

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460716

研究課題名(和文) 関節疼痛の発症におけるオステオポンチンの生理機能の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of knee pain associated with osteoarthritis

研究代表者

朱 寧進 (JU, YOUNG-JIN)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：10436636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、変形性膝関節症に伴う疼痛発症の分子機序の解明を最終的な目標としている。本研究期間内では、関節液、滑膜中に存在しオステオポンチン受容体であるCD44を発現している間葉系幹細胞による膝疼痛改善効果の検証を行い、幹細胞の関節内投与が疼痛改善に有効であることをラットを用いた実験で明らかとした。神経組織学的解析手法を用いた関節疼痛発症の評価法の確立を目的として、関節内、関節周囲より投射する脊髄後根神経節の領域の同定を行った。関節内侵襲後の関節液中の炎症性サイトカインの動態解析と臨床データとの相関解析を行い、受傷後期間、関節液サイトカイン濃度、術後の回復度の間に相関関係を見出した。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to analyze the molecular mechanisms of joint pain associated with knee osteoarthritis. In this study we reported that intra-articular injection of mesenchymal stem cells isolated from synovial membrane in the knee joint had chondroprotective and anti-inflammatory effects in monoiodoacetic acid (MIA)-induced osteoarthritis model in rats. In addition, we reported that joint pain induced by the intra-articular injection of MIA was significantly alleviated by the intra-articular injection of mesenchymal stem cells. This effect was observed only when we injected mesenchymal stem cells in the acute phase (within 1 to 5 days) of joint inflammation induced by MIA injection. These data suggest that mesenchymal stem cells might have some inhibitory effects on the pro-inflammatory mediators functioning in the immediate early stage after joint injury.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性膝関節症 疼痛

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を同定した。更なる予備解析の結果、膝 OA 関節液中のオステオポンチンタンパク濃度は、疼痛の程度（Visual Analogue Scale, VAS）と正の相関のあること、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オステオポンチンタンパクが存在することを見いだした。また、オステオポンチン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 NF κ B 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、オステオポンチン欠損マウスは、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、オステオポンチンの受容体である α 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 α 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)。以上の研究成果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、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、OA 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。本研究はこの仮説を検証することを目的とする

2. 研究の目的

本研究では、変形性膝関節症に伴う疼痛発症の分子メカニズムの解明を最終的な目標として、膝関節疼痛の重症化の分子メカニズムの解析を、オステオポンチンが関与する情報伝達経路に着目して行うことを試みてきた。本研究期間内では、以下の項目について検討を行った。(1)関節液、滑膜中に存在しオステオポンチン受容体である CD44 を発現している間葉系幹細胞による膝疼痛改善効果の検証、(2)神経組織学的解析手法を用いた関節疼痛発症の評価法の確立、(3)関節内侵襲後の関節液中の炎症性サイトカインの動態解析と臨床データとの相関解析

3. 研究の方法

(1)関節液、滑膜中に存在しオステオポンチン受容体である CD44 を発現している間葉系幹細胞による膝疼痛改善効果の検証

Wister Rat (雄、8 週齢) に対し、両膝に MIA (0.2mg または 1mg/30 μ l) を関節内注射し、注射後 1、3、5 日に右膝に MSC1.0 \times 10⁶ 個/30 μ l、左膝に PBS をそれぞれ単回投与した。MIA 注射後 7 日、8 週で Incapacitance test を行い、その後膝関節を摘出し、肉眼・組織学的検討を行った。

(2)神経組織学的解析手法を用いた関節疼痛発症の評価法の確立

Wister ラットの膝関節内及び周囲組織にモノヨード酢酸(MIA) 0.2mg/30 μ l 及びフルオロゴールド(FG) 5 μ l を投与し、5日目に灌流固定後、L3~L5 DRG (脊髄後根神経節)を摘出し、組織学的解析を行った。

(3)関節内侵襲後の関節液中の炎症性サイトカインの動態解析と臨床データとの相関解析

当院で2013年1月から2014年4月までACL再建術を行った患者32名を対象とした。術後3~5日目に関節液を採取し、サイトカイン濃度(IL-1、IL-2、IL-8、IL-6、IL-10、TNF-、IFN-)を測定した。また術後3ヶ月後に運動機能の回復レベルを5段階評価し、ジョギング可能かどうかで2群に分けた(早期回復群13名、回復遅延群19名)。2群において年齢および性別、ACL損傷から手術までの期間、サイトカイン濃度をt検定にて比較した。さらに受傷後100日以内に手術を行った群と、100日より後に手術を行った群で回復レベルをU検定にて比較した。

4. 研究成果

(1)関節液、滑膜中に存在しオステオポンチン受容体であるCD44を発現している間葉系幹細胞による膝疼痛改善効果の検証

私たちは、これまで様々な変形性膝関節症モデル動物を用いて、滑膜由来間葉系幹細胞(MSC)の関節内投与が滑膜炎と関節軟骨の退行変性を抑制することを示してきた。本研究では、モノヨード酢酸(MIA)投与によるラット関節炎モデルに対し、MSC投与が疼痛の抑制効果を有するかについての検討を行った。

その結果、8週群ではMIA注射後1、3日にMSCを投与した群で有意にMSC投与足に荷重が観察された。7日群では有意な左右差を認めなかったが、右足に荷重する傾向がみられた。組織学的には右膝で軟骨変性が軽度であった。

本研究では、ラット関節炎モデルにおいてMSC投与は組織破壊の抑制だけでなく疼痛を抑制する効果を有することが示唆された。今後の再生医療における新たな展開が期待できると考えている。今後、MSC投与による疼痛抑制効果が、間接的(抗炎症作用、軟骨変性抑制作用)か、直接的(脱感作等)作用を介するのか、検討を行っていく予定である。

(2)神経組織学的解析手法を用いた関節疼

痛発症の評価法の確立

変形性膝関節症(OA)の最大の愁訴は疼痛であり、その効果的なコントロールが患者のADLに大きな影響を与える。OA患者では、著明な関節内炎症が消退した後でも疼痛が残存するケースが多く、この疼痛の一部が炎症所見の観察されていない関節周囲組織に由来することを私たちは見出した。本研究の最終目的は、OAにおいて関節周囲痛が生じる原因、特に急性期の関節内疼痛が関節周囲へと遷移していく過程の解析とその効果的な抑制法を確立することである。本研究では、関節内組織と関節周囲組織に存在する感覚神経が異なる脊髄後根神経節(DRG)へ投射することの確認をおこなった。

関節内投与群ではL4領域にFG陽性細胞が観察された。免疫染色の結果、FG陽性細胞は、すべてCGRP陽性であった。一方、関節周囲組織投与群ではL4領域にごく少数のFG弱陽性細胞を認めるのみであった。

今回の急性期の膝疼痛モデル実験から、関節内と周囲組織に存在する感覚神経は異なるDRGへと投射することが示唆された。この知見を基に、今後、膝OAの慢性疼痛モデルにおいて関節内から周囲組織への痛みが遷移が起こるメカニズムを、組織学的に解析していく予定である。

(3)関節内侵襲後の関節液中の炎症性サイトカインの動態解析と臨床データとの相関解析

前十字靭帯(ACL)損傷はスポーツを契機とすることが多く、早期に術前のスポーツへの復帰はQOLの改善につながる。ただしACL再建術後の運動機能の回復程度は個人によって様々である。ACL再建術の患者の周術期における臨床的および生化学的パラメーターから、術後早期の運動機能の回復度を予測できないかを検討した。

その結果、年齢、性別に関しては有意な差が認められなかった。ACL損傷から手術までの期間に関しては、早期回復群のほうが回復遅延群より有意に短かった($p < 0.05$)。さらに受傷後100日以内に手術を行った群のほうが運動機能の回復レベルが有意に良好であった($p < 0.05$)。また関節液中サイトカイン濃度に関しては群間で有意な差は認められなかったが、IL-2濃度に関しては早期回復群において低い傾向を認めた($p = 0.07$)。興味深いことに、関節液IL-2濃度は他の炎症性、抗炎症性サイトカイン(IL-1、IL-10、IFN-)及びケモカイン(IL8)と有意に正の相関を示した。

以上の結果から、ACL 損傷から手術までの期間は術後の回復に影響をあたえると思われた。受傷後早期の手術が早期の運動機能の回復に役立ち、ACL 損傷より 100 日以内の再建が好ましいと考えられた。また、IL-2 は ACL 手術後の炎症の状態を表しており、マーカーとしての有用性があると考えられた。

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 5 件)

1. Udo M, Muneta T, Tsuji K, Ozeki N, Nakagawa Y, Ohara T, Saito R, Yanagisawa K, Koga H, Sekiya I. Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016: *in press*. doi: 10.1016/j.joca.2016.02.005.

2. Miyatake K, Muneta T, Ojima M, Yamada J, Matsukura Y, Abula K, Sekiya I, Tsuji K. Coordinate and synergistic effects of extensive treadmill exercise and ovariectomy on articular cartilage degeneration. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016;17(1):238. doi: 10.1186/s12891-016-1094-8.

3. Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Miyatake K, Yamada J, Abula K, Koga H, Tomita M, Sekiya I. Mouse synovial mesenchymal stem cells increase in yield with knee inflammation. *J Orthop Res*. 2015;33(2):246-53. doi: 10.1002/jor.22753.

4. Abula K, Muneta T, Miyatake K, Yamada J, Matsukura Y, Inoue M, Sekiya I, Graf D, Economides AN, Rosen V, Tsuji K. Elimination of BMP7 from the developing limb mesenchyme leads to articular cartilage degeneration and synovial inflammation with increased age. *FEBS Lett*. 2015;589(11):1240-8. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.004.

5. Yamada J, Tsuji K, Miyatake K, Matsukura Y, Abula K, Inoue M, Sekiya I, Muneta T. Follistatin alleviates

synovitis and articular cartilage degeneration induced by carrageenan. *Int J Inflamm*. 2014:959271. doi: 10.1155/2014/959271.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. M. Udo, T. Muneta, K. Tsuji, N. Ozeki, T. Hoshino, Y. Kohno, Y. Yamazaki, I. Sekiya. Effects of the intra-articular mesenchymal stem cell injection during acute inflammatory phase on cartilage degeneration and pain in rat.

International Cartilage Repair Society. September 24-27, 2016, Sorrento, Italy

2. M. Udo, T. Muneta, K. Tsuji, N. Ozeki, Y. Nakagawa, T. Ohara, R. Saito, K. Yanagisawa, I. Sekiya. Monoiodoacetic acid induces cartilage degeneration and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner. *Osteoarthritis Research Society International*. March 31-April 3, 2016, Amsterdam, Netherland

3. 宇土 美於, 辻 邦和, 大関 信武, 星野 傑, 山崎 勇大, 関矢 一郎, 宗田 大, モノヨード酢酸によるラット関節炎モデルにおいて間葉系幹細胞投与投与は疼痛を軽減する。日本運動器疼痛学会, 2015 年 12 月 12-13 日, 名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県

4. 星野 傑, 辻 邦和, 宇土 美於, 宗田 大, ラット変形性膝関節疼痛モデルの膝関節・膝周囲組織の脊髄後根神経節での組織学的検討。日本運動器疼痛学会, 2015 年 12 月 12-13 日, 名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県

5. 井上 牧子, 辻 邦和, 大川 淳, 関矢 一郎, 宗田 大, 前十字靭帯再建後の運動機能回復を規定する因子の同定。日本整形外科学会基礎学術集会, 2015 年 10 月 22-23 日, 富山国際会議場、富山市、富山県

6. 宇土 美於, 宗田 大, 辻 邦和, 大関 信武, 中川 祐介, 大原 敏之, 斉藤 龍佑, 柳沢 克昭, 大川 淳, 関矢 一郎, 低用量モノヨード酢酸を用いたラット関節炎モデルにおける関節内変化。日本整形外科学会基礎学術集会, 2015 年 10 月 22-23 日, 富山国際会議場、富山市、富山県

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

辻 邦和 (TSUJI KUNIKAZU)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・

准教授

研究者番号：20323694

宗田 大 (MUNETAKESHISHI)

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 (TSUJI KUNIKAZU)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・

教授

研究者番号：10345291

赤澤 智宏 (AKAZAWA CHIHIRO)

東京医科歯科大学・保健衛生学研究科・

教授

研究者番号：80291160