

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 守屋 秀繁

平成17(2005)年 4月

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 守屋 秀繁

平成17(2005)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
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 守屋 秀繁	5
2. マウスゲノミクスを用いた変形性関節症の分子メカニズムの解明 －Runx2 の関与－ 中村 耕三	8
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 西田 圭一郎	16
4. 変形性膝関節症患者の各種生活動作解析 松本 秀男	21
5. MR装置による膝関節軟骨の Glycosaminoglycan 濃度の評価 池平 博夫	24
6. 静水圧刺激が軟骨細胞に及ぼす効果に関する研究 牛田 多加志	26
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

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）
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

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。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、新しい治療法としての軟骨再生、関節鏡視下手術、人工関節置換術に関しても研究をおこなう。

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

西田 圭一郎

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
講座助教授

松本秀男

慶応義塾大学医学部整形外科助教授

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

牛田多加志

東京大学大学院医学系研究科附属
疾患生命工学センター
医療材料・機器工学部門教授

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棘形成など骨の変形へと進行していく。従って本研究の目的は、1) 変形性膝関節症の遺伝分子生物学的背景、2) 変形性膝関節症の発症における生化学的要因、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的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) 骨・軟骨再生医学の基礎検討より臨床応用を図り、6) 重症変形性膝関節症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。

A. 研究目的

変形性膝関節症の病因としては遺伝的素因、環境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

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…現在までの検討で、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4つのタイプのマウス膝OA誘発モデルの作製に成功した。更に、このマウス膝関節OAの進行を、軟骨破壊および骨棘形成それぞれにgradingするシステムを樹立した。現在、このモデルを候補遺伝子の遺伝子改変マウスに応用することによって、OAの発症における各遺伝子の関与を検討することを目指している。昨年度の検討で、新規遺伝子であるcystatin 10が、骨棘の形成に関与していることを、ホモ欠損マウスに上記OA負荷を与えることによって解明した。本年度は、更に初期の変化である軟骨の変性・破壊に関与する分子の同定を試みた。

②メカニカルストレスと一酸化窒素(NO)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、NOの発現に関与するとされるiNOSなどの種々の因子の検討を行ってきた。本年度は、マイクロアレイで得られた結果をRT-PCRを用いて検証すること、さらにOAモデルにおけるIL-4の効果を投与量を変えて検討すること、モデル動物より得られた軟骨サンプルにおいて上記PCRの結果が再現されているか、について組織学および免疫組織学的に検討した。またメカニカルストレスに加えて、重要な酸化ストレスの指標で、NOと密接な関係のある因子としてH₂O₂の発現についても*in vivo*, *in vitro*での検討を加えた。

③バイオメカニクスの要因の解明…変形性膝関節症患者の日常生活動作中の膝関節負荷を計測することにより、病態の把握や治療効果について検討する。具体的には、歩行や床からの立ち上がり動作における膝関節の力学的負荷、筋活動の評価を行う。また、動作中に膝関節を含む下肢のアライメントがどのように変化するかを解析する。さらにこれらのデータを下、器具による治療効果を生体工学的に考察する。加えて変形性膝関節症に対して施行した人工関節置換術により、日常生活動作における関節負荷がどのように変化するかを検討する。

2) 変形性膝関節症の早期診断法の確立
MRI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。関節軟骨の基質構成高分子であるGlycosaminoglycan (GAG)は陰性荷電しており、正常軟骨では陰性荷電量が大きい、軟骨

変性に伴い減少する。陰イオン性造影材であるGd-DTPA²⁻を経静脈投与し、関節軟骨に浸透するまで待機させた後、1.5Tの臨床MRI装置を使用し、T1強調像を撮像する。健康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。また実際の組織のGAG濃度との比較により本法の有用性を客観的に検討する。

3) 変形性膝関節症の治療の確立

①軟骨損傷、破壊に対する再生医学…昨年度は種々の静水圧刺激に対する関節軟骨細胞の応答のメカニズムへの細胞内外のCa²⁺の関与を報告した。本年度は酸素分圧、二酸化炭素分圧、圧力、周波数、負荷時間等のパラメータを用いて軟骨再構築のための効果を網羅的に探るため静水圧負荷時の循環水から培養液を隔離することにより、培養液の十分なガス交換を有し、さらに前述のパラメータを網羅的にコントロールできる長期静水圧負荷培養システムを構築し、さらに、このシステムを用いて、ウシ初代軟骨細胞を、間欠的な静水圧の周波数を変化させながら負荷培養し、その遺伝子の発現量の変化を調べることにより、間欠的静水圧の周波数変化が軟骨細胞の分化機能に及ぼす効果について検証を行った。

②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に関する研究…前年度までに、比較的軽度の内側型変形性膝関節症に対する治療として関節鏡視下デブリードマンに加え、骨膜剥離鉗子などで脛骨から内側の関節包を剥離する鏡視下後内側解離術(PMR)について検討し、術後2年以上の長期経過例の70%で満足する結果を得たことを報告した。しかし一方で、疼痛が軽減せず、その後人工関節置換術に移行した症例が50例中6例、12%存在している。そこで昨年度は単純X線分類、また自己記入式の症状評価法であるJapan Knee Osteoarthritis Measure (JKOM)を用いた手術適応の確立を進めた。今年度はさらに、症状重症度をさらに詳細に把握し、PMRの手術適応をより明確にするために、MRIを用いて画像学的に検討することを目的とした。

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. D. 研究結果および考察

1) 変形性膝関節症の原因究明

① 遺伝分子生物学的素因の解明

マウスモデルOA関節軟骨の初期にCOL10陽性の病的肥大軟骨細胞の出現と、MMP-13の発現による軟骨基質の分解が見られた。そこで、その背景分子の候補としてCOL10およびMMP-13の共通の上流転写因子として知られているRunx2 (Cbfa1)に注目した。Runx2ホモ欠損マウスは軟骨の肥大化障害による骨化不全のために胎生致死となるため、Runx2ヘテロ欠損マウス (Runx2^{+/-}) に上記OA誘発モデルを作製した。生理的条件下ではRunx2^{+/-}マウスは既知の通り鎖骨頭蓋異形成を示したが、関節軟骨は正常であった。また、成長軟骨も正常で成長障害も見られなかった。OAモデルを作成したところ、WTの関節軟骨では、術後4週よりsafranin-0染色性の低下と表層・中層の破壊が観察され、12週では破壊が深層 (tidemarkの下) にまで達していた。また8週から脛骨内側縁に骨棘形成が観察された。一方、Runx2^{+/-}では術後12週においても染色性の低下は軽度で軟骨破壊は表層内に止まっており、骨棘形成は見られなかった。COL10とMMP-13の免疫染色を行ったところ、WTでは表層・中層での軟骨細胞の病的肥大分化に伴って両者の発現が術後4週から見られたが、Runx2^{+/-}では肥大分化は殆ど見られず、COL10の発現のみならずMMP-13の発現も著明に抑制されていた。(中村ら)

② メカニカルストレスとの関連の解明

ラット培養軟骨細胞に対するメカニカルストレスは、本条件下ではaggrecan, Type II コラーゲン, MMP-3の発現に影響を与えなかった。Cathepsin Lの発現は負荷前後で認めなかった。一方、MMP-1, -13およびCathepsin B, Dの発現はメカニカルストレス負荷24時間後に有意に亢進し、rhIL-4 (10 ng/ml) によって強く抑制された。

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、6週では特に脛骨内側顆部に強い軟骨破壊を認めた。一方でIL-4投与群では軟骨の粗造化、破壊は各週において抑制されていた。

組織学的検討を大腿骨遠位内側顆部の荷重部で行ったところ、safranin-0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週から6週にかけて修正Mankin score 0-14にいたる種々の程度の組織学的進行度を呈していた。一方IL-4の関節内投与により治療群では2週で表層のみのsafranin-0に対する染色性の低下、4週で軟骨細胞の軽度増殖、6週で中間層に至るsafranin-0の染色性低下を認めたが、強い軟骨破壊には至らなかった。修正Mankinスコアは2, 4, 6週において10 ng/kg/day投与群, 50 ng/kg/day投与群, 100 ng/kg/day投与群ともに未治療群に比し、有意に軟骨破壊が抑制されていた。一方、個々の治療群間において軟骨破壊の抑制程度に差はみられなかった。

免疫染色ではOA変化に伴い、ニトロチロシン陽性細胞率は増加した。一方でCathepsin Bの発現は関節炎惹起後早期に上昇し、進行すると低下する傾向にあった。このCathepsin Bの発現は*in vitro*同様、IL-4の関節内投与により有意に抑制された。酸化ストレスの指標の一つとしてのHO-1は進行期に強く、早期、末期の軟骨組織では発現が低下していた。

(西田ら)

③ バイオメカニクスの要因の解明

Kellegren-Lawrence分類でgrade3以上の歩行可能な内側型変形性膝関節症患者26名52膝 (うち14膝は人工膝関節置換術後) および健常者として60歳以上の8名16膝を対象とした。4台の特殊カメラおよび床反力計からなる3次元動作解析装置 (Qualysis) を用いて10m平地歩行、および最大屈曲からの片脚起立動作を計測した。被験者の下肢に合計6つの表面マーカーを添付し、マーカーの3次元位置および動作中の床反力を120Hzで計測した。膝関節の負荷算出にはInverse Dynamics法を用い、データを被験者の体重および身長で標準化し、比較検討した。動作中の大腿四頭筋モーメント、膝関節内反モーメントおよび下肢内反角を患

者群と健常群で比較した。また患者群において、裸足、外側楔状型足底挿板および足関節固定バンドつき外側楔状型足底挿板の3種類における膝関節内反モーメントの変化を検討した。手術による影響の検討では、片側にのみ人工関節を施行した患者群で手術側と非手術側の動作中の大腿四頭筋モーメントおよび膝関節内反モーメントを比較した。

動作中の大腿四頭筋モーメントは、立ち上がり動作において患者群での大腿四頭筋モーメントの低下が明らかであった。また膝関節内反モーメントは、歩行中に2群間の差が大きく、患者群において増大していた。また関節負荷の差は、より重度の変形性膝関節症において顕著であった。歩行中の内反角の変化は、やはり変形が重度になるほど大きい結果を示した。足底挿板使用による影響の検討では、裸足に比べ外側楔状型足底挿板および足関節固定バンドつき外側楔状型足底挿板の使用により歩行中の膝関節内反モーメントがそれぞれ減少した。

人工膝関節による検討では、立ち上がり動作における大腿四頭筋モーメントが手術側で増大していた。一方、歩行中の膝関節内反モーメントは、手術側において減少していた。このことから、手術により筋活動や荷重状態が改善することが定量的に示された。

(松本ら)

2) 変形性関節症の早期診断法の確立

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。63症例に対し評価を行なった。造影前のR1 (=1/T1) 値と造影後のR1値の差を用いて求めた、軟骨組織内の浸透した造影剤濃度と、実際の軟骨組織におけるGAG濃度に相関関係を認めた。またこの方法によりレントゲンや従来のMRI撮像により異常を捉えられない膝蓋大腿関節障害の症例の早期の軟骨変性を捉えることに成功した。(池平ら)

3) 変形性膝関節症の治療法の確立

①軟骨損傷、破壊に対する再生医学

ウシ正常膝関節軟骨から軟骨細胞を、0.2%コラゲナーゼ溶液を用いて抽出し、10%のウシ胎児血清を含むF12培地を用いて混合し、細胞懸濁液を調製した。さらに、培養dishに 2×10^6 cells/9.6cm²の密度で播種し、12時間静置

した後、1バッグに2枚のdishを封入し、バッグ内を20mlの培地で満たした。さらにバッグをステンレスカラム(φ50, L300)に入れ、カラム内をRO水で満たした。1/2, 1/10, 1/60, 1/600Hz, 5MPaの静水圧を1日に4時間負荷し、このパターンをくり返ししながら4日間培養した。細胞を播種したdishを封入したバッグを静水圧負荷なしにインキュベーター内で培養したものをコントロールとした。培養後、軟骨細胞よりRNAを抽出した後、GAPDH, aggrecan, type I collagen, type II collagen, type X collagenのm-RNAの発現量をRT-PCR法を用いて検出し、解析をおこなった。得られたPCRのバンドをNIH Imageにて半定量的に解析した。水を循環させエアアクチュエーター弁の開閉により、耐圧カラム内に高圧を実現した。さらにパソコンにより周期[ms], 負荷時間[ms], 圧力[MPa]を制御可能とした。また、細胞を播種したdishを、ガス透過性の高いポリオレフィン製血液バッグに封入し、バッグ内を培地で充填して実験に供した。バッグ内細胞環境のガス分圧はインキュベーター内のそれと一致させることができること、良好なガス透過性を有することを確認した。負荷パターンも任意の波形の実現を確認した。RO水を循環させエアアクチュエーター弁を開閉することにより、耐圧カラム内に5MPaの静水圧を実現することができた。さらに周波数(周期[ms]), 負荷時間[ms], 圧力[MPa]を制御できるようにした。またコンタミリスクを軽減し、培地を交換しながら長期で培養できるよう、細胞を播種したdishを、ガス透過性の高いポリオレフィン製血液バッグに封入し、バッグ内を培地で充填して実験に供した。構築したシステムにおいて、バッグ内の細胞環境のガス分圧はインキュベーター内のそれと一致させることができることが確認された。静水圧負荷パターンも、5MPa, 0.5Hzの実現を確認し、この系で10Mpa, 1Hzまでの静水圧負荷が確認された。一方、aggrecanのm-RNAの発現において、静水圧条件下で抑制される傾向が見られたものの、顕著な差が見られなかった。また、type I collagenのm-RNAの発現については、静水圧条件下1/2Hzにおいて有意に抑制された(64%)。さらに、type II collagenのm-RNAの発現については、1/2Hzにおいて有意に促進されることが分かった(160%)。最後に、type X collagenのm-RNAの

発現については、静水圧条件下 1/60, 1/600Hz において有意に抑制された(62, 48%)。以上のことから、総合的に判断して 1/2Hz 条件での静水圧負荷刺激が軟骨細胞機能の分化を最も維持できることが示唆された。(牛田ら)

②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に関する研究

対象は PMR を施行した比較的重度の内側型変形性膝関節症患者 59 名 66 膝である。経過観察期間は 2 年以上が 52 膝、2 年以内が 14 膝であった。レントゲン重症度の評価には、Kellgren & Lawrence 分類を用い、MRI 所見の評価にはプロトン強調画像矢状断像を、臨床成績の評価には日整会膝治療成績判定基準 (JOA OA knee score) を用いた。統計学的検討を各スコアの改善量、最終術後スコアに関して Wilcoxon 符号付順位の検定を用いて行なった。P<0.01 を有意と判定した。

手術時 Kellgren & Lawrence の X 線分類では、Grade2 が 1 例、Grade3 が 18 膝、Grade4 が 47 膝であり、進行した変形性膝関節症が大多数であった。MRI (プロトン強調画像) 所見による分類としては、内側コンパートメントの中央を通るようなプロトン強調像矢状断像を画像処理し、大腿骨内側顆の輪郭のみを抽出し、不整がないかあるいはわずかな不整を認める群を Smooth/minimum irregularity 群 (以下 S 群)、中等度から明らかに不整になっているものを Moderate/obvious irregularity 群 (以下 IR 群) として区別した。その結果、S 群、34 例、IR 群、32 例であり、術後成績による評価では、術後 2 年以上の患者群では、IR 群のみが術後成績においてその改善度に有意な差を認めなかった。以上より、MRI プロトン強調矢状断像所見による OA 重症度分類が PMR の適応の判断に有用である可能性が示唆された。

(守屋ら)

E、結論

本年度の研究により、変形性膝関節症の発症およびその進行に関わる分子学的病態、メカニカルストレスの生化学的メカニズム、運動力学的特性がさらに明らかになった。また診断面に関しても、ごく早期での軟骨変性の把握が可能になり、予防医学の発展につながっていくものと確信する。また、大量の組織再生が困難である

軟骨組織の静水圧を用いた長期、大量再生の可能性がさらにすすみ、最小侵襲手術の代表である関節鏡視下手術の適応が確立されていくことは、今後激増していくと思われる変形性膝関節症による日常生活動作障害の根絶につながっていく治療法の確立につながる研究成果であると思われる。

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

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

分担研究者 守屋秀繁
千葉大学大学院医学研究院整形外科教授

研究要旨

比較的重度の内側型変形性膝関節症に対する手術的治療法の適応に関して検討した。鏡視下後内側切離術の手術適応の判断に、MRI 像からみた大腿骨内側顆の輪郭の不整度が術後成績の予測に有用であると思われた。

A. 研究目的

変形性膝関節症に対する手術的療法として、人工関節置換術、骨切り術、関節鏡視下手術などがある。各々の治療法に長所、短所が挙げられるが、どの程度進行した病態にどの手術法を適応するのが適当であるかは議論のあるところである。われわれは関節鏡視下に関節内のデブリードマンとともに関節後内側部の癒着を剥離、切離する鏡視下後内側切離術 (Postero-medial release 以下 PMR) も行ってきた。前年度までに同方法による二年以上の長期経過例の 70%で満足する結果を得たことを報告した。しかし一方で、疼痛が軽減せず、その後人工関節置換術に移行した症例が 50 例中 6 例、12%存在した。そこで今年度、われわれは関節鏡視下後内側切離術 (PMR) の手術適応を画像学的に用いて明確にすることを目的とした。

B. 研究方法

対象は千葉大学医学部附属病院整形外科において PMR を施行した比較的重度の内側型変形性膝関節症患者 59 名 66 膝である。手術時年齢は 47-85 歳で平均 71.5 歳であり、経過観察期間は 2 年以上が 52 膝、2 年以内が 14 膝であった。レントゲン重症度の評価には、Kellgren & Lawrence 分類を用い、MRI 所見の評価にはプロトン強調画像矢状断像を、臨床成績の評価には日整会膝治療成績判定基準 (JOA OA knee score) を用いた。統計学的検討を各スコアの改善量、最終術後スコアに関して Wilcoxon 符号付順位検定を用いて行なった。P<0.01 を有意と判定した。

C. 研究結果

手術時 Kellgren & Lawrence の X 線分類では、Grade2 が 1 例、Grade3 が 18 膝、Grade4 が 47 膝であり、進行した変形性膝関節症が大多数であった。MRI 所見による分類としては、内側コンパートメントの中央を通るようなプロトン強調像矢状断像を画像処理し、大腿骨内側顆の輪郭のみを抽出し、不整がないかあるいはわずかな不整を認める群を Smooth/minimum irregularity 群 (以下 S 群)、中等度から明らかに不整になっているものを Moderate/obvious irregularity 群 (以下 IR 群) として区別したところ、S 群、34 例、IR 群、32 例であった。術後成績による評価では、術後 2 年以上の患者群では、IR 群のみが術後成績においてその改善度に有意な差を認めなかった。

D. 考察

今年度の検討にて MRI プロトン強調画像矢状断像を用いた大腿骨内側顆の輪郭の術前の評価が PMR の術後の長期の成績予測に有用であることが示された。大腿骨内側顆の輪郭は軟骨下骨に相当すると考えられ、不整度が何らかの軟骨下骨の病的な状態を示し、術後の臨床成績に影響している可能性が考えられた。

E. 結論

MRI プロトン強調像からみた大腿骨内側顆の輪郭が整であることが PMR の術後成績が良好となることの条件である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

A. 論文発表

Moriya H, Sasho T, Sano S, Wada Y. Arthroscopic posteromedial release for osteoarthritic knees with flexion contracture.

Arthroscopy. 2004 Dec;20(10):1030-9.

佐糺孝久、守屋秀繁：変形性膝関節症の基本戦略と目標 日本医師会雑誌 2004, 第132巻、第7号、974-976

B. 学会発表

Sasho, T; Wada, Y; Suzuki, M; Tahara, M; Moriya, H
IRREGULARITY OF MEDIAL FEMORAL CONDYLE ON MRI IS AN INDICATOR FOR ASSESSING DISEASE SEVERITY OF MEDIAL-TYPE OSTEOARTHRITIC KNEE, ORS 2004

M Tahara, T Sasho, Y Wada, M Suzuki, H Moriya
Evaluation of the indicators of the arthroscopic postero-medial release of varus knee osteoarthritis by using X-ray grading and Japan Knee Osteoarthritis Measure. Osteoarthritis research society international World Congress. Chicago, USA, 2004/12/2-5 2004.

佐糺孝久、和田佑一、田原正道、守屋秀繁：シンポジウム「膝関節鏡視下手術のトピックスと問題点」変形性膝関節症に対する鏡視下後内側解離術の適応と問題点 東日本整形災害外科学会

田原正道 佐糺孝久 和田佑一 鈴木昌彦 大河昭彦 守屋秀繁：近交系マウスを用いた関節不安定性による変形性関節症(OA)モデル作成とその評価, 第19回日本整形外科学会基礎学術集会

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

マウスゲノミクスを用いた変形性関節症の分子メカニズムの解明
- Runx2 の関与 -

分担研究者 中村耕三（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 教授）

研究要旨：我々が確立したマウス OA モデルの関節軟骨を観察することによって、軟骨破壊の初期に X 型コラーゲン（COL10）とマトリックスメタロプロテアーゼ-13（MMP-13）が発現誘導されることを示した。この両分子の上流転写因子である Runx2 の関与を検討するために、Runx2 ヘテロ欠損マウス（Runx2+/-）に OA モデルを作成したところ、Runx2+/-では軟骨破壊の程度が野生型よりも軽度であった。Runx2 の機能不全が、OA における関節軟骨の病的肥大化のみならず、軟骨基質の分解をも著明に抑制することが示された。

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るが、その細胞・分子レベルのメカニズムについては殆ど解明されていない。この要因のひとつとして、遺伝子変異のシステムが確立されてい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。我々は現在までの検討で、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4つのタイプのマウス膝 OA 誘発モデルの作製に成功した。更に、このマウス膝関節 OA の進行を、軟骨破壊および骨棘形成それぞれに grading するシステムを樹立した。現在、このモデルを候補遺伝子の遺伝子変異マウスに応用することによって、OA の発症における各遺伝子の関与を検討することを目指している。昨年度の検討で、我々自身がクローニングに成功した新規遺伝子である cystatin 10 が、骨棘の形成に関与していることを、ホモ欠損マウスに上記 OA 負荷を与えることによって解明した。本年度は、更に初期の変化である軟骨の変性・破壊に関与する分子の同定を試みた。

B. 研究方法

マウスモデル OA 変化の早期における既知の軟骨基質蛋白や蛋白分解酵素の OA に伴う発現の変化は、免疫染色、in situ hybridization を用いて検討した。Runx2 欠損マウスは、長崎大学解剖学の小守寿文教授より供与された。8 週齢・雄の Runx2 ヘテロ欠損マウス（Runx2+/-）および同胞野生型マウ

ス（WT）の MM と MCL を切除・切離して OA を誘発した。軟骨破壊の程度については safranin-O 染色、骨棘の形成については組織学的所見のみならず X 線検査で検討した。また、関節軟骨における X 型コラーゲン（COL10）とマトリックスメタロプロテアーゼ-13（MMP-13）の発現については免疫染色にて検討した。

（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

マウスモデル OA 関節軟骨の初期に COL10 陽性の病的肥大軟骨細胞の出現と、MMP-13 の発現による軟骨基質の分解が見られた。そこで、その背景分子の候補として COL10 および MMP-13 の共通の上流転写因子として知られている Runx2（Cbfa1）に注目した。Runx2 ホモ欠損マウスは軟骨の肥大化障害による骨化不全のために胎生致死となるため、Runx2 ヘテロ欠損マウス（Runx2+/-）に上記 OA 誘発モデルを作製した。生理的条件下では Runx2+/-マウスは既知の通り鎖骨頭蓋異形成を示したが、関節軟骨は正常であった。また、成長軟骨も正常で成長障害も見られなかった。OA モデルを作成したところ、WT の関節軟骨では、術後 4 週より safranin-O 染色性の低下と表層・中層の破壊が観察され、12 週では破壊が深層（tidemark の下）にまで達していた。また 8 週から脛骨内側縁に骨棘形成が観察された。一方、Runx2+/-では術後 12 週においても染色性の低下は軽度で軟骨破壊は表層内に止まっ

ており、骨棘形成は見られなかった。12 週後の Mankin score は、WT が 9.2 ± 0.7 点、Runx2+/- が 4.3 ± 0.5 点 (mean \pm SEM) であった。COL10 と MMP-13 の免疫染色を行ったところ、WT では表層・中層での軟骨細胞の病的肥大分化に伴って両者の発現が術後 4 週から見られたが、Runx2+/- では肥大分化は殆ど見られず、COL10 の発現のみならず MMP-13 の発現も著明に抑制されていた。

D. 考察

Runx2 の機能不全が、OA における関節軟骨の病的肥大化のみならず、軟骨基質の分解をも著明に抑制することが示された。以上より、Runx2 による病的肥大化が OA 発症の引き金となることが示唆された。この早期変化は、OA 関節軟骨の中心部にも辺縁部にも共に認められ、その後は中心部では軟骨破壊が進行し、辺縁部では骨棘形成に移行した。この差については、軟骨の肥大化に引き続いて中心部では血管新生を伴わないが辺縁部では血管新生を伴って骨化を誘導するためと考えられた。

E. 結論

現在までのマウスゲノミクスを用いた検討で、Runx2 が軟骨破壊に、Cst10 が骨棘形成にとって重要なシグナル分子であることが示された。今後は、これらの分子と、MMP-13、VEGF などの分子との発現・機能における関連を検討することによって、OA における肥大化・軟骨破壊・骨棘形成に関する分子ネットワークを解明したいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Seto H, Fujii T, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Imamura T, Miyazono K, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chung U, Kawaguchi H, and Tanaka S: Regulation of chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts: segregation of the roles of Smad pathways and p38 MAP kinase pathways. *J Clin Invest* 113: 718-726, 2004.
2. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K,

Kadowaki T, and Kawaguchi H: PPAR- α insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113: 846-855, 2004.

3. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung U, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Matsumoto M, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, and Kawaguchi H: Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* 279: 15314-15322, 2004.
4. Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, and Kawaguchi H: Osteoclast differentiation by RANKL requires NF- κ B-mediated down-regulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19: 1128-1136, 2004.
5. Ogasawara T, Kawaguchi H, Jinno S, Hoshi K, Itaka K, Takato T, Nakamura K, and Okayama H: Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires smad-mediated down-regulation of cdk6. *Mol Cell Biol* 24: 6560-6568, 2004.
6. Yamada T, Kawano H, Sekine K, Matsumoto T, Fukuda T, Azuma Y, Itaka K, Chung UI, Chambon P, Nakamura K, Kato S, and Kawaguchi H: SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J Bone Miner Res* 19: 1452-1461, 2004.
7. Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-ishi S, Yasui H, Azuma Y, Hirasawa N, Ohuchi K, Ohuchi K, Kawaguchi H, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Murakami M, and Kudo I: Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J Biol Chem* 279: 33684-33695, 2004.
8. Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung UI, and Kawaguchi H: Cyclic GMP-dependent

- protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev* 18: 2418-2429, 2004.
9. Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Jang WD, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, and Kataoka K: Supramolecular nanocarrier of siRNA from PEG-based block cationer carrying diamine side-chain distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing. *J Am Chem Soc* 126: 13612-13613, 2004.
 10. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Takigawa Y, Matsushita T, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nature Mater* 3: 829-836, 2004.
 11. Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, and Chung UI: Combination of SOX5, SOX6 and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for chondrogenesis. *Arthritis Rheum* 50: 3561-3573, 2004.
 12. Anamizu Y, Kawaguchi H, Seichi A, Yamaguchi S, Kawakami E, Kanda N, Matsubara S, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nakamura K, and Oyanagi K: *Klotho* insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells. *Acta Neuropathol* (in press).
 13. Moro T, Ogasawara T, Chikuda H, Ikeda T, Ogata N, Maruyama Z, Komori T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Okayama H, and Kawaguchi H: Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol* (in press).
 14. Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Kamekura S, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Mutation in cGMP-dependent protein kinase II causes dwarfism in a rat mutant KMI through uncoupling of proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Bone Miner Metab* (in press).
 15. Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, and Hoshi K: Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-1 on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant* (in press).
 16. Yamaguchi M, Ogata N, Shinoda Y, Akune T, Kamekura S, Terauchi Y, Kadowaki T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Insulin receptor substrate-1 is required for bone anabolic function of parathyroid hormone in mice. *Endocrinology* (in press).
 17. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung UI, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, and Kawaguchi H: Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* (in press).
 18. Kawaguchi H, Akune T, Yamaguchi M, Ohba S, Ogata N, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, and Nakamura K: Distinct effects of PPAR γ insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab* (in press).
2. 学会発表
 1. Keiji Itaka, K. Kanayama, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, Kazunori Kataoka: An effective siRNA delivery system based on self-assembly with PEG-polycation block copolymer. 31st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. 2004. 6.12-16 (Honolulu, Hawaii, USA).
 2. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomoaki Konno, Y. Takigawa, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Inhibition of aseptic loosening of artificial joints by graft polymerization of a novel biocompatible polymer MPC. 50th annual meeting of the

- Orthopaedic Research Society. 2004. 3. 7-10 (San Francisco, California, USA).
3. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Kozo Nakamura and Hiroshi Kawaguchi: Improved longevity of the artificial joints by grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner. 7th World Biomaterial Congress. 2004.5.17-21 (Sydney, Australia)
 4. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Tomiharu Matsushita, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Biocompatible phospholipid polymer nano-grafting onto articular surface of the artificial hip joint prevents aseptic loosening. Nano-technology to prolong the longevity of the artificial joint (Best Poster Award). 17th Annual Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty. 2004.9.23-25 (Roma, Italy).
 5. Satoru Kamekura, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Hirotaka Chikuda, Ung-il Chung, Zenjiro Maruyama, Toshihisa Komori, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Runx2 contributes to pathogenesis of osteoarthritis through chondrocyte hypertrophy and matrix breakdown in articular cartilage under mechanical stress (Young Investigator Award). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
 6. Fumitaka Kugimiya, Hirotaka Chikuda, Kazuto Hoshi, Toshiyuki Ikeda, Toru Ogasawara, Satoru Kamekura, Kozo Nakamura, Kajuro Komeda, Ung-il Chung, and Hiroshi Kawaguchi: Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through attenuation of Sox9 function (Young Investigator Award). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
 7. Fumitaka Kugimiya, Satoru Kamekura, Hirotaka Chikuda, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, and Ung-il Chung: Physiological role of the combination of BMP2 and BMP6 in bone formation. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
 8. Kiyofumi Yamakawa, Masatomo Saegusa, Daisuke Kamei, Yui Takegoshi, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Makoto Murakami, Ichiro Kudo, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Dysfunction of membrane-bound prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) reduces inflammatory bone resorption. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
 9. Masayuki Yamaguchi, Yusuke Shinoda, Satoru Kamekura, Naoshi Ogata, Takashi Kadowaki, Yasuo Terauchi, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) is essential for bone anabolic function of parathyroid hormone (1-34). 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
 10. Shinsuke Ohba, Toshiyuki Ikeda, Satoru Kamekura, Fumitaka Kugimiya, Fumiko Yano, Alex C. Lichtler, Toshihisa Komori, Toru Ogasawara, Kazuto Hoshi, Kozo Nakamura, Tsuyoshi Takato, Hiroshi Kawaguchi, and Ung-il Chung: Combination of BMP and Runx2 signalings constitute the minimum and sufficient unit for osteogenic differentiation through Cbfb regulation. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
 11. Fumiko Yano, Shinsuke Ohba, Fumitaka Kugimiya, Toshiyuki Ikeda, Naoshi Ogata, Tsuyoshi Takato, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, and Ung-il Chung: The canonical Wnt signaling promotes chondrogenic differentiation and hypertrophy *in vitro*. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5

- (Seattle, Washington, USA).
12. Maruyama Z, Kanatani N, Yoshida C, Nakamura K, Kawaguchi H, and Komori T: Overexpression of CDK6 and CCND1 in chondrocytes induces chondrocyte proliferation and apoptosis and causes dwarfism. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
 13. Seto H, Kamekura S, Chikuda H, Hiraoka H, Imamura T, Miyazono K, Oda H, Kurosawa H, Nakamura K, Kawaguchi H, and Tanaka S: Distinct roles of Smad pathways and p38 pathways in cartilage-specific gene expression in synovial fibroblasts. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10.1-5 (Seattle, Washington, USA).
 14. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口浩: MPC ポリマーによる関節摺動面のナノ表面処理は人工股関節の弛みを抑制する —長寿命型人工股関節の開発—. 第34回日本人工関節学会. 2004. 1. 30-31 (幕張メッセ、千葉).
 15. 小笠原徹、川口浩、中村耕三、鄭雄一、高戸毅 星和人: 骨再生医療におけるサイクリン依存性キナーゼ 6 (Cdk6) 応用の試み. 第3回日本再生医療学会総会. 2004. 3. 23-25 (幕張メッセ、千葉).
 16. 星和人、小笠原徹、劉光耀、高橋嗣明、山岡尚世、川口浩、鄭雄一、朝戸裕貴、中村耕三、高戸毅: ヒト耳介軟骨由来細胞による再生軟骨作製の試み. 2004. 3. 23-25 (幕張メッセ、千葉).
 17. 大庭伸介、池田敏之、亀倉暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、Alex C Lichtler、小笠原徹、星和人、川口浩、中村耕三、高戸毅、鄭雄一: COL1-GFP マーカー遺伝子を用いた骨芽細胞分化十分条件の検索. 2004. 3. 23-25 (幕張メッセ、千葉).
 18. 位高啓史、金山直樹、川口浩、中村耕三、片岡一則: PEG-polycation ブロック共重合体を用いた siRNA デリバリーシステム. 遺伝子・デリバリー研究会 第4回 シンポジウム. 2004. 5. 10 (京都テルサ、京都).
 19. 星地亜都司、竹下克志、阿久根徹、川口浩、筑田博隆、河村直洋、松平浩、中村耕三: 頸部脊髄症の神経学的高位診断 - MRI からみた検証 -. 第77回日本整形外科学会学術集会. 2004. 5. 20-23 (神戸ポートピアホテル、神戸).
 20. 劉光耀、小笠原徹、岸本淳司、高橋嗣明、鄭雄一、川口浩、朝戸裕貴、高戸毅、中村耕三、星 和人: 軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の最適化. 第7回日本組織工学会. 2004. 7. 1-2 (砂防会館、東京).
 21. 位高啓史、金山直樹、川口浩、中村耕三、片岡一則: siRNA/ブロック共重合体コンプレックスを用いた遺伝子ノックダウン. 第20回日本 DDS 学会 2004. 7. 15-16 (東京).
 22. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、中村耕三、川口浩: MPC ポリマーのナノ表面処理による関節摺動面の人工関節の弛緩防止効果—長寿命型人工関節の開発—. 第2回 PC サーフェイステクノロジー研究会. 2004. 7. 23 (東京ドームホテル、東京).
 23. 川口浩、亀倉暁、山田高嗣、河野博隆、星和人、鄭雄一、中村耕三、加藤茂明、丸山善治郎、小守寿文: マウスゲノミクスからの変形性関節症の分子メカニズムの解析. 第22回日本骨代謝学会 (シンポジウム: 関節リウマチと変形性関節症における骨破壊分子メカニズムと治療). 2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪).
 24. 亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、丸山善治郎、鄭雄一、小守壽文、中村耕三、川口浩: Runx2 による関節軟骨細胞の病的肥大化が変形性関節症 (OA) 発症の引き金となる —OA 誘発モデルを用いた Runx2 ヘテロ欠損マウスの解析— (学会奨励賞受賞). 第22回日本骨代謝学会. 2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪).
 25. 釘宮典孝、亀倉暁、筑田博隆、中村耕三、川口浩、鄭雄一: BMP2 と BMP6 の組合せは生理作用として骨形成に重要である - BMP2;BMP6 ダブルノックアウトマウスの解析 - (学会奨励賞受賞). 第22回日本骨代謝学会. 2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪).
 26. 釘宮典孝、筑田博隆、池田敏之、星和人、小笠原徹、中村耕三、鄭雄一、川口浩: cGKII は Sox9 の核内移行を抑制することによって軟骨細胞肥大分化への分子スイッチとして働く. 第22回日本骨代謝学会. 2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場、大阪).
 27. 山口雅之、篠田裕介、亀倉暁、緒方直史、中村耕三、川口浩: 副甲状腺ホルモン (PTH

- 1-34) の骨同化作用における IGF-1/IRS-1 シグナルの関与 (優秀ポスター賞受賞). 第 22 回日本骨代謝学会. 2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場, 大阪).
28. 山川聖史, 亀井大輔, 竹越唯衣, 植松智, 審良静男, 村上誠, 工藤一郎, 中村耕三, 川口浩: 膜型プロスタグランジン E₂ 合成酵素-1 (mPGES-1) の炎症性骨破壊への関与 - mPGES-1 遺伝子欠損マウスの解析 -. 第 22 回日本骨代謝学会. 2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場, 大阪).
29. 大庭伸介, 池田敏之, 亀倉暁, 釘宮典孝, 筑田博隆, 矢野文子, Alex C Lichtler, 小笠原徹, 星和人, 川口浩, 中村耕三, 高戸毅, 鄭雄一: BMP シグナルと Runx2 シグナルが骨芽細胞への分化のための最低限のシグナルユニットである (優秀演題賞受賞). 第 22 回日本骨代謝学会. 2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場, 大阪).
30. 矢野文子, 大庭伸介, 釘宮典孝, 池田敏之, 緒方直史, 筑田博隆, 川口浩, 中村耕三, 高戸毅, 鄭雄一: Wnt-s カテニンシグナルは軟骨細胞への分化と肥大化を促進的に制御している. 第 22 回日本骨代謝学会. 2004. 8. 4-7 (大阪国際会議場, 大阪).
31. Guangyao Liu, Kazuto Hoshi, Toru Ogasawara, Tsuyoshi Takato, Hiroshi Kawaguchi, and Kozo Nakamura: Experimental trials to make an implant-type regenerated cartilage by autologous chondrocytes. 第 53 回東日本整形災害外科学会 (Asia Now). 2004. 9. 24-25 (山形国際交流プラザ, 山形).
32. 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 瀧川順庸, 高玉博朗, 山脇昇, 中村耕三, 川口浩: ポリエチレンライナーの MPC 処理は 1000 万サイクルまで摩耗を抑制する一ナノ表面制御による長寿命型人工股関節の開発一. 第 31 回日本股関節学会学術集会. 2004. 10. 15-16 (長崎ブリックホール, 長崎)
33. 川口浩, 阿久根徹, 緒方直史, 下赤隆, 星和人, 鄭雄一, 中村耕三: インスリン受容体基質 (IRS) シグナルによる骨代謝調節と骨再生医療への応用. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (シンポジウム: 基礎の成果を臨床に: 萌芽的最先端医療 - 運動器の再生医療 -). 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).
34. 川口浩, 岡崎裕司, 中村耕三, 松下隆: FGF-2 の骨形成促進作用と骨延長への応用. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (パネルディスカッション: 延長仮骨の強度を早期に高める). 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).
35. 亀倉暁, 星和人, 下赤隆, 筑田博隆, 鄭雄一, 小守壽文, 中村耕三, 川口浩: Runx2 による関節軟骨細胞の病的肥大化が変形性関節症の発症に重要である - 新規 OA 誘発モデルを用いた Runx2 ヘテロ欠損マウスの解析 -. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).
36. 釘宮典孝, 亀倉暁, 筑田博隆, 中村耕三, 川口浩, 鄭雄一: BMP2 と BMP6 の組合せは生理作用として骨形成の維持に重要である - BMP2; BMP6 ダブルノックアウトマウスの解析 -. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).
37. 釘宮典孝, 筑田博隆, 池田敏之, 中村耕三, 鄭雄一, 川口浩: cGKII は Sox9 の核内移行を抑制することによって軟骨細胞の肥大分化への分子スイッチとして働く. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).
38. 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 瀧川順庸, 中村耕三, 川口浩: MPC ポリマーを用いたナノテクノロジーによる人工股関節の弛みの抑制 - 耐摩耗性と生体適合性に優れた長寿命型人工股関節の開発 -. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (シンポジウム: 整形外科における医工連携の課題). 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).
39. 山口雅之, 篠田裕介, 釘宮典孝, 緒方直史, 中村耕三, 川口浩: PTH の骨同化作用における IGF-1/IRS-1 シグナルの関与. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).
40. 山川聖史, 亀井大輔, 村上誠, 工藤一郎, 中村耕三, 川口浩: 膜型プロスタグランジン E₂ 合成酵素-1 (mPGES-1) は疼痛・炎症・関節破壊に重要な酵素である - mPGES-1 遺伝子欠損マウスの解析 -. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル, 東京).
41. 篠田裕介, 緒方直史, 鄭雄一, 中村耕三, 川口浩: PTH (1-34) による *in vitro* での骨形成促進モデルシステムの確立. 第 19 回

- 日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10.21-22 (新高輪プリンスホテル、東京).
42. 星和人、鄭雄一、朝戸裕貴、高戸毅、中村耕三、川口浩：ヒト軟骨由来細胞を用いたインプラント型再生軟骨作製法の確立. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10.21-22 (新高輪プリンスホテル、東京).
43. 松原全宏、川口浩、中村耕三、加藤幸夫：歯槽骨骨髓間質細胞の再生医療における細胞源としての可能性. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10.21-22 (新高輪プリンスホテル、東京).
44. 大庭伸介、池田敏之、亀倉暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、Alex C Lichtler、小笠原徹、星和人、高戸毅、中村耕三、川口浩、鄭雄一：COL1-GFP マーカー遺伝子導入システムを用いた骨芽細胞への分化シグナルの検索. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10.21-22 (新高輪プリンスホテル、東京).
45. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、中村耕三、川口浩、鄭雄一古典的 Wnt シグナルは軟骨細胞の早期分化と肥大化を促進的に制御している. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10.21-22 (新高輪プリンスホテル、東京).
46. 山本精三、石橋英明、川口浩、鈴木隆雄、中村耕三、大腿骨頸部骨折のQOL評価. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10.21-22 (新高輪プリンスホテル、東京).
47. Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Kawaguchi H, Nakamura K, Kataoka K: Self-assembled nanocarrier composed of PEG-based block copolymer for effective siRNA delivery. 4th Asian International Symposium on Biomaterials (AISB). 2004.11.16-18 (Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan)
48. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Hiroaki Takadama, Takao Hanawa, Norio Maruyama, Kozo Nakamura and Hiroshi Kawaguchi: Inhibition of aseptic loosening of artificial hip joints by a novel biocompatible polymer MPC. 4th Asian International Symposium on Biomaterials (AISB). 2004.11.16-18 (Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan)
49. 釘宮典孝、亀倉暁、筑田博隆、中村耕三、川口浩、鄭雄一：BMP2 と BMP6 の組合せは生理作用として骨形成に重要である - BMP2;BMP6 ダブルノックアウトマウスの解析 -. 第6回日本骨粗鬆症学会. 2004. 11. 17-20 (大宮ソニックシティ、埼玉).
50. 大庭伸介、池田敏之、亀倉暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、Alex C Lichtler、小笠原徹、星和人、高戸毅、中村耕三、川口浩、鄭雄一：BMP シグナルと Runx2 は骨芽細胞分化の最小かつ十分なシグナルユニットである. 第6回日本骨粗鬆症学会. 2004. 11. 17-20 (大宮ソニックシティ、埼玉).
51. 山川聖史、三枝正朋、亀井大輔、竹越唯衣、植松智、審良静男、村上誠、工藤一郎、中村耕三、川口浩：膜型プロスタグランジン E₂ 合成酵素-1 (mPGES-1) の炎症性骨吸収治療のための重要な標的分子である. 第6回日本骨粗鬆症学会. 2004. 11. 17-20 (大宮ソニックシティ、埼玉).
52. 山口雅之、篠田裕介、亀倉暁、緒方直史、中村耕三、川口浩：副甲状腺ホルモン (PTH 1-34) の骨同化作用において IGF-1/IRS-1 シグナルが重要である. 第6回日本骨粗鬆症学会. 2004. 11. 17-20 (大宮ソニックシティ、埼玉).
53. 星和人、劉光耀、小笠原徹、高橋嗣明、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩：軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の組み合わせの最適化と相互作用機序の検討. 第18回日本軟骨代謝学会. 2005. 3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪).
54. 亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、鄭雄一、小守壽文、中村耕三、川口浩：Runx2 による関節軟骨細胞の病的肥大化が変形性関節症の発症に重要である - 新規 OA 誘発モデルを用いた Runx2 ヘテロ欠損マウスの解析 -. 第18回日本軟骨代謝学会. 2005. 3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪).
55. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、小笠原徹、池田敏之、緒方直史、高戸毅、中村耕三、川口浩、鄭雄一：古典的 Wnt シグナルは軟骨細胞への分化と肥大化を促進的に制御している. 第18回日本軟骨代謝学会. 2005. 3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪).
56. 釘宮典孝、筑田博隆、池田敏之、中村耕三、鄭雄一、川口浩：cGKII は Sox9 の核内移行を抑制することにより軟骨細胞の肥

大分化における分子スイッチとして働く。
第18回日本軟骨代謝学会。2005。

3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪)。

57. 瀬戸宏明、亀倉暁、三浦俊樹、山本愛一郎、筑田博隆、緒方徹、平岡久忠、織田弘美、中村耕三、黒沢尚、鄭雄一、川口浩、田中栄：滑膜線維芽細胞での軟骨特異的遺

伝子発現における Smad pathway と p38 pathway の役割について。第18回日本軟骨代謝学会。2005。3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪)。

- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

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

分担研究者 西田圭一郎

岡山大学大学院医歯学総合研究科助教授

研究要旨

変形性関節症（OA）の新規治療法を開発する目的で、軟骨細胞のメカニカルストレスおよび低酸素ストレスに対する遺伝子発現の変化と、炎症性サイトカインに対し軟骨細胞保護的に働くと考えられる IL-4 の効果を *in vitro*, *in vivo* で検討した。IL-4 は正常ラット膝軟骨細胞において、メカニカルストレスによって発現が亢進する iNOS, MMP-1, MMP-13, Cathepsin B, Cathepsin D 遺伝子の発現を *in vitro* で抑制した。一方、種々の濃度の rhIL-4 の関節内投与はラット膝実験的 OA における軟骨破壊をある程度抑制したが、用量依存性は認められなかった。

A. 研究の経過と目的

我々は初年度の研究で、生後 1 週齢の培養ラット軟骨細胞に伸長ストレスを負荷し、負荷前後での遺伝子発現の変化を cDNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。検討した 1081 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することを確認した。さらに昨年度は変形性関節症（OA）モデルをラット膝関節に確実かつ効率的に作成する手法を確立し、IL-4（100 ng/day）の関節内直接投与による IL-4 の *in vivo* における効果を組織学的に検討した。その結果、本モデルでは術後比較的早期に軟骨の OA 変化をきたし、術後 6 週までに強い軟骨破壊をきたすこと、IL-4 の関節内投与は肉眼的、組織学的に軟骨破壊抑制効果を示し、軟骨細胞のアポトーシスを抑制する

ことが判明した。本年度は、マイクロアレイで得られた結果を RT-PCR を用いて検証すること、さらに OA モデルにおける IL-4 の効果を投与量を変えて検討すること、モデル動物より得られた軟骨サンプルにおいて上記 PCR の結果が再現されているか、について組織学および免疫組織学的に検討した。また、本年度は、メカニカルストレスに加えて、重要な酸化ストレスの指標で、NO と密接な関係のある因子として HO-1 の発現についても *in vivo*, *in vitro* での検討を加えた。

B. 研究方法

1. *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、0, 1, 10 ng/ml rat rhIL-4 の添加の有無による aggrecan, Type II コラーゲン, MMP-1, -3, -13 および Cathepsin B, D, L の遺伝子発現を半定量 RT-PCR および real-time PCR 法で検討した。

さらに同様に採取したラット軟骨細胞を通常酸素濃度 (20%) あるいは低酸素濃度 (1%) 下に培養し、iNOS, Heme-oxygenase-1 (HO-1) の発現を real-time PCR 法で検討した。

2. *iv vivo* 実験

in vivo 実験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。

ラット OA モデルは体重 200g の雄ウイスターラット前十字靭帯 (ACL)、内側側副靭帯 (MCL) を切離し、内側半月板を切除して作成した。右膝関節に OA を作成後、左膝関節は関節包までの切開のみとした (Sham 群)。OA 群の半数にはラット rhIL-4 (10, 50, 100 ng / 50 μ l/day) を連日関節内投与 (治療群)、残りのコントロール群は PBS を同量関節内投与した。Sham 群は未治療とした。術後 2 週、4 週、6 週で膝関節を採取、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 0 染色を行い、組織学的グレード (修正 Mankin スコア) で評価し、比較検討した。さらに、コントロール群、治療群の軟骨組織中の Cathepsin B, HO-1、ニトロチロシンの発現

の時間経過、IL-4 の効果を免疫染色に対する陽性細胞率を算出して比較検討した。

C. 研究結果

ラット培養軟骨細胞に対するメカニカルストレスは、本条件下では aggrecan, Type II コラーゲン, MMP-3, の発現に影響を与えなかった。Cathepsin L の発現は負荷前後で認めなかった。一方、MMP-1, -13 および Cathepsin B, D の発現はメカニカルストレス負荷 24 時間後に有意に亢進し、rhIL-4 (10 ng/ml) によって強く抑制された。

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、6 週では特に脛骨内側顆部に強い軟骨破壊を認めた。一方で IL-4 投与群では軟骨の粗造化、破壊は各週において抑制されていた。

組織学的検討を大腿骨遠位内側顆部の荷重部で行ったところ、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 週から 6 週にかけて修正 Mankin score 0-14 にいたる種々の程度の組織学的進行度を呈していた。Mankin score の平均は 2 週で 2.28 ± 1.89 、4 週で 5.11 ± 2.47 、6 週で 5.88 ± 2.80 と有意に進行した。一方 IL-4 の関節内投与により治療群では 2 週で表層のみのサフラニン 0 に対する染色性の低下、4 週で軟骨細胞の軽度増殖、6 週で中間層に至るサフラニン 0 の染色性低下を認めたが、強い軟骨破壊には至らなかった。