線維化の所見が改善することはなかった。以上の結果は、CNP は、治療的投与においても遷延痛の改善においては有効であるが関節炎に伴う関節病態の改善効果までは期待できないことを示唆している。

### 3-2. 外科的 OA モデルに対する CNP の薬理効果の検討

本研究項目では、ヒト外傷性 OA により近いと考えられている DMM (Destabilization of the Medial Meniscus) モデルを用いて、CNP の長期的な薬理効果を、疼痛抑制、IFP 炎症抑制、軟骨変性抑制の 3 点から検証した。

Wistar ラット (雄、8~9 週齢、コントロール群 : n=5、CNP 群 : n=6) に対して、右膝に DMM を施行した。1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 週後に、コントロール群に対して PBS 20 $\mu$ L、CNP 群に対して CNP 1 $\mu$ g/20 $\mu$ L を関節内注射した。経時的に Incapacitance Test を施行し、左右後肢の荷重差を測定することで、DMM 側の疼痛回避行動を定量的に評価した。DMM 後 8 週でラット右膝関節を摘出した。組織標本作製し、IFP 炎症、ならびに軟骨変性の半定量的評価を行った。

DMM 施行によりコントロール群、CNP 群ともに有意に患側の荷重が減少した。DMM 後 2 週、3 週においては、コントロール群に対して CNP 群での荷重差が有意に改善した。一方、関節軟骨の変性が観察されるとの報告がある DMM 後 4 週以降では、両群間の有意差は見られなくなった。また、DMM 後 8 週時点での組織学的評価では、IFP の炎症、関節軟骨の変性がいずれも両群で見られ、群間で有意差は認められなかった。

以上の結果から、CNP 膝関節内投与が、外傷後の関節炎症に起因すると考えられる遷延痛を抑制するが、関節軟骨の変性に伴う慢性疼痛の発症に対しては著明な薬理作用を有さないことが示唆された。具体的な疼痛抑制機序については今後の検討が必要である。

また、DMM 後 8 週における組織学的評価から、CNP 関節内注射は外傷性の OA において、長期にわたる関節軟骨の変性抑制効果を有さないことが示唆された。

### 3-3. CNP の薬理効果の分子機序の解析

滑膜線維芽細胞における CNP の情報伝達経路並びに標的遺伝子の同定は total RNA sequence 解析により行った。Wistar ラットの膝滑膜より調製した線維芽細胞に対して CNP を 1 $\mu$ g/mL 作用させ、1 時間後の mRNA の網羅的発現解析を行った。Differential expression gene (DEG) analyses は、DESeq2 (v1.6.3) Bioconductor Package、Gene Ontology (GO) 解析は Metascape を用いて行った。

発現解析により、ラット滑膜線維芽細胞において CNP により極短期で発現変動が観察される 50 種類の遺伝子を同定した。GO 解析の結果、CNP はラット滑膜線維芽細胞において IL6-STAT3 情報伝達経路に対して抑制的に作用することが示唆された。DEG 解析の結果から、IL6 の標的遺伝子である VEGFa の発現が CNP により下方制御されることが示唆された。これらの結果を QPCR にて再検証したところ、IL6 により上昇した VEGFa mRNA は、CNP により低下することが確認出来

た。IL6 は、JAK を介して STAT3 の <sup>705</sup>Tyr 残基のリン酸化を誘導することが示されているが、CNP はラット滑膜線維芽細胞において STAT3 の <sup>727</sup>Ser 残基のリン酸化を特異的に誘導することが Western Blot 解析により明らかとなった。

本研究では、CNP が IL6 による VEGFa の発現上昇に対して抑制する薬理作用を有することを示した。またその分子機序として、STAT3 の Ser 残基のリン酸化が関与する可能性を示した。

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 2件）

1. 著者名 Hasegawa Shoichi, An Jae-Sung, Hino Jun, Amano Yusuke, Nakagawa Yusuke, Miyatake Kazumasa, Katagiri Hiroki, Nakamura Tomomasa, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki, Tsuji Kunikazu	4. 巻 31
2. 論文標題 Therapeutic effect of C-type natriuretic peptide on persistent pain in a rat knee arthritis model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Surgery	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/10225536231181708	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 -

1. 著者名 Nakagawa Yusuke, Tsuji Kunikazu, Nakamura Tomomasa, Katagiri Hiroki, Ozeki Nobutake, Shioda Mikio, An Jae-Sung, Yoshida Ryu, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of Infrapatellar Fat Pad Fibrosis at 3 Months After ACL Reconstruction With Short-term Clinical Outcomes and Inflammatory Cytokine Levels in the Synovial Fluid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Orthopaedic Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/23259671231164122	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0件

〔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
---------	---------