

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

変形性膝関節症の生活機能維持・再建に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 守屋 秀繁

平成15(2003)年 4月

目次

I.	総括研究報告書	
	変形性膝関節症の生活機能維持・再建に関する研究	1
	守屋秀繁	
II.	分担研究報告	
1.	変形性膝関節症による重度破壊関節に対する機能再建術の研究	6
	守屋秀繁	
2.	マウスにおける変形性関節症(OA)誘発モデルの確立	8
	中村耕三	
3.	変形性関節症軟骨の病態におけるメカニカルストレスとNOの関与について	12
	井上 一	
4.	変形性膝関節症患者の各種生活動作解析	15
	松本秀男	
5.	MR装置による膝関節軟骨のGlycosaminoglycan濃度の評価	17
	池平博夫	
6.	静水圧刺激が軟骨細胞に及ぼす効果に関する研究	19
	牛田多加志	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV.	研究成果の刊行物・別刷	23

変形性膝関節症の生活機能維持・再建に関する研究

主任研究者 守屋秀繁 千葉大学大学院医学研究院整形外科学教授

研究要旨

急速に高齢化へと移行している我が国において、大きな社会問題の一つは生活機能低下をきたす慢性運動器疾患いわゆる生活機能病の増大である。中でも変形性関節症は日本人に特に多く、その数は正確には把握されていないが、約700万人から1000万人とも推定されている。本症は主として加齢変性と軟骨組織の損傷により生じ、進行すれば歩行などの日常生活動作にも支障を来す重大な疾患である。すなわち変形性膝関節症による生活機能上の障害とは慢性の膝痛とそれによる歩行障害であり、ひいては歩行不能による車いす生活を余儀なくされることである。その社会的損失は今後の高齢化の進行に伴い益々増大していくものと考えられる。従って変形性膝関節症の原因究明、早期診断、早期診断に基づく機能障害の予防、さらには著しい機能障害に陥ってしまった患者に対する機能回復術の確立は今後さらに重要な意義を持つものであり、従来行われてきた治療法の再検証を行うと共に、新たな機能再建術として、軟骨再生、関節鏡視下手術、人工関節置換術について研究する。

分担研究者

池平博夫

中村耕三

放射線医学研究所画像医学部

東京大学大学院医学系研究科

分子情報研究室室長

外科学専攻感覚運動機能医学講座

牛田多加志

整形外科学教授

東京大学大学院工学系研究科

井上 一

機械工学専攻

岡山大学大学院医歯学総合研究科

再生医工学研究室助教授

機能再生・再建科学専攻

生体機能再生・再建学講座教授

松本秀男

慶應義塾大学医学部整形外科助教授

A. 研究目的

変形性膝関節症の病因としては遺伝的素因を含めて多くの因子が考えられているが、いずれにしても軟骨基質の変性が一次的な原因と考えられる。これには加齢に伴うコラーゲンなど軟骨基質の組成変化に加えて機械的ストレスの蓄積などが素因となるものと考えられる。初期には、主として軟骨の色調の変化や fibrillation などの微弱な変性像を呈するにとどまり、正確な早期診断のなされぬまま最終的には軟骨基質の消失と骨の変形へと進行していく。従って本研究の目的は、1) 変形性膝関節症の分子生物学的・遺伝子学的背景を究明し、2) 関節軟骨のアポトーシスの研究をふくめ、変形性膝関節症の発症メカニズム（メカニカルストレスとの関連等）を解明し、3) 変形性膝関節症発症のバイオメカニクスの要因を解明することにより、我が国における変形性膝関節症発症の原因を明確にし、4) 変形性膝関節症の非侵襲的、かつ質的な早期診断法を開発することによりの確な病期診断と初期治療を可能とすることであり、さらに5) 軟骨損傷に対する再生医学の基礎検討より応用を図り、6) 重症変形性膝関節症による重度破壊関節に対する機能再建術の研究により医療経済上の損失を最小限に食い止め、高齢化社会における国民福祉の向上を目指すものである。

B. 研究方法

1) 変形性膝関節症の原因究明

①遺伝子学的素因の解明…軟骨代謝や内軟骨骨性骨化関連分子のノックアウトマウスを用いて、人工的に変形性関節症モデルを複製し、それに基づき変形性関節症における

遺伝学的背景の検討を行う。②メカニカルストレスとの関連の解明…培養軟骨細胞に対するメカニカルストレス負荷後の遺伝子発現について、マイクロアレイ法による解析を行い、一酸化窒素 (NO) の発現に関与するとされる種々の因子の検討を行なう。

③バイオメカニクスの要因の解明…正常人、高齢者、人工膝関節置換術後の患者を対象に正座等の日本人特有の生活動作を、三次元動作解析装置、表面筋電図を用いて解析・究明し、人工関節開発の一助ともする。

2) 変形性膝関節症の早期診断法の確立

①MRI を用いた組織内成分分析法の臨床実用化に関する研究…MRI を用いて、組織内成分分析法による関節軟骨を中心とした病期診断の臨床実用化をめざす。②多核種 NMR による人体内代謝機能診断法の開発に関する研究…水素以外の多くの原子核の情報を捉えることのできる核磁気共鳴法を用いて、変形性膝関節症における、さまざまな原子核を含む生体活性分子の代謝情報を得ることによる診断法の確立をめざす。

3) 変形性膝関節症の治療の確立

①損傷軟骨に対する再生医学…損傷、破壊された関節軟骨に対する、骨、軟骨の分化・誘導の確立を目指す。静水圧刺激に対する関節軟骨細胞の応答のメカニズムにどのようなシグナル伝達経路が関与するかを探り、さらに臨床への応用を図る。②慢性関節リウマチおよび変形性膝関節症による重度破壊関節に対する機能再建術の確立…従来行なわれてきた治療法の再検証を行なうと共に、軟骨再生、関節鏡視下手術、骨切り術、人工関節置換術に関してのさらなる研究、新たな手術法の確立も試みる。

(倫理面への配慮)

尚、本研究において提供された生体試料及び実験動物を研究に使用する部分の倫理面には十分に配慮する。すなわち、採血等、生体試料を用いた実験及び実験動物を用いた実験は、すべてそれぞれの研究班の所属する機関の倫理委員会等で承認され、患者の同意を得ることを前提としている。また、ヒトゲノム・遺伝子解析研究にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、被験者の人権を保護する目的から説明文と同意書を文書の形で残し、説明文の中に DNA 研究もしくは遺伝子研究という文書を含むものとする。

C. 研究結果および考察

1) 変形性膝関節症の原因究明

中村らは膝関節の靭帯と半月板の切除の組み合わせを用いて、関節不安定性を加えることで、mild、moderate、severe の3つのタイプのマウス膝 OA 誘発モデル (C57BL/6、8 週令) を作成し、経時的に OA の進行過程を解析した。初期では後方の関節腔は狭小化し、増殖した軟骨細胞の一部は肥大化細胞様の所見を呈し、MMP-13 の発現が強力に誘導されていた。特徴的なことに MMP-13 の発現の時期が成長軟骨と異なり石灰化の直前であり、OA 変化における関節軟骨細胞の特異的な肥大分化反応の存在を明らかにした。今後はさらに OA 変化に関与していると思われる数種類の分子のノックアウトマウスそれぞれに対して、同モデルを作成し検討する予定である。

井上らは変形性膝関節症の病態に関わる

メカニカルストレスおよび低酸素が軟骨細胞に及ぼす影響を検討した。まずラット培養軟骨細胞を用いて、伸長ストレス負荷前後の遺伝子発現について、cDNA マイクロアレイ法による解析をおこない、軟骨細胞にアポトーシスを誘導する一酸化窒素 (NO) を合成する酵素である iNOS を含む 37 遺伝子の発現が有為に増強していることを確認した。そこで実際に iNOS の発現が、ストレス負荷後により亢進し、さらに種々の濃度で IL-4 を培養液中に加えることにより減弱することをリアルタイム PCR にて確認した。また軟骨細胞様細胞を用いた低酸素下での検討で、iNOS の発現が 12 時間で亢進すること等を確認し、変形性関節症の病態におけるメカニカルストレスおよび低酸素といったストレスに対する軟骨細胞の応答が、NO を介して誘導されることを示した。今後さらに IL-4 などのサイトカイン、NOS 阻害剤等の OA 治療への可能性をさらに検討していく予定である。

松本らは動作解析装置を用いて、これまでに人工関節置換術をおこなった変形性膝関節症患者 7 例 (術前 2 例、術後 5 例) および健常者 11 例について、日常生活動作中の膝関節負荷を計測した。変形性膝関節症患者では膝屈曲モーメントが平地歩行より、階段昇降、深屈曲動作中で大きいこと、健常者より階段降下および深屈曲で膝屈曲モーメントが小さく、全ての動作で膝外反モーメントが大きいことを示した。これらより大腿四頭筋機能の低下、内反ストレスの増加が患者に特徴的な膝負荷である可能性

が考えられた。また人工関節置換術後における深屈曲動作で膝モーメントの増大を認め、大腿四頭筋筋力の改善によるものが示唆されたが、深屈曲角度の不足もあり人工関節の機能の判断にはさらなる検討を要する思われた。

2) 変形性関節症の早期診断法の確立

池平らは関節軟骨の質的評価を非侵襲的におこなうため、軟骨基質を構成する分子の一つであるグリコサミノグリカン (GAG) 濃度の測定を MRI を用いておこなう方法を検討した。Gd-DTPA²を経静脈投与し、関節軟骨に浸透するまで約2時間待機させた後、Philips 社製 Gyroscan interna 1.5T を使用し、Inversion Recovery 法を用いて、T1 強調像を撮像する。健常軟骨および変性軟骨の T1 値の比較により、関節軟骨の GAG 濃度の評価をおこなう。今後ボランティアにおいて、臨床 MRI 装置による関節軟骨の評価に最適な方法をさらに検討していく。

3) 変形性膝関節症の治療法の確立

牛田らは静水圧負荷が軟骨細胞にどのようなシグナル伝達を生ずるかを探ることにより、静水圧刺激の軟骨細胞に及ぼす効果を検証した。生後一ヶ月の子牛の肘関節由来の軟骨細胞を分離、培養した後、間欠的静水圧負荷群、一定静水圧負荷群、IL-1 を添加したのみ群 (コントロール) の3群で負荷後5分、15分、30分後に細胞をサンプリングした。Western blotting 法によりリン酸化 ERK およびリン酸化 JNK を検出したところ、3群とも5分後、15分後に一過性の ERK のリン酸化が起こっていた。また間

欠的静水圧負荷群と bFGF 添加群 (コントロール) で負荷後4時間、8時間群で細胞をサンプリングし、Sox9 の発現を検討したところ、8時間群で発現が増加していた。以上より軟骨細胞の再分化への ERK のシグナル伝達系の関与が示唆された。

守屋らは通常であれば人工膝関節置換術を施行しうる程度の、屈曲拘縮を伴う重度の変形性膝関節症に対する鏡視下後内側切離術の長期的効果の検討をおこなってきた。Kellgren & Lawrence の X 線分類で grade3 および4の症例が大多数であったが、夜間痛、歩行能力を中心に症状の改善を認め、70%の症例では症状の改善が約2年という長期に渡っても続いており、重度の変形性膝関節症の治療法の一つとして十分選択されうるものと考えられた。さらなる長期での効果と適応の検討を重ねていく予定である。

久保らは変形性関節症の保存的治療法の一つとしての遺伝子治療法確立のため、ウイルスベクターを用いずに電氣的に遺伝子導入をおこなう electroporation 法、さらに線維芽細胞を介した遺伝子導入法についても検討した。electroporation 法にてラット膝関節の滑膜組織に高率に外来遺伝子導入が可能であった。また遺伝子導入線維芽細胞浮遊液の関節内投与後、同細胞の関節内生着および遺伝子産物の発現も確認できた。

E. 結論

今回の検討により、変形性膝関節症の発症、病態、およびそのメカニズムの一端が見えてきつつある。これらの検討をさらに継続・発展させ、変形性膝関節症の早期診断、進行予防、また効果的な治療の開発に

つとめていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

分担研究報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究要旨

屈曲拘縮を伴う比較的重度の変形性膝関節症にする鏡視下後内側切離術の長期的成績を検討した。

術後2年以上を経過した症例で約70%に満足すべき結果を得た。

A. 研究目的

重度の変形性膝関節症による疼痛、関節拘縮に関しては保存的治療では症状の改善が得られず、最終的に人工膝関節置換術に至ることが多い。しかし、手術侵襲、それに伴う比較的長期の治療期間など患者側が戸惑う面が存在するのは否めない。我々は1997年より、屈曲拘縮を伴う比較的重度の変形性膝関節症に対しても積極的に鏡視下後内側切離術を適応としてきた。今回は、本術式施行後2年以上経過した症例について、種々の症状の改善ならびにその経時変化について調査したので報告する。

B. 研究方法

対象は1997年より2001年10月までに鏡視下後内側切離術を受けた、屈曲拘縮を伴う比較的重度の変形性膝関節症患者のうち術後経過観察期間が2年以上の51例で、女性38例、男性13例である。手術時平均年齢は71.3歳であった。臨床成績の評価には日整会膝治療成績判定基準(JOAスコア)、Verbal Rating Scoreを用い、患者の満足度と夜間痛の有無などを聞き取り調査した。一部の症例においては、手術の前後1週間で

歩容を比較した。

C. 研究結果

手術時Kellgren & LawrenceのX線分類では、グレードⅢが32%、グレードⅣが66%と、進行した変形性膝関節症が大多数であった。JOAスコアは術前平均56.3点が術後平均71.6点に改善していた。特に歩行に関しては43%、階段昇降で63%の改善度を示していた。術前夜間痛を訴えていた症例の80%以上が完全に消失していた。関節可動域の改善は5%、関節腫脹は30%の改善を示した。

D. 考察

手術侵襲が少ないため術翌日よりリハビリを行い、関節可動域の改善は著明ではないものの、ほとんどの症例で歩容が改善した。術後1週間以内の入院期間中に、半数以上の患者が「よく眠れるようになり、歩くのが楽になった」と答えていた。高齢の患者にとって、術後長期間のリハビリを必要とせず短時間で生活の質を向上させることは極めて有用と思われ、その成績は2年以上持続していた。従来変形性膝関節症

に対する鏡視下手術は、症状の主因が変性半月板断裂にある場合以外は効果が一時的なものと考えられてきた。しかしながら、たとえ屈曲拘縮を伴う変形性膝関節症であっても、鏡視下にデブリードマンに加えて鏡視下後内側切離術を行えば70%の症例に術後2年以上の満足すべき結果が得られた。

E. 結論

比較的重度の変形性膝関節症に対して鏡視下後内側切離術を施行したところ、術後2年以上を経過した症例で約70%に満足すべき結果を得た。今後さらに適応および長期の成績を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

初年度であり、未発表。

2. 学会発表

1) 守屋秀繁

第46回日本リウマチ学会総会・学術集会
ランチョンセミナー1

『変形性膝関節症に対する鏡視下手術の
適応と術式』2002年4月22日

2) 守屋秀繁

第15回日本顎関節学会学術大会

『関節疾患の臨床における関節鏡視下手
術の役割』2002年6月27日

3) 和田佑一 佐粧孝久 佐野栄 守屋秀繁

第75回日本整形外科学会学術集会 ワ

ークショップ 変形性膝関節症に対する
鏡視下手術の意義

『重度の変形性膝関節症に対する鏡視下
手術の意義』2002年5月19日

4) 守屋秀繁

第51回 東日本整形災害外科学会 パ
ネルディスカッション変形性膝関節症に
対する鏡視下手術と保存療法

『変形性膝関節症に対する鏡視下後内側
解離術』2002年10月24日

5) 和田佑一 佐粧孝久 守屋秀繁

第28回日本膝関節学会 高度内反膝に
対する鏡視下後内側切離術 2003年3月
21日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

マウスにおける変形性関節症(OA)誘発モデルの確立に関する研究

分担研究者 中村耕三 東京大学大学院医学系研究科外科学専攻
感覚運動機能医学講座整形外科学教授

研究要旨

変形性関節症(OA)の分子レベルでの病因を解明する目的で、ノックアウトなどの遺伝子操作が容易であるマウスにおいて OA 誘発モデルの作製を試みた。顕微鏡下手術で各靭帯や半月板の切除を組み合わせることによって、重症度の異なる3種類の OA 誘発モデルの作製に成功した。本年度はこのマウスを組織学的に観察することにより、OA 変化の背景にはメカニカルストレスに対する関節軟骨細胞の特異的な肥大分化反応の存在が明らかとなり、この変化に MMP-13 が関与している可能性が示された。

A. 研究目的

変形性関節症(OA)は高齢者の QOL を低下させている主要な要因のひとつであり、その患者数は積極的な治療を必要とする者だけで全国に約 700 万人、軽症例を含めると 1000 万人を越えることが昨年の推計で明らかになっている。本疾患の病因については、メカニカルストレスの蓄積により軟骨変性と関節の変形が進行することは明らかであるが、その細胞・分子レベルの背景に関しては殆ど解明されていない。この要因のひとつとして、初期病変の解析やノックアウトなどの遺伝子操作が容易であるマウスにおいて適当な OA 誘発モデルが存在しなかったことが挙げられる。今回我々は、微小外科手術手技を応用し膝関節の靭帯と半月板の切除の組み合わせによって関節不安定性を加えることで3つのタイプのマウ

ス膝 OA 誘発モデル(C57BL/6、8 週令)の作製に成功した。

B. 研究方法

マウスを全身麻酔下にて顕微鏡手術によって、膝蓋靭帯、ACL、PCL の切離と MM、LM の切除を行い、これを severe モデルとした。また、ACL のみ切離したものを mild モデル、ACL 切離と MM を切除したものを moderate モデルとした。これらのモデルを用い、不安定性の程度による、OA の進行過程を免疫染色、in situ hybridization を用いて経時的に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

この3つのモデルは、病期の進行速度は異なるものの、いずれも同様のOA所見を呈した。Severeモデルでは軟骨の変性・脱落から骨棘形成に至るOAの後期変化が術後2週以後に見られた。一方 mildモデルは術後6週まで軟骨細胞の増殖・肥大化などの初期変化を詳細に観察出来た。また moderateモデルでは術後2週までは初期変化を、それ以降は後期変化が観察できた。本モデルを用い、OAの進行過程を免疫染色、in situ hybridization を用いて経時的に解析した。本モデルの初期像では後方の関節腔が狭小化してストレスが集中しており、局所の軟骨細胞は不規則な配列を示しながら増殖していた。増殖した細胞の一部は type X collagen を発現する肥大化細胞様の所見を呈し、同時に MMP-13 が他の MMP-2,3,9,14 に比べ強力に誘導されていた。一方、成長板では MMP-2,9,13 が発現・局在し、特に MMP-13 は肥大軟骨細胞において type X collagen よりも遅れて石灰化する直前に発現・局在していた。以上より OA 関節軟骨では成長軟骨と類似した分化像が見られるが、増殖と分化の時系列が不規則となっており、さらに局所における MMP-13 の発現調節機構が異なることが明らかとなった。

D. 考察

今回の検討から、OA 変化の背景にはメカニカルストレスに対する関節軟骨細胞の特異的な肥大分化反応の存在が明らかとなり、この変化に MMP-13 が関与している可能性が示された。今後は、この MMP-13 など分子レベルでの関与が疑われる数種類の分子のノックアウトマウスの膝関節

に、この3タイプのモデルを作成してそのOA病変の進行について経時的に検討する予定である。

E. 結論

重症度の異なる3種類のOA誘発モデルの作製に成功した。OA変化の背景には関節軟骨細胞の特異的な肥大分化反応の存在が明らかとなり、この変化に MMP-13 が関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, Kawano K, Koshizuka Y, Hosoi T, Nakamura K, Kuro-o M, and Kawaguchi H: Association of *klotho* gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women. *Bone* 31: 37-42, 2002.
- 2) Akune T, Ogata N, Hoshi K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Takagi H, Azuma Y, Kadowaki T, Nakamura K, and Kawaguchi H: Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts. *J Cell Biol* 159: 147-156, 2002.
- 3) Shimoaka T, Ogasawara T, Yonamine A, Chikazu D, Kawano H, Nakamura K, Itoh N, and Kawaguchi H: Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J*

Biol Chem 277: 7493-7500, 2002.

- 4) Ikeda T, Junsei Z, Chano T, Mabuchi A, Fukuda A, Kawaguchi H, Nakamura K, and Ikegawa S: Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-Sox5) gene. *Gene* 298: 59-68, 2002.
2. 学会発表
- 1) 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、川口浩、金野智浩、松下富春、中村耕三: 生体膜類似構造を持つ MPC の人工関節への応用に関する検討 - MPC ポリマーはポリエチレンライナーの摩耗を低減する -. 第 75 回日本整形外科学会学術集会. 2002. 5. 16-19 (岡山コンベンションセンター、岡山)
- 2) 川口浩: FGF-2 : 骨代謝疾患への関与と骨軟骨再生医療への応用. 第 20 回日本骨代謝学会 (ランチョンセミナー). 2002. 7.25-27 (岡山コンベンションセンター、岡山).
- 3) 茂呂徹、小笠原徹、下赤隆、筑田博隆、亀倉暁、中村耕三、岡山博人、川口浩: 軟骨細胞の分化において p38 MAPK シグナルの下流に細胞周期関連分子 CDK6 の発現抑制が存在する (優秀演題賞受賞). 第 20 回日本骨代謝学会. 2002. 7.25-27 (岡山コンベンションセンター、岡山).
- 4) 山田高嗣、河野博隆、福田亨、吉村公宏、中村貴、佐藤隆史、栗飯原賢一、中道裕子、山本陽子、渡辺資之、亀倉暁、腰塚裕、池川志郎、川口浩、加藤茂明: Cystatin 10 遺伝子欠損マウスは成長板近傍の海面骨形成の抑制を示す (優秀演題賞受賞). 第 20 回日本骨代謝学会. 2002. 7.25-27 (岡山コンベンションセンター、岡山).
- 5) 川口浩、鄭雄一、筑田博隆、山田高嗣、腰塚裕、中村耕三: 骨・関節再生への分子生物学的アプローチ. 第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会 (シンポジウム: 骨関節疾患と再生医学). 2002. 10.11-12 (青森市文化会館・ホテル青森、青森).
- 6) 山田高嗣、川口浩、河野博隆、亀倉暁、腰塚裕、池川志郎、中村耕三、加藤茂明: Cystatin 10 遺伝子欠損マウスの作出と骨軟骨組織の解析. 第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2002. 10.11-12 (青森市文化会館・ホテル青森、青森).
- 7) 筑田博隆、星和人、鄭雄一、中村耕三、米田嘉重郎、川口浩: 小人症モデルラット MRI の原因遺伝子 cGMP-dependent protein kinase 2 (cGK2) による軟骨細胞の増殖・分化のカップリングの制御. 第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2002. 10.11-12 (青森市文化会館・ホテル青森、青森).
- 8) 茂呂徹、小笠原徹、下赤隆、筑田博隆、亀倉暁、中村耕三、川口浩: 軟骨細胞の分化は細胞周期関連分子 CDK6 の発現抑制を介する. 第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2002. 10.11-12 (青森市文化会館・ホテル青森、青森).
- 9) 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、丸山典夫、黒田大介、埴隆夫、松下富春: MPC ポリマー処理の摩耗特性に対する影響 - 人工関節への応用に関する検討 -. 第 24 回バイオマテリアル学会. 2002. 11. 29-30 (東京)
- 10) 川口浩: 変形性関節症病態解明への新

たな視点. 厚生労働省厚生科学研究公開シンポジウム. 2003. 1. 28 (全社協・灘尾ホール、東京)

- 11) 筑田博隆、星和人、下赤隆、阿久根徹、河野博隆、川野健一、中村耕三、鄭雄一、米田嘉重郎、川口浩: 小人症モデルラット MRI の原因遺伝子 cGMP-dependent protein kinase 2 (cGK2) による軟骨細胞の増殖・分化のカップリング機構. 第16回日本軟骨代謝学会. 2003. 3.7-8 (岡山コンベンションセンター、岡山).
- 12) 下赤隆、小笠原徹、与那嶺享子、伊藤信行、近津大地、河野博隆、中村耕三、川口浩: Fibroblast growth factor (FGF)-18 の軟骨代謝調節作用 - FGF-2 および FGF-10 との比較 -. 第16回日本軟骨代謝学会. 2003. 3.7-8 (岡山コンベンションセンター、岡山).
- 13) 茂呂徹、小笠原徹、下赤隆、筑田博隆、亀倉暁、中村耕三、岡山博人、川口浩: 細胞周期関連分子 CDK6 による軟骨細胞分化調節機構 - p38 MAPK シグナルの下流に CDK6 の発現抑制が存在する -. 第16回日本軟骨代謝学会. 2003. 3.7-8 (岡山コンベンションセンター、岡山).
- 14) Toru Moro, Toru Ogasawara, Takashi Shimoaka, Hirotaka Chikuda, Satoshi Kamekura, Kozo Nakamura, Hitoro Okayama, and Hiroshi Kawaguchi: Chondrocyte differentiation is mediated by inhibition of cyclin-dependent kinase 6 expression as a downstream effector of p38 MAPK pathway. 24th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral

Research. 2002. 9.20 – 24 (San Antonio, Texas, USA).

- 15) Hirotaka Chikuda, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Toru Akune, Hirotaka Kawano, Ken-ichi Kawano, Kozo Nakamura, Ung-il Chung, Kajuro Komeda, and Hiroshi Kawaguchi: Mutation in cGMP-dependent protein kinase 2 causes dwarfism in a novel rat mutant, MRI, through uncoupling of proliferation and differentiation of chondrocytes (Young Investigator Award). 24th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2002. 9.20 – 24 (San Antonio, Texas, USA).

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

変形性関節症軟骨の病態におけるメカニカルストレスと NO の関与についての研究

分担研究者 井上 一 岡山大学大学院医歯学総合研究科

機能再生・再建科学専攻生体機能再生・再建学講座教授

研究要旨

ラット培養軟骨細胞にメカニカルストレスを負荷し、その前後で変化する遺伝子群を cDNA マイクロアレイ法で検討した。また軟骨保護的に作用するサイトカインである IL-4 の影響を調べた。IL-4 は用量依存性に過剰なメカニカルストレスによって誘導される Cathepsin B および iNOS の発現を抑制した。また、ラット膝関節において内側側副靭帯及び前十字靭帯を切離することで OA モデルを確立し、OA 病態における Cathepsin B および iNOS の発現を確認した。

A. 研究目的

我々はこれまで、軟骨細胞は細胞膜上の $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介してメカニカルストレスに反応し、一酸化窒素 (NO) 合成酵素 iNOS および eNOS の発現が亢進すること、種々の程度の IL-4 や NO を産生すること、さらに NO はカスパーゼの発現を介して、軟骨細胞にアポトーシスを誘導し、変形性関節症 (OA) おける軟骨破壊の一因となっていることを報告した。本研究では、変形性関節症 (OA) 病態に密接な関係のあるメカニカルストレス、あるいは低酸素が軟骨細胞に及ぼす影響を検討し、これらをターゲットとした新治療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

本研究に使用した実験動物は岡山大学医学部動物実験施設において SPF コンディシ

ョン下に哺育され、屠殺時はすべてエーテルあるいは Pentobarbital 麻酔下に無痛下に安楽死させた。

1. ラット軟骨細胞を用いた in vitro 実験：
生後 7 日のウイスターラット膝より、エーテル麻酔下に軟骨細胞を採取し、5 日間培養後、36 時間 Rat rhIL-4 (10 ng/ml) で前処置した。この培養軟骨細胞に対し、Flexercell 2000 を用いた伸長ストレス (0.5 Hz, 7%伸張) をかけ、負荷後の遺伝子発現について、cDNA マイクロアレイ法による解析を行った。次に同様の前処置を行った軟骨細胞に 0, 1, 10 ng/ml の Rat rhIL-4 存在下にメカニカルストレスをかけ、IL-4 添加により、遺伝子発現がいかなる影響を受けるかを検討した。結果の一部は半定量 RT-PCR および real-time PCR 法で確認した。

2. ラット OA モデルの作成：

Pentobarbital およびエーテル麻酔下に体

重 200g のオスウイスターラットの右膝関節を無菌的に切開、内側側副靭帯 (MCL) 及び前十字靭帯 (ACL) を切離して不安定性を惹起し、OA 膝関節モデルを作成した (OA 群)。対照として左膝関節は関節包までの切開のみとし、靭帯には処置を施さなかった (Sham 群)。術後 2 週、4 週、6 週でエーテル麻酔下に安楽死させ、膝関節を採取、肉眼的観察後、パラフォルムアルデヒド固定、脱灰後、パラフィンブロックを作成した。切片はプロテオグリカン量の評価のためにサフラニン O 染色を、また Cathepsin B および組織酸化ストレスの指標として NO が組織中の蛋白のチロシン残基をニトロ化して生じるニトロチロシンに対する免疫染色を行った。

3. 軟骨肉腫細胞株 (OUMS-27) における低酸素の影響:

ヒト軟骨肉腫細胞 OUMS-27 を用い、1%O₂ の低酸素 (Hypoxia) が軟骨細胞の代謝に与える影響を HIF-1 α 、ORP-150 および iNOS、VEGF の mRNA 発現に与える影響を指標として、20%O₂ (Normoxia) 下の遺伝子発現と比較検討した。

C. 研究結果

cDNA マイクロアレイにより検討した約 1000 の遺伝子のうち、伸張ストレスによって iNOS、Cathepsin B、c-myc、TIMP-1、TGF- β 3、VCAM-1 を含む 37 遺伝子の発現が有為に増強し、IGFBP-5、MMP-3 を含む 46 遺伝子の発現が低下した。さらに IL-4 との共培養により発現が変化した遺伝子の中から、ストレスにより発現が亢進し、IL-4 添加により発現は減弱した Cathepsin B および iNOS に注目した。RT-PCR および

real-time PCR による検討の結果、iNOS mRNA はストレス負荷後 24 時間でその発現が有為に亢進すること、IL-4 添加により、用量依存性に有為に発現が減弱することが判明した。同様に Cathepsin B についても real-time PCR により IL-4 添加によりその発現が有為に低下することを確認した。

次に ACL および MCL 切離によるラット実験的 OA 膝の肉眼的観察では Sham 群では術後 4 週でも光沢に富む正常軟骨が観察されたのに比べ、OA 群では 2 週で関節軟骨表面の粗造化が、また 4 週では軟骨変性に加え、大腿骨および脛骨に骨棘形成が認められた。サフラニン染色では Sham 群では正常の細胞配列と全層性の強い染色性を認めたのに対し、OA 群では 2 週で細胞のクローニング、サフラニン O に対する染色性の軽度の低下を、4 週では細胞数の減少とサフラニン O の染色性のさらなる低下を認めた。また、Cathepsin B に対する免疫染色では、OA 変化の比較的早期に特に表層から中間層の軟骨細胞における Cathepsin B の発現が亢進すること OA 変化に伴い、ニトロチロシン陽性細胞率が增加することが明らかとなった。

一方で、軟骨細胞様細胞 (OUMS-27) を用い、低酸素が軟骨細胞に与える影響を検討中であるが、軟骨細胞は HIF-1 α 、ORP-150 といった低酸素により誘導される遺伝子を Normoxia の状態で発現しており、低酸素に順応しやすいこと、低酸素により iNOS の発現が 12 時間で亢進すること、これに引き続き血管新生因子 VEGF の発現誘導が増強することが判った。

D. 考察及び E. 結論

CathepsinB は IX 型、XI 型コラーゲンの分解に関わり、MMP の活性化、血管新生に寄与する他、IL-1 による軟骨基質からのプロテオグリカン喪失にも関与することが判っている。今回の研究結果から正常軟骨細胞において、メカニカルストレスが Cathepsin B の発現を誘導することが新たに判明した。また、同様のメカニカルストレスにより NO 合成酵素の発現も誘導されることが明らかとなった。この iNOS 誘導が IL-1 を介するものか否かは今後の検討を要する。また、こういったメカニカルストレスにより誘導される軟骨変性因子を IL-4 が用量依存性に発現抑制することも明らかとなった。また、炎症性関節では関節内酸素濃度が低下していることが示唆されているが、低酸素によっても iNOS mRNA の発現が亢進した。以上の結果は、OA 病態においてメカニカルストレス、低酸素刺激といったストレスに対する軟骨細胞の応答が NO を介して誘導されることを示唆しており、IL-4 などのサイトカインや NOS 阻害剤による新しい OA 治療の可能性を支持するものと考えられる。今後さらに今回確立したラット OA モデルにおける IL-4 の有効性の検討、IL-4 の投与量やウイルスベクターを用いた IL-4 の強制発現の効果の検討を要する。また、NOS 阻害剤が VEGF の発現、軟骨組織への血管侵入に与える抑制効果を *in vivo*、*in vitro* で検討する必要がある。

E. 結論

- 1) ラット関節軟骨細胞では過剰なメカニカルストレス負荷により、Cathepsin B、iNOS mRNA の発現亢進を認めた。

- 2) IL-4 は用量依存性に Cathepsin B、iNOS の発現を抑制した。

- 3) ACL、MCL 切離により、ラット膝関節の OA モデルを確立した。本モデルでは術後比較的早期に軟骨の OA 変化をきたし、OA の進行に伴い、Cathepsin B および NO の発現が認められた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 土井英之、西田圭一郎、清水 晃、中西 徹、滝川正春、井上 一：ラット軟骨細胞に対するメカニカルストレス後の遺伝子発現と IL-4 の影響。第 16 回日本軟骨代謝学会。
- 2) 西田圭一郎、中田英二、井上 一、清水 晃：変形性関節症の病態と軟骨細胞の変化。第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会シンポジウム。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

変形性膝関節症患者の各種生活動作解析に関する研究

分担研究者 松本 秀男 慶應義塾大学医学部整形外科助教授

研究要旨

変形性膝関節症患者を対象に 3次元動作解析装置をもちいて日常生活動作における膝負荷の計測をおこなった。患者群において健常者とことなる負荷パターン（屈曲モーメント減少、内反モーメント増加）がみられ、今後日本人に適した人工関節の開発に参考となる知見を得た。

A. 研究目的

変形性膝関節症（以下OA）は人口の高齢化により年々増加している。日本では膝を深く曲げる機会が欧米に比し多いが、これらの動作中は膝に大きなストレスが加わると予想され、生活習慣がOAの発症要因の一つであると考えられる。しかし膝の深屈曲動作中の負荷を詳細に研究しているものはない。本研究ではOA患者の日常生活動作中（歩行、深屈曲）の膝関節負荷を計測し、これらが膝にどのように影響しているかを検討する。動作中の関節負荷を評価することで、日本人に適した人工関節開発を目指し、OAの治療の一助とする。

B. 研究方法

3次元動作解析装置を用いてOA患者、手術後患者を対象に、日常生活動作中の膝関節負荷を計測する。また表面筋電図をもちいて筋活動を評価する。動作は、平地歩行、階段昇降、立ち上がり動作などとする。変形の程度や術後期間が異なる症例それぞれ5-10例および対照として健常者10-20名

について計測を行う。得られたデータを合わせて生体工学的に考察する。

（倫理面への配慮）

計測にあたり書面を用いて計測の危険性などにつき十分なインフォームドコンセントを行った。計測では針をさすなど侵襲は全くなく、倫理上問題ないと判断した。

C. 研究結果

これまでOA患者7例（術前2例、術後5例）、健常者11名について計測をおこなった。データの比較では患者群で階段降下および深屈曲で膝屈曲モーメントが小さく、また全動作で膝内反モーメント（膝に対する内反力）が大きかった。術後の患者では、人工関節側で深屈曲動作中の膝関節屈曲モーメントが大きかった。

D. 考察

OA患者の屈曲モーメントの減少は筋機能の低下を反映し、また内反モーメント減少はO脚変形と相関していると考えられる。O脚変形はわが国に多く特徴的な負荷である

可能性がある。今後症例を増やし、人工関節でより深い屈曲を獲得するために必要な因子を検討する予定である。また計測の妥当性を評価するための生体力学的実験を行うため試験機作成を行っている。

E. 結論

OA患者では特徴的な膝負荷パターンがみられることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 名倉武雄ほか、深屈曲動作におけるPCLの重要性。膝, Vol 27, p87-89, 2003.
名倉武雄ほか、深屈曲動作におけるPCLの負荷 - 拮抗筋の影響。日本臨床バイオメカニクス学会誌、in press, 2003.

2. 学会発表

- 1) Nagura T et al. Muscle co-contraction increases the load on the PCL during deep knee flexion. ORS, Feb 2003.
名倉武雄ほか、変形性膝関節症患者の動作解析、日常生活動作における膝負荷の特徴。第28回日本膝関節学会、2003年3月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

今のところ予定なし。

MR装置による膝関節軟骨の Glycosaminoglycan 濃度の評価

分担研究者 池平 博夫 放射線医学研究所画像医学部

分子情報研究室室長

研究要旨

MR装置による膝関節軟骨の Glycosaminoglycan 濃度の評価を、Gd-DTPA を用いて開始した。本方法では関節軟骨の傷害の程度を定量的に表示することが可能で、画像化も試みている。

A. 研究目的

関節軟骨の機能は、軟骨組織内の Glycosaminoglycan (GAG) など基質構成高分子の濃度に大きく依存するが、従来この測定は、組織生検による組織検査により行われており、侵襲的であることに加え評価が採取した一部の組織しか行えず、組織全体を評価することは困難であった。今回、contrast agent として Gd-DTPA²を用いて MRI 撮影を行うより、関節軟骨中の GAG 濃度を非侵襲的に評価する方法の確立を目指す。

B. 研究方法

検査法は、Gd-DTPA²を経静脈投与し、関節軟骨に浸透するまで約2時間程度待機させた後、放医研所属の MRI 装置である、Philips 社製 Gyroscan interna1.5T を使用し、Inversion Recovery 法にて T1 強調像を撮像する。得られた画像から T1 計算画像を作成し、健常軟骨の T1 値と変性軟骨の T1 値を比較することにより関節軟骨の GAG 濃度を評価する。

(倫理面への配慮)

放射線医学総合研究所の倫理審査委員会において、厳正な倫理審査を経て検査を行い、インフォームドコンセントおよび被験者の承諾を得ている。

C. 研究結果

ボランティアに於いて MRI 撮影を行い、臨床 MRI 装置による関節軟骨の評価に最適な方法の開発を行っていく。

D. 考察

現在まで関節軟骨の MRI 評価の対象は主に形態的評価であり、質的評価を行うことは困難と考えられていた。今回用いた方法では、関節軟骨中のグリコサミノグリカン濃度を評価することが可能であり、この結果は関節軟骨の機能に強い相関を示すものと考えられる。

E. 結論

本評価法は、変形性関節症症例に対する早期診断や治療法の選択、治療効果の判定

等に於いて、極めて有用な手段となりうるものと考えられた。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

初年度であり未発表。

H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度から、関節軟骨の傷害度を定量的に画像として表示する、ソフトウェアの開発を開始した。今年度は、アルゴリズムの検討と、システムの検討を行った。

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し