

図1 IL-4を介する軟骨細胞の機械的刺激に対するシグナル伝達系路
SAC ; stretch-activated ion channels, PLC ; phospholipase C, PKC ; protein kinase C, SK channel ; small conductance calcium-activated potassium channel, IL-4R α ; IL-4 receptor α subunit, IL-13R ; IL-13 receptor subunit (文献⁵⁾より引用)

らかの液性因子の分泌がこのカスケードに関与することが示唆され、抗IL-4抗体あるいは抗IL-4レセプター抗体が一連の細胞応答を阻害することから、メカノレセプターを介するシグナル伝達には軟骨細胞自身が分泌するIL-4が関与することが明らかとなった³⁾(図1)。したがって細胞内に蓄積されたIL-4の分泌、産生が負荷に追いつかない場合には、シグナル伝達機構が破綻する可能性があると思われる。

変形性関節症軟骨細胞の IL-4に対する応答

加齢、異常なメカニカルストレス、遺伝的素因は軟骨変性の重要なrisk factorである。異常なメカニカルストレスは、関節の形態、外傷、体重増加、職業、生活様式などの因子によって引き起こされ、OAの原因あるいは悪化因子となる。われわれの経験からは、ラットにおいては内側側副靭帯切離、内側半月板切除を加えると、軟骨破壊は4~6週で急速に進行することからも、加齢とは関係なく、程度によってはメカニカルストレスのみでOA病態の再現が可能であることを示す。一方、OAの進展には軟骨細胞自身から

も産生される種々の炎症性サイトカインも関与し、MMPs(matrix metalloproteinases)やcathepsinをはじめとする蛋白分解酵素による基質破壊が進行する。上述のように、軟骨細胞は細胞外基質との接着によって機械的刺激を感知するため、主としてMMPsによりプロテオグリカンやII型コラーゲンをはじめとするコラーゲンの分解は細胞接着やシグナル伝達を阻害し、ひいては軟骨細胞の応答、代謝に影響を与える。したがってOA軟骨細胞は絶えず異常なメカニカルストレスにさらされることになり、細胞の分化度、応答の変化が生じている。上述の0.33Hz、16kPaの伸張ストレスにおいても、OA軟骨細胞では細胞膜は逆に脱分極を示すこと、シグナル伝達にアクチンやPKC、SKチャンネルを介さないこと、IL-4レセプターは正常軟骨細胞ではType II (IL-4R α /IL-13R)であるのに対し、OA軟骨細胞ではType I (IL-4R α /cy)であること、正常軟骨細胞において生じるアグリカン発現亢進およびMMP-3発現低下が生じないことなどが判明しており⁴⁾、OA軟骨細胞では正常とは異なるシグナル伝達のカスケードが働いていると考えられる。

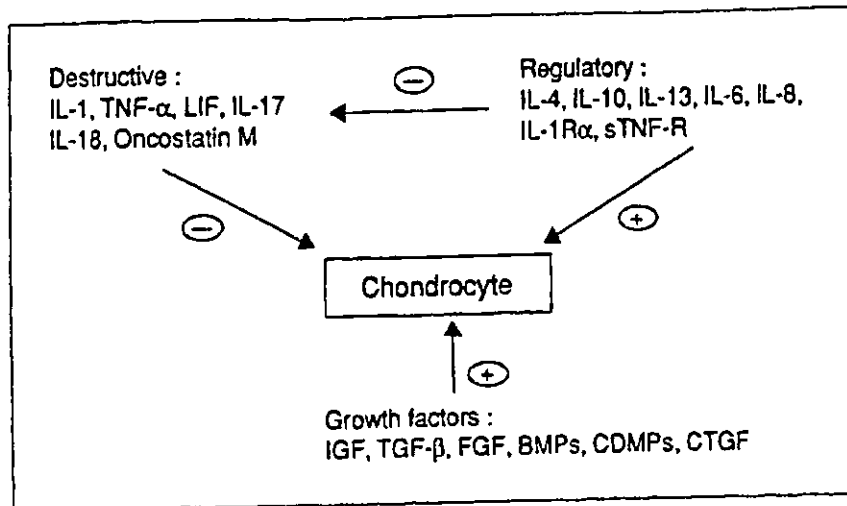


図2 軟骨細胞におけるサイトカインの相互作用
CDMP; cartilage-derived morphogenetic proteins, CTGF; connective tissue growth factor
(文献⁹⁾より引用改変)

炎症に対するIL-4の抑制効果

向炎症性サイトカインの産生あるいは活性を抑制する抗炎症性サイトカインにはIL-4, IL-10, IL-13があり, 種々の炎症プロセスにおいてこれを抑制することが知られているが, その効果は細胞種に依存性であるとされる(図2)⁶⁾. OA滑膜においては, IL-4は低容量のデキサメサゾンと同様にTNF- α , IL-1 β の産生を抑制する⁷⁾. 軟骨組織においては, IL-4とIL-10はIL-1の産生を抑制し, IL-1 α の産生を亢進させる一方で軟骨細胞における誘導型NO合成酵素の発現を抑制することで, IL-1を介したプロテオグリカン産生抑制を阻害し, 軟骨破壊抑制的に働く. Yehらは, IL-4はIL-1, IL-1+TNF, あるいはLPSによるプロテオグリカンの変性をMMPやTIMPの発現レベルを変えずに抑制することから, アグリカナゼ, カルパイン, カテプシン, プラスミノゲンアクチベーターなどの発現抑制を制御する可能性を示唆している⁸⁾が, 軟骨細胞によるMMP-3の産生抑制⁹⁾, pro-MMPの活性化の阻害¹⁰⁾TIMP-1の発現亢進¹¹⁾も報告されている. また, マウス軟骨細胞をIL-4, IL-10で前処理しておくと, IL-1あるいはIL-17による一酸化窒素(NO)を介したプロテオグリカン合成抑制は阻害される¹²⁾. 一方, Lubbertsらはマウスにコラーゲン関節炎を誘導し, IL-4およびIL-10の同時投与が軟骨破壊を有意に抑制することを報告している¹³⁾. また,

IL-4とIL-10の同時投与は軟骨細胞によるIL-1 α の産生量をかえることなくIL-1およびTNF- α の発現を抑え, 結局IL-1/IL-1 α 比を減少させることにより, 軟骨保護的に作用することも知られている¹⁴⁾.

NOは生体防衛的にも障害性にも働く両刃の剣であるが, 関節炎症においても, 過剰に産生されれば, プロテオグリカン産生抑制, II型コラーゲン産生抑制, MMP活性化, 細胞接着やシグナル伝達阻害, アポトーシスの誘導などを介して軟骨組織障害性に働く¹⁵⁾. 軟骨細胞によるメカニカルストレスに対するNO産生については, *in vitro*の実験系で刺激条件が異なれば亢進することも, 逆に抑制されるともいわれる. Leeら¹⁶⁾によると, OA軟骨細胞ではshearストレスに応じて負荷および時間依存性にNO産生が亢進する. Shear stressにより産生されたNOあるいはNO供与体(SNP)によるNOはアグリカン, II型コラーゲンのmRNAレベルを下げ, 間欠的圧負荷はSNPによるこの抑制効果をブロックする. 一方, Islamら¹⁷⁾は持続的な静水圧は5 MPa, 4時間, 1 HzでiNOSのmRNAレベルでの発現亢進を認め, 2時間でbcl-2の発現低下を, 4時間ではDNA fragmentation, Caspase-3活性化, PARPの分解による軟骨細胞のアポトーシスを誘導することを報告している. Nishisakaら¹⁸⁾はIL-4がIL-1による細胞内Caイオン濃度の上昇を抑制し, IL-1によるNO誘導およびプロテオグリカン産生を用量

依存性に阻害することを報告している。

メカニカルストレスに対する IL-4の軟骨保護効果

われわれは以上の結果に基づき、OAにおける過剰なメカニカルストレスに対するIL-4の軟骨保護効果を*in vitro*、および*in vivo*で検討中である。生後1週齢のWistar rat膝関節軟骨細胞を5日間培養後、Flexercell strain unit®(Flexcell international Co.)を用いた周期的伸長ストレス(0.5 Hz, 7%伸張)を単独あるいはラットrhIL-4存在下に24時間負荷した。その結果、誘導型NO合成酵素(iNOS)はmRNAレベルでストレス負荷後24時間でその発現が有意に亢進すること、IL-4添加により容量依存性に発現が抑制されること、またNO₂/NO₃ assayにより培養液中のNO_x濃度もIL-4添加により有意に減少することが判明した。一方、6週齢のWistar ratの膝関節において、MCLおよびACL切離および内側半月板切除によるOAモデルを作成した(OA群)。OA群の半数にはラットrhIL-4を連日関節内投与(治療群)、残りのコントロール群はPBSを関節内投与した。術後2週、4週、6週で行った組織化学的・肉眼的、組織学的検討によると、IL-4の関節内投与により治療群ではコントロール群に比べて肉眼的スコアは有意に改善しており、組織学的にも軟骨細胞のアポトーシスならびに関節軟骨破壊は有意に抑制されていた。以上より、IL-4は正常軟骨細胞において、メカニカルストレスによって発現が亢進したiNOS遺伝子の発現およびNO産生を*in vitro*で抑制し、その関節内投与はラット実験的OAにおける軟骨破壊をある程度抑制し得ると考えられた¹⁹⁾。

おわりに

われわれはラット正常軟骨細胞に対する周期的伸長ストレス負荷前後の遺伝子発現の変化について、cDNAマイクロアレイ法による網羅的解析を行っているが、検討した1081の遺伝子のうち、メカニカルストレスによって37遺伝子の発現の増強および46遺伝子の発現の低下を確認している。今後さらに解析を進めてIL-4の軟骨保護機構の詳細の解明に迫りたい。

文 献

- 1) Salter DM, Nuki G, Wright MO. IL-4 inhibition of cartilage breakdown in bovine articular explants. *J Rheumatol* 1996; 23: 1314.
- 2) Wright MO, Nishida K, Bavington C, et al. Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: evidence of a role for $\alpha 5 \beta 1$ integrin as a chondrocyte mechanoreceptor. *J Orthop Res* 1997; 15: 742.
- 3) Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, et al. Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. *J Cell Biol* 1999; 145: 183.
- 4) Salter DM, Millward-Sadler SJ, Nuki G, et al. Integrin-interleukin-4 mechanotransduction pathways in human chondrocytes. *Clin Orthop* 2001; 391: 49.
- 5) Millward-Sadler SJ, Wright MO, Davies LW, et al. Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2091.
- 6) van den Berg WB, van den Kran PM, van Beuningen HM. Pathophysiology of Osteoarthritis. In: Reginster JY, editor. *Experimental and Clinical Aspects of Osteoarthritis*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1999. p. 188.
- 7) Bendrups A, Hilton A, Meager A, et al. Reduction of tumor necrosis factor α and interleukin-1 β levels in human synovial tissue by interleukin-4 and glucocorticoid. *Rheumatol Int* 1993; 12: 217.
- 8) Yeh LA, Augustine AJ, Lee P, et al. Interleukin-4, an inhibitor of cartilage breakdown in bovine articular cartilage explants. *J Rheumatol* 1995; 22: 1740.
- 9) Nemoto O, Yamada H, Kikuchi T, et al. Suppression of matrix metalloproteinase-3 synthesis by interleukin-4 in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1997; 24: 1774.
- 10) van Lent PL, Holthuysen AE, Sloetjes A, et al. Local overexpression of adeno-viral IL-4 protects cartilage from metallo proteinase-induced destruction

- during immune complex-mediated arthritis by preventing activation of pro-MMPs. *Osteoarthritis Cartilage* 2002 ; 10 : 234.
- 11) Fernandes JC. The role of cytokines in osteoarthritis pathology. *Biorheology* 2002 ; 39 : 237.
 - 12) Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, et al. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum* 2000 ; 43 : 1300.
 - 13) Lubberts E, Joosten LA, van Den Bersselaar L, et al. Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction. *J Immunol* 1999 ; 163 : 4546.
 - 14) Joosten LA, Lubberts E, Durez P, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 1997 ; 40 : 249.
 - 15) Nishida K, Doi T, Inoue H. The role of nitric oxide in arthritic joint- a therapeutic target? Review. *Modern Rheumatol* 2000 ; 10 : 63.
 - 16) Lee MS, Trindade MC, Ikenoue T, et al. Intermittent hydrostatic pressure inhibits shear stress-induced nitric oxide release in human osteoarthritic chondrocytes *in vitro*. *J Rheumatol* 2003 ; 30 : 326.
 - 17) Islam N, Haqqi TM, Jepsen KJ, et al. Hydrostatic pressure induces apoptosis in human chondrocytes from osteoarthritic cartilage through up-regulation of tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase, p53, c-myc, and bax- α , and suppression of bcl-2. *J Cell Biochem* 2002 ; 87 : 266.
 - 18) Nishisaka F, Sohen S, Fukuoka H, et al. Interleukin-4 reversed the Interleukin-1-inhibited proteoglycan synthesis through the inhibition of NO release : a possible involvement of intracellular calcium ion. *Pathophysiology* 2001 ; 7 : 289.
 - 19) Nishida K, Doi H, Shimizu A, et al. The role of IL-4 in the control of mechanical stress-induced inflammatory mediators by rat chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2003 ; 5 Suppl 3 : 57.

* * *



話 題

変形性関節症の発症機序*

—NOからみたOA治療へのアプローチ—

西田圭一郎** 清水 晃*** 依光正則**
土井英之** 相賀礼子** 井上 一**

Key Words : osteoarthritis, aging, mechanical stress, cytokine, nitric oxide

はじめに

20年程前までは、変形性関節症(OA)は関節軟骨の加齢に伴う単なる磨耗と捉えられ、薬物によりその自然経過を変えることは困難と考えられていた。現在ではOAは生物学的なプロセスの結果ひき起こされる疾患であることが判明し、種々の薬物治療法の模索が始まっている¹⁾。軟骨細胞は関節軟骨における唯一の基質産生細胞であり、その障害および基質の変性の修復は近年の技術進歩によっても依然困難であるため、OAの有効な治療法開発にはOA初期病態の解明が必須である(表1)。滑膜炎の免疫学的関与については依然議論があるが、一般的には軟骨破壊の結果生じる軟

骨組織の分解産物に対する反応性の炎症であり、その出現はある程度病態が進行してからであると考えられている。本稿では一酸化窒素(NO)からみたOAの初期病変から、変性に至る病態について最近の知見をもとに考察する。

OAにおける真の初期病変はなにか

OAは関節リウマチ(RA)などにみられる軟骨破壊に比べると進行が緩徐な疾患であり、膝関節におけるアライメントの変化は比較的高齢になってからOAを発症するし、股関節における臼蓋形成不全は比較的若年のうちに前期股関節症を呈するようになる。OAを遺伝的側面から捉えようとする試みも始まっているが、いずれにしても

表1 変形性関節症に対する生物学的治療戦略

基質破壊の抑制
炎症性サイトカイン(IL-1, TNF)の阻害: IL-1Ra, IL-1sR, TNFsR
抗炎症性サイトカイン: IL-4, IL-10, IL-13
蛋白分解酵素(MMP)の阻害: MMP阻害剤, TIMP
基質産生の亢進
成長因子: TGF- β , IGFs, FGF, BMPs
炎症性サイトカインの阻害
フリーラジカルなどの炎症メディエーターの阻害: SOD, NOS阻害剤
軟骨細胞数の維持
アポトーシス阻害: NOS阻害剤, Fas Lの阻害
軟骨細胞あるいは前駆細胞移植

(文献¹⁾より引用改変)

* Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis.

** Keiichiro NISHIDA, M.D., Masanori YORIMITSU, M.D., Hideyuki DOI, M.D., Reiko AIGA, M.D. & Hajime INOUE, M.D.: 岡山大学大学院医歯学総合研究科機能再生・再建科学, 整形外科学(〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1); Department of Orthopaedic Surgery, Science and Functional Recovery and Reconstruction, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama 700-8558, JAPAN

*** Akira SHIMIZU, M.D.: 愛媛大学医学部整形外科



図1 末期OA患者の膝関節
関節破壊が末期に至ると、その治療は、人工関節置換術に頼らざるを得ない。

OA病変は関節の形状や安定性、関節軟骨にかかる負荷や、これらに影響を与える外傷に密接に関係しており、改善されなければ経年的に進行していく。軟骨最表層は関節液を有効にトラップし、関節潤滑に関与すると考えられるが、外傷性関節炎の関節鏡手術の際に、OAとしてはまだ無症状の時期にもかかわらず最表層の膜状の剥離がみられることもしばしばあり、最表層の障害をOAの初期病変と捉える考えもある。一方で、軟骨下骨は軟骨組織以上にショック吸収体として機能しており、この部の微小骨折が軟骨組織にかかる力学的負荷を変化させ、ひいては軟骨代謝に変化をもたらすとの考えもある。軟骨組織の変性が進行すると、軟骨自体もショック吸収体としては働かず、骨端にかかる衝撃はさらに軟骨下骨の微小骨折、これにひき続くリモデリングによる骨硬化を招来し、軟骨下骨の弾性の減少はさらに軟骨破壊を伸展させると考えられる。これらOA発症初期の変化は軟骨代謝を変化させ、軟骨細胞による組織の維持あるいは修復機構が働いて基質産生能は充進し、細胞外基質は膨化し、いわゆる軟骨軟化(chondromalacia)を呈する。この状態は可逆的とされ、要因がとり

除かれれば、正常の代謝に戻る時期でもある。表層の障害や軟骨下骨の障害の防止はほぼ不可能であり、治療側はいかに初期病変を捉え、非可逆の状態に陥らせないようにするかがOA進行防止のカギを握っているといっても過言ではない(図1)。

軟骨変性の進展に関与する因子

以前から指摘されているように、加齢、異常なメカニカルストレス、遺伝的素因は軟骨変性の重要なrisk factorである。異常なメカニカルストレスは、関節の形態、外傷、体重増加、職業、生活様式などの因子によってひき起こされる。一方、OAの進展には軟骨細胞自身からも産生される種々の炎症性サイトカインが関与する。また、MMPs(matrix metalloproteinases)やcathepsinをはじめとする蛋白分解酵素の関与も重要である。MMPsによりプロテオグリカンのコア蛋白が分解を受けると、保水性も失われ、その機能を失う。さらにII型コラーゲンをはじめとするコラーゲンも分解を受けるが、軟骨細胞周囲のマイナーコラーゲンの分解も、細胞接着やシグナル伝達にとって非常に重要と思われる。一方で、軟骨細胞による基質産生能自体もとくに表層においては著しく減少する。

他方、RAやOA患者の関節液や組織中では正常に比較して高いレベルのNOが検出される²⁾ことから、関節炎症の進展にNOが大きく関与していることが示唆されてきた。NOは生体防御にも、障害性にも働き得るガス・メディエーターであるが、誘導型NO合成酵素(iNOS)が発現すると、ほかのアイソフォームの1,000倍以上の持続的・高濃度のNOが産生されることがわかっており、生体防御的に働くか、組織障害性に働くかはその局所濃度に依存するといわれる。NOはさらにスーパーオキシド(O_2^-)と反応して細胞障害性の強いperoxynitriteに変換され、軟骨細胞のDNAを障害し、脂質や蛋白の変性を装飾する³⁾。以下では個々の軟骨変性因子とNOの関係についてとくに最近の報告から考察する。

加齢とNO産生

軟骨組織の器官培養ではOA軟骨は無刺激でNOやPGE₂を産生することは以前から知られていた。

Minら⁹⁾はNO産生に与える加齢, OA変化の影響を*in vitro*で検討した。無刺激の状態では, 高齢者の非荷重部および荷重部軟骨細胞は若年者の軟骨細胞のそれぞれ5倍, 15倍のNOを, OA軟骨細胞は約7倍のNOを産生する。一方, IL-1 β によって誘導されるNO産生量は若年者の軟骨細胞に比べて高齢者では非荷重部の軟骨細胞で約2倍, 荷重部で約4倍であるが, その増加率は加齢とともに減少しており, OA軟骨細胞ではIL-1 β による産生誘導はほとんどみられない。一方, iNOS阻害剤であるaminoguanidine (AG)はiNOS発現を若年, 老年, 荷重, 非荷重にかかわらず, 正常軟骨では完全に阻害するが, OA軟骨では完全には阻害し得ない。また, IL-1 β によるII型コラーゲン産生抑制はOA軟骨細胞でより顕著であった。以上の結果は, 加齢により軟骨細胞はより多量のNOを産生すること, IL-1 β 刺激に対する反応性は加齢およびOA変化により減弱すること, すでにOA軟骨細胞は最大量のNO産生を行っていることを示唆しており, 正常軟骨細胞とOA軟骨細胞の質的相違(分化度の違い)が関与していると思われる。さらに, Millward-SadlerらによってOA軟骨細胞では, メカニカルストレスに対する応答も変化していることが報告されている⁹⁾。Loeserらは酸化ストレスの指標にニトロチロシン(NOによる組織内チロシン残基ニトロ化の指標, NT)の染色性を用いて, 若年および老年サル, ヒトOAの軟骨組織を検討した¹⁰⁾。NT染色性は年齢およびOA変化に関連しており, また同時に行ったIL-1 β の染色性と一致した。一部の老齡サル軟骨ではIL-1の存在なしにNT染色性が亢進しているものがあり, 年齢に関連した酸化ストレスはIL-1非依存性であると報告している。

メカニカルストレスとNO

軟骨細胞に対するメカニカルストレスを*in vitro*で再現する方法としてはこれまで, 静的圧負荷, 伸張ストレス, shearストレスなどさまざまな方法が試みられている。上記のように, 正常軟骨細胞とOA軟骨細胞ではメカニカルストレスに対する反応は異なる。また, 刺激のサイクルや負荷量といったストレスの条件を変えたり, 単層, 三次元培養, 器官培養など細胞培養の条件によっては,

軟骨細胞は異なる反応を示すことも知られている。生体内でも軟骨組織は表層から石灰化層に至る層状構造を示し, またそれぞれの深度によって酸素分圧も異なることから, メカニカルストレスに対する応答も異なるものと考えられる。また, 炎症性メディエーターに対する反応も異なっており, たとえば表層の軟骨細胞は深層に比較してIL-1刺激に対する反応性が高い¹¹⁾。

軟骨細胞によるメカニカルストレスに対するNO産生については, 亢進するとの報告と逆に抑制されるとの報告があるが, 上述のように刺激条件が異なっており, また生体内のどのような状態を反映しているかの評価も難しい。われわれのラット正常軟骨細胞を用いた実験では, 0.5Hz, 7%伸張ストレスは時間依存性にiNOSおよびNO産生を亢進させる。この刺激はアグリカン, II型コラーゲンの遺伝子発現を24時間刺激で低下させるストレス条件であり, 比較的強い刺激であると考えられる⁹⁾。Leeら¹²⁾によると, OA軟骨細胞ではshearストレスに応じて負荷および時間依存性にNO産生が亢進することを報告している。静水圧はこのNO産生を抑制するが, ストレスなしでも内因性NOには影響を与えない。Shearストレスにより産生されたNOあるいはNO供与体によるNOはアグリカン, II型コラーゲンのmRNAレベルを下げ, 間欠的圧負荷はSNPによるこの抑制効果をブロックしたが, shearストレスによる遺伝子発現に影響を与えなかった。一方, Islamら¹³⁾は持続的な静水圧は5 Mpa, 4時間, 1HzでiNOSのmRNAレベルでの発現亢進を認めた。また, 2時間でbcl-2の発現低下を, 4時間ではDNA fragmentation, caspase-3活性化, PARPの分解による軟骨細胞のアポトーシスを誘導することを報告している。

一方, *in vivo*でのOAモデルの多くは, 靭帯切離により異常なメカニカルストレスを誘導するものが多く, 短期間でOAが進行することから薬効評価にも用いられるが, 軟骨組織におけるNO産生は亢進するとの報告が多い。イヌあるいはウサギでは, 前十字靭帯切離によるOAモデルがよく使用されており, Hashimotoら¹⁴⁾は前十字靭帯切離による実験的OAモデルにおいてTUNEL陽性細胞率とNO産生が相関することを報告してい

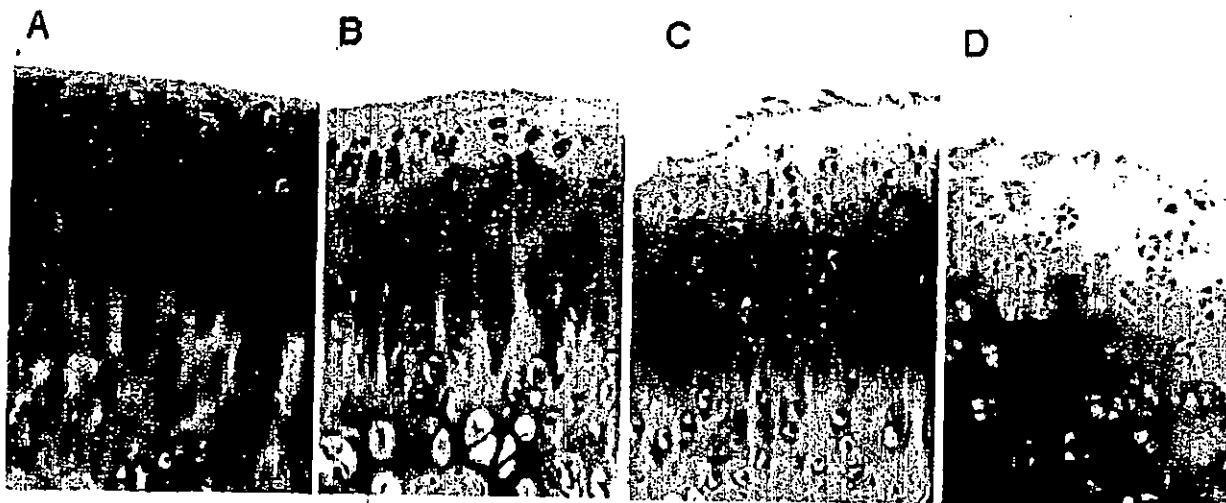


図2 ラット膝関節軟骨における種々のOA変化

前十字靭帯、内側側副靭帯の切離、内側半月板切除によりOAモデルを作成し、術後6週までの変化をサフラニンO染色で組織学的にみた。A: 関節包のみの切開、B: 表層のサフラニンOの染色性の低下と細胞数の増加、C: 表層のfibrillationと細胞数の低下、D: 表層の消失と軟骨細胞のクローニング、配列異常。

る。われわれの経験からは、ラットにおいては前十字靭帯切離のみではOA変化は軽微であり、プロテオグリカンの喪失はあっても短期間で強い形態学的な変化は生じない。しかし、臨床的にも重要ないわゆるunhappy triadとして内側側副靭帯切離、内側半月板切除を加えると、軟骨破壊は4~6週で急速に進行する¹¹⁾(図2)。このことは、加齢とは関係なく、程度によってはメカニカルストレスのみでOA病態の再現が可能であることを示す。

サイトカインとNO

OAの関節炎においてIL-1, TNF α といったサイトカインはMMPsの誘導を通じてマトリックス破壊に関与したり、プロテオグリカン産生を抑制するほか、iNOSやCOX(cyclooxygenase)-2などの発現によりNOやPGE₂といった炎症のメディエーターを誘導して、滑膜炎と軟骨破壊に中心的な役割を果たす。培養軟骨細胞では、IL-1, TNF α , IL-17, IL-18といった炎症性サイトカインやLPS(lipopolysaccharide)刺激によるiNOSの発現誘導がみられる¹²⁾。

IL-1はOAやRA患者の関節液中に多量に認められ、MMPによる基質分解を促進し、細胞外基質の産生を抑えることにより軟骨破壊に強く関与する。IL-1 β のレセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)がOAあるいはRAの動物モデルにおいて軟骨破壊

を抑制することからも、IL-1 β の軟骨組織への強い影響が示唆される¹³⁾。培養軟骨細胞ではIL-1 β 刺激に反応して刺激後約12~48時間で多量のNOを産生するが、ラット膝関節へのIL-1 β 関節内注入では、関節液中のNOは約10時間でピークに達し、24時間までに元のレベルに復帰する。さらにNOはIL-1 β によるプロテオグリカン産生抑制に関与することも知られているが、IL-1 β 関節内注入後のプロテオグリカン産生の著明な抑制は2日の間にみられる。これらの結果は、NOはIL-1 β による軟骨破壊における初期のメディエーターであることを示唆する。一方で、NO合成酵素阻害剤の関節内投与、ならびにosmotic pumpによる持続的腹腔内投与は、IL-1 β 関節内注入によるプロテオグリカン産生抑制に拮抗するが、IL-1 β の効果を完全に障害するほど十分ではないことも報告されている¹⁴⁾。われわれはNOS阻害剤の効果検証のため、iNOSノックアウトマウスに関節炎を誘導して軟骨破壊の程度を検討したが、組織変化を有意に抑制する一方で血清中のIL-1および軟骨組織中のMMP-3, MMP-9発現は野生型と比べて差がなく、NOS阻害剤単独での使用には限界があると考えている¹⁵⁾。

また、最近では、RAに対する生物学的治療としてのキメラ型抗ヒトTNF α モノクローナル抗体infiximabや可溶性TNF α 受容体化合物etanerceptの有用性が示され、臨床応用が各国で始まって

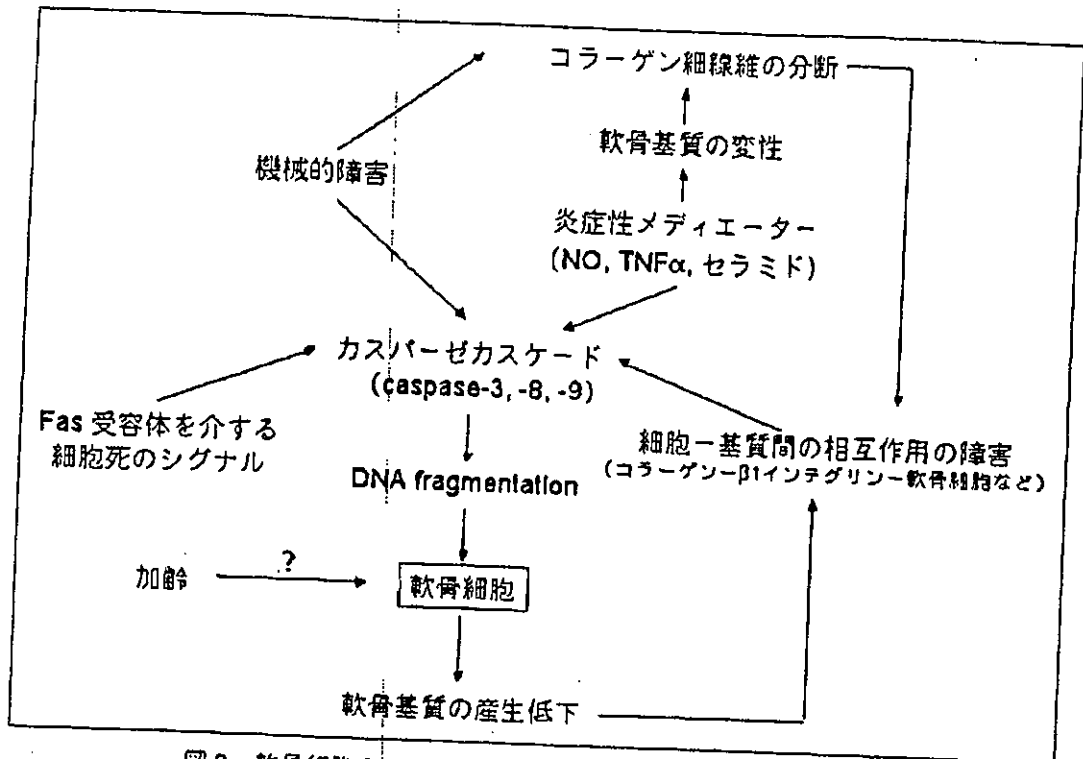


図3 軟骨細胞のアポトーシス誘導因子(文献¹⁶⁾より引用改変)

いる。Vuolteenahoら¹⁶⁾によると、これらTNF α 拮抗薬は、軟骨の器官培養において、iNOS発現低下を伴う容量依存性のNO産生抑制効果を示す。また、TNF α の可溶性受容体sTNF α RIに対する中和抗体の培養液中への添加はNO産生を亢進させることから、OA病態においても、内因性のTNF α およびその可溶性受容体がNO産生を調節していることが示唆される。

一方、IL-4、IL-10、IL-13といった抗炎症性サイトカインはIL-1やTNF α といった炎症性サイトカインに拮抗する。Wangら¹⁷⁾の報告によると、ラット軟骨細胞においてIL-10(20ng/ml)はIL-1に拮抗して細胞死を抑制し、iNOSおよびMMP-3の発現を抑制した。われわれの最近の研究では、IL-4は伸張ストレスの結果発現が亢進するiNOS mRNAレベルを用量依存性に低下させる¹⁸⁾。また、IL-4とIL-10の同時投与は軟骨細胞によるIL-1Raの産生量を変えずにIL-1およびTNF α の発現を抑え、結局IL-1/IL-1Ra比を減少させることにより、軟骨保護的に作用する¹⁹⁾。

OA病態における軟骨細胞死

軟骨細胞死は組織学的にも、OA初期から認められるようになる。OAの病態において軟骨細胞

死は重要であり、軟骨組織中の唯一の基質産生細胞である軟骨細胞の減少により軟骨修復が妨げられたり、軟骨変性が進展すると考えられる。軟骨組織に比較的緩やかな衝撃を加えた場合には、細胞死は主にアポトーシスによって生じると報告されているが、一方で強く早い衝撃(53MPa, 250ms)を加えた場合にはアポトーシスではなく、ネクローシスが軟骨の亀裂周辺に生じる。強い衝撃の場合、インパクターの周辺に細胞死が生じやすく、かえって中心部には生じにくい。このことは衝撃の強度や弾性による変形のみでは細胞死は生じないことを示す¹⁹⁾。したがって、急激な衝撃によって起こる軟骨細胞のネクローシスに対しては、衝撃によって生じた亀裂の修復・安定化が必要であり、一方で比較的緩やかな衝撃が繰り返し起こる場合には、アポトーシスを抑止することが有効となる。前述の衝撃力によって誘導された軟骨細胞のアポトーシスは、部分的にしてもカスパーゼ阻害剤で防止できることも報告されている²⁰⁾。

軟骨細胞のアポトーシスは1995年頃から研究が盛んになった。これまでの研究で繁用されてきたTUNEL染色は偽陽性を生じやすく、10%とも20%とも報告されてきた軟骨細胞のアポト-

シスの出現率は進行の緩徐なOAの臨床像に合致しない。むしろ、0.02~0.04%に脳神経細胞のアポトーシスが生じるとされるアルツハイマー病のように、OA軟骨におけるアポトーシスはかなり低い率で生じているものと考えられ、また慢性疾患としてのOAの臨床像をより反映する。

軟骨細胞のアポトーシスは、NOやFas Lがその原因として報告されているが、そのほかの誘因、たとえば低酸素、基質のアポトーシス、異常なメカニカルストレス、向炎症性サイトカインの影響については検討が始まったばかりである。また、IGF-1などの成長因子や抗炎症性のサイトカインがアポトーシスを抑制できるかについてもほとんど検討されていない。イヌのACL切離OAモデルではiNOSの選択的阻害剤であるN-iminoethyl-L-lysine(L-NIL)の投与により、軟骨変性、骨棘形成が有意に抑制され、組織学的な検討でもL-NIL投与群においてiNOS, nitrotyrosine, COX-2, MMP-1, MMP-3の発現率が減少する²¹⁾。さらに同様の系において軟骨細胞のアポトーシスとcaspase-3の発現率もNOS阻害剤により低下することも報告されている²²⁾。いずれにしても、軟骨細胞のDNA fragmentationを誘導するカスパーゼの活性化は、サイトカインやNOなどのケミカルメディエーター、軟骨損傷などによる細胞外基質の変性、あるいはそれらの直接効果によって細胞-基質間接着の阻害を介して誘導され、軟骨細胞の数の減少は基質産生能の低下を介した軟骨変性に向かう悪循環に陥ると考えられる²³⁾(図3)。

おわりに

変形性関節症(OA)を可及的早期に把握し、適切な治療に導く上で、今後さらにMRIを含めた画像診断の進歩、あるいは病態を反映するより有用な関節マーカー、血清・尿中マーカーの発見、臨床応用が重要と思われる。OA初期を把握し得ても、形態、アライメント異常、外傷を基盤とする場合には手術的介入あるいは理学療法による関節の安定化、筋力強化、さらには装具療法が必須となる。その上で、軟骨代謝異常を是正し、非可逆的な変性を防止し得る生物学的アプローチに関する研究は、今後ますます必要になってくると考えられる。

文 献

- 1) Evans CH, Robbins PD. Potential treatment of osteoarthritis by gene therapy. *Rheum Dis Clin North Am* 1999; 25: 333.
- 2) Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, et al. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1219.
- 3) 西田圭一郎, 土井英之, 藤原一夫, ほか. 変形性関節症における軟骨破壊とNO. In: 平澤泰介, 井上一, 高岡邦夫, ほか・編. 先端医療シリーズ 22 整形外科の最新医療. 東京: 先端医療技術研究所; 2003. p. 81.
- 4) Min BH, Kim HJ, Lim H, et al. Effects of ageing and arthritic disease on nitric oxide production by human articular chondrocytes. *Exp Mol Med* 2001; 33: 299.
- 5) Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, et al. Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through alpha5beta 1 integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 272.
- 6) Loeser RF, Carlson CS, Del Carlo M, et al. Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2349.
- 7) Fukuda K, Kumano F, Takayama M, et al. Zonal differences in nitric oxide synthesis by bovine chondrocytes exposed to interleukin-1. *Inflamm Res* 1995; 44: 434.
- 8) Nishida K, Doi H, Shimizu A, et al. The role of IL-4 in the control of mechanical stress-induced inflammatory mediators by rat chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2003; 5 Suppl 3: 57.
- 9) Lee MS, Trindade MC, Ikenoue T, et al. Intermittent hydrostatic pressure inhibits shear stress-induced nitric oxide release in human osteoarthritic chondrocytes *in vitro*. *J Rheumatol* 2003; 30: 326.
- 10) Islam N, Haqqi TM, Jepsen KJ, et al. Hydrostatic pressure induces apoptosis in human chondrocytes

- from osteoarthritic cartilage through up-regulation of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase, p53, c-myc, and bax-alpha, and suppression of bcl-2. *J Cell Biochem* 2002 ; 87 : 266.
- 11) Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, et al. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998 ; 41 : 1266.
 - 12) Lots M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 1999 ; 25 : 269.
 - 13) Caron JP, Fernandès JC, Martel-Pelletier J, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* 1996 ; 39 : 1535.
 - 14) Presle N, Cipolletta C, Jouzeau JY, et al. Cartilage protection by nitric oxide synthase inhibitors after intraarticular injection of interleukin-1beta in rats. *Arthritis Rheum* 1999 ; 42 : 2094.
 - 15) Kato H, Nishida K, Inoue H. Effect of NOS2 gene deficiency on the development of autoantibody mediated arthritis and subsequent articular cartilage degeneration. *J Rheumatol* 2003 ; 30 : 247.
 - 16) Vuolteenaho K, Moilanen T, Hamalainen M, et al. Effects of TNFalpha-antagonists on nitric oxide production in human cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002 ; 10 : 327.
 - 17) Wang Y, Lou S. Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes *in vitro*. *Chin Med J (Engl)* 2001 ; 114 : 723.
 - 18) Leo AB, Lubberts E, Durez P, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 1997 ; 40 : 249.
 - 19) Lewis JL, Deloria LB, Oyen-Tiesma M, et al. Cell death after cartilage impact occurs around matrix cracks. *J Orthop Res* 2003 ; 21 : 881.
 - 20) D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, et al. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage* 2001 ; 9 : 712.
 - 21) Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol* 1999 ; 26 : 2002.
 - 22) Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis *in vivo*. Possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 2000 ; 43 : 1290.
 - 23) Aigner T, Kim HA. Apoptosis and cellular vitality : issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* 2002 ; 46 : 1986.

* * *

変形性膝関節症患者の動作解析 —日常生活動作における関節負荷の特徴—

Knee joint loads during various activities of daily living in the patients with knee osteoarthritis

名倉 武雄 松本 秀男 大谷 俊郎 須田 康文
畔柳 裕二 磐田振一郎 戸山 芳昭

慶應義塾大学整形外科

Takeo NAGURA, Hideo MATSUMOTO, Toshiro OTANI, Yasunori SUDA,
Yuji KUROYANAGI, Shinichiro IWATA, Yoshiaki TOYAMA

Department of Orthopedic Surgery, Keio University

Knee loads were evaluated in 7 patients with knee osteoarthritis (OA) during walking, stairs and deep flexion activities. A motion analysis system was used to obtain knee kinematics and kinetics. Eleven healthy volunteers were also analyzed to compare the knee mechanics during the activities. The patients showed reduced the knee flexion moment during stair descending and rising from maximum flexion, while the knee adduction moments were greater than the normal knees in all activities. The different knee joint loads with OA patients should result from several clinical aspects of the patients, such as reduced function of the quadriceps muscle, pain, and the static alignment of the knee.

key words : Osteoarthritis (変形性関節症)

Joint load (関節負荷)

Deep flexion (深屈曲)

はじめに

変形性膝関節症（以下膝 OA）患者の歩行中の関節負荷の特徴として、膝外反モーメント（Knee Adduction Moment）の増大がある。この外反モーメントは下肢アライメント（荷重時 FTA）と強く相関し、膝 OA の病勢をよく反映しすることが知られている^{3,4,9}。このように関節負荷の計測は膝 OA の病態を把握するうえで有用であるが、膝 OA 患者についてより負担の大きい階段降下や深屈曲動作中の関節負荷について検討している研究は少ない。膝 OA 患者ではこれらの動作で疼痛を訴えることが多く、臨床症状と関節負荷の関係が注目される。本研究では膝 OA 患者の日常生活動作、とくに 90° 以上の深い屈曲動作における関節負荷について検討した。

対象および方法

X 線で腰野分類 2 度以上の変形があり日常生活動作に支障のない膝 OA 患者 7 例（年齢：67-78 歳，平均 71 歳，HSS スコア：79-94 点，平均 87 点，関節可動域：120-155 度，平均 140 度）を対象とした。OA の grade は 2 度および 3 度が 3 例，4 度が 1 例で，全例内側型 OA であった。動作解析装置（Qualysis 社製）および床反力計を用いて，下肢に貼付した 6 つのマーカの位置と床反力を計測し，4 種類の動作中の膝関節負荷を Inverse Dynamics 法¹⁾をもちいて計算した。対象動作は，平地歩行，階段昇降および深屈曲からの起立とした。深屈曲からの起立では，被験者は側方に設置した台を指示として，最大屈曲位からの片脚起立を行った（Fig. 1）。対照として健常者 11 名（平均年齢 30 歳）について同様に計測を行い，膝 OA 群と比較検討した。

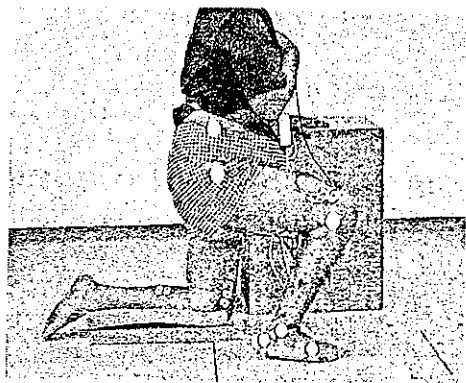


Fig. 1 最大屈曲位からの片脚起立
膝 OA 患者では側方に台を設置し、これを支持として動作を行った。

結 果

各動作中の膝関節最大屈曲角は、階段上昇を除く3つの動作で膝 OA 患者において小さかった (Fig. 2)。膝屈曲モーメントは膝 OA 群で、全ての動作において小さく、階段降下、深屈曲からの起立では有意差を認めた (Fig. 3)。膝外反モーメントは、全ての動作において膝 OA 群で有意に小さかった (Fig. 4)。膝関節外力は膝 OA、コントロールとも階段降下中が最大であり、歩行中の後方、垂直外力および深屈曲からの起立中の後方外力が OA 群において小さかった (Table 1)。

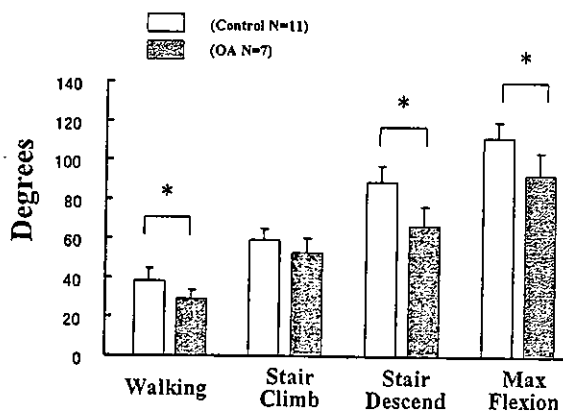


Fig. 2 各動作中の膝関節最大屈曲角度の比較
*p<0.05

考 察

今回の検討で、膝 OA 患者ではさまざまな日常生活動作において健常者と異なる関節負荷のパターンがみられることがわかった。膝屈曲モーメントは膝伸筋 (大腿四頭筋) により拮抗されるため、動作中の大腿四頭筋機能の指標と

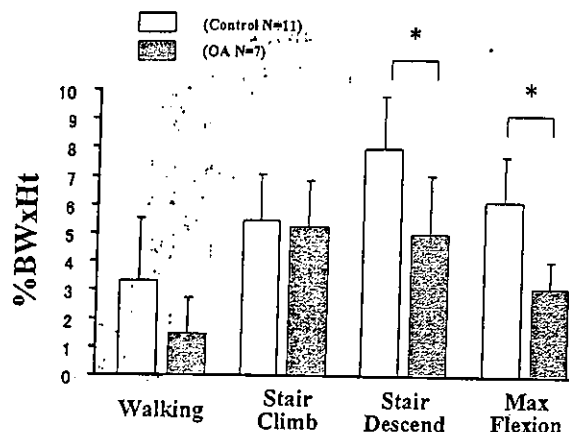


Fig. 3 各動作中の膝関節屈曲モーメントの比較
%BW × Ht = %体重 × 身長。*p<0.05

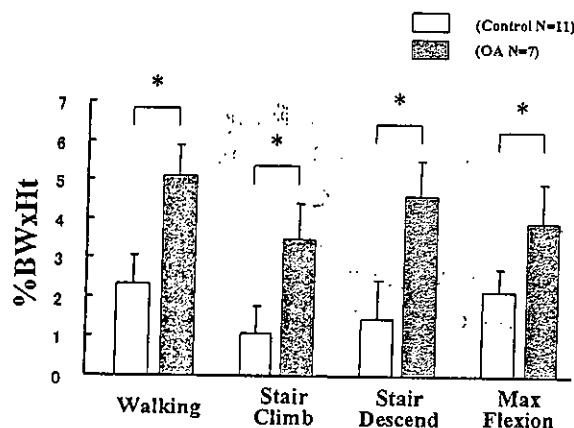


Fig. 4 各動作中の膝関節外反モーメントの比較
%BW × Ht = %体重 × 身長。*p<0.05

Table 1 各動作中の膝関節外力の比較 (単位 %体重)

動作	群	垂直外力後方外力	
		垂直外力	後方外力
歩行	健常群	37.4 (6.2)	112.5 (14.3)
	膝OA群	25.3 (5.0)*	93.4 (5.7)*
階段上昇	健常群	41.6 (7.9)	100.3 (6.4)
	膝OA群	36.5 (5.7)	90.0 (7.8)
階段降下	健常群	60.4 (11.0)	115.6 (16.5)
	膝OA群	50.5 (5.7)	114.4 (15.9)
深屈曲から起立	健常群	47.2 (11.7)	85.5 (18.0)
	膝OA群	28.0 (5.8)*	78.3 (0.2)

* P<0.05

考えられる。また膝屈曲モーメントは、歩行中に疼痛のある患者では減少することが知られている^{2,3)}。本結果では膝 OA 患者は階段降下や深屈曲などより負荷の大きな動作で屈曲モーメントの低下が顕著であり、これらの動作で四頭筋機能の低下や疼痛の影響がより大きく反映されていたと考えられる。事実、膝スコア (HSS)

と屈曲モーメントの相関は、歩行 ($R=0.06$) よりも階段降下 ($R=0.36$) や深屈曲からの起立 ($R=0.46$) で高くなる傾向を示した。膝 OA 患者における膝外反モーメントは全ての動作で増大しており、内反変形が関節負荷に影響したものと考えられる^{4,5)}。立位 FTA との相関は歩行 ($R=0.63$) で最も高く深屈曲からの起立 ($R=0.27$) では相関が低かった。これは歩行では立脚期において膝が伸展位をとるため、より下肢の静的アライメントが関節負荷に反映された結果となったと考えられた。

ま と め

1) 膝 OA 患者 7 名について 4 種類の日常生活動作中の膝関節負荷について評価した。

2) 膝 OA 患者では、階段降下や深屈曲からの起立などより負荷の大きい動作で膝屈曲モーメントが減少していた。また膝外反モーメントが全ての動作で増大していた。

3) 膝 OA 患者における関節負荷は、大腿四頭筋機能の低下、運動時の疼痛や下肢の内反変

形を反映していると考えられた。

文 献

- 1) Andriacchi T.P., Galante J.O., et al.: The influence of total knee-replacement design on walking and stair-climbing. *J Bone Joint Surg Am.*, 64: 1328-1335, 1982.
- 2) Goh J.C., Bose K., et al.: Gait analysis study on patients with varus osteoarthritis of the knee. *Clin.Orthop.*, 294: 223-231, 1993.
- 3) Hurwitz D.E., Ryals A.R., et al.: Knee pain and joint loading in subjects with osteoarthritis of the knee. *J Orthop Res.*, 18: 572-579, 2000.
- 4) Hurwitz De., Ryals A.B., et al.: The knee adduction moment during gait in subjects with knee osteoarthritis is more closely correlated with static alignment than radiographic disease severity, toe out angle and pain. *J Orthop Res.*, 20: 101-107, 2002.
- 5) Sharma L., Hurwitz D.E., et al.: Knee adduction moment, serum hyaluronan level, and disease severity in medial tibiofemoral osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 41: 1233-1240, 1998.

変形性膝関節症患者における歩行時 膝関節内反角度の変化 —動的 FTA 評価の試み—

Changes in varus angle during gait in patients
with knee osteoarthritis
—Evaluation of dynamic femoro-tibial angle—

畔柳 裕二 名倉 武雄 松本 秀男 大谷 俊郎
須田 康文 磐田振一郎 桐山 善守 戸山 芳昭

慶應義塾大学整形外科

Yuji KUROYANAGI, Takeo NAGURA, Hideo MATSUMOTO,
Toshiro OTANI, Yasunori SUDA, Shinichiro IWATA,
Yoshimori KIRIYAMA, Yoshiaki TOYAMA

Department of Orthopedic Surgery, Keio University

Clinical evaluation of knee osteoarthritis (OA) is usually on X-ray, while the patients experience pain during the motions. And the varus deformity of the knee is also diagnosed by femoro-tibial angle (FTA) under weight bearing. This study was designed to measure the dynamic changes in varus angle of the knee during walking with knee OA patients, using skin marker based 3D motion analysis system.

Thirty seven medial OA knees in 25 patients and 24 knees in 12 volunteers were tested at the gait laboratory. The varus angles of the knee defined by skin markers at heel strike were 180.0 ± 2.4 , 185.2 ± 3.5 , 188.8 ± 4.0 degrees for normal group, moderate OA group, severe OA group, respectively. The angles increased by 0.4 ± 1.1 , 1.9 ± 1.6 , 3.1 ± 1.6 degrees in stance phase, respectively ($p < 0.05$).

This study showed that the varus angle and the changes of the varus angle increased as the grade of the knee OA advanced. An analysis of knee kinematics using skin markers was thought to be a useful tool to evaluate dynamic deformity on coronal plane in OA knees.

膝 29:123~126, 2004

key words : Knee osteoarthritis(変形性膝関節症)
Motion analysis (動作解析)
Femoro-tibial angle(大腿骨脛骨角)

はじめに

本邦における変形性膝関節症(以下 OA)は内反膝を呈するものが多いが、通常その評価には単純レントゲンによる大腿骨脛骨角(以下 FTA)が指標とされる。一方、OA患者は歩行・立ち上がりなどの動作時に疼痛を訴えることが多いが、その際の膝関節内反角がどの程度変化している

かは不明である。これまで膝動作時の動態解析は fluoroscopy による報告が多い^{2,3,4}が、本法は側方入射のため内外反の評価は難しい。今回われわれは三次元動作解析装置を用いて、内側型 OA 患者の歩行中の下肢アライメントの変化を三次元的に計測し、歩行中に生じる膝関節内反角の変化と X 線による病期、臨床症状との関係を解析したので報告する。

対象および方法

X 線で腰野分類 2 度以上の変形があり補助具

を用いずに歩行可能な内側型OA患者25例37膝(男性6膝,女性31膝,67~81歳,平均72.4歳)を対象とした。OAのgradeはgrade2が18膝,grade3が15膝,grade4が4膝であった。Hospital for Special Surgery score(以下HSSスコア)はそれぞれ 87.6 ± 6.1 点, 79.2 ± 6.3 点, 74.2 ± 7.8 点であった。対照として膝に愁訴のない健常者12例24膝(男性12膝,女性12膝,平均21歳)についても同様に計測した。

下肢に6つのマーカー(腸骨稜,大転子,膝関節外側,足関節外果,踵外側,第5中足骨骨頭)を貼付し,10mの平地歩行を4台の特殊カメラ(Qualysis社製,120Hz),床反力計(Bertec社製)を用いて計測した⁹⁾。

得られたデータより,前額面上で大転子,膝外側,足関節外果のマーカーで成す角を'膝関節内反角'(Fig.1),大転子,膝外側,足関節外果の3点で成す平面と進行方向の成す角を'下肢外旋角'(Fig.2)と定義し,各歩行相におけるこれらの変化を分析した。ここで言う進行方向とは,歩行路の方向であり動作解析装置におけるY座標を指す。

Fig.3に示すように膝関節内反角は膝屈曲角度の変化に影響を受けるため,立脚期において膝屈曲角度が近似する2点において膝関節内反角の計測を行った。接地後,膝が屈曲し伸展すること(double knee action)に着目し,屈曲角度の

極小値を与える時点と接地時において検討した。検討項目は,(1)立位膝関節内反角と立位FTAとの関係,(2)接地時,立脚期(Fig.3)の膝関節内反角の差,(3)接地時,立脚期における膝屈曲角度及び膝外旋角度である。

上記の検討項目についてレントゲン評価でgrade2を中等度OA群(n=18),grade3,4を高度OA群(n=19)とし各群間で比較検討した。統計には分散分析一元配置を用い, $p < 0.05$ で有意差ありとし,相関についてはPearsonの相関係数を用いた。

結 果

- 1) 立位膝関節内反角と立位FTAとの関係:

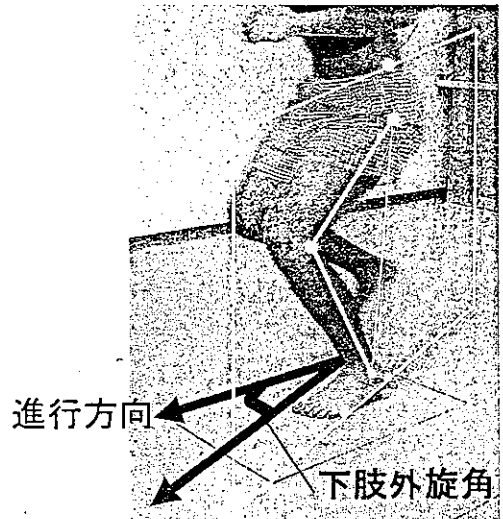


Fig.2 “下肢外旋角”の定義

マーカー3点で成す角と進行方向の成す角を下肢外旋角と定義した。

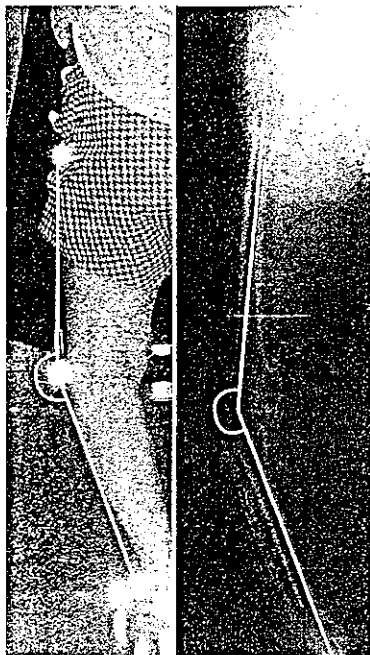


Fig.1 立位膝関節内反角と荷重位FTA

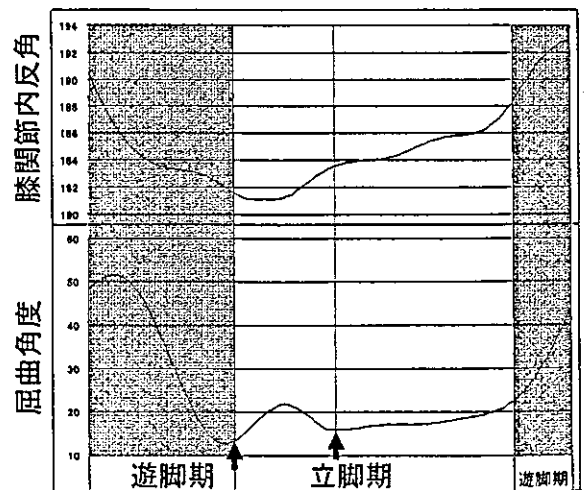


Fig.3 計測した2点(矢印)

屈曲角度がほぼ等しくなる2点(接地時,立脚期)

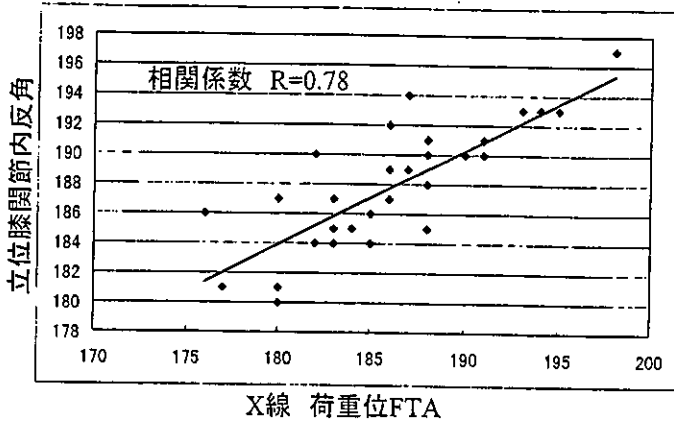


Fig. 4 荷重位 FTA と立位膝関節内反角の関係
相関係数 R = 0.78 と高い相関を認めた。

Table 1 歩行時膝関節内反角の変化量

膝関節内反角(°)	接地時	立脚期	変化量
健常膝	180.0±2.4	180.4±2.3	0.4±1.1
中等度OA	185.2±3.5	187.1±3.3	1.9±1.6
高度OA	188.8±4.0	191.9±4.0	3.1±1.6

p<0.001
p<0.05

マーカによる立位膝関節内反角は立位 FTA と相関係数 0.78 と高い相関を認めた (Fig. 4)。

2) 接地時, 立脚期の膝関節内反角度の差: 接地時と立脚期の膝関節内反角度の差は各群間で有意差を認めた (Table 1)。すなわち OA が高度なほど接地時の膝内反角度は大きく, 立脚期には, さらにその増加量が大きかった。また膝関節内反角の変化量と HSS スコアの相関係数は -0.48 であった。

3) 接地時, 立脚期における膝屈曲角度及び膝外旋角度: 膝屈曲角度は接地時・立脚期において中等度 OA 群でそれぞれ 8.3 ± 5.9 度・12.7 ± 6.6 度, 高度 OA 群では 10.2 ± 5.8 度・14.6 ± 8.3 度であった。また下肢外旋角は中等度 OA 群で 20.2 ± 12.5 度から 21.8 ± 10.1 度, 高度 OA 群で 35.3 ± 12.5 度から 38.8 ± 9.2 度であり, いずれも高度 OA 群で大きかったが, 接地時・立脚期の間各群間で有意差を認めなかった。

考 察

膝関節の内反変形は多くの場合回旋を含む三次元的な変形である。今回検討した膝内反角はこのうち前額面における変化を評価したものである。したがって, 歩行時膝関節内反角の変化については膝関節屈曲角度, 脛骨の回旋角度,

側方動揺性 (lateral thrust) などの影響を考慮する必要がある。Koshino ら⁹⁾は健常膝において屈曲角度が 1 度大きくなると FTA が計測上約 0.1 度小さくなると報告した。すなわち屈曲拘縮などにより屈曲角度が大きくなると見かけ上の内反角が変化する可能性がある。そこで, 今回の検討では屈曲角度の違いによる影響をなるべく小さくなるように, 接地時と荷重時のうち最も屈曲角度が小さかつ近似した 2 点において検討した (Fig. 3)。その結果 OA の X 線上の病期が進行すると膝関節内反角度ばかりでなく, 荷重による内反角の増加量も大きくなることが明らかとなった。臨床症状を反映する HSS スコアと相関係数 -0.48 であるため, 歩行時の下肢内反角の変化量は OA の病態を dynamic に評価する一つの指標となりえると考えられた。

本研究では大転子, 膝外側, 足関節外果に貼付したマーカにより膝関節内反角を計測したに過ぎない。本システムでは skin motion による誤差を有する。しかし本法は動作を拘束することなく三次元の動態解析を行うことができる利点を有する。特に前額面における OA 膝の動的変化を捉えた研究は少ない⁷⁾。Lateral thrust を含めた OA 膝における関節動態は依然不明な点が多く, これらの非生理的な関節動態は OA の病態, 進行に深く関与していると考えられる。

近年の計測手法の発展により, 多数の皮膚マーカを用いてより詳細な計測が可能となっている¹⁰⁾。今後, これらの手法の応用により OA のより詳細な動態解析を行いその有効性を検証したいと考えている。

結 語

- 1) 三次元動作解析装置を用いて OA 患者の歩行中の前額面での下肢アライメントを計測した。
- 2) OA の病期が進行すると膝関節内反角度ばかりでなく荷重による内反角の増加量も大きくなった。
- 3) OA の病態評価には, 三次元動作解析は有用である。

文 献

1) Andriacchi T.P., Alexander E.J., Toney M.K., et al.: A point cluster method for in vivo motion analysis.: applied to a study of knee kinematics. J Biomech Eng., 120: 743-749, 1998.

- 2) Banks S., Bellemans J., Nozaki H., et al.: Knee motions during maximum flexion and mobile-bearing arthroplasties. *Clin Orthop.*, 410: 131-138, 2003.
- 3) Bellemans J., Banks S., Victor J., et al.: Fluoroscopic analysis of the kinematics of deep flexion in total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg.*, 84-B: 50-53, 2002.
- 4) Komistek D., Dennis A., Mahfouz M.: In vivo fluoroscopic analysis of the normal human knee. *Clin Orthop.*, 410: 69-81, 2003.
- 5) Koshino T., Takayama M., Jiang L.S., et al.: Underestimation of varus angulation in knees with flexion deformity. *Knee*, 9: 275-279, 2002.
- 6) 名倉 武雄, 松本 秀男, 大谷 俊郎ほか: 変形性膝関節症患者の動作解析・日常生活動作における関節負荷の特徴. *膝*, 28: 14-16, 2003.
- 7) Ogata K., Yasunaga M., Nomiya H.: The effect of insole on the thrust of osteoarthritic knees. *Int Orthop.*, 21: 308-312, 1997.

工学的アプローチによる 細胞分化・組織形成のコントロール

Control of cell differentiation & tissue regeneration by engineering approaches

Keywords

differentiation
tissue regeneration
scaffold →用語解説 141 頁
physical stimulation
spheroid →用語解説 141 頁

牛田 多加志

東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター
医療材料・機器工学部門

Summary

Methodology for cell differentiation and tissue regeneration *in vitro* is keenly required towards the adaptation to regenerative medicine. The methodology could be composed from three indispensable approaches other than biochemical one. One is an approach from material side, where cells could receive outside-in signal from biomaterials such as collagen, hyaluronan. 3D scaffolds hybridizing biomaterials with biodegradable polymers could be served as an incubator not only for controlling cell differentiation but also for promoting tissue regeneration. The second is physical approach, where cells also could transduce outer physical stimulation into intracellular signals. Hydrostatic pressure, shear stress could be used for regulating differentiation of chondrocytes, endothelial cells, and for regenerating articular cartilage, blood vessel, respectively. The last is one from cell-cell interaction, which is known to be necessary in the developmental steps. Spheroids, as far as necrosis is avoided, are useful for controlling cell differentiation, and could become micro-tissue elements for tissue regeneration.

はじめに

再生医療において、*in vitro*における細胞の分化制御・維持、そして*in vitro*における組織形成は、クリアすべき大きな課題の一つである。細胞分化、組織形成ともに*in vitro*では自ずからその限界があると考えられる。特に組織形成については、細胞壊死の問題と切り離して論ずることはできず、血管網の形成による nutrition と *in vitro* 培養というものを両立させるためには、今後大きなブレイクスルーが要求されると考えられる。このような状況の中で、いかに *in vitro* において再生医療に貢献できる細胞分化制御技術、組織形成技術を開発するかが現在強く求められている。

細胞の分化および組織形成に関する知見は生化学の分野から数多くもたらされている。細胞生物学、分子生物学を含めたこのような生化学的アプロ

Ushida, Takashi

Division of Biomedical Materials and Systems, Center for Disease Biology
and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo
E-mail : ushida@mech.t.u-tokyo.ac.jp

チによる研究は、その研究人口からみても巨大であり、そこからもたらされる最新の知見を再生医療に適用していくのは理にかなっており、より一層推進されるべきものである。生化学的刺激は、細胞増殖因子をはじめとする各種のりガンドとそれに対応するレセプターとの相互作用によりそのシグナルが細胞内に伝達されることから、(細胞内シグナルのクロストークはあるものの) 特定の生化学的刺激により特定の細胞応答を引き出すことが可能であり、細胞分化制御、組織形成制御を目的とする刺激手段としては的確である。

一方、細胞はこれらの生化学的刺激以外にも外部的な刺激により細胞内にシグナルを伝達することが知られている。たとえば、インテグリンを中心とする細胞接着アセンブリは、細胞接着、進展、運動などの inside-out の情報のみならず、接着によってマトリックスからの outside-in のシグナルを細胞へ伝達し、細胞の分化や組織形成をコントロールする役目を担っていることが知られている。その他、特に発生にお

いては、細胞凝集など細胞と細胞が接触することにより細胞分化、組織形成が制御される事実が知られている。このように、細胞-マトリックス相互作用、細胞-細胞相互作用を工学的に実現させることにより、細胞分化、組織形成を制御するというアプローチの方法が考えられる。

また、生化学的刺激のみならず物理的刺激によっても細胞内にシグナルが伝達され、多彩な細胞応答が引き出されることが知られている。生理的にみても、血管には血流によるずり応力、拍動による引張応力が負荷されており、また大腿骨などの長管骨には運動や体重負荷などによる圧縮応力が、関節軟骨には静水圧が負荷されており、これらの物理的刺激が細胞や組織の機能をコントロールしていることが知られている。これらの物理的刺激はいくつかのシグナル伝達カスケードを同時に活性化させることも知られており、生化学的刺激と比較するとブロードな細胞応答を引き起こすが、同様に細胞分化、組織形成のための工学的アプローチとして有効な方法の一つと考え

られる。

図1に示されるように、これらのことから、細胞分化制御、組織形成制御を実現させる工学的アプローチとして、①三次元 scaffold をはじめとする細胞培養担体を用いた方法、②物理的刺激を用いた方法、③細胞-細胞相互作用を用いた方法、が考えられる。これらのアプローチを実現するための技術開発はまだまだ途上にあるが、私どもで行っている研究を紹介しながら、これらの方法の可能性について以下に概説する。

三次元 scaffold による細胞分化、組織形成コントロールの試み

軟骨組織は無神経であり無血管であり、軟骨細胞そのものの酸素要求性、栄養要求性も他の細胞に比べ低いために、ティッシュエンジニアリングを用いた *in vitro* の組織再構築の最も実現可能性の高い組織の一つである。一方で、モザイクプラスティを凌駕するためには、バイオプシする軟骨組織よりも大きな組織を再構築する必要があり、そのためには生体外での細胞増殖ステップが不可欠である。関節軟骨の基質を構築するコラーゲンはII型であり、線維性軟骨組織のコラーゲンはI型である。しかしながら、この増殖ステップにより関節軟骨細胞は脱分化し、産生するコラーゲンの型をII型からI型へ変換する。したがって、脱分化した軟骨細胞をいかに再分化させるか、その技術の確立がティッシュエン

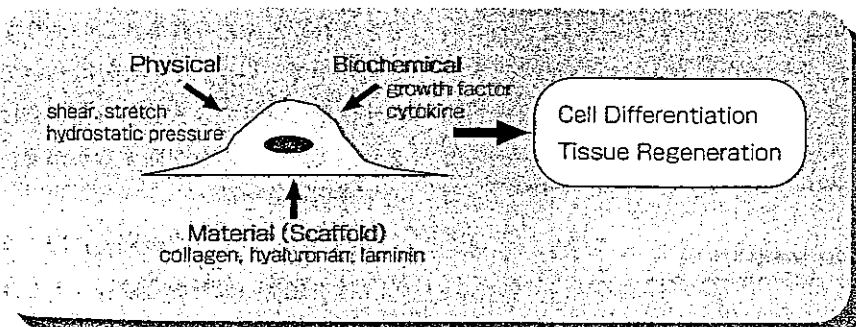


図1 工学的アプローチによる細胞分化・組織形成コントロールのための要素技術