

剪断力がもたらす変形性膝関節症発症過程において 軟骨細胞は滑膜細胞より先に軟骨分解酵素を産生する

埼玉県立大学大学院博士後期課程大学院生、日本学術振興会特別研究員 (DC1) 高畠啓さん (第一著者) と、同学の国分貴徳准教授 (責任著者) のグループは、関節軟骨の変性を特徴とする変形性膝関節症(膝 Osteoarthritis ; 膝 OA)^{※1} の発症メカニズムに関して、関節不安定性による剪断力の増加に対し滑膜より先に関節軟骨が応答し、膝 OA 発症につながっている可能性を明らかにしました。

研究グループは、マウスを対象として、関節軟骨や半月板、軟骨下骨などの関節内組織が可能な限り損傷しないように、膝前十字靱帯(Anterior Cruciate Ligament ; ACL)のみを非侵襲的に破断させた新規モデルを作成しました。このモデルに関節不安定性を抑制する関節制動介入^{※2}を組み合わせ、膝 OA 発症経過を軟骨細胞と滑膜細胞の経時的变化から比較しました。剪断力が増加したモデルでは、関節軟骨変性が観察される以前から軟骨細胞にて関節軟骨を変性させる酵素の発現が確認された一方、滑膜細胞では認められませんでした。また、剪断力の有無によって、滑膜炎の程度に差は認められませんでした。

この研究結果より、関節不安定性によって生じる剪断力に対し、関節内組織の細胞応答順序が異なる可能性が示され、膝 OA の発症・進行予防を目的としたリハビリテーション介入戦略の確立に寄与することが期待されます。

本研究成果は、2023 年 1 月 10 日に、国際変形性関節症学会の公式ジャーナル『Osteoarthritis and Cartilage』誌に掲載されました。本研究の一部は、日本学術振興会(JSPS)の特別研究員事業、並びに科学研究費助成事業の支援を受け実施されました。

本研究のハイライト

(1) 関節不安定性による剪断力増加と膝 OA 発症の関連性を解明するため、関節軟骨や半月板、軟骨下骨といった他の関節内組織を損傷させずに ACL のみを断裂したマウスモデルを確立しました。

(2) この確立した関節不安定性により剪断力が増加したモデルと、同モデルに関節不安定性を抑制する関節制動介入を追加したモデルを比較すると、膝 OA の主たる増悪因子の一つである滑膜炎の程度には差が生じていませんでした。

(3) 一方、関節不安定性による剪断力が増加したモデルでは、初めに軟骨細胞において関節軟骨分解酵素の発現が増加し、その後滑膜細胞においても同様に分解酵素が発現するこ

とが明らかになりました。

(4) 以上の研究結果から、関節不安定性による剪断力増大がもたらす膝 OA 発症過程において、まず初めに軟骨細胞が応答して関節軟骨分解酵素を発現し、滑膜細胞へと生化学的影響をもたらし、同様に分解酵素を誘発することが示唆されました。また、滑膜炎は膝 OA 初期における関節軟骨変性の発生を引き起こさない可能性が明らかとなりました。

1. 研究の背景

関節は弾性力のある関節軟骨によって覆われていますが、膝 OA 患者ではこの関節軟骨が変性してしまい、炎症や変形、それらに伴う痛みを引き起こすことで、日常生活動作が制限されてしまいます。関節軟骨は、皮膚や骨といった他の結合組織と比べて治癒能力が著しく低いため、軟骨変性の発症を予防することが重要となります。そのため、膝 OA の発症メカニズムを解明することが必要となりますが、その詳細は依然として明らかになっていません。我々の研究グループは昨年、膝 OA 患者で生じる 2 つの異なるメカニカルストレス（剪断力/圧迫力）^{※3}が、膝関節表層に位置する関節軟骨と関節軟骨の下層に位置する軟骨下骨に与える影響の違いについて比較検証しました。その結果、剪断力と圧迫力では関節軟骨変性が異なるメカニズムで引き起こされ、特に剪断力増加では関節表層から膝 OA が発症する可能性が高いことを報告しました。しかし、この研究で用いた小動物モデルは、剪断力増大を誘発する ACL 切断に際して外科的侵襲を伴うため、剪断力とは関係のない急性炎症の影響が混在していました。そのため、関節表層から関節軟骨へと生化学的影響をもたらし滑膜との関係性についても明らかになっていませんでした。そこで今回、非外科的 ACL 破断により膝 OA を引き起こす新たなマウスモデルを開発し、純粋な剪断力のみの増大が関節軟骨と滑膜に及ぼす影響について解明することを目的に研究を行いました。

2. 研究概要

まず初めに、12 週齢の C57BL/6 マウスを対象に膝関節を 90 度に固定し、皮膚の上から大腿骨を長軸方向に押し込むことで ACL 破断を引き起こした新たな ACL-Rupture (ACL-R) モデルを作成しました (図 1)。モデル作成に際して、必要な破断強度と力適応速度について計測しました。その後直ぐに膝関節を採取し、組織学的観察、巨視的観察、微細構造学的観察から関節軟骨、半月板、軟骨下骨の損傷の有無を確認しました。この作成した ACL-R モデルに加え、ACL-R モデルに生じる関節不安定性を抑制する Controlled abnormal tibial translation (CATT) 群と Sham 群を作成しました (各群の位置付けとしては ACL-R 群: ACL 断裂による炎症+/剪断力+、CATT 群: ACL 断裂による炎症+/剪断力-、Sham 群: ACL 断裂による炎症-/剪断力-となります)。モデル作製後 2,4,8 週間後に膝関節を採取し、関

節軟骨の変性、滑膜炎、軟骨細胞と滑膜細胞における軟骨分解酵素と炎症性サイトカインの発現量を組織学的解析により調査しました。

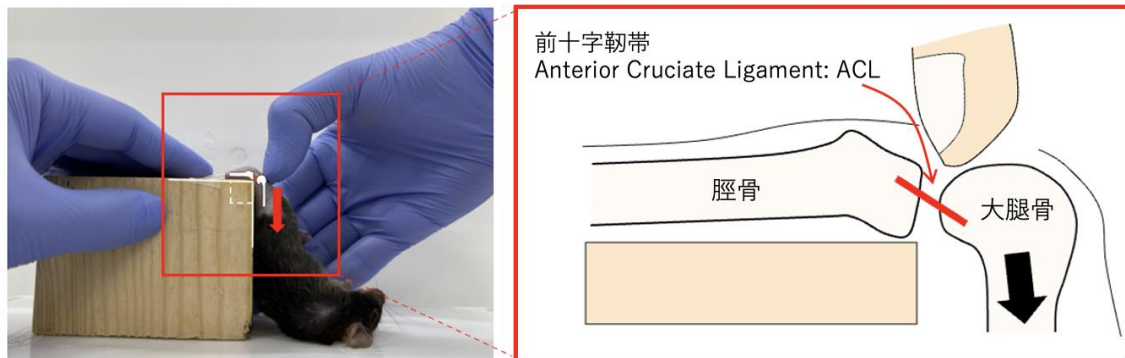


図 1：我々が確立した新たな ACL-R マウスモデル

大腿骨の後方から脛骨前方へと付着している ACL を断裂させるため、皮膚の上から大腿骨の長軸方向に向かってゆっくりと押し込み、相対的に脛骨の前方引き出しを生じさせることで ACL を破断します。

上記の方法により ACL を断裂する際に必要な破断強度は 7.11 ± 0.45 N、力適応速度は 4.09 ± 1.21 N/s でした。結果として、新たな ACL-R モデルでは ACL 断裂とそれによる関節不安定性が確認されましたが、その他の関節内組織損傷は観察されませんでした(図 2)。これらの結果から、関節内損傷を伴わずに ACL 断裂のみを引き起こすことで、純粋な剪断力増加による新たな膝 OA マウスモデルを確立することに成功しました。

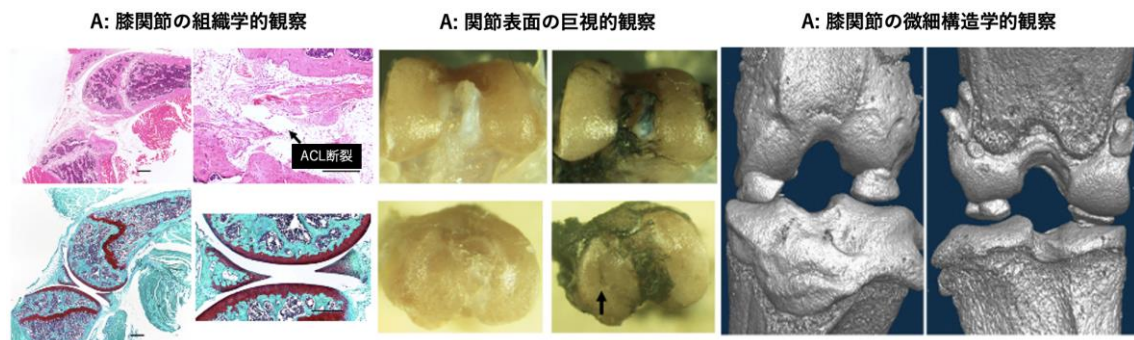


図 2：ACL-R モデル作成後の組織学的・巨視的・微細構造学的観察

A: ACL 破断直後の膝関節組織染色像。上段の組織像からは ACL が中央部で断裂していることが観察される一方で、下段の組織像から関節軟骨や半月板に損傷がないことが確認できます。B: 膝関節表面の巨視的観察像。墨汁に浸すことで軟骨損傷部位（黒く染まった部位）を特定することができますが、ACL 断裂直後の膝関節と正常な膝関節で差は認められませんでした。C: μ CT によってスキャンされた膝関節像。関節表面や軟骨下骨に欠損等は観察されませんでした。

次に、今回開発した新たな ACL-R モデルと、ACL-R モデルに関節制動介入を行った CATT モデルの膝 OA 進行度を比較しました。モデル作成から 8 週後、CATT モデルと比較して ACL-R モデルにおける関節軟骨の変性度が有意に増大していた一方で、滑膜炎の程度に差は認められませんでした(図 3)。これまで滑膜炎は軟骨変性より先に生じることで、膝 OA 初期から関節軟骨分解を誘導する可能性があることが報告されてきましたが、剪断力増加による膝 OA 発症過程では、その関係性は明らかになっていませんでした。本研究によって、剪断力による膝 OA 発症過程において、滑膜炎による二次的な影響が関節軟骨変性の発生要因となっている可能性は低いことが示唆されました。

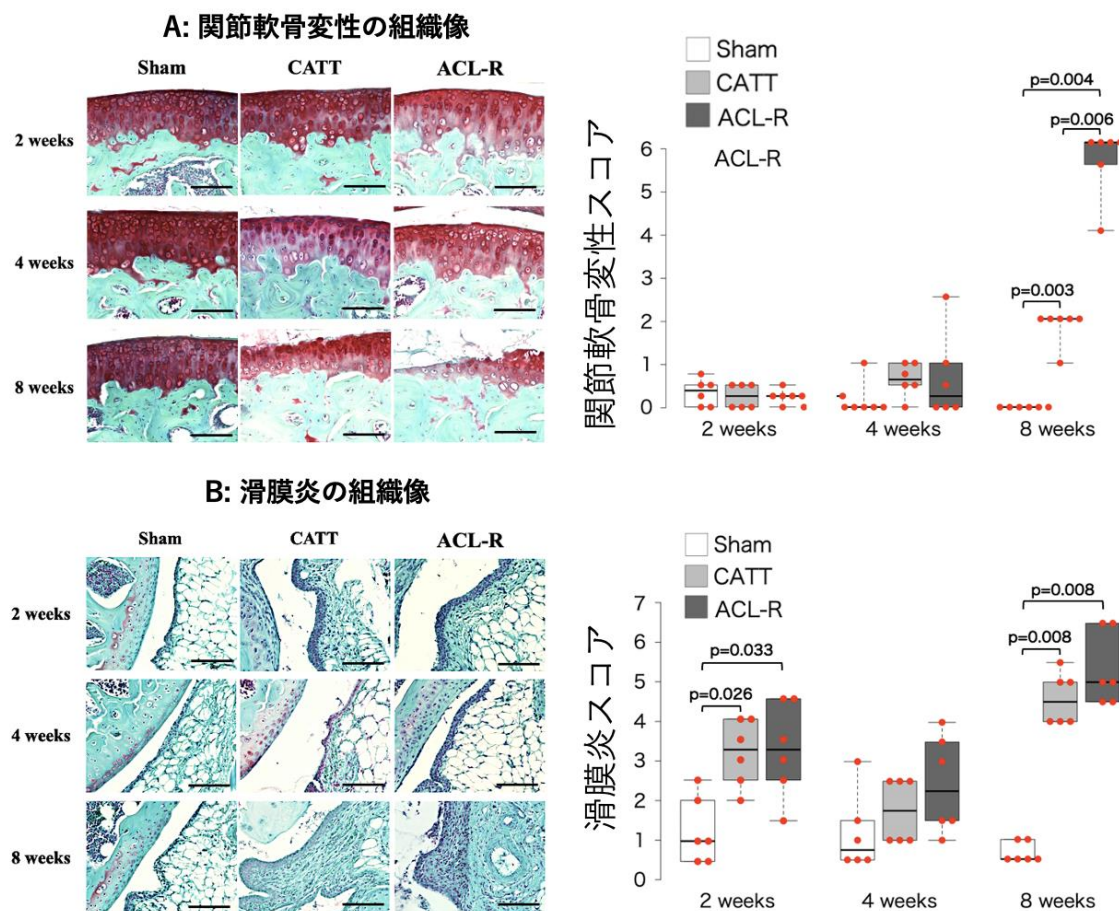
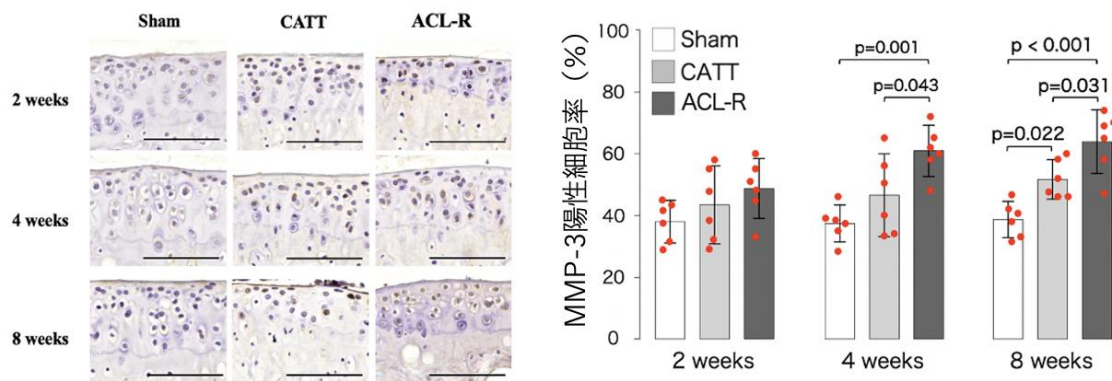


図 3：関節軟骨変性と滑膜炎の組織像

A: 関節軟骨変性の組織像。モデル作成から 8 週後、CATT モデルと比較して ACL-R モデルにおける関節軟骨の変性度が有意に増大していました(赤色の部分が関節軟骨)。B: 滑膜炎の組織像。2 週、8 週時点において、正常群に対し介入群で滑膜炎が生じているものの、CATT モデルと ACL-R モデル間(剪断力の増減)により滑膜炎の程度に差は認められませんでした。

最後に軟骨細胞と滑膜細胞をターゲットに、免疫組織化学染色により軟骨分解酵素と炎症性サイトカインの発現解析を実施しました。ACL-R モデルの軟骨細胞における軟骨分解酵素 Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) ※4 は 4 週時点で発現量が増大した一方で、滑膜細胞では 8 週時点で発現量が増大しました。また、炎症性サイトカイン Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) ※5 の発現量は軟骨細胞・滑膜細胞ともに ACL-R モデルと CATT モデル間における差は認められませんでした (図 4)。以上の結果から、軟骨細胞は滑膜細胞よりも先に膝関節内に生じる剪断力に応答し、関節軟骨分解酵素を分泌することで膝 OA 発症に関与している可能性が示唆されました。

A: 軟骨細胞におけるMMP-3発現量



B: 滑膜細胞におけるMMP-3発現量

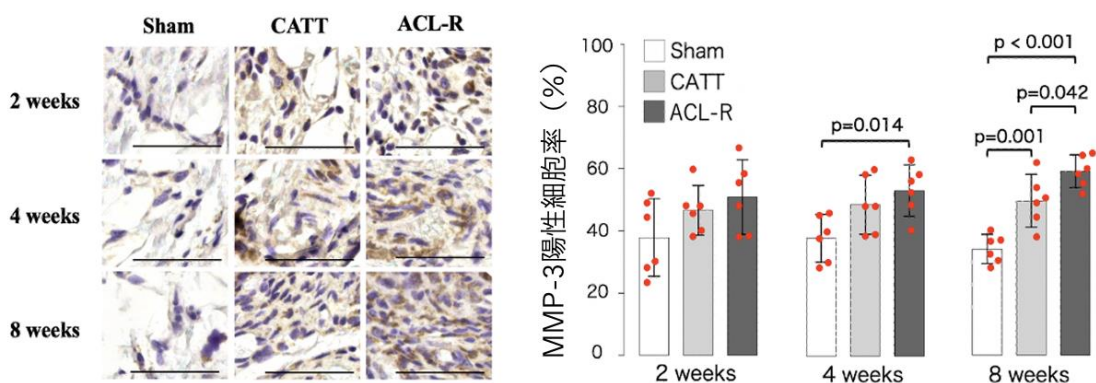


図 4：関節軟骨変性と滑膜炎の組織像

A: 軟骨細胞における MMP-3 発現量を表す組織像。モデル作成から 4 週時点で、CATT モデルと比較して ACL-R モデルにおける軟骨細胞での MMP-3 発現量が有意に増大していました。B: 滑膜細胞における MMP-3 発現量を表す組織像。軟骨細胞とは異なり、モデル作成から 8 週時点で、CATT モデルと比較して ACL-R モデルにおける軟骨細胞での MMP-3 発現量が有意に増大していました。

上記の研究成果は、膝 OA 発症・進行メカニズムにおいて、滑膜細胞より先に軟骨細胞が関節不安定性による剪断力増加に応答することで軟骨分解酵素を誘導し、膝 OA の発症に関与することが明らかとなりました。また、剪断力による膝 OA 発症過程では、初期関節軟骨変性の発生に、滑膜炎は関与しない可能性が明らかとなりました。

この研究結果は今後、膝 OA の発症・進行予防を目的としたリハビリテーション介入戦略の確立に寄与することが期待されます。

3. 用語説明

※1 変形性膝関節症(膝 OA) 関節軟骨の変性を特徴とする関節疾患。疼痛や関節機能障害によって日常生活に支障をきたす疾患。

※2 関節制動モデル 我々の研究室が確立した関節不安定性による異常な関節運動を抑制する動物モデル。

※3 メカニカルストレス 生体内の細胞や組織が受ける機械的刺激のことを意味する。膝関節に対するメカニカルストレスとして剪断力、圧迫力、伸張力、静水圧がある。

※4 Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) タンパク質分解酵素と呼ばれる因子。関節軟骨を構成するプロテオグリカンやⅡ型コラーゲンといった軟骨成分を分解することで、関節軟骨変性を導く。

※5 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) 炎症性サイトカインの一つ。他の炎症性サイトカインや MMPs といった因子を誘導することで、間接的に関節軟骨変性を導く。

4. 発表雑誌

掲載誌名 : Osteoarthritis and Cartilage

論文タイトル : Joint instability causes catabolic enzyme production in chondrocytes prior to synovial cells in novel non-invasive ACL ruptured mouse model

DOI : 10.1016/j.joca.2022.12.004

著者・所属

Kei Takahata^{1,2}, Kohei Arakawa¹, Saaya Enomoto¹, Yuna Usami¹, Koyo Nogi¹, Riku Saitou¹, Kaichi Ozone³, Haruna Takahashi¹, Moe Yoneno¹, Takanori Kokubun^{1,4}

- 1) Graduate School of Health, Medicine, and Welfare, Saitama Prefectural University, Saitama, Japan
- 2) Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan
- 3) University of Tsukuba Hospital, Ibaraki, Japan
- 4) Department of Physical Therapy, School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University, Saitama