

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861336

研究課題名(和文) 活性型ビタミンD3による関節軟骨変性予防効果とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) The effect of Vitamin D3 on the degradation of articular cartilage

## 研究代表者

大田 陽一(Ohta, Yoichi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・病院講師

研究者番号：50633484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、活性型ビタミンD3の軟骨細胞分化、及び関節軟骨の変性に対する影響を検討することを目的とした。マウス骨端部の軟骨細胞を採取し、活性型ビタミンD3誘導体を添加、培養後細胞を回収し遺伝子発現をreal-time PCRにて検討したところErgやlubricin (Prg4)の発現は非添加群と比べ高い傾向にあった。また、マウスの内側不安定型変形性関節症誘導モデルに活性型ビタミンD3誘導体を局所投与したところ非添加群に比べ関節軟骨変性の程度は低い傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the effect of Vitamin D3 on the differentiation of chondrocytes and the degradation of articular cartilage. Primary mouse epiphyseal chondrocytes were isolated from new born mice, and subjected to gene expression analysis. Treatment with Vitamin D analog tended to stimulate Erg and lubricin (Prg4) expression. Local administration of Vitamin D analog to mice subjected to osteoarthritis (OA)-inducing surgery tended to decrease joint degradation following OA inducing surgery.

研究分野：整形外科

キーワード：活性型ビタミンD3 関節軟骨

## 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は外圧の緩衝や円滑な可動性を提供する重要な組織である。しかし、関節軟骨組織は血管、神経、リンパ管が存在しない組織であるため、変形性関節症や関節破壊性疾患などにおいて、一度損傷を受けるとその修復は困難であり、その結果、経時的に関節軟骨そのものの破壊とその周囲の軟骨の変性をきたし、疼痛、可動域制限により著しい関節機能の低下を招く。しかしながら、関節軟骨組織変性の予防法または軟骨組織そのものを修復するという治療法は確立されていないのが現状である。関節軟骨の変性、退行性変化を病態とする変形性関節症の患者数は、高齢化社会を迎えるにあたり飛躍的に増加しているため、軟骨組織の形態維持及びその再生は患者の QOL (Quality of Life) を高める上で非常に重要である。

関節形成を発生学的な観点から考えると、大部分の軟骨細胞は成長軟骨を形成し、肥大化、石灰化(最終分化)を経て骨に置換されるのに対して(成長軟骨細胞)、特に骨端部に存在する軟骨細胞は最終分化することなく関節軟骨(永久軟骨)として機能することが知られている(永久軟骨細胞)。また、関節形成時には同時に様々な因子やシグナル伝達経路が作用していることが考えられているため、変形性関節症等における関節軟骨組織損傷の予防や修復、及びその再生には軟骨組織の発生機構の解明とともに、軟骨細胞の分化制御に関わるメカニズムなどの分子病態の解明が重要であると考えられる。

近年、臨床研究において、血清ビタミン D の低値が変形性膝関節症や変形性股関節症の進行に関係するという報告(引用文献、)がされている。また in vitro の研究において、ビタミン D が関節軟骨においてプロテオグリカンの産生を刺激し、関節軟骨代謝に直接影響を与えていることや、活性型ビタミン D<sub>3</sub> による軟骨細胞最終分化抑制効果が報告されているが(引用文献)、以降、未だそのメカニズムは明らかにされていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ビタミン D シグナルの軟骨細胞分化における影響について検討を行い、関節軟骨の退行性変化における役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 活性型ビタミン D<sub>3</sub> による in vivo 軟骨細胞分化制御の評価

生後 3-5 日のマウス骨端部の軟骨細胞を単離、培養し、活性型ビタミン D<sub>3</sub> および活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体として 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup> M)、1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropoxy) vitamin D<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup> M) を 7 日間添加した。細胞を回収し Type 1 コラーゲンゲル 200 µl

中に 1.0×10<sup>6</sup> 個の細胞を均一に攪拌させ、ヌードマウスの皮下に細胞移植を行った(引用文献)。コントロールとして、1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>、及び 1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropoxy) vitamin D<sub>3</sub> 非添加群の軟骨細胞を同数、細胞移植することにより形成されたペレットを組織学的に比較検討した。組織評価は細胞移植後 1 週、2 週、4 週と経時的に H-E 染色、アルシアンブルー染色で評価した。

(2) 活性型ビタミン D<sub>3</sub> による in vitro 軟骨細胞分化制御機構の解明

生後 3-5 日のマウス骨端部の軟骨細胞を単離、培養し、1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropoxy) vitamin D<sub>3</sub> を添加した。RNA を回収し関節マーカーの発現量を real time RT-PCR 法を用いて評価を行った。

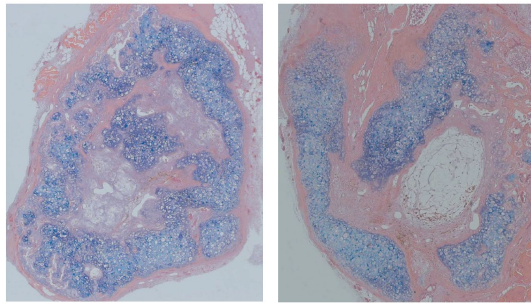
(3) 変形性関節症における活性型ビタミン D<sub>3</sub> の予防効果の検討

野生型マウスの右膝関節に、内側不安定型変形性関節症誘導モデルを作成した(引用文献)。手術はイソフルレン吸入麻酔下、右膝内側側副靭帯を横切し右膝関節内側部から関節包を切開することにより関節軟骨の展開を行った。次に内側半月板全切除を顕微鏡視下手術にて行った。左膝関節にはコントロールとして sham 手術を施行した。内側不安定型変形性関節症誘導後、1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropoxy) vitamin D<sub>3</sub> を関節内に局所投与 1 回/週 (0.2 µg/kg) を行った。コントロールには 1,25-dihydroxy-2-(3-hydroxypropoxy) vitamin D<sub>3</sub> 溶解液として使用する中鎖脂肪酸溶液を関節内投与した群を作成した。8 週後に屠殺し、内側膝関節の体軸方向にパラフィン組織標本切片を作成した。変形性関節症様変化はサフランin-0 染色にて経時的に評価を行った。関節軟骨変性の評価は OARSI (Osteoarthritis research society international) によって推奨されている組織学的なスコアリング(引用文献)を基に定量評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) 活性型ビタミン D<sub>3</sub> による in vivo 軟骨細胞分化制御の評価

活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体 (10<sup>-8</sup> M) 添加群、非添加群のいずれの組織像においても 1 週、2 週にて軟骨細胞の肥大化を認め、明らかな組織学的な差は認められなかった。4 週の組織像においても軟骨細胞の肥大化及び一部骨化を認め、明らかな組織学的な差は認められなかった(図 1)。また、活性型ビタミン D<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup> M) 添加群においても 4 週の組織像においても軟骨細胞の肥大化及び一部骨化を認め非添加群と比べて明らかな組織学的な差は認められなかった。



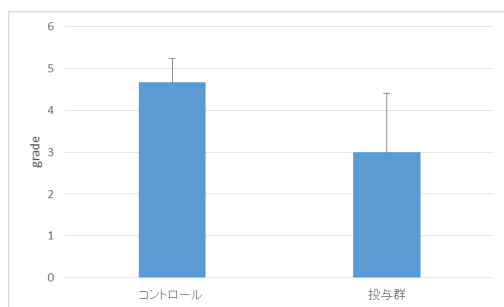
非添加群 4 週                      添加群 4 週  
(図 1)

(2) 活性型ビタミン D<sub>3</sub> による in vitro 軟骨細胞分化制御機構の解明

軟骨細胞に活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体添加後 4 日で RNA を回収し real-time RT-PCR を解析した結果、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体添加群において非添加群と比べ、Erg は約 1.4 倍(活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体: 10<sup>-8</sup> M)、lubricin (Prg4) は約 1.2 倍(活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体: 10<sup>-7</sup> M) と発現が高い傾向が認められた。軟骨細胞において活性型ビタミン D<sub>3</sub> の軟骨細胞分化制御効果の可能性が考えられた。

(3) 変形性関節症における活性型ビタミン D<sub>3</sub> の予防効果の検討

内側不安定型変形性関節症誘導 8 週後において、内側関節軟骨の変性に関して組織学的に評価した結果、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体投与群では、コントロール群に比べ、OARSI による OA cartilage grade 評価は低い傾向にあった(図 2)。In vivo における活性型ビタミン D<sub>3</sub> による関節軟骨変性抑制効果の可能性が考えられた。



(図 2)

< 引用文献 >

Chaganti RK, Parimi N, Cawthon P, Dam TL, Nevitt MC, Lane NE. Association of 25-hydroxyvitamin D with prevalent osteoarthritis of the hip in elderly men: the osteoporotic fractures in men study. *Arthritis Rheum.* 2010;62(2):511-4.

Muraki S, Dennison E, Jameson K, Boucher

BJ, Akune T, Yoshimura N, Judge A, Arden NK, Javaid K, Cooper C. Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(11):1301-6.

Bergink AP, Uitterlinden AG, Van Leeuwen JP, Burman CJ, Hofman A, Verhaar JA, Pols HA. Vitamin D status, bone mineral density, and the development of radiographic osteoarthritis of the knee: The Rotterdam Study. *J Clin Rheumatol.* 2009;15(5):230-7.

Tetlow LC, Smith SJ, Mawer EB, Woolley DE. Vitamin D receptors in the rheumatoid lesion: expression by chondrocytes, macrophages, and synoviocytes. *Ann Rheum Dis.* 1999;58(2):118-21.

Kato Y, Shimazu A, Iwamoto M, Nakashima K, Koike T, Suzuki F, Nishii Y, Sato K. Role of 1,25-dihydroxycholecalciferol in growth-plate cartilage: inhibition of terminal differentiation of chondrocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(17):6522-6.

Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, Fortina P, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Roles of -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells. *Lab Invest.* 2011;91(12):1739-52.

Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2462-70.

Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(1):13-29.

5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 3 件 )

Hata K, Minoda Y, Ikebuchi M, Mizokawa S, Ohta Y, Miyazaki N, Miyake Y, Nakamura H. In vivo wear particles of remelted highly crosslinked polyethylene after total hip arthroplasty: report of four

cases. J Mater Sci Mater Med.  
2015;26(3):133. (査読有り)  
doi:10.1007/s10856-015-5472-9.

Iwamoto M, Ohta Y, Larmour C,  
Enomoto-Iwamoto M. Toward regeneration of  
articular cartilage. Birth Defects Res C  
Embryo Today. 2013;99(3):192-202. (査読有  
り) doi:10.1002/bdrc.21042.

Cantley L, Saunders C, Guttenberg M,  
Candela ME, Ohta Y, Yasuhara R, Kondo N,  
Sgariglia F, Asai S, Zhang X, Qin L, Hecht  
JT, Chen D, Yamamoto M, Toyosawa S, Dormans  
JP, Esko JD, Yamaguchi Y, Iwamoto M,  
Pacifci M, Enomoto-Iwamoto M. Loss of  
-Catenin Induces Multifocal Periosteal  
Chondroma-like Masses in Mice. Am J  
Pathol.2013;182(3) 917-27. (査読有り)  
doi: 10.1016/j.ajpath.2012.11.012.

〔学会発表〕(計5件)

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi  
M, Itokazu M, Yamaura K, Nakamura S,  
Nakamura H. Assymetric Tibial Component  
Reduced The Risk Of Malrotation In TKA.  
Annual meeting of American Academy of  
Orthopaedic Surgeons. 2015年3月24日  
-2015年3月28日. Las Vegas (USA)

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi  
M, Itokazu M, Yamaura K, Nakamura S,  
Nakamura H. Comparison Of In Vivo  
Polyethylene Wear Particles Between  
Mobile- And Fixed-bearing TKA In The Same  
Patients. Annual meeting of American  
Academy of Orthopaedic Surgeons. 2015年  
3月24日-2015年3月28日. Las Vegas (USA)

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi  
M, Itokazu M, Yamaura K, Nakamura S,  
Nakamura H. Mobile-bearing TKA Reduced  
The Postoperative Anteroposterior Laxity  
Comparing To Fixed-bearing TKA In The Same  
patients. Annual meeting of Orthopaedic  
Research Society. 2015年3月28日-2015  
年3月31日. Las Vegas (USA)

Nakamura S, Minoda Y, Mizokawa S,  
Ohta Y, Itokazu M, Yamaura K,  
Nakamura H. Peri-prosthetic Bone  
Mineral Density after Bilateral TKA:  
Mobile vs. Fixed Bearing prostheses.  
Annual meeting of Orthopaedic Research  
Society. 2015年3月28日-2015年3月31  
日. Las Vegas (USA)

大田 陽一、箕田 行秀、溝川 滋一、渭  
川 徹秀、糸数 万紀、山村 一正、中村 博  
亮。人工股関節置換術後におけるステム周

囲の骨密度変化 Anatomical stem と  
Zweymuller stemの術後4年の比較 第44回  
日本人工関節学会.2014年2月20日~2014  
年2月22日.沖縄コンベンションセンター  
(沖縄県・宜野湾市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大田 陽一 (Ohta, Yoichi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・  
病院講師

研究者番号 : 50633484