

論 文 内 容 要 旨

The role of substance P on maintaining ligament
homeostasis by inhibiting endochondral
ossification during osteoarthritis progression

(変形性関節症の進行に伴う内軟骨性骨化の抑制による
靭帯の恒常性維持に対するサブスタンス P の役割)

Connective Tissue Research, 2022, in press.

主指導教員：安達 伸生教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：味八木 茂講師

(広島大学病院 未来医療センター)

徳本 真矢

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【はじめに】

変形性関節症(Osteoarthritis; OA)は進行性の疾患で、軟骨や軟骨下骨、半月板、関節包、靭帯などの様々な組織が変性する。OAのメカニズムは徐々に明らかになってきているが、膝関節を安定させる上で重要な靭帯の変性メカニズムはほとんどわかっていない。OAにおける靭帯では、線維芽細胞主体である靭帯中に、軟骨様細胞の増加や骨化がみられ、内軟骨性骨化の関与が考えられている。OAでは感覚神経が関節周囲に伸長することが知られており、この神経支配の変化とOAの関係性が示唆されている。神経ペプチドである Substance P (SP) は、骨代謝や血管新生、炎症惹起などの様々な機能を有しており、OA関連性疼痛に重要な役割を果たしている。また、軟骨変性が進行するにつれて関節軟骨におけるSPの発現が低下することが知られている。そこで本研究では、OA靭帯におけるSPの発現と機能、およびOAマウスにおけるSP受容体アゴニストの治療可能性を解析することを目的とした。

【対象と方法】

まず、OA靭帯でのSP発現パターンを調べるために、人工膝関節全置換術(TKA)の際に採取されたヒトOA患者の後十字靭帯(PCL)および自然発症のOAモデルである Senescence-accelerated mouse-prone 8 (SAMP8) マウスのPCLを採取し、組織学的評価を行った。組織学的評価は、靭帯実質の炎症、ムコイド変性、軟骨化生、嚢胞状変化、コラーゲン線維の配列についてスコア化し、変性が軽度、中等度、高度の3群に分類した。また、免疫染色によりSP、SOX9、MMP13の発現を解析した。次にTKAの際に採取したヒト前十字靭帯(ACL)を用いて靭帯細胞を培養し、passage2 または3の細胞にNK1Rアゴニスト(Septide)10nM、100nM、NK1Rアンタゴニスト(Aprepitant)100nMを添加し、24時間後、48時間後、21日後に polymerase chain reaction (PCR)を用いて、MMP13、RUNX2、VEGFA、SOX9、COL2A1、COL10A1の発現量を解析した。また軟骨誘導培地で100nMのNK1Rアゴニストを添加し3週間培養した後、ペレットサイズとPCRでのSOX9、COL2A1の発現を解析した。最後に、10週齢のC57BL/6マウスの medial meniscotibial ligament を切離しOAを誘導する destabilization of the medial meniscus (DMM) マウスを作製し、コントロール群としてPBS、septide群としてNK1Rアゴニスト(septide)を 10^{-8} mol/kgを腹腔内に単回投与した。8週目に膝関節を採取し、PCLを前述と同様に組織学的評価を行った。

【結果】

ヒトおよびSAMP8マウスのPCLにおいて、SP、SOX9、MMP13の発現はOAの進行に伴い増加し、重度の変性では発現が低下していた。免疫染色ではSPとSOX9は軟骨様細胞で共発現していた。培養靭帯細胞では、NK1Rアゴニストは、SOX9、RUNX2、COL10A1の発現を低下させた。靭帯細胞を軟骨分化誘導すると、NK1Rアゴニストを添加した群は、コントロール群に比べてペレット径が減少し、SOX9、COL2A1の発現を低下させた。また、DMMマウスに腹腔内投与を行ったところ、septide群は、コントロール群に比べて靭帯変性が軽度であ

り、SPの発現も減少していた。

【考察】

OAにおける靭帯変性は、コラーゲン配列の乱れ、軟骨様細胞の増加、骨化が特徴的である。OA靭帯では内軟骨性骨化の過程の軟骨特異的なマーカーであるSOX9陽性細胞が増加することが報告されており、この内軟骨性骨化を抑制することにより、靭帯変性が予防できると考えた。OA膝では進行に伴い関節周囲の感覚神経が伸長し、軟骨や滑膜の知覚神経終末からSPが分泌され、関節液中のSPが増加することが明らかになっている。靭帯は関節内に存在する構造物であり、常にSPの刺激を受けている。本研究では、靭帯変性が進むにつれてSPの発現が増加し、さらに進行するとSPの発現が低下し、SPが軟骨様細胞で発現することが示された。これはOA進行に伴って増加した関節液中のSPが靭帯細胞を刺激し、さらに靭帯内細胞が内因性にSPを産生することによるものと考えられる。また、靭帯細胞にSPを持続的に投与することにより、初期にはSOX9、RUNX2、後期にはCOL10A1の発現を低下させることが示された。さらにin vivoではDMMマウスにSP受容体アゴニストを投与することにより靭帯変性を抑制できることも判明した。これらの結果は、OAの進行に伴う軟骨変性や軟骨下骨の骨硬化がSP受容体アゴニスト投与により抑制された以前の研究と併せて、SPがOAの進行を抑制するという可能性を示唆している。

【結論】

SPは、OA進行中の軟骨内骨化を抑制することにより、靭帯の構造を維持する重要な役割を担っている。SPをターゲットにすることで、靭帯変性の予防の治療効果が期待される。