

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21209

研究課題名（和文）変形性関節症に対する運動療法から迫るマクロファージを介した軟骨保護作用の解明

研究課題名（英文）Understanding the Cartilage-Protective Effects Mediated by Macrophages through Exercise Therapy for Osteoarthritis

研究代表者

岡 優一郎（Oka, Yuichiro）

北海道大学・保健科学研究院・助教

研究者番号：10965354

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：変形性膝関節症モデルマウスに対し、トレッドミル運動を実施した時の滑膜におけるマクロファージの時空間的分布とM2マクロファージ阻害剤による影響を調査した。その結果、トレッドミル運動によって軟骨や滑膜などの組織学的形態変化を示す前にM2マクロファージが増加していることがわかった。また、M2マクロファージ阻害剤を用いるとトレッドミル運動を行っても軟骨変性が抑制されないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は運動という物理的刺激を介した炎症の抑制メカニズムについて、特にマクロファージの役割を中心とした知見を提供する。また軟骨保護に関して、M2マクロファージをターゲットとした新たな治療法の開発に貢献することを可能とする。さらに、運動が炎症抑制に働くメカニズムを解明することは治療法の開発だけでなく、予防医学のためのプログラム設計にも貢献する可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：We investigated the spatiotemporal distribution of macrophages in the synovium and the effects of an M2 macrophage inhibitor when treadmill exercise was performed on a mouse model of osteoarthritis. As a result, it was found that M2 macrophages increased before histological changes in tissues such as cartilage and synovium were observed due to treadmill exercise. Furthermore, it was revealed that the use of an M2 macrophage inhibitor did not prevent cartilage degeneration even with treadmill exercise.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：変形性関節症 運動療法 マクロファージ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は関節軟骨の摩耗を主病変とする退行性の運動器疾患である。主病変部位である関節軟骨は無血管・無神経領域であるため、一度損傷すると二度と元の状態に戻らない不可逆性の組織である。そのため、いかに状態を悪化させないかに治療の焦点が当てられてきたが、現在も軟骨変性を防止する治療法の確立には至っていない。2000年代より、理学療法の観点より、トレッドミル運動などの運動療法の効果が、変形性関節症モデル動物の軟骨変性を抑制すると報告されてきた。一般的に軟骨の維持には運動などによる機械的刺激が必要と認識されており、運動療法の効果としても適度な機械的刺激が付加されたからと説明されてきた。一方で過度な機械的刺激は軟骨変性を惹起する増悪因子としても作用することが報告されており、変形性関節症のモデル動物の特性を考慮すると、トレッドミル運動の効果を機械的刺激のみで解釈することは困難であり、他要因が軟骨の変性抑制に関与しているのではないかと考えた。そこで、我々は滑膜に存在するマクロファージの機能に着目した。マクロファージは炎症型のM1マクロファージと抗炎症型のM2マクロファージに大別され、変形性関節症の進行に伴いM1マクロファージが増加することが報告されている。それに対し、我々の知見ではトレッドミル運動を実施するとM1マクロファージが減少し、M2マクロファージが増加することを見出した。さらにマクロファージ枯渇剤を関節内に投与すると軟骨変性が悪化することが明らかとなり、トレッドミル運動の効果としてマクロファージの存在が必要であることが示唆された。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、トレッドミル運動時のマクロファージの役割について、特にM2型のマクロファージが軟骨の維持に対してどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。このために1)トレッドミル運動による軟骨保護とM2マクロファージの時空間的分布の検証と2)M2特異的阻害剤による検証を実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象・実験デザイン

12週齢のICR系雄性マウスを対象とし、前十字靭帯を切断し自由飼育期間を設けることにより、変形性膝関節症モデルを作成した。その後1)の運動時のマクロファージの時空間的分布を確認するため、運動群と非運動群に分け、運動から3,7,14,28日後に膝関節を採取した。次に2)のM2マクロファージの役割検証では、M2マクロファージ特異的阻害剤を用いて、非運動群、運動群、阻害剤投与群、運動+阻害剤投与群の4群に振り分けた。

#### (2) トレッドミル運動

我々の先行研究に従い、小動物用トレッドミルを用いて10m/minの強度で週3日行なった。また、1日の介入時間は30分とした。

#### (3) マクロファージ枯渇剤の投与

滑膜にあるM2マクロファージを選択的に枯渇させるため、Mannosylated Clodronate Liposome (MCL)を用いた。阻害剤投与群、運動+阻害剤投与群に対し、膝蓋腱の内側よりシリンジを侵入させ、6 $\mu$ lを関節内投与した。対照群には同様の方法でPBSを投与した。

#### (4) 組織学的解析

採取した膝関節はパラフィン包埋し、ミクロトームにて矢状断切片を作成した。組織切片に対し、関節軟骨を観察するためにSafranin-O Fast Green染色を実施した。また滑膜を観察するためにHematoxylin Eosin (HE)染色を実施した。関節軟骨はOARSIによって推奨されているスコアリング法に基づき脛骨内側を評価した。滑膜は顆間窩に入り脂肪体が確認できる点を評価位置とし、滑膜層の数や肥厚度、細胞浸潤度から滑膜の炎症を評価した。次にABC法に基づき、免疫組織化学染色を実施した。使用抗体は抗MMP13抗体、抗ADAMTs4抗体、抗CD68抗体、抗F4/80抗体、抗CD206抗体、抗CD163抗体、抗TNF- $\alpha$ 抗体、抗IL-4抗体とした。軟骨、滑膜における陽性細胞率を算出し、各タンパク発現の評価を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) トレッドミル運動による軟骨保護とM2マクロファージの時空間的分布の検証

OARSIスコアによる関節軟骨の評価では、すべてのタイムポイントで軽度から中等度の軟骨変性を確認し、運動から3,7,14日後までは非運動群とスコアに有意な差を認めなかったものの、先行研究と同様に28日後では有意な差を認めた。滑膜病変についてはすべての群で滑膜の肥厚や細胞浸潤所見を確認し、運動から3,7日後までは非運動群とスコアに優位差を認めなかったものの、14,28日後では非運動群と比較して運動群の滑膜炎が抑制されていた。

マクロファージについては滑膜の構造的変化が確認される前の段階である運動から7日後に

において非運動群よりも M2 マクロファージが増加していることを確認し、その後運動 28 日後まで継続していた。運動から 3 日目の組織像では M2 マクロファージは増加傾向にあったものの、有意な差は認めなかった。

## (2) M2 特異的阻害剤による検証

CD68 について、阻害剤投与群、運動+阻害剤投与群では陽性細胞が減少していた。またそれに伴い CD206 陽性細胞も減少しており、阻害剤による効果を確認した。

OARSI スコアによる関節軟骨の評価において、阻害剤投与群では非運動群と比較して OARSI スコアが高値を示し、運動+阻害剤投与群では非運動群と有意な差を認めなかった。滑膜の炎症については阻害剤投与群でスコアの亢進を認めた。

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 Oka Yuichiro, Murata Kenji, Ozone Kaichi, Minegishi Yuki, Kano Takuma, Shimada Naoki, Kanemura Naohiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Mild treadmill exercise inhibits cartilage degeneration via macrophages in an osteoarthritis mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage Open	6. 最初と最後の頁 100359 ~ 100359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ocarto.2023.100359	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
---------	---------