

関節運動の正常化は軟骨の変性を予防する のか？

—早期 OA マウスモデルを用いた研究—

岡優一郎 (PT, MSc)¹⁾, 村田健児 (PT, PhD)²⁾,
小曾根海知 (PT, MSc)¹⁾³⁾, 国分貴徳 (PT, PhD)²⁾,
金村尚彦 (PT, PhD)²⁾

¹⁾ 埼玉県立大学大学院博士後期課程

²⁾ 埼玉県立大学理学療法学科

³⁾ 日本学術振興会特別研究員 DC2

キーワード：変形性膝関節症, 異常関節運動, Gremlin-1
経路

緒 言

変形性膝関節症（以下、膝 OA）の発症・進行要因として過度な機械的ストレスが挙げられる。関節組織は力学的環境に対して非常に敏感な性質をもっており、メカニカルストレスは関節組織の発達や長期的に形状を維持するためのもっとも重要な外的要因であると考えられている。しかし、長年にわたるストレスの集積や過度なストレスによって関節軟骨が変性することが明らかになっている。過度なストレスは関節の不安定性や位置異常など、膝関節の運動学になんらかの異常変化が生じたときに生まれる。そして、その関節不安定性や位置異常は関節構成体である靭帯や半月板などの損傷や、長年の生活習慣などの積み重ねによって生じるマルアライメントによって惹起されると考えられている。OA に関する動物モデルにおいては外科的処置によって靭帯を断裂するモデルや炎症誘発性の薬剤を投与することによって OA を惹起するモデルが確立されている。その中でも前十字靭帯切断（以下、ACL-T）モデルは脛骨の前方引き出しを制動する靭帯を切断することにより、関節不安定性は惹起され、関節軟骨の変性が生じると認識されている。つまり、関節内環境が変化するとそれに伴い膝関節で生じる運動学の変化を引き起こし、接触領域が変化することによって生理的な負荷を逸脱したストレスが産生され、OA 化につながっていると解釈できる。

近年、過度なストレスが関節軟骨に負荷されたときの生体内の反応として、Gremlin-1-NF- κ B 経路を通じて軟骨変性が生じることが報告された。Gremlin-1 は BMP のアンタゴニストとして知られており、BMP とのバランスは細胞の肥大と恒常性と関連するといわれている¹⁾。Gremlin-1 は繰り返されるストレスによって発現するといわれている。Chang らの報告²⁾によると内側副靭帯切断（以下、MCL-T）モデルでは、術後 2 週より関節軟骨の石灰化層に Gremlin-1 が発現し、それに伴い NF- κ B 経路の下流に当たる I κ B- α が活性化

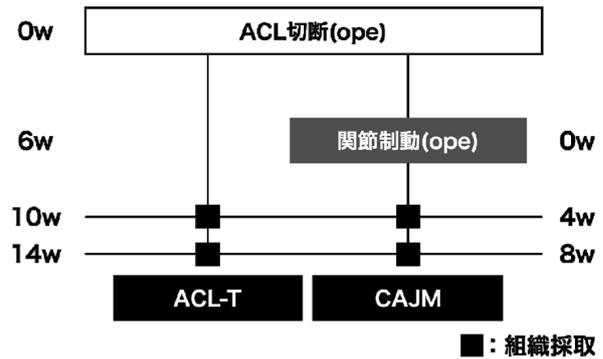


図 1 実験プロトコル

し、軟骨基質分解酵素である MMP-13 や ADAMTS-5 を誘導することが明らかとなった。また、MCL-T に併せて Gremlin-1 の促進剤の投与により OA 化が進行し、Gremlin-1 の遺伝子欠損や抑制剤の投与により OA 化が遅延したことから、過度なメカニカルストレスによる Gremlin-1 の誘導は、NF- κ B 経路を介して OA を発症させることが明らかとなった。

我々の研究室においてもメカニカルストレスと OA の関連性を追ってきた。我々は ACL-T モデルに加えて、ACL 切断によって生じた脛骨の前方への位置異常を管理する異常関節運動制動（以下、CAJM）モデルを開発³⁾し、運動学の異なる 2 つのモデルを採用した結果、IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインの放出を抑制し、OA の発症を遅延させることを明らかにした⁴⁾。しかし、CAJM による運動学的な変化が、関節軟骨にどのような影響を及ぼすのかはまだ完全に理解されていない。

本研究では 2 つの運動学が異なるモデルを使用して、ストレス依存的に活性化する Gremlin-1-NF- κ B 経路と軟骨変性を評価し、運動学的変化が軟骨にかかるストレスにどのような影響を及ぼしているのかを明らかにすることを目的とした。脛骨が前方へ偏位する ACL-T モデルでは Gremlin-1 が過剰発現するが、CAJM モデルではそれら経路の活性が抑制され、軟骨の変性を予防すると仮説を立てた。

方 法

1. 対象とデザイン

本研究は学内動物実験倫理委員会の承認（承認番号 30-4）を得て実施した。12 週齢の ICR 系雄性マウス 32 匹を使用した。すべてのマウスに対し前十字靭帯を切断し 6 週間の自由飼育によって早期 OA モデルを作成した。その後未処置の ACLT 群と脛骨の前方偏位を抑制する CAJM モデルに分類した（図 1）。

2. モデル作成

手術手順は我々の先行研究⁵⁾に沿って実施した。両群ともに ACL を完全に切断した。次に 25 ゲージの注

射針を用いて、大腿骨遠位後方と脛骨近位前方に骨孔を開けた。そして、3-0 ナイロン糸を骨孔に通して、脛骨の前方偏位を戻すように緊縛したものを CAJM 群とした。ACL-T 群は骨孔までは同様の処置を行い、ナイロン糸を緩く結ぶことによって脛骨の前方偏位を許した。

3. 軟 X 線写真撮影

脛骨の位置異常を評価するために軟 X 線装置 M-60 を利用して撮影した。右後肢を採取し、膝関節 90° 屈曲位で X 線画像を撮影した。画像はデジタル画像センサー NAOMI によってデジタル化した。脛骨の位置異常は脛骨の前方移動量として、画像処理ソフトウェア Image J を用いて定量化した。

4. 組織学的解析

1) 一般染色による解析

軟骨変性の評価を行うために 4 週、8 週時点の膝関節を供した。切片はマイクローム ROM-380 を利用し、矢状断切片を作成し、Safranin-O Fast Green 染色を実施した。軟骨の欠損の評価は OARSI スコアリングシステムに沿って実施した。また評価は 1 人の訓練された研究者によって行われた。

2) 蛍光免疫組織化学染色による解析

Gremlin-1-NF- κ B 経路の活性化を評価するために免疫蛍光染色を実施した。一次抗体として Anti-Gremlin-1 抗体 (1:200 abcam), Anti-I κ B- α 抗体 (1:200 abcam), anti-MMP-13 抗体 (1:250 abcam), anti-ADAMTS-5 抗体 (1:100 bioss) を使用し、4°C にて 24 時間反応させた。二次抗体には Dylight 488 (1:1000 ThermoFisher) を使用した。最後に DAPI を滴下し、組織切片を封入した。

染色後、蛍光顕微鏡 BZ-X700 を用いて関節軟骨部を撮像した。画像解析には KEYENCE ハイブリッドセルカウントを利用し、陽性細胞率をカウントした。陽性細胞率は指定区間 (100 × 100 μ m) 中の DAPI 染色による陽性細胞中の各抗体の陽性細胞数の割合とした。

5. 統計解析

統計解析は SPSS を用いた。すべてデータの正規性を Shapiro-Wilk 検定にて確認後、二元配置分散分析を実施した。また、事後検定としては Tukey 法を用いた。すべてのデータは平均値 [95% 信頼区間] で示した。また、すべての有意水準は 5% とした。

結 果

1. 軟 X 線による脛骨の前方偏位の評価

組織採取後の膝関節を矢状面より軟 X 線写真を撮影した。脛骨の前方偏位量の測定結果を示した。4 週時点の前方偏位量は ACL-T 群 : 1.03[0.90-1.17]mm ; CAJM 群 : 0.51[0.40-0.62]mm, 8 週時点の前方偏位量は ACL-T 群 : 1.11[0.94-1.29]mm ; CAJM 群 : 0.59[0.50-0.67]mm であった。4 週での比較では CAJM 群は ACL-T 群よりも前方偏位量が有意に減少しており ($p < 0.001$), 8week においても CAJM 群が ACL-T 群よりも前方偏位偏位量が有

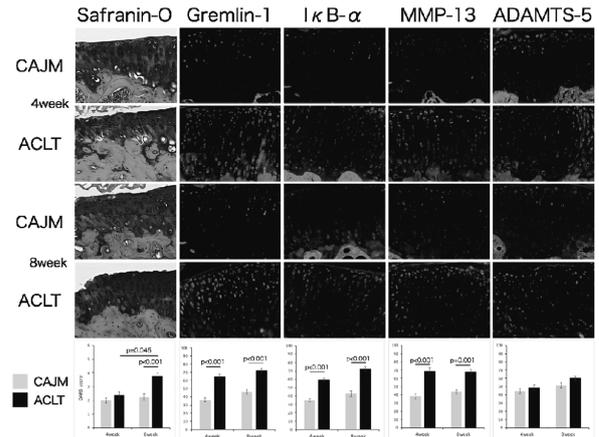


図 2 Safranin-O 染色, 各因子の蛍光免疫染色の組織像および解析結果

意に減少していた ($p < 0.001$)。ACL-T 群, CAJM 群内の比較においては ACL-T 群, CAJM 群ともに有意差は見られなかった ([ACL-T 4week VS ACL-T 8week]; $p=0.843$, [CAJM 4week VS CAJM 8week]; $p = 0.877$)。

2. 組織学的解析

Safranin-O Fast Green による染色像とスコアリング結果を示した (図 2)。4, 8 週時点ともに CAJM 群が ACL-T 群よりも軟骨変性が抑制されており, 8 週時点の ACL-T 群では軟骨の欠損が石灰化層に到達しているものも多く観察された。OARSI score による分析では, 4 週時点では OARSI score に差は見られなかったが, 8 週時点では ACL-T 群の OARSI score が CAJM 群よりも有意に高値を示した [4week ; ACL-T VS CAJM]; $p=0.131$, [8week ; ACL-T VS CAJM]; $p < 0.001$)。また, ACL-T 群, CAJM 群内の比較においては ACL-T 群では 8 週時点の OARSI score が有意に高値を示し, CAJM 群では有意差は見られなかった ([ACL-T 4week VS ACL-T 8week]; $p = 0.045$, [CAJM 4week VS CAJM 8week]; $p = 0.402$) (4 week ACL-T 群 : 2.4[1.9-2.9]; CAJM 群 : 2.0[1.6-2.4], 8week ACL-T 群 : 3.8[3.3-4.2]; CAJM 群 : 2.3[1.8-2.7])。

3. 免疫組織化学染色による解析

免疫組織化学による染色像と陽性細胞率の分析結果を示した (図 2)。Gremlin-1 の陽性細胞率は, 4, 8 週時点ともに ACL-T 群の陽性細胞率が CAJM 群よりも有意に高値を示した [4week ; ACL-T VS CAJM]; $p < 0.001$, [8week ; ACL-T VS CAJM]; $p < 0.001$)。また, ACL-T 群, CAJM 群の群内の比較においては ACL-T 群, CAJM 群ともに有意差は見られなかった ([ACL-T 4week VS ACL-T 8week]; $p=0.372$, [CAJM 4week VS CAJM 8week]; $p = 0.118$)。その他の I κ B- α , MMP-13, ADAMTS-5 についても ACL-T 群の陽性細胞率は CAJM 群よりも高値を示した。

考 察

本研究は早期の変形性膝関節症モデルマウスに対して、2つの運動学が異なるモデルを採用し、メカニカルストレスに応答する Gremlin-1-NF κ B 経路を評価することによって、運動学的変化が軟骨変性に与える影響を明らかにすることを目的とした。

軟 X 線による脛骨の前方偏位量の計測では、4, 8 週群でともに CAJM 群の前方偏位量が ACL-T 群よりも有意に減少していた。CAJM モデルを採用した以前の報告⁴⁾⁵⁾では、脛骨を前方に引き出す装置を使用することによって膝関節の不安定性を評価してきた。しかし、本研究では脛骨の前方引き出し試験を実施することなく写真撮影を実施した。その結果、2度目の外科的処置から4, 8 週時点ともに、CAJM 群の前方偏位量が減少していた。このことから、CAJM 群は介入期間を通して脛骨の前方偏位を抑制していたことが示唆される。

ACL-T 群では脛骨の前方引き出しを制動する ACL を切断することにより関節の不安定性を呈するモデルとして捉えられてきたが、本研究では前方引き出し試験を実施しなくても脛骨が前方偏位しており、運動時に脛骨が前方に偏位するのではなく、常時脛骨が前方に偏位している状態で運動が遂行されている可能性が示唆される。つまり、ACL-T モデルは脛骨が前方に偏位することにより、関節軟骨後方へ過剰なストレスが加わるモデルであるといえる。

Gremlin-1 経路の陽性細胞率の比較における CAJM の外科的処置から4 週時点では Gremlin-1, I κ B- α , MMP-13 の陽性細胞率に差が見られたが、軟骨欠損の程度を示す OARSI score では差は見られなかった。Gremlin-1 とその下流経路の因子は過剰なメカニカルストレスによって発現することがわかっている²⁾。CAJM 群の各因子の陽性細胞率の抑制は、脛骨の前方偏位を管理する外科的処置を実施したことで、ACL-T によって生じる関節軟骨後方への局所的なストレスが減少していたことを示す。しかし、膝 OA にかかわる炎症・分解因子の発現後、軟骨の変性までには6 週程度要するという報告もあるように、CAJM 後4 週では軟骨の変性に差が生じなかった可能性がある。各因子の陽性細胞率は CAJM 後から8 週時点でも差が見られており、軟 X 線で示された脛骨の前方変位量の違いが、メカニカルストレスの量の違いとなり、結果的にストレス依存的に発現する因子に差が見られたと考えられる。4 週時点では差が見られなかった OARSI score においても8 週時点では差が見られ、CAJM 群では Gremlin-1 とそれに続く下流経路の活性が抑制されたことにより、軟骨変性を予防したと考えられる。

臨床現場において、膝 OA 患者に対し膝の関節運動に

着目し介入することが多い。しかし、それら介入に対する科学的根拠は乏しく、運動学と軟骨変性の関連性について生物学的視点から追った研究はわずかである。その中で本研究結果は、2つの運動学が異なるモデルを使用し、脛骨の前方偏位という運動学的異常を抑制することで軟骨変性にかかわる因子の発現を抑制することを示した。これは我々理学療法士が臨床の場で行っている治療介入が大きな意義をもつということを示し、膝 OA の治療法確立に向けた重要な基礎的データとなり得るだろう。

本研究結果を解釈するうえで注意すべき点が存在する。MMP-13 や ADAMTS-5 といった軟骨基質分解因子の発現は Gremlin-1-NF κ B 経路の活性化を介さずとも起こりうる。本研究では Gremlin-1 や I κ B- α の発現をもってその経路の活性化を言及し、それによって分解因子が発現したと考察した。現時点では Gremlin-1 経路と分解因子の発現の因果関係は明らかにすることができていない。この因果関係を明らかにするためには、Gremlin-1 もしくはその下流経路の遺伝子をノックアウトしたマウスの採用や、上記関連因子の発現を抑制もしくは増加するような薬剤を投与し、基質分解因子や関節軟骨状態を確認する必要がある。

結 論

運動学的異常を抑制する治療介入は Gremlin-1-NF κ B 経路の活性を抑制し、関節軟骨の変性を予防する可能性がある。

利益相反

本研究における利益相反はない。

文 献

- 1) Yi J, Jin Q, Zhang B, *et al.*: Gremlin-1 concentrations are correlated with the severity of knee osteoarthritis. *Med Sci Monit.* 2016; 22: 4062-4065.
- 2) Chang SH, Mori D, *et al.*: Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1-NF κ B pathway. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 1-5.
- 3) Kokubun T, Kanemura N, *et al.*: Effect of Changing the Joint Kinematics of Knees with a Ruptured Anterior Cruciate Ligament on the Molecular Biological Responses and Spontaneous Healing in a Rat Model. *Am J Sports Med.* 2016; 44(11): 2900-2910.
- 4) Murata K, Kanemura N, *et al.*: Controlling joint instability delays the degeneration of articular cartilage in a rat model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017; 25(2): 297-308.
- 5) Oka Y, Murata K, *et al.*: Impact of Controlling Abnormal Joint Movement on the Effectiveness of Subsequent Exercise Intervention in Mouse Models of Early Knee Osteoarthritis. *Cartilage.* 2019.