

Figure 7. T-averaged size distribution analyzed by the histogram method for 45C52/45A53 with different NaCl concentrations: (a) 10, (b) 100, and (c) 150 mM. (d) Respective transmittance changes at 500 nm as a function of temperature (total concentration, 1.0 mg/mL; temperature, 20 °C; detection angle, 90°; solvent, 10 mM Tris-HCl; rate, 0.5 °C/min).

several concentrations (1–10 mg/mL). The T_{cp} values of Me-PiPrOx-acrylate, dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), exhibited a remarkable dependence on the concentrations of both the oligomer and NaCl. The transmittance curves become duller by shifting to a higher temperature region as a result of the decreasing concentration of the oligomer solutions. Obviously, more than a 5 °C decrease in T_{cp} was observed at every oligomer concentration by adding 150 mM NaCl to the solution (Figures 8 and 9). Also, there was a gradual decrease in the T_{cp} at each oligomer concentration with an increase in the NaCl concentration (10, 100, 150 mM) (Figure 9). Alternatively, all of the ω -hydroxyl-terminated PiPrOx oligomers (Me-PiPrOx-OH) exhibited a sharp thermoresponsivity in the relatively higher temperature region (44–51 °C) compared to that of the Me-PiPrOx-acrylate, and the dependency of T_{cp} on the oligomer and NaCl concentrations was less pronounced. As the NaCl concentration increased from 0 to 150 mM, the decrease in the T_{cp} of Me-PiPrOx-OH was only in the range of a few degrees (Figures 8 and 9).

Note that turbidimetric behavior similar to that of PiPrOx has also been observed for poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm), a typical thermosensitive polymer as well as the chemical isomer of PiPrOx, at least in a similar molecular weight ($M_n \leq$ ca. 10 000) range. In particular, the LCST values of the end-functionalized PNIPAAm oligomers ($M_n \leq$ ca. 10 000) were found to have a significant dependence on either the hydrophilic or hydrophobic property of the terminal end group. For instance, ω -hydroxyl-terminated PNIPAAm with lower molecular weight from 3300 to 8000 demonstrated even higher LCST values of ca. 36–50 °C.^{16b,c} This was considered to be a result of the

comparatively enhanced hydrating contribution of hydrophilic ω -hydroxyl groups in the PNIPAAm oligomers, compared to that for those of higher molecular weight in which the ratio of the ω -terminal hydroxyl groups to the backbone is lower. In contrast, PNIPAAm with hydrophobic terminal ends, such as alkyl, phenyl, and pyrenyl groups, had LCST values shifted toward lower temperatures, which were quite pronounced with decreasing molecular weight.^{16a,b,d–g} Moreover, the PNIPAAm oligomers with hydrophilic terminal ends showed relatively sharp transitions, whereas those of the hydrophobic terminal ends had a tendency toward early onset as well as also decreasing in their cloud-point curves, presumably resulting from the difference in the rate of aggregation.^{16g} On the basis of these results from the PNIPAAm oligomer solutions, a similar explanation could be adapted for the higher T_{cp} values exhibiting a sharper transition of Me-PiPrOx-OH with the hydrophilic ω -hydroxyl groups than those of Me-PiPrOx-acrylate with hydrophobic ω -acrylate groups. As far as the notable dependency of T_{cp} of the PiPrOx oligomers on the NaCl concentration, this could be understood through the well-known “salting-out” effect of NaCl,¹⁷ as also observed in previous studies of polyoxazolines including PiPrOx.¹⁸ The T_{cp} values of

(16) (a) Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Suzuki, K.; Aoyagi, T.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Colloids Surf., B* **1997**, *9*, 37. (b) Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Aoyagi, T.; Sakurai, Y.; Okano, T. *J. Controlled Release* **1998**, *53*, 119. (c) Kohori, F.; Sakai, K.; Aoyagi, T.; Yokoyama, M.; Sakurai, Y.; Okano, T. *J. Controlled Release* **1998**, *55*, 87. (d) Xia, Y.; Yin, X.; Burke, N. A. D.; Stöver, H. D. H. *Macromolecules* **2005**, *38*, 5937. (e) Duan, Q.; Miura, Y.; Narumi, A.; Shen, X.; Sato, S.-I.; Satoh, T.; Kakuchi, T. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 1117. (f) Furyk, S.; Zhang, Y.; Ortiz-Acosta, D.; Cremer, P. S.; Bergbreiter, D. E. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 1492. (g) Xia, Y.; Burke, N. A. D.; Stöver, H. D. H. *Macromolecules* **2006**, *39*, 2275.

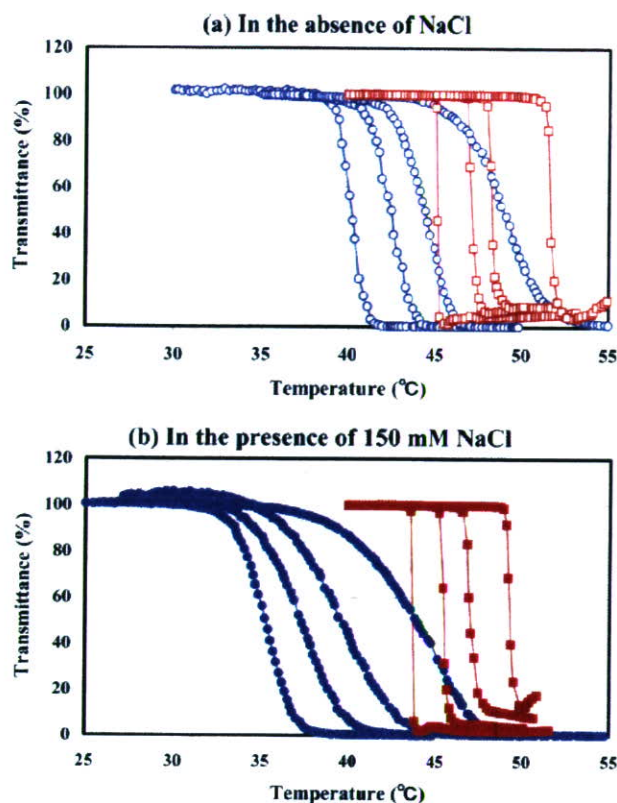


Figure 8. Transmittance changes at 500 nm as a function of temperature under different oligomer concentrations (1–10 mg/mL): (a) in the absence of NaCl (Me-PiPrOx-acrylate, $M_n = 4500$, $M_w/M_n = 1.03$; open circle), Me-PiPrOx-OH ($M_n = 4500$, $M_w/M_n = 1.03$; open square) and (b) in the presence of 150 mM NaCl (Me-PiPrOx-acrylate, solid circle; Me-PiPrOx-OH, solid square); 10 mM Tris-HCl buffered solution (pH 7.4); rate, 0.5 °C/min).

the respective PiPrOx oligomer solutions decrease with increasing concentration of NaCl up to 150 mM. In particular, the NaCl concentration effect on the decreasing T_{cp} values of Me-PiPrOx-OH was relatively alleviated compared to that of the Me-PiPrOx-acrylate, as a result of the existence of a hydrophilic hydroxyl group at the ω -terminal end (Figures 8 and 9). In other words, it was obvious that the salting-out effect of NaCl to decrease the affinity or solubility power of water against the hydrophilic carbonyl groups at the side chain of the Me-PiPrOx-OH oligomer solutions was reduced by the strong hydrating contribution of the terminal ω -hydroxyl groups.

Interestingly, the T_{cp} value of neither the 45C52 nor the 45A53 block ionomer solution both in the absence and the presence of 150 mM NaCl was detected in the measured temperature range up to 75 °C, suggesting the strong hydrating effect of the ionized groups at the side chains of a charged block segment of ionomers (Figure 10a and b). Although there is also possibility for the block ionomer systems to form nanometer-scale micelles composed of a hydrophilic charged outer shell and a hydrophobic PiPrOx inner core resulting from aggregation among the PiPrOx oligomers collapsed over the phase-separation temperature, it was ascertained from the static light scattering (SLS) measurement that no evidence of micellar formation, such as an increase in the light scattering intensity, was observed for the respective

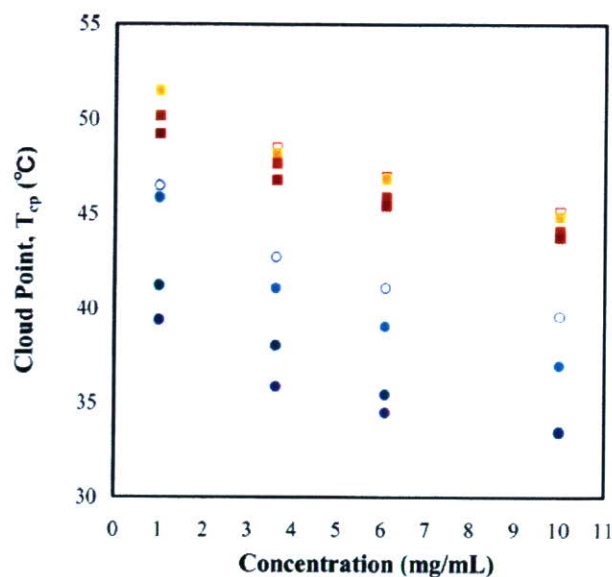


Figure 9. Plots of the changes in the cloud point (T_{cp}) determined from Figure 8 as a function of the respective oligomer concentration (1–10 mg/mL) (Me-PiPrOx-acrylate with 0, open circle; 10, solid light-green dot; 100, dark-green solid dot; and 150 mM NaCl, solid blue dot; Me-PiPrOx-OH with 0, open square; 10, light-orange solid square; 100, medium-orange solid square; and 150 mM NaCl, red solid square).

ionomer solutions in the measured temperature range (25–75 °C) (data not shown).

We next investigated the thermoresponsive behavior of PiPrOx under the formation of PIC micelles. Figure 10a also shows the transmittance changes in the 45C52/45A53 PIC micelles under several total concentrations (0.125, 0.25, 0.5, and 1 mg/mL; 10 mM Tris-HCl buffered solution (pH 7.4) in the absence of NaCl). The results showed a unique characteristic of the PIC micelles. Indeed, the T_{cp} values for the PIC micelles were observed to shift remarkably to a lower temperature than for the PiPrOx oligomers (Me-PiPrOx-OH and Me-PiPrOx-acrylate). Furthermore, all of the micelles with different total concentrations underwent an agglomeration even at a same constant temperature of ca. 33 °C. It was already confirmed in Table 2 and Figure 4 that the diffusion coefficients (D_T) and hence the cumulative average diameters of the PIC micelles remained almost constant under the wide concentration conditions down to 0.125 mg/mL at 20 °C, indicating that the micelles stably exist in the measured concentration region (0.125–1 mg/mL). In addition, the transmittance changes at a constant total concentration (1 mg/mL) but containing different NaCl concentrations up to 150 mM, as was also observed as shown in Figure 7d. The T_{cp} values of the PIC micelles coexisting with NaCl also exhibited a similar temperature, ca. 32 °C, which is similar to that in the absence of NaCl regardless of the NaCl concentration up to 150 mM. Moreover, the turbidimetric behavior of the 45C52/45A53 micelles in the presence of 150 mM NaCl was also investigated by diluting the total concentration from 1 to 0.125 mg/mL (Figure 10b). All of the micelles also showed a turbidity near the constant temperature of ca. 32 °C, and the changing behavior of the transmittance curves was similar to that in Figure 10a. Concerning the 45C52/45A53 micelles under 0.125 mg/mL, it was notable that the turbidimetric curve was rather broadly decreasing with increasing temperature compared to the initial sharp responsivity, obviously resulting from the dependence on the rate of temperature increase (Figure S6 in Supporting Information).

(17) (a) Eckman, F.; Amighi, K.; Moës, A. J. *Int. J. Pharm.* **2001**, *222*, 259. (b) Freitag, R.; Garret-Flaudy, F. *Langmuir* **2002**, *18*, 3434. (c) Liu, X. M.; Wang, L. S.; Wang, L.; Huang, J.; He, C. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5659.

(18) (a) Lin, P.; Pearce, E. M.; Kwei, T. K. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1988**, *26*, 603. (b) Uyama, H.; Kobayashi, S. *Chem. Lett.* **1992**, 1643.

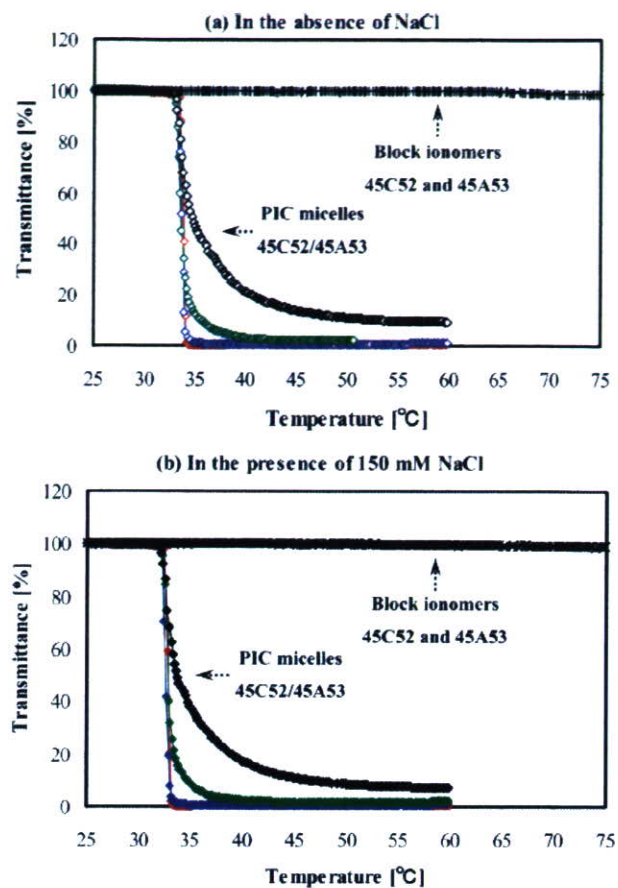


Figure 10. Transmittance changes at 500 nm as a function of temperature for oppositely charged block ionomers (45C52 and 45A53) and their PIC micelles (45C52/45A53): (a) in the absence of NaCl: block ionomers, +; PIC micelles (\diamond , 0.125 mg/mL; open green diamond, 0.25 mg/mL; open blue diamond, 0.5 mg/mL; and open red diamond, 1 mg/mL) and (b) in the presence of 150 mM NaCl: block ionomers, x; PIC micelles (\diamond , 0.125 mg/mL; solid green diamond, 0.25 mg/mL; solid blue diamond, 0.5 mg/mL; and open red diamond, 1 mg/mL); 10 mM Tris-HCl buffered solution (pH 7.4); rate, 0.5 °C/min.

It should be noted that the T_{cp} values for the PIC micelles significantly shifted to a lower temperature (ca. 32–33 °C) when comparing two end-functionalized *PiPrOx* oligomers (Me-*PiPrOx*-OH and Me-*PiPrOx*-acrylate) and, in addition, were almost constant regardless of the total concentration of the system with or without NaCl (≤ 150 mM). It is reasonable to suggest that the remarkable decrease in T_{cp} may be related to the high local concentration of the *PiPrOx* segments on micelles with an appreciable increase in the apparent molecular weight. To put it more concretely, whereas the *PiPrOx* oligomer solutions were significantly related to the intermolecular aggregation behavior through the notable concentration-dependent dehydration process with increasing temperature, the supramolecular assembly, such as PIC micelles with densely packed outer shells, may prefer rapid intramicellar aggregation with an accelerated dehydration process resulting from the high local concentration of the micelles' shell layer. As a result, the T_{cp} values for the PIC micelles could be appreciably shifted to a lower temperature (ca. 32 °C) even rarely depending on the total concentration including NaCl up to 150 mM. In addition, another possible factor is also considered to be the effect of terminal end groups. The ω terminal groups of the *PiPrOx* oligomers, fixed on the shell surface of the present PIC micelles, could not be expected to interfere with the shifts

in T_{cp} . However, it seemed that the hydrophobic methyl groups at the α -terminal ends of the *PiPrOx* oligomers, accumulated on the outermost micelle surfaces through self-assemblies among block ionomers, were also connected with the decreasing T_{cp} of the PIC micelles. As appreciated from the fact that the T_{cp} of Me-*PiPrOx*-acrylate with hydrophobic groups at both terminal ends decreased at a high rate with increasing concentration when comparing Me-*PiPrOx*-OH with the hydrophilic ω -hydroxyl ends, the T_{cp} of PIC micelles could be affected by the hydrophobic methyl groups existing on the outermost micelle surfaces. A similar result is that the presence of the hydrophilic or hydrophobic groups on the outermost surface of the polymeric micelles strongly influenced the shift in the LCST values of the micelles, which was also observed in the micelle system composed of the thermosensitive PNIPAAm outer shell and hydrophobic inner core.¹⁹ Considering the future application as thermosensitive drug delivery vehicles, such as responding to local hyperthermia, it was highly desirable that the T_{cp} of the thermosensitive PIC micelles should be constant regardless of the wide concentration range under physiological conditions. Moreover, the present PIC micelles might be dissociated into free block ionomers not showing thermosensitivity under specific conditions, suggesting their facile separation after fulfilling their mission as a thermosensitive vehicle.

Conclusions

The controlled synthesis of oppositely charged block ionomers (*PiPrOx*-P(Lys) and *PiPrOx*-P(Asp)) was achieved via ring-opening anionic polymerization of *N*-carboxyanhydrides (NCA) (ϵ -benzyloxycarbonyl-L-lysine (Lys(Z)-NCA) and β -benzyl-L-aspartate (BLA-NCA)) with ω -amino-functionalized *PiPrOx* macroinitiators and the subsequent deprotection reaction. Then, polyion complex (PIC) micelles were prepared by the complexation of *PiPrOx*-P(Lys) and *PiPrOx*-P(Asp) under physiological conditions. It was confirmed that the PIC micelles were spherical particles with small polydispersity indices and were very stable without any secondary aggregates. Furthermore, these PIC micelles had a constant phase-separation temperature (ca. 32 °C) under physiological conditions regardless of the wide ranges of concentration, reflecting the increased local concentration of the *PiPrOx* segments in the shell layer. In this respect, the *PiPrOx*-based PIC micelles might have promising applications, especially as a thermosensitive drug carrier loading charged biomacromolecules that include proteins, nucleic acids, and enzymes.

Acknowledgment. This work was financially supported by Special Coordination Funds for Science and Technology from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT) and by the Core Research for Evolution of Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation (JST). We express our appreciation to Professor Woo-Dong Jang, The University of Tokyo (Present address: Yonsei University, Korea) and Mr. Shigeto Fukushima, Nippon Kayaku Co., Ltd., Japan, for their help with the NCA synthesis and Ph.D. candidate Michiaki Kumagai, The University of Tokyo, for his support with the acquisition of the TEM image.

Supporting Information Available: MALDI-TOF mass spectrum of Me-*PiPrOx*-acrylate obtained after the conversion reaction. ¹H NMR spectra of Me-*PiPrOx*-acrylate in D₂O, Me-*PiPrOx*-PBLA in DMSO-*d*₆, and *PiPrOx*-P(Asp) in D₂O. Gel permeation chromatograms of Me-*PiPrOx*-NH₂ and Me-*PiPrOx*-PBLA. Transmittance changes for 45C52/45A53 in the absence and presence of NaCl. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

LA061431J

シンポジウム 「運動器の10年」変形性関節症の病態解明・診断・治療の新世紀

MRI を用いた変形性膝関節症の客観的な重症度評価指数の確立*

佐粧孝久[†] 中川晃一[†] 鈴木昌彦[†] 田原正道[†] 落合信靖[†]
 荻野修平[†] 守屋秀繁[†] 和田佑一[‡] 中口俊哉[§] 三宅洋一[§]

緒言

変形性膝関節症 (osteoarthritis, OA) の重症度を客観的に評価することは、症例に応じた治療法の適切な選択を可能とし、治療体系を形成する上で有用となるものである。また、その経時的な評価は、疾患の進行速度や各種治療法の効果判定を可能とする。

X線によるOAの評価は客観的な指標の1つと考えられている。実際にX線のグレードと疾患の重症度は関連があるとの報告がある^{1),2)}。しかしその一方で、関連がないという報告もある^{3),4)}。われわれも日常診療上、しばしば画像所見と臨床像との間に解離があることを経験する。したがって、X線検査はOAの診断に必要なものであり、重症度を把握する補助となるが、これのみに依存して重症度を決めることはできない。その他に、疾患の重症度を示す指標としてバイオマーカーも検討されている⁵⁾。しかし、確立したものとはなっていない。また、バイオマーカーの場合、他の関節の状態にも左右されるものである。よって、ある特定の関節の状態を把握するという意味においてはX線検査以外の画像検査が必要とされる。そこでわれわれはMRI (magnetic resonance imaging) 所見に着目した。す

なわち、内側型OAにおいて、進行するに従い明らかとなってくる大腿骨内側顆 (medial femoral condyle, MFC) の輪郭の不整像に着目したのである (図1)。そこでプレリミナリーな検討として、他の目的に開発されたソフトウェアを用いて、不整度を数値化した膝機能スコアとの相関を調べた。その結果、不整度と膝機能の間に負の相関があることがわかった。すなわち不整度が大きくなると膝機能が低下するということがわかり、不整度の計測が客観的なOAの重症度の指標となる可能性を示した⁶⁾。われわれはこの結果を元に新しいソフトウェアを開発し、不整度測定のリ再現性と精度を高めた。本稿ではこの新しいソフトウェアが客観的なOAの重症度の指標となりえるかを検討した。さらに、人工膝関節置換術 (total knee arthroplasty, TKA) 施行時に得られた試料に免疫組織学的検討を加え、MRIで見られた不整像の意義につき検討を加えた。

対象と方法

1. 対象と膝機能評価

対象は内側型OA56膝である。男性が17名、女性が39名、平均年齢が73歳 (50-73歳) であった。23膝のちにTKAを受け、23膝のちに鏡視下手術を受けることとなったが、本検討を施行した時点では外科的な治療を受けた例はなかった。全例、MRI撮像時の膝機能の評価をJOAスコアとLysholmスコアにて施行した。

2. ソフトウェア

MRI撮像に使用したのはシグナ1.5テスラ (GE medical system) である。プロトン密度強調の矢状断像を検討に用いた。撮像に用いたパラメータは2000/16 ms (TR/TE), FOV14 cm×14 cm, matrix number 512×512, number of excitation 2, slice thickness

Key words: Osteoarthritis, MRI, Subchondral bone, Severity, X-ray grading

*Objective Assessment of Severity of Osteoarthritic Knee Using MRI

[†]千葉大学大学院医学研究院整形外科. Takahisa Sasho, Koichi Nakagawa, Masahiko Suzuki, Masamichi Tahara, Nobuyasu Ochiai, Shuhei Ogino, Hideshige Moriya: Department of Orthopedic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University

[‡]帝京大学医学部整形外科教室. Yuichi Wada: Department of Orthopaedic Surgery, Teikyo University School of Medicine

[§]千葉大学工学部. Toshiya Nakaguchi, Yoichi Miyake: Department of Engineering, Chiba University

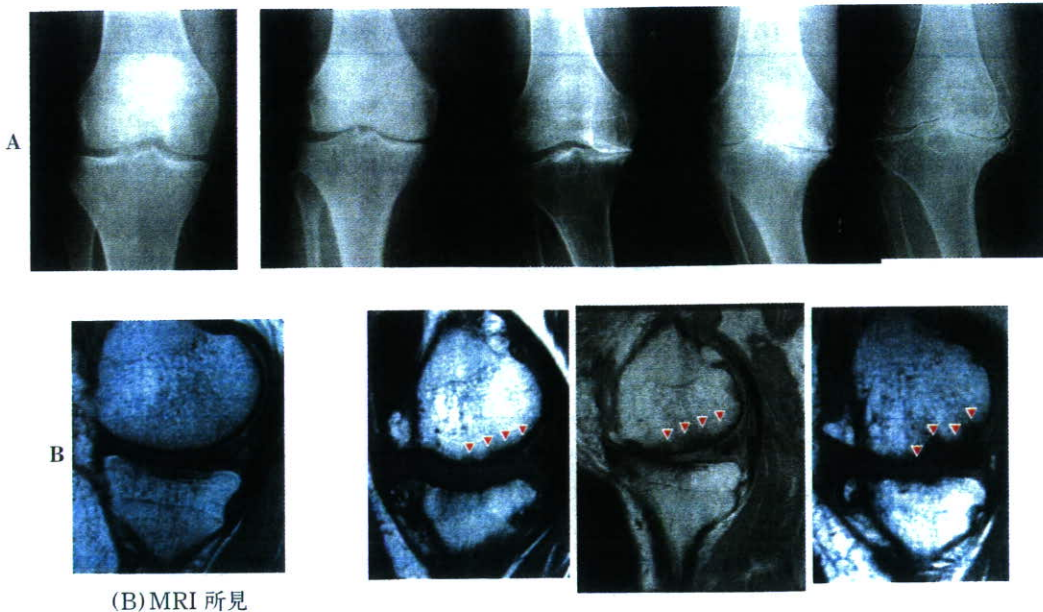


図1 進行した OA の MRI で見られる軟骨下骨領域の変化. 上段(A : X 線所見)は右に行くに従い X 線グレードが上がっている. これに応じて, 下段(B : MRI 所見)においても, 右に行くに従い X 線グレードの高い症例の内側コンパートメントの矢状断像を示しているが, 矢頭で示すように大腿骨内側顆の輪郭に不整な像が出現してくることがわかる.

3 mm, slice gap 0 mm である. 各症例につき内側コンパートメントの中央に相当する 2 スライスを選定し, 平均値をその膝の値とした. 統計学的検討には Pearson の相関係数, または Mann-Whitney's U test を用いた.

新しく開発したソフトウェアの特徴であるが, ① Matlab 6.5 を用いてプログラミングしたソフトであること, ② MRI の DICOM データを直接使用し計測が可能であること, ③計測が半自動的に行えるようになっていること, などである. ②の特徴により, プレリミナリーな検討の際に問題点の 1 つであった, 1 度フィルムとなった画像をもう 1 度スキャンしてコンピュータに取り込むという操作がなくなった.

ここで不整度の計測法を紹介する. まず, MRI の DICOM データをコンピュータに取り込み, コンピュータ上で計測すべきスライスを選択する(図 2-A). ついで画像を構成するピクセルの濃淡のヒストグラムを元に白黒画像化する(図 2-B). その後に MFC の輪郭を抽出するが, この過程では自動的に輪郭の上縁と下縁が青と赤でトレースされる(図 2-C).

不整度に関係するパラメータとして計測されるのは

上縁と下縁で囲まれた面積(Area), 上縁の長さとは下縁の長さの比, つまり青い線の長さを赤い線の長さで割ったもの(Ratio), 上縁と下縁の間の距離をピクセルごとに計測し 2 乗したものの和(Error)の 3 つの数値である(図 3).

3. 免疫組織学的検討

組織学的な検討である. TKA 施行時の大腿骨遠位骨切除時に得られる MFC, 大腿骨外側顆(lateral femoral condyle, LFC)を試料とした. 得られた試料は 4%パラホルムアルデヒドで 48 時間固定後, 20% EDTA で脱灰し, 組織標本を作製した. 試料は HE (hematoxyline-eosin) 染色に加え, 疼痛関連物質である Cox-1, Cox-2, TNF- α (tumor necrosis factor-2), また神経線維の存在を調べるために TUJ1 で染色した. TUJ1 はラットの脳から得られた微小管に対する抗体として作成されたもので, 神経特異的なクラス III- β チューブリンを認識する⁷⁾.

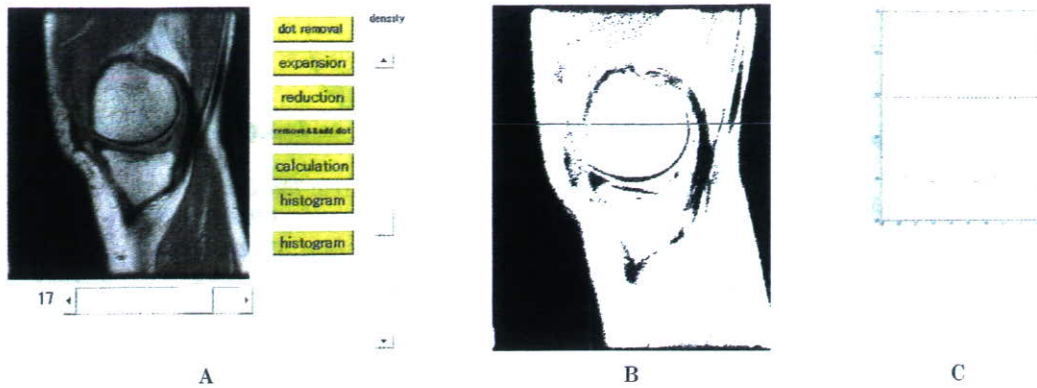
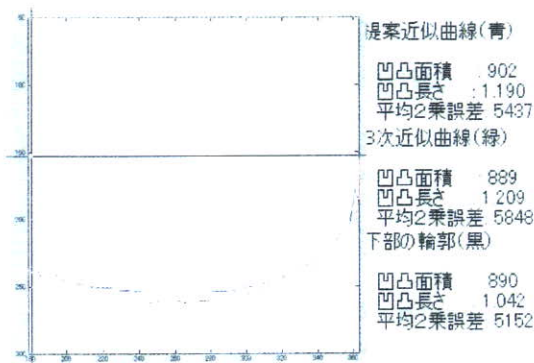


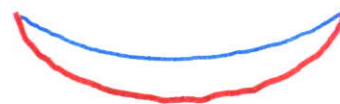
図2 大腿骨内側顆(MFC)の輪郭の抽出. MRIのDICOMデータをコンピュータに取り込み, コンピュータ上で計測すべきスライスを選択する(A). ついで画像を構成するピクセルの濃淡のヒストグラムを元に白黒画像化する(B). その後にMFCの輪郭を抽出するが, この過程では自動的に輪郭の上縁と下縁が青と赤でトレースされる(C).



A) 凹凸面積 ... Area



B) 上縁/下縁 ... Ratio



C) (上縁-下縁)² ... Error



図3 計測されるパラメータ. 不整度に関するパラメータとして計測されるのは上縁と下縁で囲まれる部位の面積: Area, 上縁の線の長さとして下縁の線の長さの比: Ratio, ピクセルごとに計測された幅の2乗の和: Errorの3つの数値である.

結果

1. 不整度の計測と膝スコア

計測した3つの値と抽出した輪郭の関係を, 代表的な例を用いて示した(図4). 4つの輪郭のうち右に行くほど肉眼的には不整が強いように見える. したがって各パラメータも右に行くに従い上昇する. しかし, Ratioにおいては症例3のほうが症例4より大きな値となっている. 3つのパラメータは互いに独立したものではないと考えられるが, 症例によってはこのように値が逆

転することもある.

不整度を表す3つのパラメータと膝スコアの関係であるが, 代表的な例としてJOAスコアとAreaの関係を図5に示した(図5). 相関係数-0.489で負の相関を認める. すなわち, 不整度が大きくなると膝機能が低下することを表している. JOAスコアのうち, 疼痛に関連する歩行時の痛み, 階段昇降時の痛みとAreaの関係調べると歩行時の痛みとAreaがよく相関することがわかった(図5). LysholmスコアとAreaも相関係数が-0.381と負の相関を認めた. 他の2つのパラメー

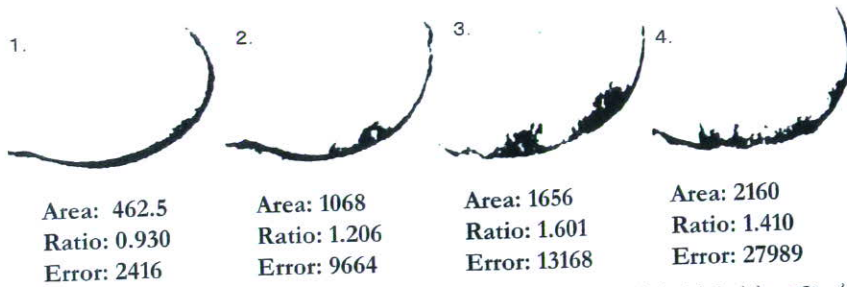


図4 代表例の計測値. 症例1から4に進むに従い, 肉眼的には不整度が大きくなっていくが, 各例に対応した3つの計測値も右に行くに従い大きくなる. ただし Ratio に関しては3と4の間で逆転が起きている.

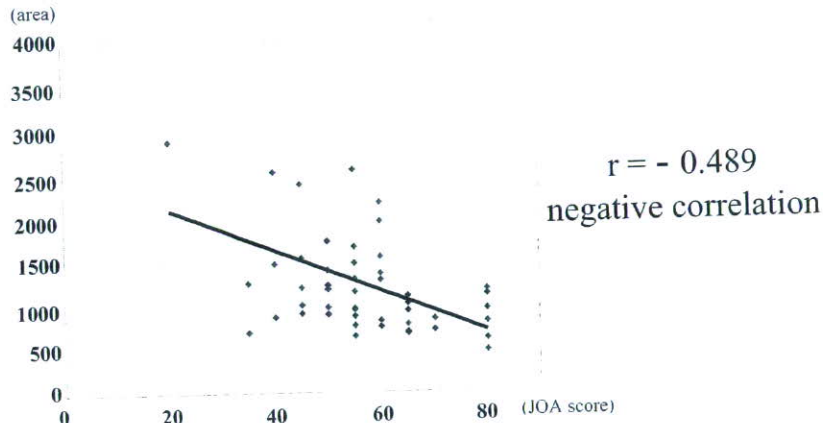


図5 JOA score と Area の関係. JOA score と Area をグラフにプロットしてみると, 負の相関のあることがわかった.

表1 3つのパラメータと膝機能スコアの関係

	Area	Ratio	Error
JOA スコア	-0.489*	-0.533*	-0.448*
歩行時の疼痛	-0.361*	-0.468*	-0.414*
階段昇降時の疼痛	-0.148	-0.200	-0.103
Lysholm スコア	-0.381*	-0.441*	-0.380*

3つのパラメータと JOA スコアの総点数, JOA スコアの内訳として歩行時の疼痛, Lysholm スコアの総点数と負の相関があった. JOA スコアの内訳として階段昇降時の疼痛とは相関がなかった. *Statistically significant

タである Ratio, Error とともに Area と同様の傾向を示し, JOA スコアの総点数, 内訳として歩行時の疼痛, Lysholm スコアの総点数と負の相関があった(表1).

2. 免疫組織学的検討

HE 染色では MFC の軟骨下骨の骨梁の乱れや軟骨下

骨に pseudocyst の形成が見られた. 強拡大では同部は, 軟骨下骨や石灰板に接して存在する線維性組織であった(図6). この組織は Shibakawa らが bone resorption pit と名づけた骨髄由来の組織であると考えられる⁸⁾. MFC に形成されたこの線維性組織内には Cox-2 陽性細胞が存在することがわかった(図7-A). しかし

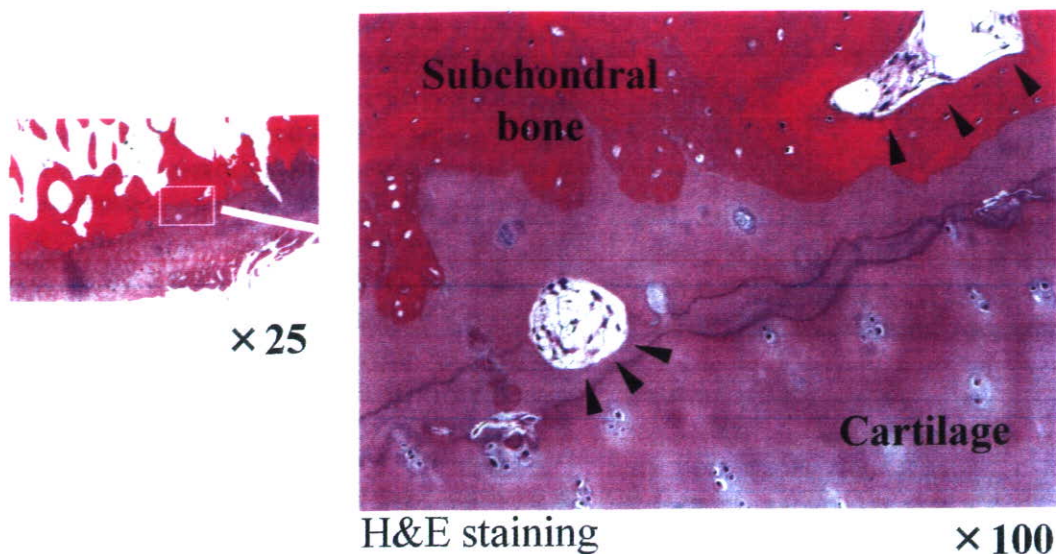


図6 軟骨下骨領域の病理像。MFCの軟骨下骨の骨梁の乱れや軟骨下骨に矢頭で示すように pseudocyst の形成が見られた。拡大すると pseudocyst のように見えるのは、軟骨下骨や石灰板に接して存在する線維性組織の形成であった。(HE染色)

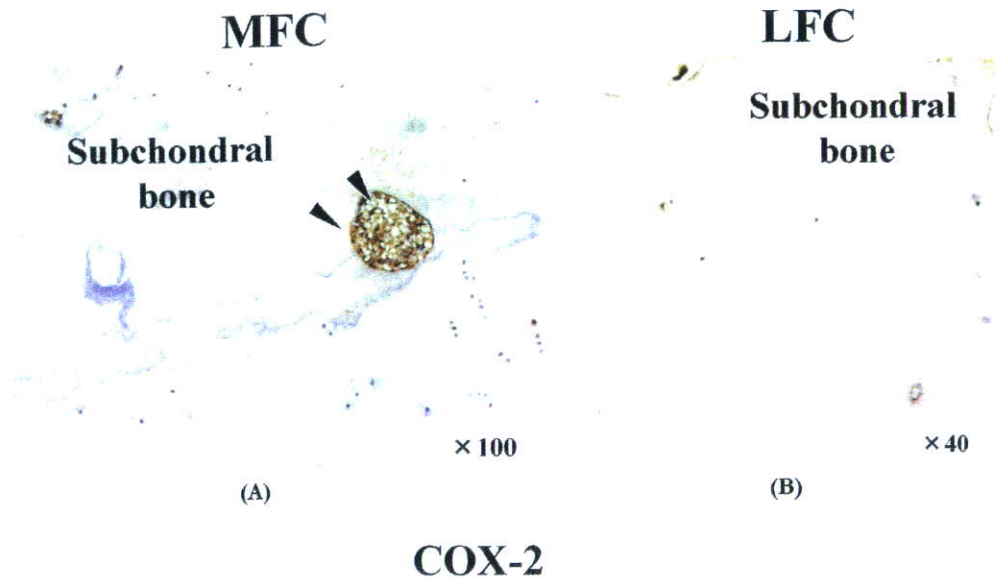


図7 軟骨下骨領域の免疫染色(COX-2)。MFCに形成されたこの線維性組織内にはCox-2陽性細胞が存在することがわかった(A)。しかしLFCにはCox-2陽性細胞は存在しなかった(B)。

LFCにはCox-2陽性細胞は存在しなかった(図7-B)。また、同部位はTNF- α 陽性の細胞が存在することもわかった(data not shown)。さらにはTUJ1陽性の細胞も存在した(data not shown)。免疫染色の結果をまとめるとMFCでは調べた20例のうちCox-1陽性の症例

が30%、Cox-2陽性例が100%、TNF- α 陽性例が90%、TUJ1は15症例の検討であるが、100%陽性であった。一方、LFCではいずれの抗原も陰性であった。

考 察

図1に見られるようなMFCの変化に着目し、われわれは今までにMRI上のMFCの輪郭の評価を施行してきた^{6),9)}。初期の方法ではMRI画像をスキャナーでコンピュータに取り込み、白黒画像に変換したのち、MFCの輪郭を抽出するという方法を取っていたが、今回は新たなソフトウェアにより不整度計測が半自動的になり、より再現性が高く客観的に数値が算出できるようになった。

MRIで見られるMFCの輪郭は軟骨下骨に相当すると考えられる。つまりMFCの不整とは、OAの進行に伴い出現してくる軟骨下骨の組織学的変化を捉えているものと考えられる。われわれが示した、不整度と膝スコアが負の相関を示したということは軟骨下骨の組織学的変化がOAの重症度の指標となりえることを示したものである。特に、疼痛関連物質であるCox-2やTNF- α が高率に陽性であることは、軟骨下骨に起きる組織学的変化はOAの膝の疼痛に強く関係していることが示唆される。これまでOAの膝の疼痛は滑膜炎¹⁰⁾や骨髄圧の上昇¹¹⁾によるものと考えられてきた。また、内側型OAでは内側コンパートメントの滑膜にsubstance Pが外側コンパートメントに比べて高頻度で見られるとの報告もあり¹²⁾、滑膜は疼痛を感知する場ともなっている。一方、変形性膝関節症が進行してくると明らかな組織学的な変化を起こす軟骨下骨は疼痛発生の場、または疼痛を感知する場としてはあまり考慮されることがなかった。しかし、本検討の結果は軟骨下骨が疼痛発生の場の1つとして重要な位置を占めることを示すものである。この結果からTKAにより得られる除痛のメカニズムとして、TKA施行時には必然的に病的変化を生じた軟骨下骨の切除が行われており、これにより除痛が達成されているのではないかと考えている。つまり、軟骨下骨のデブリドマン効果であると考えている。

MRI上の不整度測定の臨床的意義であるが、今後不整度に応じた適切な治療法を検討することで、治療法を選択する際の指標となることが期待できる。ただし、本研究の対象となった症例の多くは手術療法を必要としており、進行例が多かった。より軽症例では軟骨下骨の変化はあまりないと考えられること、また軽症例では多くの場合、半月板の変性断裂による症状も疼痛に関与することが考えられることから、軟骨下骨を評価する本方法は、進行例した例にのみ適応可能な方法

であろうとは考えている。

本研究の問題点は3つ挙げられる。第1点目は大腿骨側のみを評価しており、胫骨側を見ていないことである。これに関しては大腿骨内側顆を評価することでミラリジョンとなっている胫骨の変化を捉えているものと考えており、内側コンパートメントを代表する指標として大腿骨内側顆はふさわしいと考えられる。さらに大腿骨顆部は膝蓋骨とも関節を形成するため、進行例では膝蓋大腿関節へと進展したOAも捉えている可能性がある。しかし、将来的には胫骨や膝蓋骨をも含めた評価法が理想的であるとも考えている。第2点目として、内側コンパートメントの矢状断2スライスでのみ評価していることがあげられるが、MRIがより進歩し、またそれに対応したよりよいソフトウェアを開発することで三次元的に評価することが将来的には必要になると考えている。第3点目は、明らかなX線所見があるが症状に乏しい症例での検討がなされていないことである。つまりネガティブコントロールに相当する症例での検討がなされていないことが、今後の課題と言える。

結 語

大腿骨内側顆の不整度の計測はOA膝の客観的な重症度評価法となりえることを示した。この指標は治療法を選択する際の客観的な目安となることが期待できる。

文 献

- 1) Lethbridge-Cejku M, Scott WW Jr, Reichle R, et al. Association of radiographic features of osteoarthritis of the knee with knee pain: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Arthritis Care Res* 1995; 8: 182-8.
- 2) Hopman-Rock M, Odding E, Hofman A, et al. Physical and psychosocial disability in elderly subjects in relation to pain in the hip and/or knee. *J Rheumatol* 1996; 23: 1037-44.
- 3) Hannan MT, Felson DT, Pincus T. Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 2000; 27: 1513-7.
- 4) Meding JB, Ritter MA, Faris PM, et al. Does the preoperative radiographic degree of osteoarthritis correlate to the results in primary total knee arthroplasty? *J Arthroplasty* 2001; 16: 13-6.
- 5) Bruyere O, Collette J, Kothari M, et al.

- Osteoarthritis, magnetic resonance imaging, and biochemical markers: a one year prospective study. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65: 1050-4.
- 6) Sasho T, Wada Y, Suzuki M, et al. Irregularity of medial femoral condyle on MRI is an indicator for assessing disease severity of medial-type osteoarthritic knee. *Trans ORS* 2004; 29: 1012.
 - 7) Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LL, et al. The expression and posttranscriptional modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 1990; 17: 118-32.
 - 8) Shibakawa A, Yudoh K, Masuko-Hongo K, et al. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 679-87.
 - 9) Moriya H, Sasho T, Sano S, et al. Arthroscopic posteromedial release for osteoarthritic knees with flexion contracture. *Arthroscopy* 2004; 20: 1030-9.
 - 10) Smith MD, Trianta ES, Parker A, et al. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997; 24: 365-71.
 - 11) Arnoldi CC, Djurhuus JC, Heerfordt J, et al. Intraosseous phlebography, intraosseous pressure measurements and ^{99m}Tc-polyphosphate scintigraphy in patients with various painful conditions in the hip and knee. *Acta Orthop Scand* 1980; 51: 19-28.
 - 12) Saito T, T Koshino. Distribution of neuropeptides in synovium of the knee with osteoarthritis. *Clin Orthop* 2000; 376: 172-82.



変形性関節症の病態 —Overview と最近の知見—*

福井 尚志[†]

はじめに

変形性関節症 (osteoarthritis: OA) は運動器領域の代表的な common disease であるが、現在のところ疾患の進行を抑制し、その自然経過を変えうる有効な治療法は確立されていない。これは病態の解明がいまなお不十分であることに関連している。本稿では OA の病態に関する現在までの理解を最近の知見を中心に概説する。OA の病態は発症に至る過程と、いったん発症した後の疾患の進行の過程で大きく異なる。このためここでは OA の病態を発症と進行という2つの局面に分けて扱う。

I. OA の発症機序

OA の発症機序を考えるために、疫学的研究によって明らかになった疾患発症の危険因子について検討してみたい。従来の疫学的研究の結果から、OA の発症に関与する明確な危険因子として年齢、体重、性、外傷や関節炎の既往、の4つが明らかになっている^{1),2)}。以下にこのうち年齢、肥満、性の3つの要因について OA の発症とどのような関連があるのか、現在までの知見をまとめる。

1. 年齢

年齢は OA 発症の最大の危険因子である。したがって OA の発症には関節の構成要素の年齢に伴う変化が大きく関与すると考えられる。滑膜関節では軟骨細胞、軟骨基質、骨、半月、靭帯、関節包について加齢に伴う変化が知られており、また筋力、反射やプロプリオ

セプションといった神経機能も年齢とともに変化する。このうち軟骨細胞と軟骨基質の変化が OA の発症にもっとも関連が深いと考えられる。

(1) 軟骨細胞における変化

軟骨細胞は軟骨基質中に存在する唯一の細胞である。軟骨基質の代謝は軟骨細胞によって担われており、軟骨細胞の機能の変化は軟骨基質の性状を変えることによって OA の発症に関与する。

軟骨細胞は年齢とともに基質産生能が低下することが知られている^{3),4)}。これは成長因子に対する応答性が年齢とともに低下することによるのかもしれない。従来の研究によって高齢個体から採取した軟骨細胞は insulin-like growth factor-1 (IGF-1)^{5),6)}, platelet-derived growth factor⁷⁾, transforming growth factor- β (TGF- β)^{8),9)} に対する反応が低下し、基質産生の亢進が起こりにくくなっていることが知られている。このうち IGF-1 に対する反応性の低下は IGF 結合タンパクの増加が原因である可能性がある⁵⁾。ちなみに OA 罹患軟骨において軟骨細胞の IGF-1 に対する反応はさらに低下しているが、これにも IGF 結合タンパクの発現亢進が関与している¹⁰⁾。

軟骨細胞はまた加齢とともに機械的刺激に対する応答性が変化する。軟骨細胞は力学的な負荷に対してきわめて敏感な細胞であり、若年個体から得られた正常な軟骨細胞の場合、関節内で加わる荷重に近い大きさの力学的負荷を周期的に加えることで基質産生が増加する。しかし老化した個体から得られた軟骨細胞では同じ負荷を与えても基質の産生はむしろ抑制されることが報告されている¹¹⁾。

加齢に伴い、軟骨細胞は catabolic なレスポンスを起こしやすくなることも知られている。たとえばマウスにおいて高齢個体の軟骨細胞は炎症性サイトカインに対する反応がより長期間持続することが報告されてい

Key words: Osteoarthritis, Onset, Progression

*Pathology of Osteoarthritis: An Updated Overview

[†]国立病院機構相模原病院臨床研究センター。Naoshi Fukui: Clinical Research Center, National Hospital Organization Sagami Hospital

る¹²⁾。ヒトでも同様に、高齢者から採取した軟骨細胞は若年者の細胞に比べ catabolic な刺激を与えた場合に matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) の産生がより顕著に起こる¹³⁾。こういった catabolic な反応の亢進のため、高齢者から採取した関節軟骨では OA 変化が見られなくても、II 型コラーゲンを分解する MMP-1 と MMP-13 の発現が亢進している¹⁴⁾。関節軟骨では OA 変化が生じていなくても変性した II 型コラーゲンが年齢とともに徐々に増加し、OA 発症の基盤となっている可能性がある^{14), 15)}、これはこれらの MMP の発現亢進と関連があるのかもしれない¹⁴⁾。また高齢者の軟骨細胞では OA 変化がなくても nitric oxide (NO) の産生が若年者の数倍に及んでいる^{16), 17)}。NO は後述するように軟骨細胞に対してアポトーシスを引き起こし、また軟骨基質の産生も障害するため、これも OA 発症の誘因となっている可能性がある。軟骨基質中の軟骨細胞は軟骨に病変が生じなくても加齢に伴って細胞密度が減少する¹⁸⁾。細胞のアポトーシスがこの一因と考えられているが、これも加齢に伴う NO の産生亢進によるのかもしれない。

このように軟骨細胞には加齢に伴ってさまざまな変化が生じており、これが OA の発症に直接、間接に関連していると考えられる。一方、関節軟骨を構成する基質自体にも加齢によって明らかな変化が生じ、これはまた別の次元で OA 発症の原因となっている。

(2) 軟骨基質における変化

軟骨基質は II 型コラーゲンを中心とするコラーゲンと、アグリカンをはじめとするプロテオグリカンによって構成される。軟骨基質の特徴のひとつは他の組織と比べてマトリクスの代謝回転がきわめて遅いことである。関節軟骨中のアグリカンは半減期が 20 年前後¹⁹⁾とされ、II 型コラーゲンについては半減期はじつに 100 年以上と報告されている²⁰⁾。このように長期間体内に存在する間にマトリクスを構成する分子はさまざまな修飾、変性を受け、その性質を変えていく。これらの分子の変化は軟骨基質の特性を変えることで直接 OA 発症の引き金となりうるし、軟骨細胞に影響を与えることで間接的にも OA 発症の原因となる。

II 型コラーゲンは関節軟骨にもっとも多量に含まれるマトリクス分子で、軟骨の乾燥重量のおよそ 60% を占める。II 型コラーゲンはコラーゲンに特徴的な 3 本鎖構造をとることもあってタンパク分解酵素に対して比較的安定であり、半減期が非常に長いにもかかわらず、

後述するアグリカンのように加齢に伴って分子の切断が生じることはない。代わりに見られるのが翻訳後修飾の蓄積である。翻訳後修飾にはさまざまな種類があるが、なかでも病的意義が最も大きいのが advanced glycation end product (AGE: 最終糖化反応物) の形成である。軟骨基質中には加齢に伴って数種の AGE があらわれる。このうちペントシジンは分子間に不可逆的に架橋を形成するため、その形成によって軟骨基質は硬く脆くなる^{21), 22)}。こういった基質の物性の変化が OA の発症に関与している可能性がある²³⁾。

AGE の形成は単に軟骨基質の物性を変える以上の意義を持つ。一般に形成された AGE はこれを認識する受容体 (receptors for AGEs; RAGE) を介して種々の細胞にさまざまな反応を引き起こすことが知られている。滑膜関節では軟骨細胞と滑膜細胞に RAGE が発現している²⁴⁾。このため基質中に形成された AGE はこれらの細胞において炎症性サイトカインや MMP の産生を誘導し、II 型コラーゲンやプロテオグリカンの産生を抑制する^{24), 25)}。コラーゲン分子に蓄積される AGE は、このような変化を通じて OA 発症の誘因となっていると考えられる。

軟骨基質のもう一方の主役であるアグリカンについても、年齢の増加に伴う明らかな変化が観察される (図 1)。アグリカンの場合、加齢に伴って分子サイズの顕著な減少が観察される^{19), 26)–29)}。この理由はおもにアグリカンのコア・プロテインが直鎖状であって種々のタンパク分解酵素の作用を受けやすいことにある (図 1)。アグリカンは軟骨内でヒアルロン酸に結合して存在するが、分子の短縮が起こってもアグリカンはヒアルロン酸と結合したまま残り、基質内から取り除かれにくいことも加齢に伴うアグリカンの分子量の低下を助長する。正常なアグリカン分子は分子のカルボキシル端に近い領域にコンドロイチン硫酸が多数結合している。この側鎖が強い負の電荷を帯びているためにアグリカンはイオンや水分子をひきつけ、自身の体積の数十倍もの空間を占めることができる。このようなアグリカンの特性は軟骨の弾性保持の上できわめて重要である。加齢に伴うアグリカン分子の短縮はカルボキシル端から起こっていくため、高齢者の軟骨ではこの空間占拠能を失ったアグリカン分子が増加していることになる。これは高齢者の関節軟骨で弾性が低下する主な原因と考えられている。

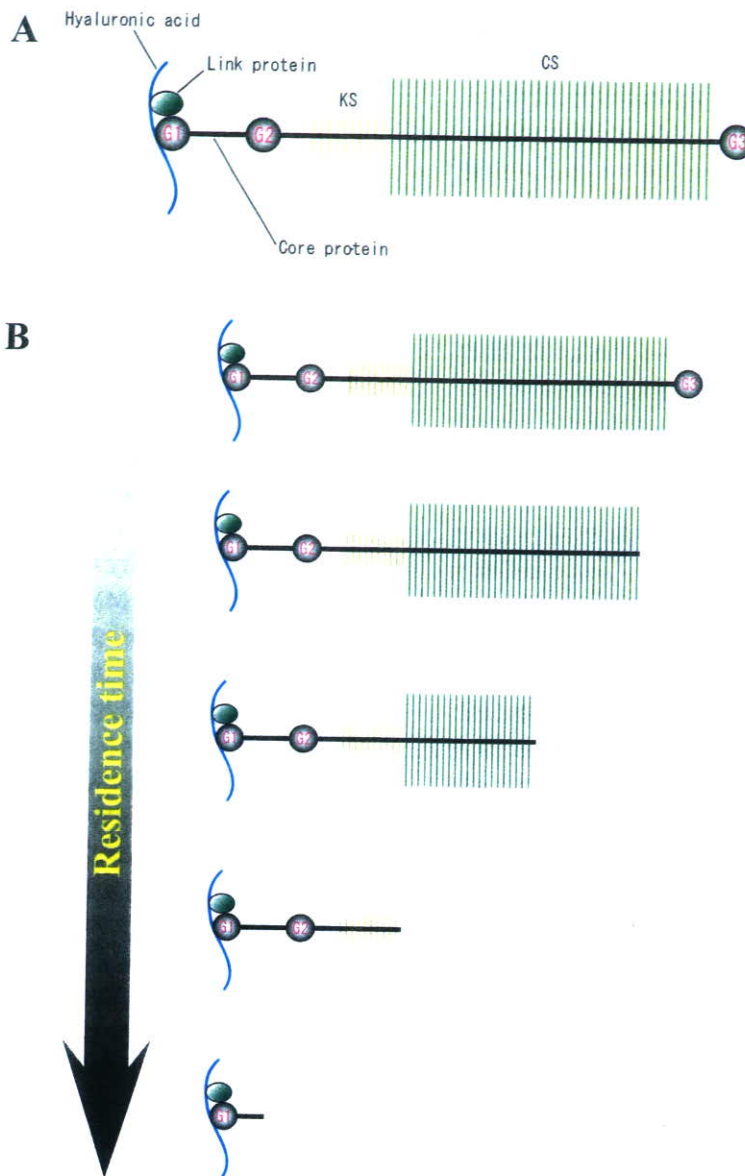


図1 アグリカン分子の構造と加齢に伴う変化¹⁹⁾。(A)アグリカン分子はおよそ2400のアミノ酸からなる直鎖状のコア・プロテインにケラタン硫酸(KS)とコンドロイチン硫酸(CS)の側鎖が多数結合した構造を持つ。コア・プロテインには3つの球状領域があり、アミノ端から順にG1、G2、G3と呼ばれる。軟骨においてアグリカンはG1領域でヒアルロン酸に結合しており、この結合はリンク・プロテインによって補強される。(B)アグリカンは加齢に伴ってカルボキシル端が切断された、分子量の小さな分子が増えていく。65歳では関節軟骨中の切断を受けていないアグリカン分子の比率は新生児のわずか8%しかない²⁸⁾。アグリカンの断片は短いものほど組織内の存在期間が長いという事実から²⁹⁾、軟骨中でアグリカン分子は時間の経過とともに繰り返し切断を受け、次第に分子量を減じていくと考えられる。切断されたカルボキシル端側の断片は切断後速やかに軟骨基質から失われるが、アミノ端側の断片はヒアルロン酸との結合部位を含むため、分子の切断が生じたあとも長期間基質内に残ることになる。

2. 肥 満

肥満は膝関節において OA 発症の明らかな危険因子であり^{30),31)}, 股関節でも OA 発症の危険因子である可能性がある^{32),33)}。肥満と OA との関連は従来, 関節に加わる荷重の増加によると考えられてきた。しかし肥満者では手指の関節のような非荷重関節においても OA の発症率が高いことがわかり^{2),34),35)}, 肥満と OA の関連は単純な荷重の変化だけではないことが明らかになってきた。肥満者における OA の発症には脂肪組織で産生される adipokine と呼ばれるサイトカインに似た作用を持つ物質が関与している可能性が示されている。Adipokine の 1 種 leptin は OA との関連がとくに注目されている物質である。肥満者において関節液中の leptin の濃度は肥満度に関連して上昇する傾向があったこと, 動物実験において leptin を関節内に投与したところ OA 様の変化が生じたことから, leptin は肥満と OA の発症を関連付ける因子と考えられている³⁶⁾。実際 OA 罹患関節で leptin は軟骨, 滑膜, 骨棘で産生されており, このため OA 関節の関節液中に高い濃度で存在する^{37),38)}。しかし leptin が OA の病態で実際にどの程度の重要性を持つのかについては, なお今後の研究を待たなくてはならない。肥満傾向のある者では一定以上の減量を行うことで OA の発症率, 進行速度は明らかに減少する。このような減量の治療効果も一部は leptin の産生低下によるものなのかもしれない³⁶⁾。

3. 性 差

OA の罹患率には明らかな性差がある。膝関節の場合女性の OA 罹患率は同年代の男性の 1.7 倍であるとされ, 膝以外の関節についても同様の性差が報告されている³⁹⁾。疫学的研究によって女性では閉経後に OA の発症が急増すること⁴⁰⁾, ホルモン補充療法を受けた女性では膝および股関節における OA の発症が減少すること^{41),42)}が明らかにされ, またエストロゲン受容体の遺伝子多型が OA の発症と有意に関連することからも⁴³⁾, 性差の原因は主にエストロゲンにあると考えられている。事実, 最近の研究では内因性エストロゲンのレベルが低い女性では膝関節の OA の発症率が有意に高い傾向があることが報告されている⁴⁴⁾。

In vitro の実験からエストロゲンは軟骨細胞の基質産生能を亢進させることによって OA の発症を軽減している可能性が示されている^{45),46)}が, しかし実際にエストロゲンがどのような機序で OA の発症を抑えているのかについては, まだ明確な結論が得られていない。エ

ストロゲンの OA 発症抑制効果は比較的弱く, 有害な作用もあるために OA の発症予防の目的でのエストロゲンの投与は実際には行われていない。

II. OA の進行機序

次に OA が発症したあとの進行のメカニズムについて述べる。OA では軟骨, 滑膜, 骨などさまざまな組織に変化が見られ, それぞれが疾患の進行に重要な役割を果たしているが, 本稿では関節軟骨の変性, 消失に焦点を当て, 現在までに明らかになっている疾患の進行機序を 5 つの観点から概説する。

1. OA における軟骨基質の変性の機序

OA における軟骨基質の変性・喪失には多くのタンパク分解酵素が関与する。なかでも活性の発現に 2 価金属イオンを必要とするマトロプロテアーゼ類が重要で, 軟骨基質の分解は主に MMP, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeat (ADAMTS) によって進められると考えられている。実際, OA に罹患した関節では多種のマトロプロテアーゼが発現されており, 今までに MMP-1,2,3,7,8,9,13, MT1-MMP, ADAMTS-4,5 (aggrecanase-1,2) について OA 罹患関節での発現亢進が報告されている⁴⁷⁾⁻⁵¹⁾。

II 型コラーゲンは軟骨基質の最も重要な構成要素である。前述のように 3 本鎖構造をとっているため一般にタンパク分解酵素による分解を受けにくい, MMP-1,8,13 (collagenase-1,2,3) は 3 本鎖の II 型コラーゲンをカルボキシル端から 1/4 の部分で切断することができる。このためこれらの酵素は軟骨基質内のコラーゲン線維網の分解の主役と考えられている。このうち MMP-13 は MMP-1 のおよそ 5-10 倍の効率で II 型コラーゲンを分解するため, 軟骨変性においてとくに重要な役割を果たしていると考えられる⁵²⁾⁻⁵⁴⁾。実際に MMP-13 の発現は OA の進行に伴って亢進することが報告されている^{52),55)}。

軟骨基質の構成要素であるアグリカンのコア・プロテインは, 前述のすべての MMP によって一定の場所で切断される⁵⁶⁾(図 2)。しかし OA 患者の関節液中のアグリカンの断片の多くは MMP による切断箇所とは別の部位で切断を受けていることから^{57),58)}, OA におけるアグリカンの分解には MMP 以外のタンパク分解酵素が関与しているものと推定され, 同定されるより先に aggrecanase と名付けられた。この酵素は同定までに時間を要したが, 1999 年になって MMP とは別のメタ

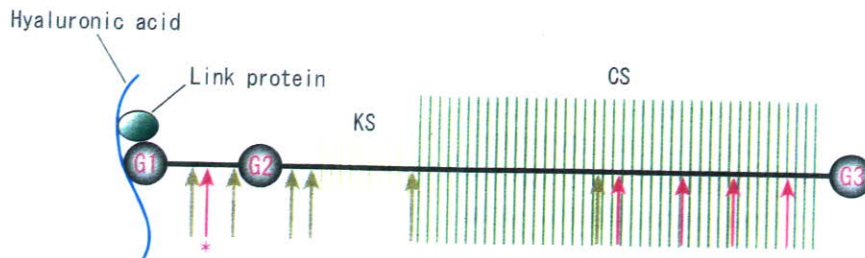


図2 MMP および aggrecanase によるアグリカン分子の切断⁶¹⁾。MMP, aggrecanase はともにアグリカン分子のコア・プロテインを複数の箇所切断する。図中、茶色の矢印は MMP の切断部位を、赤色の矢印は aggrecanase の切断部位を示す。Aggrecanase の存在は G1, G2 の間で切断されたアグリカン断片の関節液中の存在により予想された(*)。

ロプロテアーゼ群である ADAMTS family に属する ADAMTS-4,5 であることが明らかにされた⁵⁹⁾⁻⁶¹⁾。前述の経緯からこれらの酵素はそれぞれ aggrecanase-1,2 と呼ばれている。ADAMTS-4 よりも ADAMTS-5 が OA 軟骨における発現量が多く、病的な意義が大きいと考えられており⁵¹⁾、実際遺伝子欠損マウスを用いた解析でも、ADAMTS-4 の欠損は OA モデルにおいて病態の進行を大きく変えなかったのに対し⁶²⁾、ADAMTS-5 のノックアウトマウスでは OA の進行が顕著に抑制された⁶³⁾。Aggrecanase の活性の抑制は OA の進行を抑止する上できわめて有効である可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

軟骨は II 型コラーゲンやアグリカン以外にもさまざまな分子によって構成されるが、これらの分子は多くが MMP により分解される⁵⁶⁾。したがって OA において MMP は II 型コラーゲンやアグリカン以外の基質分子の変性にも深く関与すると考えられる。

2. タンパク分解酵素の発現の機序

OA においてこれらのタンパク分解酵素はどのようなメカニズムによって誘導されるのであろうか。MMP や aggrecanase は第 1 に IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインによって誘導される。これらの炎症性サイトカインは OA 関節内に発現し、軟骨細胞の基質産生を抑制するとともにタンパク分解酵素の発現を促すことによって軟骨基質の喪失をもたらす。OA で軟骨基質の変性・喪失を促進する因子としてはほかに leukocyte inhibitory factor (LIF) や interleukin-17 (IL-17) などのサイトカイン、IL-8, RANTES (regulated on activation, normal T cell-expressed and secreted), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) などのケモカインが知られているが、これらもタンパ

ク分解酵素の発現を誘導することで軟骨の変性をもたらす。

OA 関節ではこのほかにマトリクスの変性産物が直接に MMP や aggrecanase の発現を誘導することも知られている。なかでもファイブロネクチンの変性断片 (FN-f) は軟骨細胞、滑膜細胞に対して基質産生の抑制、タンパク分解酵素の発現や活性の誘導といった炎症性サイトカインに似た catabolic な反応を強く誘導する⁶⁴⁾。実際、FN-f の作用の一部は炎症性サイトカイン、ケモカイン、あるいは後述の NO の産生を介したものであることが知られている⁶⁵⁾⁻⁶⁸⁾。FN-f はまた軟骨細胞に対し種々の MMP および aggrecanase を直接誘導する効果も有している^{65),69),70)}。ファイブロネクチンは正常軟骨ではほとんど発現していないが、OA に罹患した軟骨では発現が強く誘導される。われわれはファイブロネクチンが、OA 罹患軟骨において軟骨変性部の表層近くで特に強く誘導されていることを見出した。軟骨変性部の表層は基質喪失の最前線であり、マトリクスの変性が最も著しい場所であることを考えると、この部位におけるファイブロネクチンの発現は OA の進行に特に重要な意義を持つと思われる。

3. 活性酸素の関与

OA の進行には reactive oxygen species (ROS), とくに NO の産生も大きな意味を持つ。前述のプロテアーゼが軟骨基質変性の主因であるとすれば、ROS は軟骨細胞障害の主因と言ってもよい。NO は nitric oxide synthase (NOS) によって産生される。軟骨細胞には neuronal NOS (nNOS) と inducible NOS (iNOS) が発現しており、OA に罹患した軟骨は iNOS の発現亢進によって多量の NO を産生するようになる⁷¹⁾。産生された NO は細胞内のさまざまなメカニズムを直

接障害することによって基質産生を低下させ^{72),73)}, また細胞死を誘導する^{73),74)}. OA では軟骨細胞数の減少が観察されるが, この原因のひとつが ROS による細胞死の誘導であると考えられている. また NO は軟骨細胞に対して炎症性サイトカインの産生を促し⁷⁵⁾, MMP の活性を誘導する⁷⁶⁾ことでも OA の進行に関与する. 実際, 動物実験において iNOS の活性阻害が OA の進行を抑制することも報告されている⁷⁷⁾.

4. 生体力学的要因

OA の発症, 進行には軟骨に加わる力学的な負荷の増加が大きな意義を持つ. とくに膝関節では OA の進行に伴いアライメントの変化が生じ, 関節軟骨の変性部に加わる負荷が増大する結果, 疾患の進行が加速される. 力学的な過負荷は軟骨基質を物理的に損傷し, 基質の破壊産物の産生を増加させるとともに軟骨細胞に対して直接 catabolic な反応を引き起こすことが知られている. たとえば力学的ストレスは軟骨細胞に対して NO の産生を促すが^{78),79)}, 産生された NO はさらにタンパク分解酵素や炎症性サイトカインの発現を誘導する.

先述のように軟骨基質の弾性はコラーゲン線維と負の電荷を持ったプロテオグリカンによって保たれる. OA 罹患軟骨では基質中のプロテオグリカンが失われており, コラーゲン線維網の破綻と相まって軟骨の弾性が低下している⁸⁰⁾. このようなマトリクスの変化は軟骨細胞に対する力学的荷重を増強させることになる. また正常な軟骨では軟骨細胞は細胞周囲のコンドロンと呼ばれる固有の構造によって力学的な負荷から保護されているが, OA 罹患軟骨ではこのコンドロンの構造の破綻が観察され, その程度は軟骨変性部で著しい^{81),82)}. OA 軟骨において軟骨細胞に加わる力学的負荷はこのようなコンドロンの変化によっても増加していると考えられる. これらの変化の結果, 軟骨細胞は力学的環境の悪化によっても catabolic な作用を示すようになる. 膝関節などのように OA の進行に伴い軟骨変性部への荷重が増加する場合には, 力学的環境の悪化は病態の進行にとくに大きく関与している可能性がある.

以上, OA における軟骨基質変性の機序について概説してきた. ここで述べた機序は互いに独立したものではなく, 相互に関連しつつ 1 種の悪循環を形成して軟骨の変性を推し進めることになる (図 3). これに対して軟骨細胞は修復反応を起こして基質産生を増すことが知られている. しかし次項で述べるように, この修復

反応は必ずしも疾患の進行を抑制する上で役に立っていない可能性がある.

5. OA における基質産生

OA は関節軟骨の変性・消失を特徴とする疾患であるため, 病態の解明は基質の変性のメカニズムが中心となってきた. しかし OA では軟骨細胞の基質産生は単純に低下していくのではなく, 疾患の進行に伴ってむしろ高度に亢進する^{83),84)}. この軟骨細胞の基質産生の亢進は一般に軟骨変性に対する修復反応と考えられているが, その機序はまだよくわかっていない. われわれは炎症性サイトカインが成長因子の一種 BMP-2 の発現を直接誘導する現象を見出しており^{85),86)}, これが OA において基質産生が亢進する理由の 1 つであろうと考えている.

このような基質産生の亢進の結果, 疾患の進行に伴い, 関節軟骨の中には新しく産生されたマトリクス分子が相当な割合で含まれるようになる. たとえば高齢者の軟骨では前述のように分子サイズの小さなアグリカンが増加していくが, OA 罹患軟骨では新しく産生されたアグリカンが蓄積される結果, アグリカンの分子サイズの増加が観察され⁸⁷⁾, 新しく産生されたアグリカン分子に特徴的な 846 epitope 陽性のアグリカンが増加する⁸⁸⁾. II 型コラーゲン分子については, 分子の生体内の存在期間の長さに比例してアスパラギン酸の光学異性体 (D-アスパラギン酸) の含有量が増加することが知られているが, 進行期の OA の症例では年齢から予想されるより少ない量の D-アスパラギン酸しか含まれていない⁸⁹⁾. これらの知見は, いずれも OA 罹患軟骨では基質の一部が新しく産生された分子によって構成されていることを示すものである.

これらのことを考慮すると, OA において新しく産生された軟骨基質が正常な軟骨と同等の「質」を持っているのが問題になる. われわれはレーザー・マイクロダイセクションと定量的 PCR を組み合わせた解析によって, OA 罹患軟骨では IX 型および XI 型コラーゲンの産生が II 型コラーゲンに対して相対的に低下していること, またコラーゲン線維間に架橋を形成する上で重要な酵素 lysyl oxidase の発現が低下していることを見出し, OA において産生される軟骨基質は質的に劣ったものである可能性を明らかにしてきた⁹⁰⁾. OA における軟骨細胞の基質産生の亢進は OA の進行を単純に阻止するものではなく, 状況によって疾患の進行を促進する要因となっているのかもしれない.

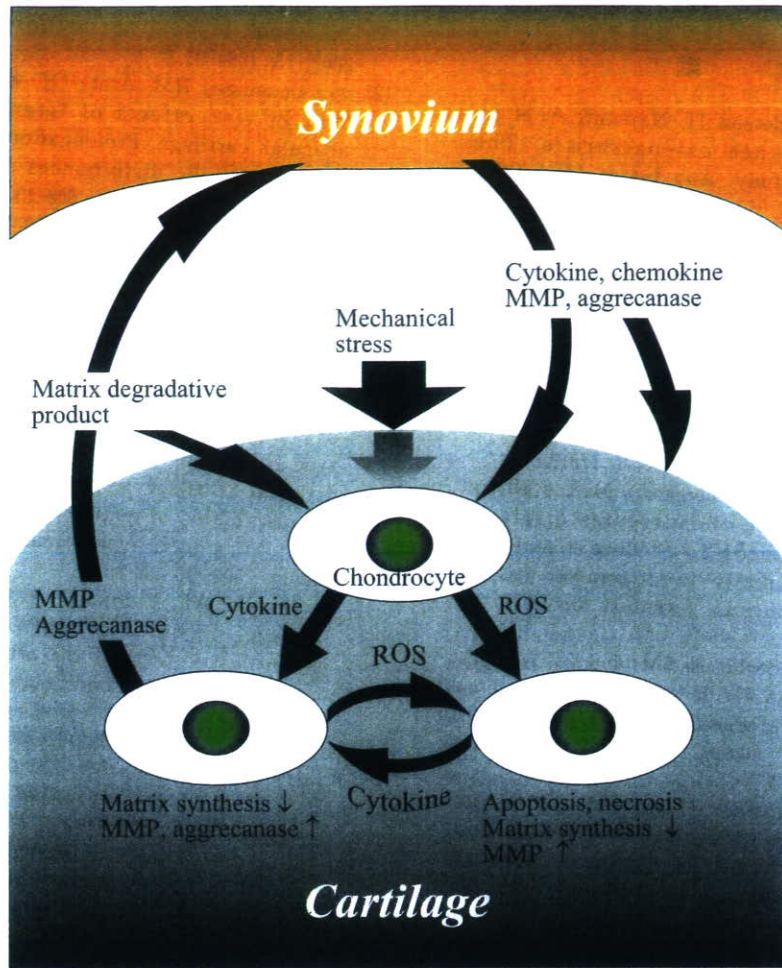


図3 OAの病態におけるタンパク分解酵素、炎症性サイトカイン、ROS、関節軟骨への力学的負荷の相互関係。軟骨細胞は種々の要因による力学的負荷の増大、catabolicなレスポンスの増強などにより炎症性サイトカイン、ROSを過剰に産生するようになる。産生されたサイトカインやROSは軟骨細胞自身に作用して軟骨基質の産生を低下させ、タンパク分解酵素の発現を誘導する。産生されたタンパク分解酵素は基質の変性を引き起こすが、この結果生じた軟骨の変性産物は軟骨細胞自身と滑膜細胞に対して炎症性サイトカインやタンパク分解酵素の発現を誘導するため、軟骨変性はさらに進行することになる。OAではこのように軟骨細胞、滑膜細胞のさまざまなレスポンスが悪循環を形成することによって病態が進行すると考えられる。理解を容易にするため図ではcatabolicな要因を発現する軟骨細胞とこの影響を受ける側の細胞を分けて示してある。

おわりに

多くの研究によってOAにおける病変についてさまざまな機序が明らかにされ、病態の理解が徐々に深まっているのは間違いない。しかし一方であまりに多様な機序が提唱されてきたため、病態においてどのような変化が重要であるのかかむしろ不明確になっている

傾向も見られる、今後OAの病態に含まれるさまざまな現象がそのsignificanceを含めて明らかにされることで効果的な疾患の発症予防法、進行抑止法が確立されることを期待したい。

文 献

- 1) Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, et al. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1988; 109: 18-24.
- 2) Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, et al. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1992; 116: 535-9.
- 3) Verbruggen G, Cornelissen M, Almqvist KF, et al. Influence of aging on the synthesis and morphology of the aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 170-9.
- 4) Tran-Khanh N, Hoemann CD, McKee MD, et al. Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix. *J Orthop Res* 2005; 23: 1354-62.
- 5) Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res* 1997; 15: 491-8.
- 6) Loeser RF, Shanker G. Autocrine stimulation by insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 2 mediates chondrocyte survival in vitro. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1552-9.
- 7) Schafer SJ, Luyten FP, Yanagishita M, et al. Proteoglycan metabolism is age related and modulated by isoforms of platelet-derived growth factor in bovine articular cartilage explant cultures. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 431-8.
- 8) Scharstuhl A, van Beuningen HM, Vitters EL, et al. Loss of transforming growth factor counteraction on interleukin 1 mediated effects in cartilage of old mice. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 1095-8.
- 9) Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, et al. Reduced transforming growth factor- β signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R1338-47.
- 10) Tardif G, Reboul P, Pelletier JP, et al. Normal expression of type 1 insulin-like growth factor receptor by human osteoarthritic chondrocytes with increased expression and synthesis of insulin-like growth factor binding proteins. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 968-78.
- 11) Plumb MS, Aspden RM. The response of elderly human articular cartilage to mechanical stimuli in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 1084-91.
- 12) van Beuningen HM, Arntz OJ, van den Berg WB. In vivo effects of interleukin-1 on articular cartilage. Prolongation of proteoglycan metabolic disturbances in old mice. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 606-15.
- 13) Forsyth CB, Cole A, Murphy G, et al. Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 1118-24.
- 14) Wu W, Billingham RC, Pidoux I, et al. Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2087-94.
- 15) Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, et al. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* 1995; 96: 2859-69.
- 16) 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-1 β and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2349-57.
- 17) Min BH, Kim HJ, Lim H, et al. Effects of aging and arthritic disease on nitric oxide production by human articular chondrocytes. *Exp Mol Med* 2001; 33: 299-302.
- 18) Bobacz K, Erlacher L, Smolen J, et al. Chondrocyte number and proteoglycan synthesis in the aging and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1618-22.
- 19) Verzijl N, DeGroot J, Bank RA, et al. Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover. *Matrix Biol* 2001; 20: 409-17.
- 20) Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2000; 275: 39027-31.
- 21) Chen AC, Temple MM, Ng DM, et al. Induction of advanced glycation end products and alterations of the tensile properties of

- articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3212-7.
- 22) Verzijl N, DeGroot J, Ben ZC, et al. Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 114-23.
 - 23) DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJ, et al. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1207-15.
 - 24) Steenvoorden MM, Huijzinga TW, Verzijl N, et al. Activation of receptor for advanced glycation end products in osteoarthritis leads to increased stimulation of chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 253-63.
 - 25) DeGroot J, Verzijl N, Bank RA, et al. Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of nonenzymatic glycation. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1003-9.
 - 26) Inerot S, Heinegard D, Audell L, et al. Articular-cartilage proteoglycans in aging and osteoarthritis. *Biochem J* 1978; 169: 143-56.
 - 27) Bayliss MT, Ali SY. Age-related changes in the composition and structure of human articular-cartilage proteoglycans. *Biochem J* 1978; 176: 683-93.
 - 28) Dudhia J, Davidson CM, Wells TM, et al. Age-related changes in the content of the C-terminal region of aggrecan in human articular cartilage. *Biochem J* 1996; 313 (Pt 3): 933-40.
 - 29) Maroudas A, Bayliss MT, Uchitel-Kaushansky N, et al. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys* 1998; 350: 61-71.
 - 30) Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 728-33.
 - 31) Manek NJ, Hart D, Spector TD, et al. The association of body mass index and osteoarthritis of the knee joint: an examination of genetic and environmental influences. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1024-9.
 - 32) Marks R, Allegrante JP. Body mass indices in patients with disabling hip osteoarthritis. *Arthritis Res* 2002; 4: 112-6.
 - 33) Tepper S, Hochberg MC. Factors associated with hip osteoarthritis: data from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-I). *Am J Epidemiol* 1993; 137: 1081-8.
 - 34) Haara MM, Heliövaara M, Kroger H, et al. Osteoarthritis in the carpometacarpal joint of the thumb. Prevalence and associations with disability and mortality. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86: 1452-7.
 - 35) Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, et al. Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Epidemiology* 1999; 10: 161-6.
 - 36) Miller GD, Nicklas BJ, Davis CC, et al. Is serum leptin related to physical function and is it modifiable through weight loss and exercise in older adults with knee osteoarthritis? *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 1383-90.
 - 37) Dumond H, Presle N, Terlain B, et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3118-29.
 - 38) Presle N, Pottie P, Dumond H, et al. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 690-5.
 - 39) Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1500-5.
 - 40) Hart DJ, Doyle DV, Spector TD. Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 17-24.
 - 41) Nevitt MC, Cummings SR, Lane NE, et al. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med* 1996; 156: 2073-80.
 - 42) Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, et al. Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1867-73.
 - 43) Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, et al. Estrogen receptor a gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1913-22.

- 44) Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, et al. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2481-7.
- 45) Kinney RC, Schwartz Z, Week K, et al. Human articular chondrocytes exhibit sexual dimorphism in their responses to 17 β -estradiol. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 330-7.
- 46) Richmond RS, Carlson CS, Register TC, et al. Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2081-90.
- 47) Flannery CR, Lark MW, Sandy JD. Identification of a stromelysin cleavage site within the interglobular domain of human aggrecan. Evidence for proteolysis at this site in vivo in human articular cartilage. *J Biol Chem* 1992; 267: 1008-14.
- 48) Fosang AJ, Neame PJ, Last K, et al. The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. *J Biol Chem* 1992; 267: 19470-4.
- 49) Fosang AJ, Last K, Knauper V, et al. Fibroblast and neutrophil collagenases cleave at two sites in the cartilage aggrecan interglobular domain. *Biochem J* 1993; 295 (Pt 1): 273-6.
- 50) Fosang AJ, Last K, Knauper V, et al. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett* 1996; 380: 17-20.
- 51) Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, et al. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002; 277: 22201-8.
- 52) Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, et al. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996; 97: 2011-9.
- 53) Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997; 99: 1534-45.
- 54) Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97: 761-8.
- 55) Aigner T, Zien A, Gehrsitz A, et al. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2777-89.
- 56) Fukui N, Purple CR, Sandell LJ. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Curr Rheumatol Rep* 2001; 3: 496-505.
- 57) Lohmander LS, Neame PJ, Sandy JD. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1214-22.
- 58) Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ, et al. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* 1992; 89: 1512-6.
- 59) Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 1999; 284: 1664-6.
- 60) Abbaszade I, Liu RQ, Yang F, et al. Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* 1999; 274: 23443-50.
- 61) Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 94-103.
- 62) Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2547-58.
- 63) Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005; 434: 644-8.
- 64) Homandberg GA, Meyers R, Xie DL. Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *J Biol Chem* 1992; 267: 3597-604.
- 65) Arner EC, Tortorella MD. Signal transduction through chondrocyte integrin receptors induces matrix metalloproteinase synthesis and synergizes with interleukin-1. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1304-14.
- 66) Pulai JI, Chen H, Im HJ, et al. NF- κ B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol* 2005; 174: 5781-8.
- 67) Homandberg GA, Hui F, Wen C, et al. Fibronectin-fragment-induced cartilage chondrolysis is associated with release of