

## 異常関節運動制動が関節軟骨代謝動態に与える効果

鬼塚勝哉 (PT)<sup>1)2)</sup>, 村田健児 (PT, MSc)<sup>3)</sup>,  
国分貴徳 (PT, PhD)<sup>4)</sup>, 藤原秀平 (PT)<sup>1)</sup>, 中島彩 (PT)<sup>1)</sup>,  
森下佑里 (PT, MSc)<sup>3)</sup>, 金村尚彦 (PT, PhD)<sup>4)</sup>

- 1) 埼玉県立大学大学院保健医療福祉学研究科博士前期課程
- 2) 東京女子医科大学附属八千代医療センター
- 3) 埼玉県立大学大学院保健医療福祉学研究科博士後期課程
- 4) 埼玉県立大学 保健医療福祉学部理学療法学科

**キーワード:** 関節軟骨, 関節運動, 組織学

### はじめに

変形性膝関節症 (Knee Osteoarthritis : 以下, 膝 OA) は, 代表的な運動器疾患の 1 つであり, その発症と進行には, メカニカルストレスと生物学的ストレスが関与することが動物膝 OA モデルを用いた研究により明らかになっている<sup>1)2)3)</sup>。膝 OA は関節軟骨変性を主病態とし, 軟骨基質の破壊には, プロテオグリカンと II 型コラーゲンを分解する酵素が重要な役割を果たす。プロテオグリカンの分解には ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) が関与し, II 型コラーゲンの分解には MMP (Matrix Metalloproteinase) が関与するとされている。その中でも, ADAMTS<sup>4)</sup>や MMP<sup>13)</sup>に代表される蛋白分解酵素が OA 治療標的分子となる可能性が報告され, OA 関節軟骨では, 肥大軟骨細胞の特異的な分化マーカーである X 型コラーゲンが表層から深層にかけて発現が認められたことが報告されている<sup>3)</sup>。その他にも, MMP のインヒビターである TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase)<sup>6)</sup> や軟骨合成マーカーとして CP II (Cartilage type II procollagen carboxy propeptide)<sup>7)</sup> などのバイオマーカーの存在も報告され, 病態や治療効果の解明に向けた研究が広く行われている。しかし, 軟骨基質の分解に作用する ADAMTS や MMP は炎症性サイトカインにより産生されることが明らかになっており, 手術侵襲を伴う動物膝 OA モデルでは, 軟骨変性に寄与したストレスがメカニカルストレスか生物学的ストレスかは不明瞭であった。

膝 OA の発症・進行要因は複雑であり様々な因子の関与が報告されている<sup>8)</sup>が, 軟骨変性は荷重部に多く生じることから, 関節軟骨に加わる非生理的なメカニカルストレスは, 膝 OA 発症・進行の最も重要な因子に成り得ると

考えられる。この疑問を解決するために, 膝 OA を惹起するために確立されている前十字靭帯損傷モデル (ACL-T モデル : Anterior Cruciate Ligament Transection)<sup>9)</sup> と前十字靭帯切離後の脛骨前方動揺を制動することで異常関節運動を制動したモデル (CAJM : Controlled Abnormal Joint Movement)<sup>10)</sup>を用いることで, 異常関節運動を制動することが軟骨代謝動態に与える効果を検討することを本研究の目的とした。

### 対象および方法

#### 1. 倫理的配慮

本学における研究推進委員会の承認を得た後, 動物実験基本計画書ならびに実施計画書に従い, 研究を推進した (承認番号 27-7)。

#### 2. 対象

12 週齢の Wistar 系雄性ラット (日本 SLC, 浜松) 15 匹を用いた。対象は, ランダムに Sham 群, ACL-T 群, CAJM 群の 3 群に分類した。解析時期は, 術後 2 週時に組織学的な解析を実施した。

#### 3. 手術方法

ACL-T 群は, 膝関節内側を縦切開し, 膝蓋腱内側の関節包から関節内へ侵入し, 剪刀を用いて前十字靭帯を切離後, 関節包ならびに皮膚を縫合して閉創した。CAJM 群は, 先行研究に基づき<sup>11)</sup>, ACL-T モデルと同手順で前十字靭帯を切離後, 歯科用ドリルを用いて脛骨内側から外側に向けて骨孔を作成し, 骨孔に縫合糸を通して大腿骨後方にループ状にかけることで脛骨の前方引き出しを制動し, 関節包ならびに皮膚を縫合して閉創した。手術肢は右後肢に統一し, 両群ともに手術後に脛骨の前方動揺性を徒手的に確認した。なお, 術後は, 運動制限を設けずに飼育した。

#### 4. 標本作製方法

手術後 2 週経過時に膝関節を採取した。採取した組織は, リン酸緩衝食塩水で洗浄し, 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した (4℃, 48 時間)。脱灰は, 10%エチレンジアミン四酢酸溶液を用いて, 冷蔵庫内で 90 日間脱灰した。脱灰終了後, 10%スクロース (4 時間), 15%スクロース (4 時間), 20%スクロース (12 時間以上) 溶液に浸潤させるスクロース置換処理を実施した後, OCT compound (サクラファインテックジャパン株式会社, 東京) で凍結包埋した。凍結包埋した組織は, クリオスタット CM1900 を用いて, 内側から矢状断で膝関節を 14μm 厚に薄切し, 連続切片を作成した。

## 5. 一般染色方法

SafraninO-Fast Green 染色を実施し、関節軟骨の組織学的解析は軟骨破壊の組織学的評価として報告された Mankin スコア<sup>12)</sup>を用いた。Mankin スコアは、組織構築 (0-6 点)、軟骨細胞の状態 (0-3 点)、Safranin O の染色性 (0-4 点)、tidemark の不整 (0-1 点)をそれぞれで評価し、合計点で正常軟骨 (0 点) から重度の変性 (14 点) までを評価する半定量的評価スケールである。解析は、脛骨前面を対象に染色された組織を撮像し、ランダムに番号割り付けを施行した後、採点経験のある 2 人の共同研究者に採点を依頼した。平均点を算出し、Mankin スコアとして解析した。

## 6. 免疫組織化学染色方法

凍結切片を、風乾させ PBS で洗浄した後、0.3%過酸化水素水を含むメタノール中に 30 分間浸漬し、PBS で洗浄した。その後、正常ヤギ血清にて blocking 操作し、抗 MMP13 抗体 (希釈濃度 1:250, Bioss, USA)、抗 TIMP1 抗体 (希釈濃度 1:250, Bioss, USA)、抗 collagen II 抗体 (希釈濃度 1:250, Bioss, USA)、抗 collagen X 抗体 (希釈濃度 1:250, GENETEX, USA)、抗 TFCP2C (CP II と同一) 抗体 (希釈濃度 1:250, Bioss, USA) にてそれぞれ反応させ、VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories, USA) による ABC 法を用いて DAB にて発色させた。さらに、ヘマトキシレン核染色を施行し、光学顕微鏡にて観察した。

## 7. 統計解析方法

統計解析ソフト JMP pro ver.12.1 for Windows (SAS Institute Japan 株式会社, 東京) を用いた。正規性の検定は Shapiro-Wilk 検定を用いて行い、ノンパラメトリックデータであった Mankin スコアは、Kruskal-Wallis test を施行した。なお、すべての有意水準は 5%とした。

## 結 果

全ての群において、Mankin スコアでは有意差を示さなかったが、ACL-T 群においては、表層の不整が確認された (図 1)。また、免疫組織化学染色の結果 (図 2) では、ACL-T 群において、ADAMTS5 と MMP13 の陽性反応が認められ、CAJM 群では TIMP-1 と CP II の陽性反応が認められた。collagen II と collagen X に関しては群間での差は観察されなかった。

## 考 察

本研究では、関節運動が異なる 2 つの動物膝 OA モデルを用いることで、異常な関節運動を制動することが軟骨代謝動態に与える効果について検討した。その結果、術後 2 週時点では、形態学的な変化に関しては有意差が認められなかったが、ACL-T 群と比較して CAJM 群では軟骨の異化に作用する分子の発現が抑制された。

Kamekura ら<sup>3)</sup>は、動物膝 OA モデルの中で ACL-T モデルは mild モデルであり、術後 4 週時に軟骨変性が観察されたことを報告し、Murata ら<sup>11)</sup>は、CAJM モデルでは術後 4 週時点では、ACL-T 群との比較において軟骨変性に差を認めなかったことを報告している。これらより、本研究では解析時期が 2 週と早期であったため、群間での有意差を示さなかったと考えられる。しかし、異化に作用する ADAMTS5 と MMP13 は ACL-T 群で強い陽生反応を示し、TIMP-1 と CP II では CAJM 群で強い陽生反応を示したことから、ACL-T 群では CAJM 群と比較して軟骨の異化作用が亢進した可能性が示唆された。

早期の OA 軟骨組織では、プロテオグリカンの減少が重要な所見の 1 つであり、それに伴い軟骨基質の保水性を減少させ、II 型コラーゲンの破壊によって生じるとされる。本研究では II 型コラーゲンや X 型コラーゲンの発現に関しては群間での差は観察されなかったが、ADAMTS5 や MMP13 の陽生反応が観察されたことから、2 週以降ではコラーゲンの変化が生じる可能性が示唆された。

本研究の限界は、関節不安定性の程度を定量化できていないことであり、CAJM 群において異常関節運動がどの程度制動できたかが定量化することができなかった点や、各群間での荷重時間や左右対称性などの歩行パラメーターも不明であることが挙げられる。今後は、膝関節における運動学、運動力学的解析を行う必要があると考える。しかし、先行研究において、CAJM モデルでは ACL-T モデルと比較して脛骨の前方動揺性が有意に改善したことが示されており<sup>11)</sup>、本研究結果の要因としては関節運動の違い (本研究では、脛骨の前方動揺性の違い) によるメカニカルストレスが大きく影響を及ぼしたと考えられた。

本研究で得られた知見をヒトに応用していくためには、データが不十分と言わざるを得ないが、臨床的観点だけではなく基礎的観点から膝 OA の病態や介入効果の解明を目指すことが新たな治療法の確立に向けて重要となる。ヒト膝 OA 患者においても膝の外側動揺性の増大という、異常関節運動が多く認められることが報告されているが、今回、前方への異常動揺性を改善することで軟骨の異化作用が ACL-T 群と比較して改善したことから、異

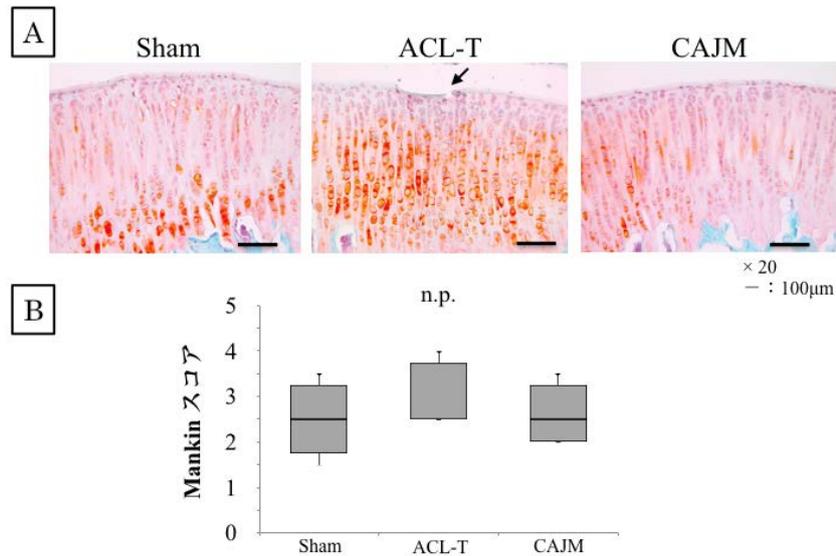


図1 組織学的解析結果

[A]: Safranin O - Fast green 染色像. ACL-T 群において表層の不整が認められた (矢印). [B]: Mankin score の結果.

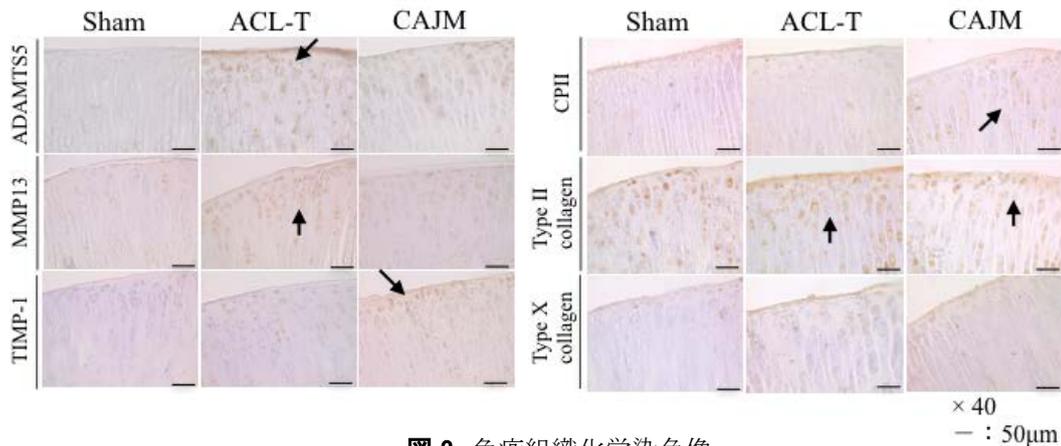


図2 免疫組織化学染色像

陽性反応が確認された部分を黒矢印で示した.

常関節運動の改善に向けた介入は重要であり, 理学療法の発展に重要な知見を与え得ると考えている。

## 結 論

本研究では, 異常関節運動の制動が軟骨代謝動態に与える影響を明らかにするため, 2 つの異なる動物モデルを用いて組織学的解析を施行した。その結果, 異常関節運動を制動することが関節軟骨の異化反応の予防に作用する可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Anderson DD, Chubinskaya S, et al: Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. J Orthop Res. 2012; 29(6): 802–809.
- 2) Blalock D, Miller A, et al: Joint instability and osteoarthritis. Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord. 2015; 8: 15-23.
- 3) Kamekura S, Hoshi K, et al: Osteoarthritis

- development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthr Cartil.* 2005; 13(7): 632–641.
- 4) Stanton H, Rogerson FM, et al: ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* 2005; 434(7033): 648–652.
  - 5) Little CB, Barai A, et al: Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(12): 3723–3733.
  - 6) Naito K, Takahashi M, et al: Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology.* 1999; 38: 510-515.
  - 7) Cahue S, Sharma L, et al: The ratio of type II collagen breakdown to synthesis and its relationship with the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2007; 15(7): 819-823.
  - 8) Glyn-Jones S, Palmer AJR, et al: Osteoarthritis. *Lancet.* 2015; 386(9991): 376–387.
  - 9) Bendele AM: Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001; 1(4): 363–376.
  - 10) 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.
  - 11) Murata K, Kanemura N, et al: Controlling joint instability delays the degeneration of articular cartilage in a rat model. *Osteoarthr Cartil.* 2016; 25(2): 297-308.
  - 12) Mankin HJ, Dorfman HLL et al: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Jt Surg Am.* 1971; 53(3): 523–537.