

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350645

研究課題名(和文)変形性関節症におけるAGEの役割：OA発症と関節炎に起因する機能障害に着目して

研究課題名(英文)Implications of AGEs for the development of OA and contracture

研究代表者

小澤 淳也(Ozawa, Junya)

広島国際大学・総合リハビリテーション学部・准教授

研究者番号：00435059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの膝関節に終末糖化産物(AGE)を蓄積させるモデルを用い、関節へのメカニカルストレスとしての走行運動に対する関節軟骨恒常性と、関節不動に伴う拘縮に及ぼす影響を検討した。AGE蓄積と走行運動の併用では、膝関節軟骨に明らかな軟骨減少や病理学的変化は認められなかった。関節拘縮への影響について、AGE蓄積のみでは関節拘縮は出現しなかったが、3週間の関節固定により、関節性拘縮がAGE蓄積関節でAGE非蓄積関節よりも重症化し、関節包では線維化関連遺伝子やコラーゲン遺伝子・タンパク増加を伴っていた。これらの結果から、高齢者や糖尿病患者の拘縮に対し、AGEを標的とした治療が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of hypo- and hyperactivity of joint with accumulation of AGEs. First, a combination of AGEs accumulation and treadmill running was tested. AGEs accumulated knee joint was not induced any pathological changes. Second, we tested the effects of AGEs on joint mobility. AGEs accumulation in joint components did not affect joint mobility. However, joint contracture following immobilization was aggravated in AGEs accumulating joints with concomitant upregulation of collagen genes and protein in joint capsule. This study is the first to elucidate the relationship between AGEs and joint contracture formation following immobilization via enhancement of fibrosis in joint capsule.

研究分野：総合領域

キーワード：終末糖化産物 軟骨代謝 関節拘縮 線維化 関節不動

1. 研究開始当初の背景

終末糖化産物 (AGE) は、加齢や糖尿病により増加する。関節軟骨の AGE の蓄積は、軟骨代謝を異化に傾けること、炎症を促進させることから、変形性膝関節症 (膝 OA) との関係が示唆される。しかし、AGE 蓄積を誘導した動物モデルでは膝 OA 発症・進行において一致した結果が得られていない。そこで、AGE に加え、それ以外の要因としてメカニカルストレスとの相互作用が膝 OA に導くと推測した。

また、AGE はコラーゲンを架橋して組織の機械的性質を変化させることから、関節拘縮の発生や進行に關与する可能性が示唆されている。また、AGE は炎症促進作用があるが、関節固定後に関節炎が出現すること、関節炎は拘縮の誘導因子であることから、AGE 蓄積は拘縮を増悪させる因子である可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、1) AGE 蓄積とメカニカルストレスの相互作用が OA 発症・進行に果たす役割の解明、2) 不動により誘導される関節拘縮形成に AGE が及ぼす影響について解明を目的とした。

3. 研究の方法

実験 1

ラット膝関節にリボース (100 μ l 2.0M、2 回/週、8 週間) を投与して AGEs (ペントシジン) の蓄積を誘導した。対照群には生理食塩水を同様に投与した。その後、低速度 (12 m/min) のトレッドミル走行を 5 回/週、6 週間行った。膝関節を採取、前額断パラフィン切片を作製、HE 染色して組織学的・形態定量学的に解析した。

実験 2

ラットの膝関節に実験 1 と同量のリボースもしくは生理食塩水を両膝関節内に 2 回/週投与した。8 週後、後方関節包を採取し、HPLC でペントシジン量の測定を行った。残りのラットには、右膝関節を 140° 屈曲位で 3 週間創外固定した。その後、膝関節伸展方向に 14.6 N/mm のモーメントを加えた状態で、膝関節可動域 (ROM) を測定した。その後、膝関節を固定、脱灰し、矢状断パラフィン切片を作製した。HE 染色及びアルデヒドフクシンマッソンゴールドナー染色を行い、後方関節包を組織学的・形態定量学的に解析した。さらに、切片から後方関節包を採取し、total RNA を抽出、逆転写反応により cDNA を作製し、線維化関連遺伝子であるトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 1)、I 型コラーゲン (COL1A1)、III 型コラーゲン (COL3A1) の mRNA をリアルタイム PCR にて測定した。

4. 研究成果

実験 1

サフラニン O ファーストグリーン染色では、脛骨プラトー部、大腿骨顆部、膝蓋骨内側全てで軟骨基質の染色性はいずれの群でも均一であり、変形性膝関節症を示す明らかな病理学的変化を認めなかった。膝蓋骨内側の軟骨形態定量的解析を行った結果、非走行群同士の比較では、AGE 関節は非 AGE 関節よりも軟骨基質厚が 5% 減少した。走行群同士の比較では、AGE 関節で非 AGE 関節よりも 8% 減少した。また、走行により非 AGE 関節では軟骨厚が 8% 増加したのに対し、AGE 関節では 5% 増加した。二元配置分散分析では、2 要因 (走行とリボース投与) の間に交互作用は認められなかった。

以上のことから、関節軟骨における AGE の蓄積は低速度の走行運動に対する感受性を変化させなかった。

実験 2

ペントシジンは、リボース群で生食群の 9.2 倍に増加した ($P < 0.05$) (図 1)。

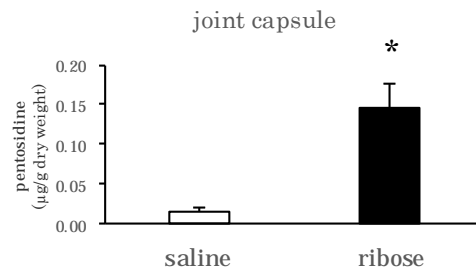


図 1. 関節包ペントシジン量。リボース投与により約 9.2 倍増加した。* : < 0.05

筋性要因と関節性要因を含む筋切断前 ROM は、非固定側及び固定側ともにリボース群と生食群の間に差がみられなかった。一方、関節性要因を反映する筋切断後 ROM (図 2) は、非固定側では両群間に差がみられなかったのに対し、固定側ではリボース群で生食群よりも ROM が有意に減少した。二元配置分散分析では、関節固定とリボース投与に交互作用 (相乗効果) が認められた。

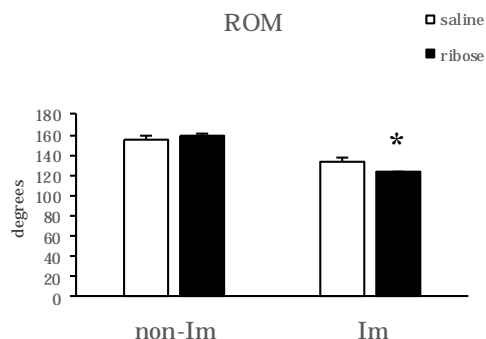


図 2. 筋切断後 ROM。非固定側では生食群とリボース群に差はなかったが、関節固定後の ROM は生食群に比べリボース群で有意に減少した。* <

関節性拘縮の責任病巣である後方関節包は、固定側で非固定側よりも滑膜長の短縮および関節包の肥厚が認められたが、リボース群と生食群の間に差はみられなかった。

TGF- β 1 mRNA 発現は、リボース投与や固定により変化しなかった。COL1A1 mRNA および COL3A1 mRNA は、リボース群の固定側で非固定側よりも有意に増加(それぞれ 1.9 倍、1.7 倍)した。固定側同士の比較では、COL3A1 mRNA で生食群よりリボース群で有意に増加(1.5 倍)した。

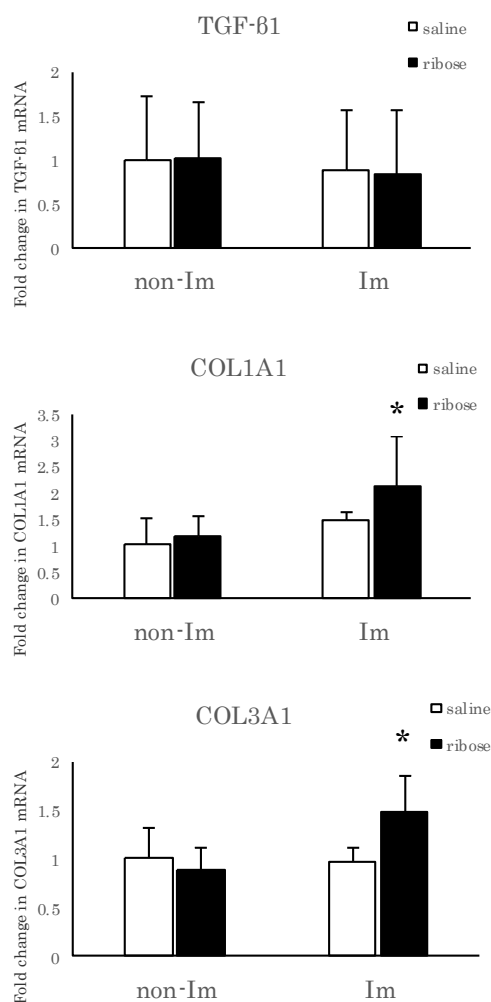


図3.線維化関連遺伝子発現 (A) TGF- β 1 mRNA, (B) COL1A1 mRNA (C) COL3A1 mRNA. * < 0.05

結論として、リボース投与による AGEs 蓄積では、関節拘縮を発症させなかったが、不動により誘導された関節拘縮は、AGE 蓄積によりコラーゲン遺伝子発現促進を介して拘縮を増悪させた。本研究の結果から、高齢者や糖尿病患者の拘縮に対し、AGE を標的とした治療が有効である可能性が示唆された。

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)

Kaneguchi A, Ozawa J, Yamaoka K. Structures responsible for the formation of knee joint contracture secondary to adjuvant-induced arthritis in a rat model. *Iryo Kougaku Zassi (J Med Eng)* 2015. 9: 1-9

Kurose T, Hashimoto M, Ozawa J, Kawamata S. Analysis of Gene Expression in Experimental Pressure Ulcers in the Rat with Special Reference to Inflammatory Cytokines. *PLoS One*. 2015 Jul 15;10(7):e0132622. doi: 10.1371/journal.pone.0132622. eCollection 2015.

Kaneguchi A, Ozawa J, Kawamata S, Yamaoka K. Development of arthrogenic joint contracture as a result of pathological changes in remobilized rat knees. *J Orthop Res*. 2016 Sep 7. doi: 10.1002/jor.23419.

Kaneguchi A, Ozawa J, Moriyama H, Yamaoka K. Nociception contributes to the formation of myogenic contracture in the early phase of adjuvant-induced arthritis in a rat knee. *J Orthop Res*. 2016 Sep 1. doi: 10.1002/jor.23412.

Ozawa J, Kaneguchi A, Tanaka R, Kito N, Moriyama H. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib attenuates joint contracture following immobilization in rat knees. *BMC Musculoskel Dis*. 2016 Oct 24;17(1):446.

[学会発表](計 7 件)

小澤 淳也, Interaction between gastrocnemius muscle weakness and moderate running exercise on rat knee joint cartilage, ラット膝関節軟骨代謝における中等度走行運動と腓腹筋筋力低下の相互作用, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 第 92 回日本生理学会(合同学会) 2015 年 3 月 22 日, 神戸

Ozawa J, Kaneguchi A, Kito N, Tanaka R, Moriyama H. Locomotion abnormalities and the subsequent ankle muscle atrophy are induced by hip adductor muscle weakness in a rat. 4th AOCPRM, 11 Dec, 2014, Bangkok, Thailand.

Ozawa J, Kaneguchi A, Kito N, Tanaka R, Tokumori K, Moriyama H. Selective COX-2 inhibitor celecoxib partially attenuates joint contracture followed by immobilization in a rat. 4th AOCPRM, 12 Dec, 2014, Bangkok, Thailand.

Kaneguchi A, Ozawa J, Yamaoka K.
Nociception contributes to the development of joint contracture induced by arthritis in a rat. 4th AOCPRM, 11 Dec, 2014, Bangkok, Thailand.

Ozawa J, Kaneguchi A, Minamimoto K, Tanaka R, Kito N, Moriyama H, Matsuba J.
Accumulation of advanced glycation end products progresses joint contracture following immobilization. ACPT2016, 7 Oct, 2016, Kuala Lumpur, Malaysia.

Ozawa J, Kaneguchi A, Iwamoto M, Minamimoto K, Tanaka R, Kito N, Moriyama H, Matsuba J. Joint contracture is recovered by remobilization with accompanying elongation of shortened muscle lengths in rat knees. ACPT2016, 7 Oct, 2016, Kuala Lumpur, Malaysia.

小澤 淳也, 金口 瑛典, 森山 英樹, 木藤 伸宏, 田中 亮, 終末糖化産物 (AGEs)は固定に誘導される関節拘縮を悪化させる, 第51回日本理学療法学会, 2016年5月29日, 札幌

〔図書〕(計 3件)

臨床思考を踏まえる理学療法プラクティス 極める変形性膝関節症の理学療法, 文光堂, 2014年5月, 常任編集: 斎藤秀之、加藤浩、ゲスト編集: 山田 英司、執筆: 小澤 淳也, 木藤 伸宏, 田中 亮 他多数)

理学療法研究の進めかた 基礎から学ぶ研究のすべて, 文光堂, 2014年3月, 編集: 森山英樹, 執筆: 小澤 淳也, 木藤 伸宏, 田中 亮 他多数)

臨床思考が身につく運動療法 Q&A (理学療法 NAVI), 医学書院, 2016年9月, 編集: 高橋 哲也、執筆: 小澤 淳也, 木藤 伸宏, 金口 瑛典 他多数)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 淳也 (OZAWA JUNYA)
広島国際大学・総合リハビリテーション学部・准教授
研究者番号: 00435059

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

木藤 伸宏 (KITO NOBUHORO)
広島国際大学・総合リハビリテーション学部・准教授
研究者番号: 40435061

森山 英樹 (MORIYAMA HIDEKI)
神戸大学大学院・保健学研究科・教授
研究者番号: 10438111

田中 亮 (TANAKA RYO)
広島国際大学・総合リハビリテーション学部・講師
研究者番号: 50454880

(4) 研究協力者

()