

ny) と膝用コイル (伸展位: CP Extremity, SIEMENS, Erlangen, Germany, 屈曲位: Loop Coil, SIEMENS, Erlangen, Germany) を使用した。この装置はガントリー径が70cmと大きく、膝屈曲位でも撮影が可能である。撮影条件は true FISP (Fat suppression water excitation, TR 9.77ms TE 4.33ms, Flip angle 28deg., FOV 16cm~20cm, slice厚0.8mm, matrix 320 × 256, slice resolution 50%, Band width 300hz/pixel, 撮影時間 6分) を使用した。この撮影方法は軟骨や半月板と水分との分離が良いとされている^{5), 14)}。撮影は仰臥位で行い、専用のデバイスを用いて下腿内外旋は制限せず、膝関節伸展0度から屈曲60度まで20度刻みに4ポジションを撮影した (図1)。

2. 3-D半月モデルの作成と半月板3-D動態の可視化

3-D半月モデルの作成と可視化には開発した解析ソフトVirtual Place-M (AZE Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。MR画像から半月、脛骨、関節軟骨の輪郭をコンピューター上で半自動的に抽出し⁹⁾、3-Dコンピューターモデルを作成した (図2-(A))。

Volume-based registration method⁴⁾ を応用し、各屈曲角度で撮影した脛骨を画像の輝度値を基にコンピューター上で重ね合わせることににより、脛骨に対する異なる膝屈曲角度での半月板の3次元的空间位置を求めた。これらのデータを基に、関節運動に伴う3-D半月モデルの3次元動態を可視化した¹⁶⁾ (図2-(B))。

3. 内側半月板水平断裂の膝関節屈伸に伴う変位・変形の定量評価

半月板水平断裂の膝屈伸に伴う変位・変形を定量評価するために、脛骨後縁の接線と直行し、脛骨の最大前後径となる傍矢状断面での断面を作成した (図3-(A))。作成した傍矢状断面で見られる半月板の特徴点10点を以下のように設定した。前節は脛骨側付着部A、遊離縁B、大腿骨側縁C、後節は遊離縁D、脛骨側付着部E、大腿骨側縁Fとし、水平断裂部の脛骨面前縁G、脛骨面後縁H、断裂の滑膜移行部遠位縁I、断裂の滑膜移行部近位縁Jとした (図3-(B))。

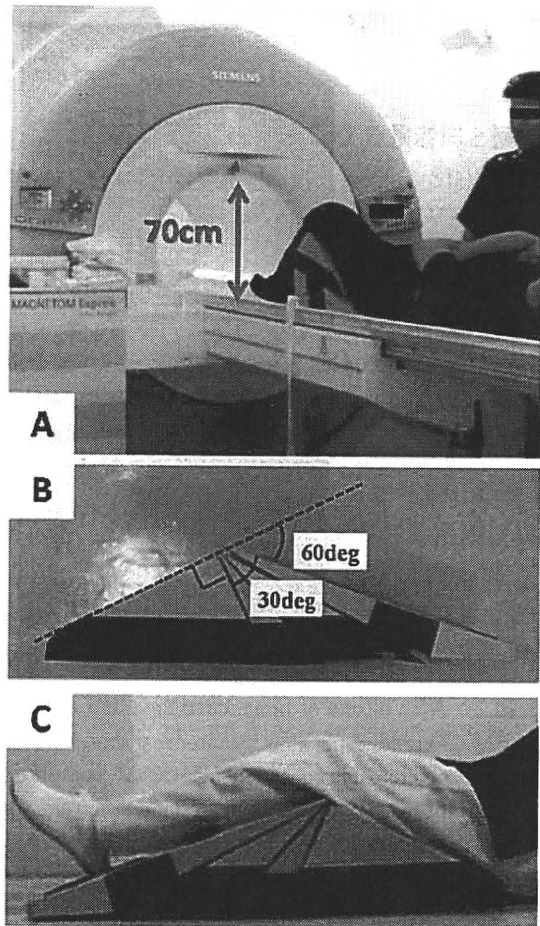


図1. A: 1.5T MR scanner which is characterized by an expanded 70cm bore diameter.
B, C: A custom-made brace.

次に、Boxheimerらの報告に基づき²⁾、作成した傍矢状断面に脛骨高原皮質骨の接線HTRL (Horizontal tibial reference line) と、HTRLに直行し脛骨関節軟骨の前縁を通るATRL (Anterior tibial reference line) の2本を補助線として加えた。そして、HTRLとATRLから各特徴点までの距離をそれぞれの肢位で測定し、0度から60度までの変化量 (移動距離) を計算した (図3-(B))。半月板損傷部での屈曲に伴う変形の評価は、屈曲に伴うGH間距離の変化 (水平方向の変化) とIJ間距離の変化 (垂直方向の変化) を計算した。また、半月板後節を三角形に単純化することにより、それぞれの屈曲角度における水平断裂の損傷部面積 (S) を特徴点E, G, H, I, Jの測定値から近似した。

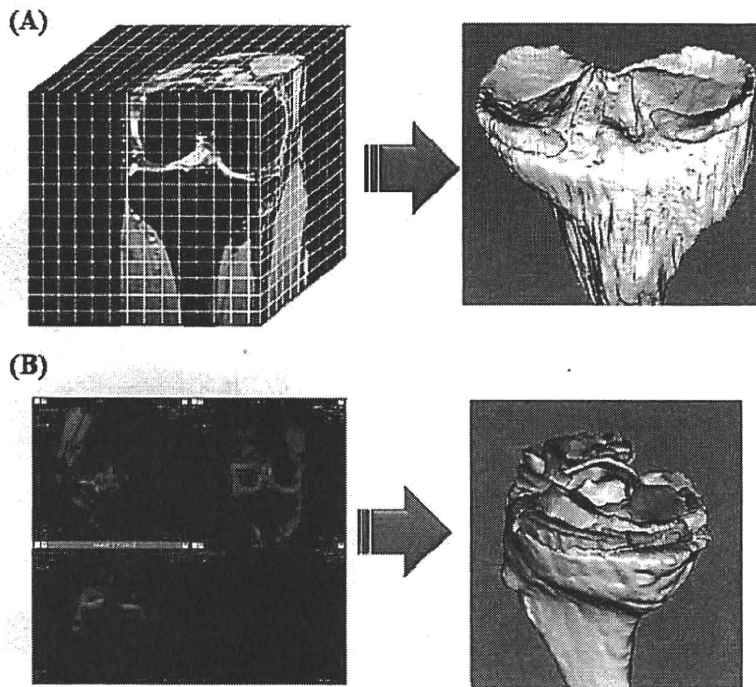


図2. A : Volume of bone, cartilage, and meniscus was semiautomatically extracted from the images of extended position by intensity threshold techniques to segment bony, cartilage and meniscal regions of tibia. Three dimensional (3-D) computer models then constructed using the marching cubes technique. B : 3-D computer models of each position were automatically superimposed using volume registration technique, which is an image-processing method for matching volume images based on voxel values, and were visualized by the Visualization Tool Kit (VTK, Kitware Inc. New York, USA).

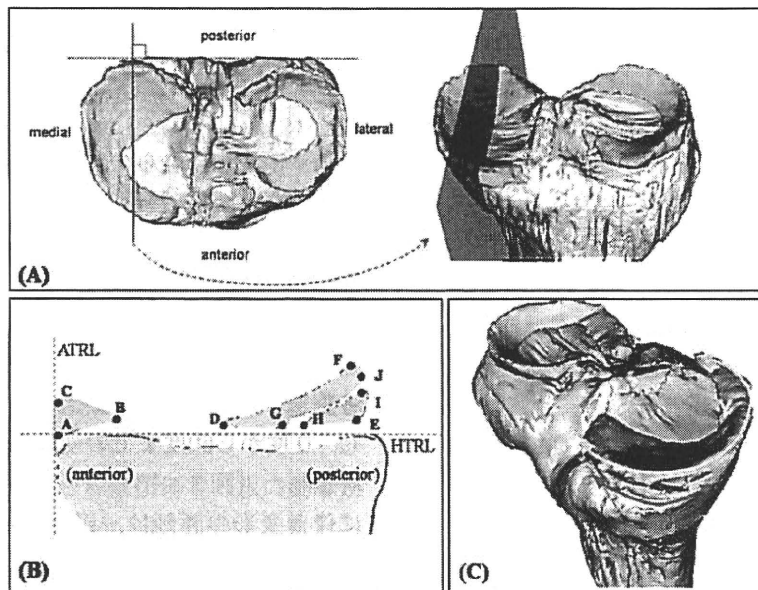


図3. A : 3-D model of the knee was cut in the sagittal plane which crosses the most posterior part of the medial tibial plateau. B : Ten points A-J were chosen to evaluate movement and deformation of the meniscus body. C : The circumferential length of horizontal tear was also measured against the whole circumferential length of meniscus on the 3-D meniscus models.

三角形JGEの面積から三角形IEHの面積を引くことにより、損傷部面積の近似値を計算した (S@0°, S@20°, S@40°, S@60°)。伸展0度から屈曲60度までの変化量 ($\Delta S = S@60^\circ - S@0^\circ$) を評価した。

内側半月水平断裂の損傷部の広がり进行评估するため、半月辺縁部の損傷部の円周方向の長さ (X) と、半月の円周方向の全長 (Y) の比 (X/Y) を% tearとして評価した (図3-(C))。

4. 測定における信頼性

半月板の特徴点10点の位置を、同一検者による3回の測定と、3人の検者による各1回の測定から、検者内あるいは検者間の標準偏差 (standard deviation: SD) と変動係数 (coefficients of variation: CV), 級内相関係数 (intraclass correlation coefficient: ICC) を計算した。信頼性を評価したのちに、同一検者により半月板の特徴点10点を測定した。

5. 統計処理

統計ソフトはSSPS11.5J (SSPS Japan Inc. Tokyo, Japan) を使用した。相関係数はSpearmanの順位相関係数より求め、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 測定における信頼性

半月板特徴点10点の測定による検者間と検者内の標準偏差 (standard deviation: SD) と変動係数 (coefficients of variation: CV), 級内相関係数 (intraclass correlation coefficient: ICC) を表1に示す。ICCはいずれも0.99であり、測定における信頼性は高いといえる。

2. 内側半月板水平断裂の膝屈曲に伴う変位, 変形

後節に水平断裂のある内側半月板は、膝屈曲に伴い、前節と後節とも9例全例で後方に移動した。前節のA, B, C点は後方に移動したが、A, B, C点それぞれの後方への移動距離は異なり、A点平均4.7mm, B点平均6.8mm, C点平均6.6mm後方へ移動し、C点の高さは平均0.2mm低くなり、前節は屈曲に伴い変形を呈した。後節のD, E, F点も9例全例で後方へ移動したが、D, E, F点それぞれの後方移動距離は異なり、D点平均4.8mm, E点平均4.2mm, F点平均4.6mm後方に移動し、F点の高さは平均1.8mm高くなり、後節も屈曲に伴い変形を呈した (図4-(A), (B))。

表1. The intra-observer and inter-observer standard deviation (SD), coefficients of variation (CV) and intraclass correlation coefficient (ICC) for ten points.

| 膝屈曲角度 | 特徴点 | 検者間 | | | 検者内 | | |
|-------|-----|---------|--------|---------|---------|--------|---------|
| | | SD (cm) | CV (%) | ICC | SD (cm) | CV (%) | ICC |
| 0° | A | 0.00 | 0.00 | 0.99831 | 0.00 | 0.00 | 0.99938 |
| | B | 0.00 | 0.00 | | 0.06 | 5.41 | |
| | C | 0.06 | 10.83 | | 0.06 | 10.19 | |
| | D | 0.10 | 4.35 | | 0.00 | 0.00 | |
| | E | 0.10 | 2.13 | | 0.06 | 1.26 | |
| | F | 0.06 | 5.97 | | 0.00 | 0.00 | |
| | G | 0.12 | 3.43 | | 0.06 | 1.67 | |
| | H | 0.06 | 1.53 | | 0.06 | 1.57 | |
| | I | 0.06 | 17.32 | | 0.00 | 0.00 | |
| | J | 0.00 | 0.00 | | 0.00 | 0.00 | |
| 60° | A | 0.15 | 41.66 | 0.99753 | 0.00 | 0.00 | 0.99938 |
| | B | 0.12 | 7.37 | | 0.00 | 0.00 | |
| | C | 0.00 | 0.00 | | 0.00 | 0.00 | |
| | D | 0.06 | 2.37 | | 0.06 | 2.34 | |
| | E | 0.06 | 1.19 | | 0.06 | 1.19 | |
| | F | 0.10 | 7.69 | | 0.00 | 0.00 | |
| | G | 0.06 | 1.62 | | 0.06 | 1.62 | |
| | H | 0.06 | 1.43 | | 0.00 | 0.00 | |
| | I | 0.06 | 13.32 | | 0.06 | 15.75 | |
| | J | 0.06 | 7.53 | | 0.06 | 7.87 | |

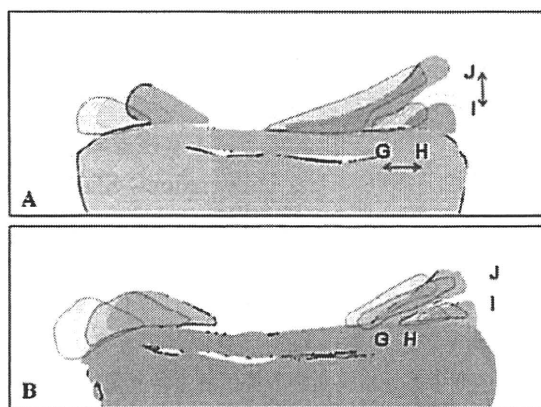


図4. Deformation of horizontal tear of medial meniscus. A : case1. The distance GH (horizontal gap) and IJ (vertical gap) increased during knee flexion. B : case2. The gap of tear is hardly opened during knee flexion.

3. 損傷部の膝屈曲に伴う変形

膝屈伸に伴う損傷部の変位, 変形の変化と損傷部の大きさを示す (表1).

水平方向GH間の膝屈曲による変化は, 個々の症例により異なり -1 mmから4 mmで, 9例平均では1.0mmと開大した. 損傷部の垂直方向IJも症例により異なり, 0 mmから4 mmで, 9例平均で平均1.6mm開大した (図4 - (A), (B), 表2). また, これらGH間の距離変化とIJ間の距離変化の間には, 強い正の相関関係を示した ($R^2=0.8, p<0.01$, 図5 - (A)).

表2. Results of the change of distance of GH and IJ, the % tear, and the change of tear site area (ΔS).

| n | 年齢 | GH間距離変化(mm) | IJ間距離変化(mm) | %tear(%) | $\Delta S(mm^2)$ |
|----|------|-------------|-------------|----------|------------------|
| 1 | 39 | 3 | 3 | 47.7 | 19 |
| 2 | 30 | 1 | 3 | 50.2 | 14 |
| 3 | 50 | 0 | 1 | 28.0 | 0 |
| 4 | 47 | -1 | 0 | 20.1 | 5.5 |
| 5 | 44 | 0 | 0 | 20.5 | 0.5 |
| 6 | 41 | 0 | 1 | 23.0 | -0.5 |
| 7 | 42 | 2 | 2 | 41.5 | 16 |
| 8 | 47 | 0 | 0 | 16.9 | -4.5 |
| 9 | 17 | 4 | 4 | 52.5 | 19.5 |
| 平均 | 39.7 | 1.0 | 1.6 | 33.4 | 7.7 |
| SD | 10.3 | 1.7 | 1.5 | 14.4 | 9.4 |

4. 損傷部面積と三次元半月モデルによる内側半月水平断裂の損傷部の大きさ

三次元半月モデルでは, 内側半月水平断裂が辺縁部の間隙として認められ, % tearは16%から52%であった. 損傷部の大きさの分布は, 30%以下の例が5例, 40%を越える例が4例であった (表2).

また, 膝伸展から屈曲60度までの損傷部面積の変化量は -4.5mm²から19.5mm²であった (表2).

損傷部の大きさ% tearと, 損傷部面積Sの膝屈伸による変化の間には, 高い正の相関を認め相関係数は0.8857 ($p<0.01$)であった. つまり, 損傷部の大きさが大きな症例は損傷部が膝屈曲

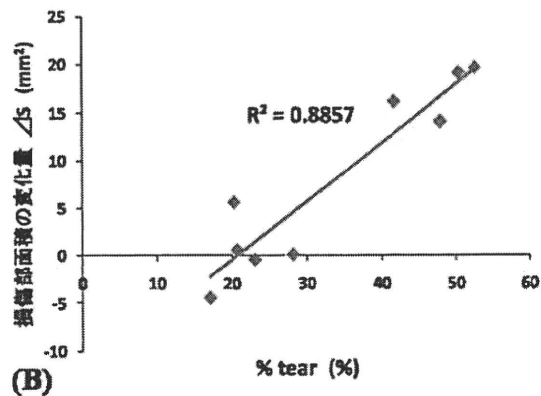
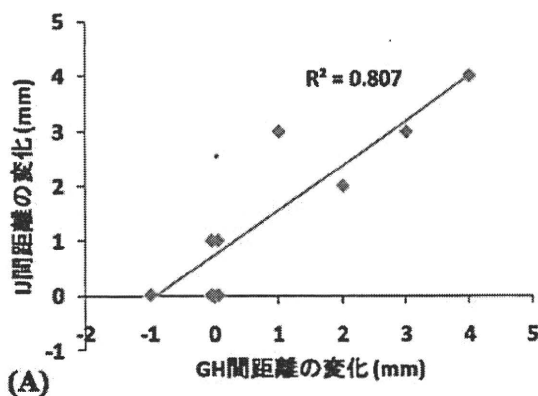


図5. A : Scatter plots of the change of GH versus IJ with best-fit line. B : Scatter plots of the % tear versus the change of tear site area with best-fit line.

に伴って開大する症例であった (図5-(B)).

考 察

われわれは症状のある水平断裂の膝屈曲に伴う変位, 変形を, 3-DMRIおよび3-Dコンピューターモデルにより検討した. 本研究の特徴は, 屍膝ではなく生体での3-D動作解析という点であり, さらにbore径の広いMRIを用いることで, 従来のMRIでは撮影が制限されていたような機能的な肢位での撮影が可能となった. また, volume-based registration method⁴⁾を応用し, 各屈曲角度で撮影した脛骨を画像の輝度値を基にコンピューター上で重ね合わせることにより, 脛骨に対する異なる膝屈曲角度での半月板の3次元的空间位置を求める本手法は, 位置誤差, 回転誤差1 mm, 1度以下の高精度なシステムであり¹⁶⁾, 従来法に比べより生理的かつ正確な動作解析が可能となる.

MRIによる正常半月板の変位に関して, 過去にいくつか報告されている. Thompsonらは新鮮凍結膝5膝を用いて膝伸展0度から屈曲120度までを調べ, 内側半月板前節は7.0mm, 後節は3.2mm後方へ変位し, 外側半月板前節は12.8mm, 後節は9.6mm後方へ変位すると報告している¹³⁾. またVediらは生体膝を垂直型open MRIにて撮影し, 立位荷重時には非荷重時に比べて半月板の移動量が大きくなることや, 高さ変化において荷重により外側半月板前角では変化が大きいが, 内側半月板ではあまり変わらないことを報告している¹⁵⁾. 本研究でも, 変位についてはこれら正常半月板の報告と同様に, 膝屈曲に従い後方へ変位していた.

一方で, 損傷半月板の変位, 変形についてはBoxheimerらが報告している³⁾. 垂直型open MRIを用いて, 非荷重伸展位から屈曲90°, 荷重, 内外旋を加えて, 環状断面での半月板のdisplaceについて検討している. それによると, 縦断裂, 横断裂, complex tearはdisplaceが大きく, 水平断裂はdisplaceが小さかった, と述べている. しかし, 水平断裂は損傷部位が後節から後角に存在することが多いため, 環状断面よりも矢状断面で変位, 変形が大きくなると考えられる.

したがってわれわれは, 水平断裂について, 3-DMRIの矢状断像と3-Dコンピューターモデルから病態を検討し, 屈曲に従い損傷部が開大する症例が存在することを明らかにした.

内側半月水平断裂の3-D半月モデルでは, 辺縁部の間隙として損傷部が示され, 今回計測した9例では症例により水平方向の広がり異なっていた. 半月板全周に対する損傷部の割合である% tearが30%以下の症例が9例中5例であり, 40%以上の症例が9例中5例であった. 言い換えれば, 同じ症状を有する水平断裂であっても, 損傷の大きさは異なっていた. また, % tearと膝屈曲に伴う損傷部面積の変化の間には高い正の相関関係がみられた. つまり, 損傷部が大きいものが損傷部の開大が大きいことが明らかになった. 本研究では検討していないが, 損傷部の開大は関節包に無理な力が生じ, 疼痛の原因になりうるのではないかと考えられる. 臨床症状との検討は今後の課題である.

HaugerらはMRIの半月板像と半月板を比較し, MRI画像でのWedge shapeの信号域が半月全体を描出していると報告している⁷⁾ことから, MR画像上で半月板を同定することは十分な精度を持って可能であると考えられる. また, 本研究のMRI撮影の条件はtrue FISPを採用している. この撮影条件はVasanawalaらが報告している¹⁰⁾ように軟骨, 半月, 関節液との分離が非常に判定しやすく, 損傷部の特定も容易である. さらに, 3-Dモデルの作成と測定部位決定での信頼性は, われわれが3検者で検討したところ検者内, 検者間ともにICC>0.99と十分高いと考えられる. しかし生体の半月板と3Dモデルの半月板との精度評価については, 半月板は非剛体であるため困難であり今後の課題である.

本研究の限界については, 非荷重下の静止画像であること, また膝屈曲が60度までであり深屈曲していない点があげられる. より生理的な環境を再現するには, 荷重下に連続運動として画像化することが望ましい. 今後, MR撮影室内で使用可能な荷重装置の開発や, 撮影時間の短縮が必要である.

しかし, 3-D MR撮影から3-D半月モデルを複製することで, 形態的な検討がより詳細にでき, 異なった肢位で撮影することで, 生理的に近い関節運動が視覚化され再現できる。これにより, 半月損傷の病態を詳しく理解することにつながると考えられる。また, この手法を用いれば, 半月損傷の治療効果を形態的評価だけでなく機能的評価も可能となる可能性があり, 今後有用になっていく方法であると考えられる。

結 論

膝屈伸による内側半月板水平断裂の三次元動態MRI解析を9例9膝で行なった。水平断裂を持つ内側半月板も9例全例で膝伸展から屈曲60°まで後方に変位し, 変形していた。水平半月損傷部の変形は症例により異なり, 膝屈曲により損傷部は水平方向に-1 mmから4 mmまで変化し, 垂直方向は0 mmから4 mmまで変化した。また, 損傷部の大きさと損傷部の断面積の膝屈曲による変化量は正の相関を示しており, 損傷部が大きいと損傷部は大きく開大することがわかった。

文 献

- 1) Bessette GC. : The meniscus. *Orthopedics* 15 : 35-42, 1992.
- 2) Boxheimer L, Lutz AM, Treiber K, et al. : MR imaging of the knee : position related changes of the menisci in asymptomatic volunteers. *Invest Radiol.* 39 : 254-63, 2004.
- 3) Boxheimer L, Lutz AM, Weishaupt D, et al. : Characteristic of displaceable and nondisplaceable meniscal tears at kinematic MR imaging of the knee. *Radiology.* 238 : 221-31, 2006.
- 4) Brown LG. : A survey of image registration techniques. *ACM Compt Surveys.* 24 : 325-76, 1992.
- 5) Duc SR, Hodler J, et al. : Articular cartilage defects detected with 3D water-excitation true FISP : prospective comparison with sequences commonly used for knee imaging. *Radiology.* 245 : 216-223, 2007.
- 6) Fairbank TL. : knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg.* 30B : 664-670, 1948.
- 7) Hauger O, Resnick D, et al. : Characterization of the "Red zone" of knee meniscus : MR imaging and histologic correlation. *Radiology.* 217 : 193-200, 2000.
- 8) Hsieh HH, Walker PS. : Stabilising mechanisms of the loaded and unloaded knee joint. *J Bone Joint Surg.* 58A : 87-93, 1976.
- 9) Lorensen W, Cline H. : Marching cubes : a high resolution 3D surface construction algorithm. *Comput Graphics.* 21 : 163-9, 1987.
- 10) Markolf KL, Amstutz HC, et al. : Stiffness and laxity of the knee. The contributions of the supporting structures : a quantitative in vitro study. *J Bone Joint Surg.* 58A : 583-94, 1976.
- 11) McBride ID, Reid JG. : Biomechanical considerations of the menisci of the knee. *Can J Sport Sci.* 13 : 175-87, 1988.
- 12) Seedhom BB. : Transmission of the load in the knee joint with special reference to the role of the menisci. Part 1 : anatomy, analysis and apparatus. *Engineering in Medicine.* 8 : 207-28, 1979.
- 13) Thompson WO, Fu FH, et al. : Tibial meniscal dynamics using three-dimensional reconstruction of magnetic resonance images. *Am J Sports Med.* 19 : 210-215, 1991.
- 14) Vasanawala SS, Gold GE, et al. : Rapid musculoskeletal MRI with phase-sensitive free precession : comparison with routine knee MRI. *Am J Roentgenol.* 184 : 1450-1455, 2005.
- 15) Vedi V, Tennat SJ, et al. : Meniscal movement. *J Bone Joint Surg.* 81B : 37-41, 1999.
- 16) Yamada Y, Toritsuka Y, Shino K, et al. : Morphological analysis of the femoral trochlea in patients with recurrent dislocation of the patella using three-dimensional computer models. *J Bone Joint Surg Br* 89 : 746-751, 2007.

Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis

Reiji Higashiyama · Shigeru Miyaki · Satoshi Yamashita · Teruhito Yoshitaka · Görel Lindman · Yoshiaki Ito · Takahisa Sasho · Kazuhisa Takahashi · Martin Lotz · Hiroshi Asahara

Received: 3 April 2009 / Accepted: 5 August 2009 / Published online: 26 September 2009
© Japan College of Rheumatology 2009

Abstract Recent studies suggest that histone deacetylase (HDAC) inhibitors may therapeutically prevent cartilage degradation in osteoarthritis (OA). Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) plays an important role in the pathogenesis of this disease and in the present study we investigated the correlation between HDACs and MMP-13. Comparing the expression of different HDACs in cartilage from OA patients and healthy donors, HDAC7 showed a significant elevation in cartilage from OA patients. High level of HDAC7 expression in OA cartilage was also confirmed by immunohistochemistry. Knockdown of HDAC7 by small interference RNA (siRNA) in SW1353 human chondrosarcoma cells strongly suppressed interleukin (IL)-1-dependent and independent induction of MMP-13 gene expression. In conclusion, elevated HDAC7 expression in human OA may contribute to cartilage degradation via promoting MMP-13 gene expression, suggesting the critical role of MMP-13 in OA pathogenesis.

Keywords Osteoarthritis · HDAC7 and MMP-13

Abbreviations

| | |
|--------|---|
| MMP | Matrix metalloproteinase |
| OA | Osteoarthritis |
| HDAC | Histone deacetylase |
| RT-PCR | Reverse-transcriptase polymerase chain reaction |
| IL-1 | Interleukin-1 β |
| TSA | Trichostatin A |

Background

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative joint disorder and a major cause of disability in the elderly. Characterized by progressive structural changes in articular cartilage, with persistent degeneration the disease eventually leads to loss of joint function. A significant feature of OA is excessive production of inflammatory mediators [1–3], among which pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1) plays a crucial role in the pathophysiology. IL-1 induces a cascade of inflammatory and catabolic events in chondrocytes, changing chondrocyte anabolism through suppression of proteoglycan and collagen synthesis and by enhancing matrix metalloproteinase (MMP) production.

Several lines of evidence suggest that MMP-13 contributes to cartilage degradation in OA. MMP-13 expression is significantly higher in chondrocytes from cartilage of late-stage OA compared with early OA or normal knee cartilage [4]. In explant cultures treated with a specific MMP-13 inhibitor, release of collagen degradation products from human OA cartilage is reduced [5]. Furthermore, transgenic mice overexpressing activated MMP-13 in the articular chondrocytes develop joint degradation similar to human OA [6]. Characterization of MMP-13 expression

R. Higashiyama · S. Miyaki · M. Lotz · H. Asahara
Division of Arthritis Research, The Scripps Research Institute,
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA

R. Higashiyama · S. Yamashita · T. Yoshitaka · G. Lindman ·
Y. Ito · H. Asahara (✉)
Department of Systems BioMedicine, National Research
Institute for Child Health and Development, 2-10-1 Okura,
Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan
e-mail: asahara@nch.go.jp

R. Higashiyama · T. Sasho · K. Takahashi
Department of Orthopaedic Surgery,
Graduate School of Medicine,
Chiba University, Chiba, Japan

regulation in articular chondrocytes will contribute to understanding the molecular etiology of OA.

Two families of histone deacetylase (HDACs) have been identified: the classical HDAC family and the NAD⁺-dependent, so-called SIR2 family (sometimes called class III HDACs). Classical HDACs can be grouped into 3 classes (I, II, and IV) based on phylogeny [7]. Class I HDACs (HDAC1, 2, 3, and 8) are related to yeast RPD3, and class II HDACs (HDAC4, 5, 6, 7, 9, and 10) are more closely related to yeast HDA1 [8]. HDAC11 alone represents class IV, and HDAC11-related proteins have been described in all eukaryotic organisms with the exception of fungi [7]. Trichostatin A (TSA) is a HDAC inhibitor [8] with a broad spectrum of activity against class I and II HDACs, but not HDACs from the SIR2 family. Administration of these reagents to cells blocks histone deacetylation and leads to increased histone acetylation within gene expression in susceptible genes. There are also, however, many cases in which HDAC inhibitors act as repressors of gene expression [9–13].

Recently, HDACs have emerged as targets in cancer therapy and inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis (RA) and OA [14–23], but it is still unclear which HDACs are specifically involved in cartilage degradation. These observations prompted us to investigate HDAC expression in normal and OA cartilage and identify the specific HDAC that contributes to cartilage degradation in human OA.

Materials and methods

Cartilage procurement and processing

Cartilage was obtained from 6 normal donors (age range 19–49 years; Mankin score 0–2 points) and 10 OA donors (age range 44–93 years; Mankin score 5–10 points). All tissue samples were graded according to a modified Mankin scale [24], for which <3 points was normal and ≥ 5 points represented OA. Normal articular cartilage was harvested from femoral condyles and tibial plateaus of human tissue donors under approval from the Scripps Human Subjects Committee. Osteoarthritis cartilage was obtained from patients undergoing knee replacement surgery. Cartilage thickness ranged from 1.5 to 2.8 mm. Cartilage surfaces were rinsed with saline and parallel sections 5 mm apart were cut vertically from the cartilage surface onto subchondral bone with a scalpel. These cartilage strips were then resected from bone. Human chondrocytes were isolated and cultured as previously described [25]. Cartilage tissue was incubated with trypsin at 37°C for 10 min. Following removal of trypsin solution, tissue slices were treated for 12–16 h with type IV clostridial

collagenase in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 5% fetal calf serum. After initial isolation, cells were kept in high-density cultures in DMEM (high glucose) supplemented with 10% CS, L-glutamine, and antibiotics and allowed to attach to the surface of the culture flasks. After cells had grown to confluence, they were split once (passage 1) and grown to confluence again in preparation for experiments [26].

Cell culture

Human knee chondrocytes were grown to confluence in 35-mm 6-well plates with 2 mL DMEM containing 10% CS with or without TSA (SIGMA Inc.) at 300 nM for 24 h (Fig. 1a). In parallel, cells were precultured for 5 h with 5 ng/mL IL-1, after which TSA was added at 300 nM and cultured additionally 24 h (Fig. 1b).

Knockdown experiments by small interference RNA (siRNA) were carried out on SW1353 human chondrosarcoma cells transfected with 25 nmol siHDAC7 (Applied Biosystems Inc.) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation) for 5 h, following the manufacturer's instructions. Then incubation with 5 ng/mL IL-1 was done. In preliminary experiments, we could knock down the HDAC7 expression level to 20% by 25 nmol siHDAC7. Because the siHDAC7 effect was not enough in human

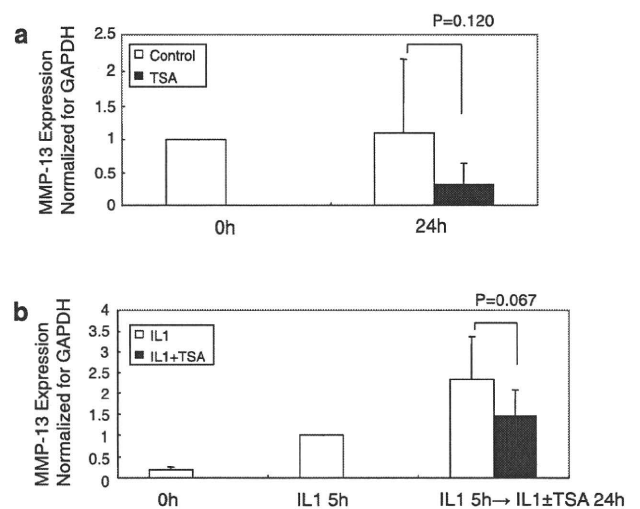


Fig. 1 TSA suppresses both natural and IL-1-induced MMP-13 expression. TSA lowered both natural and IL-1-induced MMP-13 expression, although the effect was not statistically significant. Real-time PCR results from **a** human knee chondrocytes ($n = 6$, age range 19–66 years) treated or untreated with 300 nM TSA for 24 h, and **b** chondrocytes stimulated with IL-1 (5 ng/mL) for 5 h and then treated or untreated with TSA (300 nM) for 24 h. GAPDH gene expression was used for normalization. Results are expressed as fold changes relative to a value of 1 for untreated control cells. $P = 0.120$ (a). Results are expressed as fold changes relative to a value of 1 for untreated control cells after 5 h of IL-1 stimulation. $P = 0.067$ (b)

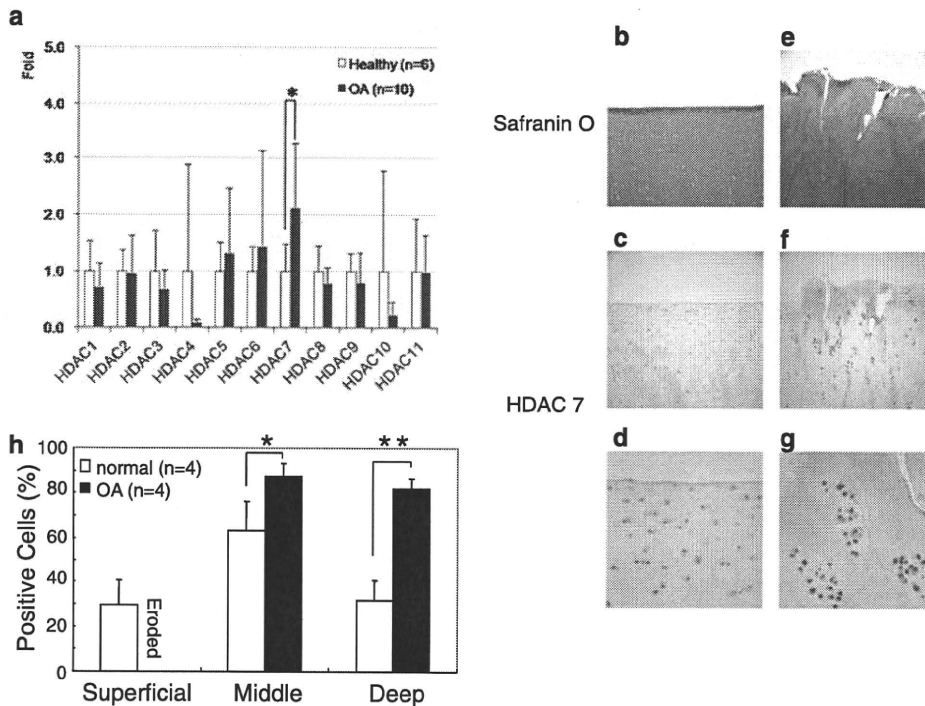


Fig. 2 Localization of HDAC7 in normal and OA knee cartilage. **a** HDAC1–11 mRNA expression in human knee cartilage was determined by real-time RT-PCR. In normal samples, HDAC3 was the most abundantly expressed HDAC (data not shown). HDAC7 had significantly higher expression in OA than in normal cartilage (Fig. 2a). Cartilage was obtained from 6 normal donors (mean age 30.8 years; range 19–49 years; Mankin score 0–2 points) and 10 OA donors (mean age 71.6 years; range 44–93 years old; Mankin score 5–10 points) (Fig. 2a). The results are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$. **b–g** HDAC7 localization was examined in tissue from 4

normal donors (age range 19–48 years) and 4 OA donors (age range 48–93 years). HDAC7-positive cells were more frequent in OA cartilage than in normal cartilage. The immunoreactive product is *dark red*. $\times 10$ (**b, c, e, f**). **h** The number of HDAC7-positive cells was counted in the superficial, middle, and deep zones of sections from normal ($n = 4$) and OA ($n = 4$) cartilage with specific antibodies. The OA middle and deep zones had significantly more HDAC7-positive cells than did normal middle and deep zones, respectively. The results are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

normal chondrocytes, we used SW1353 human chondrosarcoma cells for this assay (data not shown).

Quantitative polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from cartilage tissues or monolayer chondrocyte cultures using Trizol (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA). Complementary DNA was produced using Ready-To-Go You Prime First Strand Beads (GE Health Inc., USA) with 2 μ g total RNA and oligo (dT) primers. Messenger RNA expression of HDAC1–11 and MMP-13 was detected by real-time RT-PCR with TaqMan Gene Expression Assay probe (Applied Biosystems Inc.) using an iCycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) as follows: 10 min at 95°C for initial denaturation, followed by 45 cycles at 95°C (15 s) and 60°C (1 min). The expression levels of HDACs and MMP-13 were defined from the threshold cycle (Ct) and relative values were calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method after normalizing expression to GAPDH.

Histology and immunohistochemistry

Cartilage tissues were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Safranin O. HDAC7 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (catalog no. sc-11421, Santa Cruz, CA, USA). Paraffin-fixed samples were first deparaffinized in xylene substitute Pro-Par Clearant (Anatech Ltd, Battle Creek, MI, USA) and ethanol before rehydration in water. Following a wash with phosphate-buffered saline (PBS), sections were blocked with 0.1% Tween 20 with 3% normal goat serum for 30 min at room temperature. HDAC7 antibodies (1:50 dilution; 4 μ g/mL) and normal rabbit immunoglobulin G (IgG, 4 μ g/mL) as a negative control were applied and incubated overnight at 4°C. After washing with PBS, sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody for 30 min (1:200; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) and then incubated with Vectastain ABC-AP kit (AK-5000; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) for 30 min at room temperature. Finally, sections

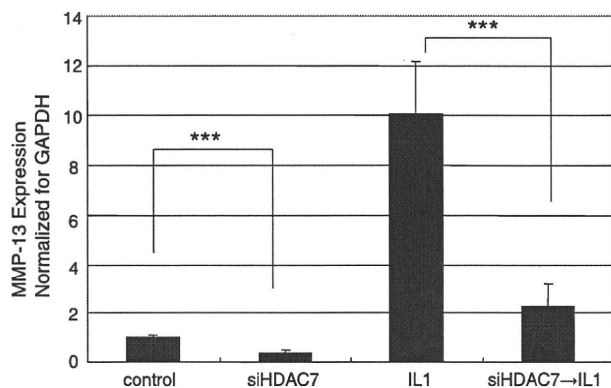


Fig. 3 Knockdown of HDAC7 by siRNA in SW1353 human chondrosarcoma cells. Real-time PCR results of MMP-13 expression in HDAC7 knocked down cells with and without the additional 5 h of culturing in IL-1 (5 ng/mL). Knockdown of HDAC7 decreased both natural and IL-1-induced MMP-13 expression. Data are presented as mean \pm SD ($n = 2$, in duplicate). *** $P < 0.001$

were stained with an alkaline phosphatase substrate kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

Quantification and localization of signals throughout cartilage

To systematically assess HDAC7 localization throughout each cartilage zone, we counted positive and negative cells in a $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ grid (using a $40\times$ field objective) starting from the cartilage surface to the deep zone (DZ). This procedure was repeated a minimum of 5 times for each section. We based our identification of each zone on previously reported characteristics that comprise cell shape, morphology, orientation, and pericellular matrix (PM) deposition [27]. Thus, superficial zone (SZ) cells were characterized by their elongated shape, their parallel orientation relative to the surface, and their lack of extensive PM. These cells predominate within the first $50 \mu\text{m}$. The middle zone (MZ) was distinguishable by the presence of rounded cells without an organized orientation relative to the surface, an extracellular matrix (ECM) rich in proteoglycans, and evidence of PM. Conversely, DZ cells were recognized by extensive PM deposition and an organization of 3 or more cells in chondron groups arranged in columns. The depth of each zone was recorded for each section for comparative analysis on the frequency of positive signals in each zone. The frequency of positive cells was expressed as a percentage relative to the total number of cells counted in each zone.

Statistical analysis

Statistically significant differences between 2 groups were determined with t tests. Results are presented as

mean \pm standard deviation (SD). P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Histone deacetylase inhibitor TSA modulates MMP-13 gene expression

To examine the potential role of HDACs on MMP13 expression, chondrocytes were treated with TSA, a HDAC inhibitor. We used normal chondrocytes ($n = 6$) to exclude effect of OA changes on chondrocytes. When treating human knee chondrocytes with TSA only, natural MMP-13 expression was suppressed to a small degree ($P = 0.120$) and with IL-1 induction of MMP-13 the suppression was greater ($P = 0.067$), but none of the results were statistically significant (Fig. 1). Even though not significant, these results provide a clue and increase our curiosity to which HDAC is affecting the MMP-13 expression.

HDAC7 expression is elevated in OA cartilage

All the knee cartilage samples obtained for this study were examined for HDAC1–11 messenger RNA (mRNA) expressions in human by real-time PCR. Expression of HDAC7 was significantly higher in OA than in normal cartilage (Fig. 2a). On the other hand, HDAC4 and HDAC10 were relatively lower in OA cartilage, although the changes were not statistically significant.

Normal and OA samples stained with Safranin O (Fig. 2b, e) displayed different localization of HDAC7-positive cells. In normal cartilage, we detected positive cells in the MZ (Fig. 2c), whereas in OA cartilage we detected many positive cells, especially in chondrocyte clusters (Fig. 2f, g). Representative examples were a normal 19-year-old female (Mankin score 1) and a 57-year-old male with OA (Mankin score 9). Figure 2h presents the quantitative analysis of zonal distribution of HDAC7-expressing cells in 4 normal (range 19–48 years old) and OA (range 48–93 years old) donors. Complete erosion of the SZ was observed in OA cartilage. Moreover, significantly more positive cells were observed in middle and DZs in OA cartilage, compared with in normal middle and DZs, respectively.

Knockdown of HDAC7 significantly decreases MMP-13 expression

To investigate the correlation between HDAC7 and MMP-13, HDAC7 was knocked down by siRNA in SW1353 human chondrosarcoma cells and mRNA expression of MMP-13 was measured by real-time RT-PCR. HDAC7

knockdown cells were further stimulated with IL-1, and MMP-13 expression was measured again. Knocking down HDAC7 in SW1353 cells decreased both natural and IL-1-induced MMP-13 expression significantly (Fig. 3), indicating functional interaction between HDAC7 and MMP-13.

Discussion

Onset and progression of OA is associated with changes in chondrocyte gene expression. HDACs balance histone acetyltransferases (HATs) and regulate gene transcription epigenetically, and thereby control the acetylation status of histone proteins and nonhistone substrates. In general, acetylation of histones loosens nucleosomal structures, which promotes gene transcription. In contrast, deacetylation of histones stabilizes nucleosomal structures and represses gene transcription [28, 29]. However, emerging evidence indicates that gene regulation by acetylation/deacetylation is more dynamic and complex, and that HATs also can act as repressors and HDACs as transcription activators. Indeed, global analysis of gene expression has shown that inhibition of HDAC activity results in both induction and repression of gene expression [30–35]. Recent studies demonstrated that HDAC inhibitors have therapeutic effects in cancer and inflammatory diseases [14–23]. Young et al. [22] revealed that HDAC inhibitors modulate MMP gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. Although we could not find a statistically significant difference, there is a tendency for MMP13 to be reduced by TSA treatment. As TSA inhibits multiple HDACs, it may be difficult to see direct effect of specific HDAC inhibition by TSA treatment. In this regard, our data showing that specific reduction of HDAC7 by siRNA inhibited MMP-13 expression (Fig. 3) support the idea that HDAC7 promotes MMP-13 in OA pathogenesis.

Matrix metalloproteinases are a family of enzymes that collectively degrade components of the ECM. They are important in normal physiological processes such as development and wound healing, where they appear in a low concentration. In contrast, aberrant MMP expression occurs in several disease states, including atherosclerosis, tumor invasion, and arthritic diseases [36, 37]. MMPs mediate irreversible matrix degradation and subsequent joint destruction in RA and OA. MMP-13 is expressed by chondrocytes and is critical for collagen degradation as it hydrolyzes type II collagen more efficiently than do other collagenases [38]. Therefore, we wanted to see whether a specific HDAC is responsible for IL-1-induced MMP-13 expression and thus contributes to cartilage degradation in OA.

In the present study, we observed significant upregulation of HDAC7 in OA cartilage by real-time RT-PCR and immunohistochemistry (Fig. 2a). HDAC7 is a member of the class II HDACs, which comprises HDAC4, 5, 6, 7, 9, and 10, all of which display cell-type-restricted patterns of expression and contain a highly conserved C-terminal deacetylase catalytic domain. Class II HDACs also contain an N-terminal extension that links them to specific transcription factors and confers responsiveness to a variety of signal transduction pathways serving as a link between the genome and the extracellular environment [39]. Disruption of the HDAC7 gene in mice results in embryonic lethality due to a failure of endothelial cell–cell adhesion and consequent dilatation and rupture of blood vessels. HDAC7 represses MMP-10 gene transcription by associating with myocyte enhancer factor-2 (MEF2), a direct activator of MMP-10 transcription and an essential regulator of angiogenesis [40].

Recently, Jensen et al. [41] demonstrated that HDAC7 associates with Runx2 and represses its activity during osteoblast maturation. Runx2 is required for MMP-13 promoter activity induced by IL-1 [42]. Increased expression of Runx2 in OA cartilage may contribute to increased expression of MMP-13 [43]. Kawaguchi [44] proposed that endochondral ossification signals, in which Runx2 plays a central role, may be important for OA progression [45]. The expression pattern of HDAC7 is different between normal and OA cartilage and the localization of HDAC7 in OA is similar to Runc2 expression in OA [43], suggesting the potential link between Runx2 and HDAC7 in OA pathogenesis. It will be interesting to test whether HDAC7 and Runx2 may cooperatively regulate MMP13 in chondrocytes.

The human genome contains only 18 HDAC genes, but more than 1,800 genes are predicted to encode transcription factors [46]. Given the number of other mechanisms for regulation of MMP-13 expression [47–53], it is important to identify the precise mechanism for how HDAC7 may regulate MMP-13 via specific transcription factors in OA chondrocytes. On the other hand, it is likely that HDAC7 regulates many other OA-related genes. Based on our current study showing the link between HDAC7 and MMP-13 in OA chondrocytes, it is important to examine other HDAC7 targets in OA pathogenesis and test whether HDAC7 could be a therapeutic target by *in vivo* study.

Conclusions

Our findings support the idea that HDAC7 expression is elevated in human OA cartilage and promotes IL-1 induction of MMP13, contributing to cartilage degradation. Many enigmatic interactions remain unclear, and further

studies are needed to elucidate the mechanism of cartilage degradation by MMP-13 in OA.

Acknowledgments This study was supported by NIH grants AR056120, AR050631, AG007996, and AG033409.

Conflict of interest statement None.

References

- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 2001;44(6):1237–47.
- Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):1916–26.
- Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;427(suppl):S37–46.
- Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum.* 2002;46(10):2648–57.
- Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest.* 1997;99(7):1534–45.
- Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest.* 2001;107(1):35–44.
- Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol.* 2004;338(1):17–31.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 2003;370(Pt 3):737–49.
- Bernstein BE, Tong JK, Schreiber SL. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(25):13708–13.
- Mulholland NM, Soeth E, Smith CL. Inhibition of MMTV transcription by HDAC inhibitors occurs independent of changes in chromatin remodeling and increased histone acetylation. *Oncogene.* 2003;22(31):4807–18.
- Nair AR, Boersma LJ, Schiltz L, Chaudhry MA, Muschel RJ. Paradoxical effects of trichostatin A: inhibition of NF- κ B-associated histone acetyltransferase activity, phosphorylation of hGCN5 and downregulation of cyclin A and B1 mRNA. *Cancer Lett.* 2001;166(1):55–64.
- Pujuguet P, Radisky D, Levy D, Lacza C, Bissell MJ. Trichostatin A inhibits beta-casein expression in mammary epithelial cells. *J Cell Biochem.* 2001;83(4):660–70.
- Saunders N, Dicker A, Popa C, Jones S, Dahler A. Histone deacetylase inhibitors as potential anti-skin cancer agents. *Cancer Res.* 1999;59(2):399–404.
- Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev.* 2006;26(4):397–413.
- Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer.* 2004;112(2):171–8.
- Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(4):287–99.
- Kortenhorst MS, Carducci MA, Shabbeer S. Acetylation and histone deacetylase inhibitors in cancer. *Cell Oncol.* 2006;28(5–6):191–222.
- Blanchard F, Chipoy C. Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today.* 2005;10(3):197–204.
- Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, et al. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br J Pharmacol.* 2007;150(7):862–72.
- Nasu Y, Nishida K, Miyazawa S, Komiyama T, Kadota Y, Abe N, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses synovial inflammation and subsequent cartilage destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Osteoarthr Cartil.* 2008;16(6):723–32.
- Nishida K, Komiyama T, Miyazawa S, Shen ZN, Furumatsu T, Doi H, et al. Histone deacetylase inhibitor suppression of auto-antibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.* 2004;50(10):3365–76.
- Young DA, Lakey RL, Pennington CJ, Jones D, Kevorkian L, Edwards DR, et al. Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):R503–12.
- Chabane N, Zayed N, Afif H, Mfuna-Endam L, Benderdour M, Boileau C, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress interleukin-1 β -induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in human chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* 2008;16(10):1267–74.
- Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15(1):27–34.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol.* 1995;146(1):75–85.
- Otsuki S, Taniguchi N, Grogan SP, D'Lima D, Kinoshita M, Lotz M. Expression of novel extracellular sulfatases Sulf-1 and Sulf-2 in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(3):R61.
- Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, et al. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:498–512.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293(5532):1074–80.
- Urnov FD. Chromatin remodeling as a guide to transcriptional regulatory networks in mammals. *J Cell Biochem.* 2003;88(4):684–94.
- Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem.* 1982;42(2):65–82.
- Chang S, Pikaard CS. Transcript profiling in Arabidopsis reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *J Biol Chem.* 2005;280(1):796–804.
- Reid G, Metivier R, Lin CY, Denger S, Ibberson D, Ivacevic T, et al. Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A. *Oncogene.* 2005;24(31):4894–907.
- Nawaz Z, Baniahmad C, Burris TP, Stillman DJ, O'Malley BW, Tsai MJ. The yeast SIN3 gene product negatively regulates the activity of the human progesterone receptor and positively regulates the activities of GAL4 and the HAP1 activator. *Mol Gen Genet.* 1994;245(6):724–33.
- Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac,

- and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res.* 2000;60(16):4561–72.
35. Chambers AE, Banerjee S, Chaplin T, Dunne J, Debernardi S, Joel SP, et al. Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells. *Eur J Cancer.* 2003;39(8):1165–75.
 36. Libby P, Aikawa M. New insights into plaque stabilisation by lipid lowering. *Drugs.* 1998;56(suppl 1):9–13. (discussion 33).
 37. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today.* 2000;6(4):149–56.
 38. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1996;97(3):761–8.
 39. Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 2003;19(5):286–93.
 40. Chang S, Young BD, Li S, Qi X, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell.* 2006;126(2):321–34.
 41. Jensen ED, Schroeder TM, Bailey J, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ. Histone deacetylase 7 associates with Runx2 and represses its activity during osteoblast maturation in a deacetylation-independent manner. *J Bone Miner Res.* 2008;23(3):361–72.
 42. Mengshol JA, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(21):4361–72.
 43. Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH. Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2004;12(12):963–73.
 44. Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells.* 2008;25(1):1–6.
 45. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, et al. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2462–70.
 46. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291(5507):1304–51.
 47. Iliopoulos D, Malizos KN, Tsezou A. Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(12):1616–21.
 48. Yun K, Im SH. Transcriptional regulation of MMP13 by Lef1 in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;364(4):b1009–14.
 49. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000;43(4):801–11.
 50. Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature.* 1989;337(6208):661–3.
 51. Conca W, Kaplan PB, Krane SM. Increases in levels of procollagenase messenger RNA in cultured fibroblasts induced by human recombinant interleukin 1 beta or serum follow c-jun expression and are dependent on new protein synthesis. *J Clin Invest.* 1989;83(5):1753–7.
 52. Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, Lindman B, Cannon P, Heller RA. Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *J Biol Chem.* 1996;271(38):23577–81.
 53. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 19):3719–27.

特集
変形性膝関節症の治療戦略

【診断】

変形性膝関節症に 対するMRI診断の 位置づけ

MRI examination for osteoarthritic knee :
the status quo

佐粧孝久

T. Sasho : 千葉大学大学院医学研究院整形外科

Key words

- 変形性膝関節症 (osteoarthritis of the knee)
- MRI (magnetic resonance imaging)
- WORMS (Whole-Organ magnetic resonance imaging score)
- BLOKS (Boston leeds osteoarthritis knee score)
- KOOS (knee osteoarthritis scoring system)
- 不整度計測 (irregularity index)

12 (988) 関節外科 Vol.29 No.9 (2010)

はじめに

■変形性膝関節症のX線検査

変形性膝関節症(膝OA)の画像診断ではX線検査が必須の検査となっている。X線検査では骨棘、関節裂隙の狭小化、骨硬化像、骨嚢包などの有無や程度の評価と下肢アライメントの評価が可能である。繁用されているX線分類であるKellgren-Lawrence分類(K-L分類)では骨棘の形成が重要視され¹⁾、疫学的検討には必須の分類となっている。X線検査は、荷重下に膝の屈曲角度を厳密にコントロールすることで関節裂隙の狭小化を鋭敏に捉えることが可能であり²⁾、間接的であるものの、わずかな軟骨の消失をも捉えることができる。そのため薬物療法の効果を調べるバイオモニターとして利用されている。Okara³⁾はX線像を自動的に解析するソフトウェアを開発し、臨床応用への可能性を示唆した。以上のように診断・重症度分類・薬物効果の判定など、目的により撮像法や分類法を選択することでX線検査は有用な検査である。しかしながら、その一方でX線所見と臨床症状にはしばしば解離がみられること、多様な症状を示す患者群をわずかに4段階や5段階に分類することしかできないことなどの問題点があることも事実である。

■膝OAのMRI検査

そこで、MRIが膝OAの診断・重症度評価、治療効果の判定などのために用いられるようになってきた。膝OAの病態・臨床症状に関与する組織はX線で捉えられる骨組織の変化に留まらないため、理論的にもMRIがより適していると考えられる。MRIでは軟骨、半月板、大腿骨・脛骨の骨髄の変化、関節水症の程度、滑膜炎の程度を捉えることが可能である。

本稿では、膝OAに対するMRI検査の位置づけについて話を進めていく。そのために大きく2つに分けて論述する。1つ目は膝OAとして症状

0286-5394/10/¥400/論文/JCOPY

を発現する前の軟骨変性を捉えうる検査法であり、2つ目は膝OAを発症した後にその重症度・進行度を判定する検査法である。前者は膝OAの予防や薬物療法の効果を知るために有効であり、後者は罹患膝の状態を評価し適切な治療法を選択するために必要となる検査法であるといえよう。

軟骨の初期変性を捉える撮像法

さまざまな撮像法が考案され試行されているが、代表的な撮像法を4つ取り上げたい。いずれも膝OAの初期変性を捉えるものであり、バイオマーカーとしての応用が期待されている。

■ three-dimensional spoiled gradient-recalled (3D-SPGR法)

主として水分含量を鋭敏に捉え、軟骨の厚み、ボリュームの評価に適している。三次元撮像のため膝全体の軟骨の評価が可能であり、軟骨とほかの組織のコントラストが良好なため、画像解析ソフトと組み合わせることで膝全体の軟骨だけを抽出して評価することも可能である⁴⁾。代表例を図1に示した。

■ 遅延相軟骨造影MRI (delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging for cartilage ; dGEMRIC)

造影剤であるGd-DTPA²⁺を経静脈的に投与して撮像する。造影剤を投与してから軟骨にGd-DTPA²⁺が均一に浸透した後に撮像することから遅延相とよばれる。陰性荷電したGd-DTPA²⁺と同様に陰性荷電をもつ軟骨基質の主要な構成成分であるglucosamino-glycan(GAG)が反発し合う性質を応用したものである⁵⁾。すなわちGAG濃度の低い部位ではGd-DTPA²⁺が高濃度に分布し、GAG濃度の高い部位ではGd-DTPA²⁺が低濃度に分布することになるのである。臨床的には、前十字靭帯損傷時に大腿骨外側顆の骨挫傷部にみられる軟骨損傷や、半月板損傷または切除後に合併してみられる軟骨変性などの診断が可能であると報告されている⁶⁾。また、軟骨修復術後の経時的な軟骨の質的变化を評価できる方法としても報告されている⁷⁾。本法はGAG濃度を唯一のパラメータとする方法であり、初期OAの軟骨変性を捉える方法として有望である。ただし造影剤を使用せざるをえないのが欠点であり、無症状である膝に対するスクリーニングと

【図1】【症例1】3D-SPGR法
50歳代、男性。外側コンパートメントの矢状断像である。膝蓋骨、大腿骨、脛骨の軟骨の厚みが低輝度の領域として明瞭に描出されている。



しては問題がある。また、現在までの報告の多くでは代表的な1スライスしか撮像できていないため、膝全体の評価法としてはさらなる発展が望まれる。代表例を**図2, 3**に示した。

■ T2 mapping

軟骨の構成成分のうち水分含量，コラーゲン配列の2つをパラメータとする。軟骨基質のコラーゲン配列は層ごとに異なるためマッピング上，正常でも均一とはならず，正常軟骨においてもT2は表層で長く，中間層，深層で短くなる。そのため表層にみられるT2の延長を変性と解釈

する可能性があること，マジックアングル効果の影響を大きく受けることが問題となる⁶⁾。とくに矢状断像ではアーチファクトを生じやすい。代表例を**図4**に示した。

■ T1 rho

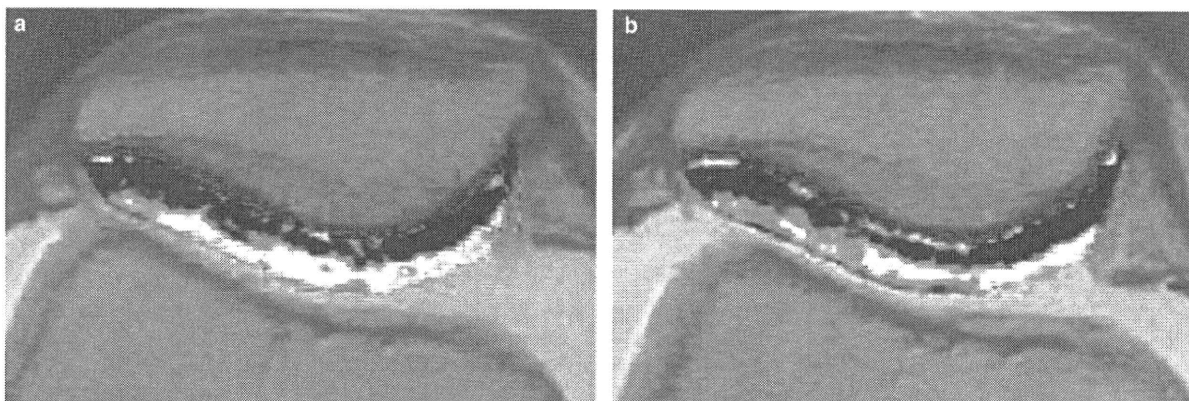
造影剤を用いなくてもGAGの評価が可能な方法として期待されている。比較的最近になり確立してきた方法であるため，臨床的な応用・知見はほかの方法に比べると少ない。dGEMRICと同様に，主にGAG濃度を反映するものであるが，OAが進行するとコラーゲンの変化も反映

【症例2】dGEMRIC

30歳代，女性。膝蓋骨亜脱臼のある膝関節の横断像である。膝蓋骨の軟骨をカラーマッピングにて表示している。

a：ヒアルロン酸製剤投与前。

b：ヒアルロン酸製剤投与後。表層軟骨のGAG濃度が改善したことが示唆される。



【症例3】dGEMRIC

30歳代，男性。前十字靭帯断裂時にみられた大腿骨顆部骨挫傷に相当する部位に赤色で示される軟骨の変性が認められた(矢印)。



すると考えられている⁸⁾。今後の発展が期待されている撮像法である。

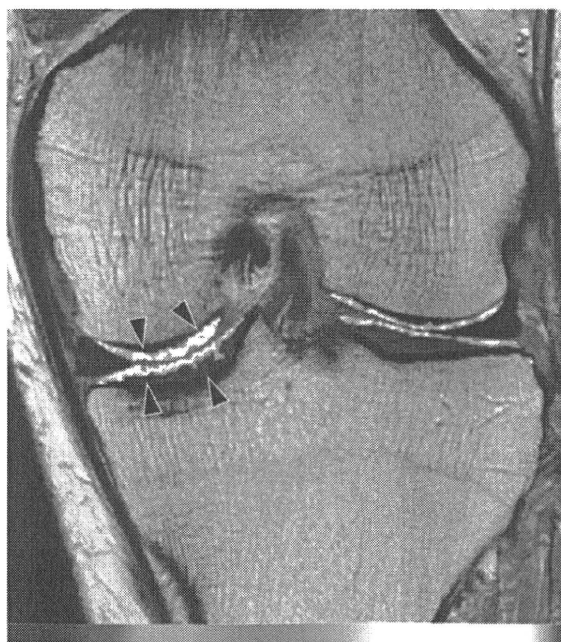
各々の撮像法は個々にも軟骨の初期変性を捉えるものとして期待されているが、組み合わせることでより膝OAの病態を詳細に理解することを助けるものとなりうる。しかしながら、撮像時間が長くなること、できるだけ高磁場の撮像装置が望ましいことなどから、一般的に普及するには至っていない。

重症度・進行度の評価法

本稿では4つの方法を取り上げたい。前半の3つの方法は膝関節の状態を半定量的に示すものである。Whole-Organ magnetic resonance imaging score (WORMS), Boston leeds osteoarthritis knee score

図4 【症例4】T2 mapping

30歳代、女性。膝関節痛のため精査を行ったT2 mapping像。カラーバーの赤色はT2の長い変性部位を、青色はT2の短い健常部位を示す。単純X線や通常のMRIでは明らかな異常所見を指摘できなかったが、大腿骨内側顆および脛骨内側顆に軟骨のT2延長が認められ(矢頭印)、同部にコラーゲン配列の不整化などを伴う軟骨変性の存在が示唆された。



(文献⁶⁾より)

(BLOKS), knee osteoarthritis scoring system (KOOS)の3つの方法である。どの方法も基本的には関節を区域に分け、各々の区域内での関節を構成する要素をグレーディングし点数化するものである。各々の方法で区域分けの方法や対象とする組織、グレーディングの数などに違いがある。現時点ではWORMSが最も広く使用されている。4番目に取り上げる不整度評価法は著者らが提唱している方法であり、大腿骨顆部の輪郭の不整度のみを数値化するものである。

■ WORMS

2004年にPeterfyら⁹⁾により報告された方法である。膝関節を15の区域に分け(図5)それぞれの区域の軟骨、骨髄の輝度変化、bone cyst, bone attrition, 骨棘、半月板、靭帯などの評価を行い、MRI所見を点数化する方法であり、膝関節の全体的な評価だけではなく内外側コンパートメント、膝蓋大腿コンパートメントといったコンパートメントごとの評価も可能という特徴がある。WORMS点数はMRI上まったく所見がなければ0点であり、最高点は332点である。

■ BLOKS

2008年にHunterら¹⁰⁾により報告された。膝関節を9つの区域に分け評価対象となる組織に点数をつけていくものである。WORMSと異なるのはbone attritionを評価に含まないことである。

■ KOOS

2005年にKoomaら¹¹⁾により報告された。膝関節を9つに分け評価するが、BLOKSとは異なる分け方を採用している。WORMSと比較し靭帯、遊離体を評価に含まないという特徴がある。

■ 不整度評価法

膝OAが進行すると明らかになってくる、大腿骨顆部の輪郭の不整の程度を数値化する方法であり、JOAスコア、Japan knee osteoarthritis measure(JKOM)と相関することが示されている^{12)~14)}。また、臨床応用として治療法の選択する際の指標となる可能性を報告している¹⁵⁾。

WORMSとの比較でもほぼ同等に使用できることもわかっている¹⁶⁾。不整度とWORMSにより評価した代表的な2例を図6に示した。

■重症度・進行度評価法の現状

膝OAの重症度・進行度評価法は、

- ①進行度の評価
- ②進行度の評価に基づく治療体系の作成
- ③治療効果の判定
- ④経時的なモニタリングなど

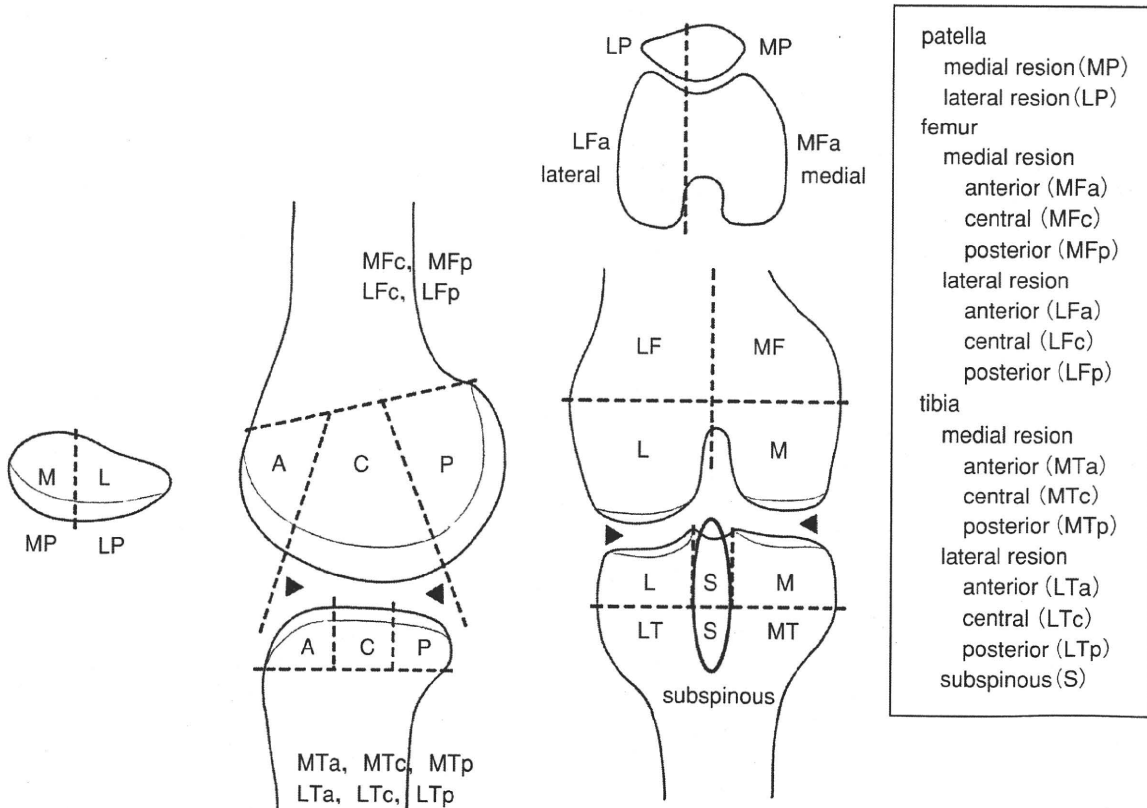
に適用可能であり、高齢社会において必要性が高くなっていくものである。しかしながら、「1.わが国の患者群に適応するためにどの方法がよいのか」、「2.なんらかの修正が必要となるのか」、「3.目的に応じて使用すべき方法が異なるのか」、など解決すべき問題がある。

まとめ

膝OAは高齢者のQOLを著しく低下させる大きな問題である。そのため膝OAの早期発見や予防法が大切な課題となってきている。この目的のためにはスクリーニング検査が必要となり、MRIが最も有力な手段と考えられる。しかしながら撮像時間が長いことやコストがかさむことなどの理由もあり、一般化するには至っていない。また、重症度を評価する方法が考案されてきており、さらなる発展と臨床への応用が期待されている。

■図5 WORMSで用いられている膝関節の区域分け

WORMSでは膝関節の膝伸展位MRIを15の区域に分ける。S領域以外の14の区域について軟骨を8段階、骨髄病変を4段階、骨嚢包を4段階、bone attritionを4段階、骨棘を8段階のグレードで評価し評点を与える。S領域については骨髄病変と骨嚢包のみ評価する。その他に半月板、靭帯、滑膜炎の程度を評価し点数を合計することでその膝の重症度が定まる。



(文献⁹⁾より)

【症例5】

【図6】 X線所見とWORMSおよび不
整度

ともに60歳代後半，女性の膝関節の画像所見である。

【症例5】

a：単純X線正面像。

b：内側コンパートメントのプロトン密度強調像の矢状断像。

c：bを白黒画像に変換したもの。K-L分類ではグレードⅣである。

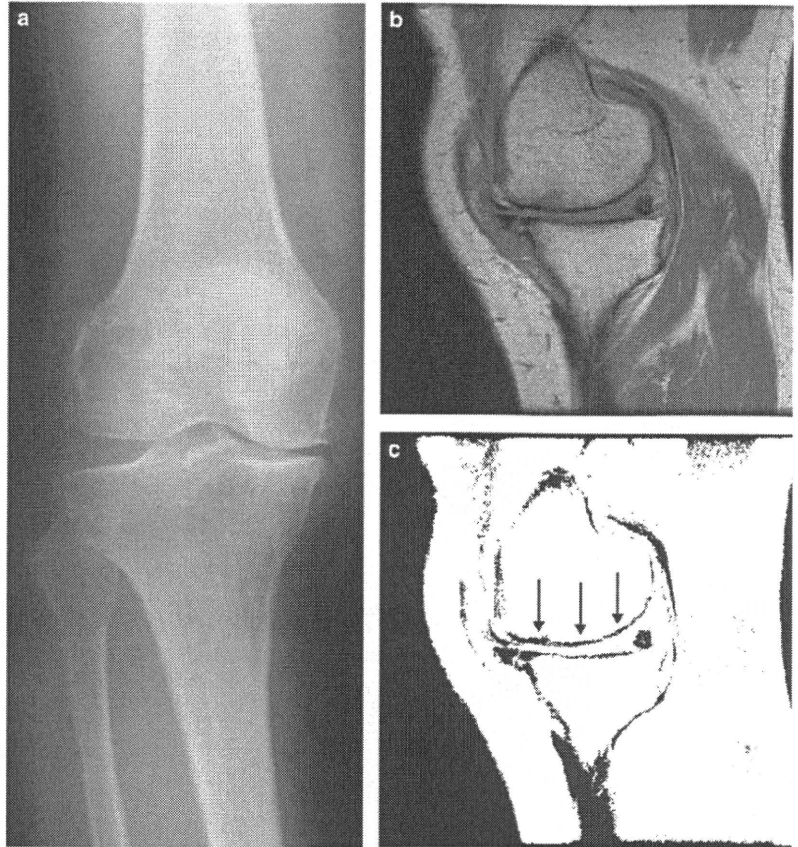
【症例6】

d：単純X線正面像。

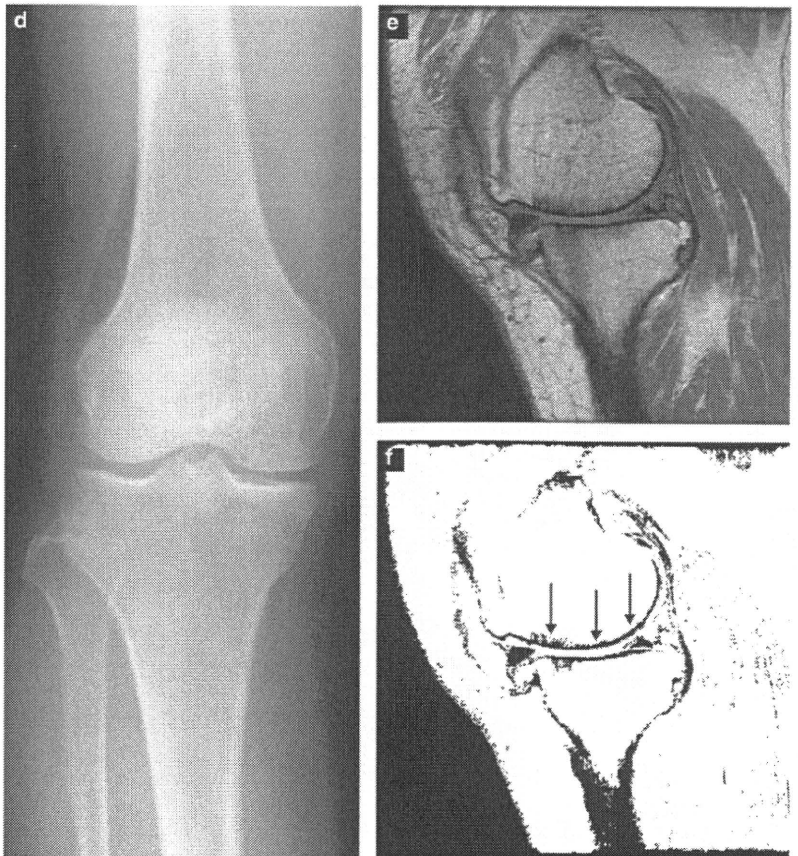
e：内側コンパートメントのプロトン密度強調像の矢状断像。

f：eを白黒画像に変換したもの。K-L分類ではグレードⅢである。

両者のWORMSは75，78とあまり差がなく，c，f内の矢印で示した大腿骨内側顆の不整度を計測したところ，2.40および2.48と不整度の差も少なかった。X線とMRIでは評価が異なることを示す代表例である。



【症例6】



文献

- 1) Kellgren J, Lawrence J : Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis*, 16 : 494-502, 1957.
- 2) Radiography Working Group of the OARSI-OMERACT Imaging Workshop, Le Graverand MP, Mazzuca S, Lassere M, et al : Assessment of the radioanatomic positioning of the osteoarthritic knee in serial radiographs : comparison of three acquisition techniques. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(Suppl A) : A37-43, 2006.
- 3) Oka H, Muraki S, Akune T, et al : Fully automatic quantification of knee osteoarthritis severity on plain radiographs. *Osteoarthritis Cartilage*, 16 (11) : 1300-1306, 2008.
- 4) Brem MH, Pauser J, Yoshioka H, et al : Longitudinal *in vivo* reproducibility of cartilage volume and surface in osteoarthritis of the knee. *Skeletal Radiol*, 36(4) : 315-320, 2007.
- 5) Bashir A, Gray ML, Hartke J, et al : Nondestructive imaging of human cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI. *Magn Reson Med*, 41 : 857-865, 1999.
- 6) 渡辺淳也, 大久保敏之, 山下剛司ほか : 遅延相造影MRIおよびT2マッピングによる変性軟骨の質的評価. *関節外科*, 27 : 229-234, 2008.
- 7) Watanabe A, Wada Y, Obata T, et al : Time course evaluation of reparative cartilage with MR imaging after autologous chondrocyte implantation. *Cell Transplantation*, 14 : 695-700, 2005.
- 8) Ragatte RR, Akella SVS, Wheaton AJ, et al : 3D-T1p-relaxation mapping of articular cartilage. *Acad Radiol*, 11 : 741-749, 2004.
- 9) Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S : Whole-Organ magnetic resonance imaging score(WORMS) of the knee in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12 : 177-190, 2004.
- 10) Hunter DJ, Lo GH, Gale D, et al : The reliability of a new scoring system for knee osteoarthritis MRI and the validity of bone marrow lesion assessment : BLOKS(Boston leads osteoarthritis knee score). *Ann Rheum Dis*, 67 : 206-211, 2008.
- 11) Kooma PR, Ceulemans RY, Kroon HM, et al : MRI assessment of knee osteoarthritis : Knee osteoarthritis scoring system(KOSS)? inter-observer and intra-observer reproducibility of a compartment-based scoring system. *Skeletal Radiol*, 34 : 95-102, 2005.
- 12) 佐粧孝久, 中川晃一, 鈴木昌彦ほか : 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. *日整会誌*, 81 : 29-35, 2007.
- 13) Iwasaki J, Sasho T, Nakagawa K, et al : Irregularity of medial femoral condyle on MR imaging serves as a possible indicator of objective severity of medial-type osteoarthritic knee. *Clin Rheumatol*, 26(10) : 1705-1708, 2007.
- 14) Ochiai N, Sasho T, Tahara M, et al : Objective assessments of medial osteoarthritic knee severity by MRI : new computer software to evaluate femoral condyle contours. *International Orthopaedics*, 2009.
- 15) 佐粧孝久, 落合信靖, 松木 恵ほか : 変形性膝関節症に対するMRIを用いた重症度評価法に基づく治療法の選択. *関節外科*, 27(10月増刊号) : 109-115, 2008.
- 16) 松木 恵, 佐粧孝久, 中川晃一ほか : MRIによる変形性膝関節症の重症度評価法—大腿骨顆部輪郭の不整度とWORMSの比較—. *膝*, 33 : 33-38, 2008.