

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	徳本 真矢
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①、2 項該当		
論文題目			
<p>The role of substance P on maintaining ligament homeostasis by inhibiting endochondral ossification during osteoarthritis progression</p> <p>(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)</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	平田 信太郎	印
審査委員	教授	今泉 和則	
審査委員	准教授	近間 泰一郎	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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それに続く骨化がみられ、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。本論文は、OA 靭帯におけるヒト、マウスにおける SP の発現と機能、および OA マウスにおける SP 受容体 (NK1R) アゴニストの治療効果を明らかにすることを目的とした研究である。本研究では、ヒト、マウスにおける靭帯変性と SP の発現を解析し、さらにヒト前十字靭帯培養細胞における SP の機能解析を明らかにするとともに、マウスへの SP 投与による靭帯変性との関連性が明らかにされた。</p> <p>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 OA モデルである Senescence-accelerated mouse-prone 8 (SAMP8) の PCL の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。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。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) 法により、MMP13、RUNX2、VEGFA、SOX9、COL2A1、COL10A1 の発現量を解析した。NK1R アゴニストは、SOX9、RUNX2、COL10A1 の発現を低下させた。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 SOX9、COL2A1 の発現を解析した。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 の発現が低下していたことから、NK1R アゴニストは軟骨分化を抑制した。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</p>			

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。NK1R アゴニスト投与群は、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。

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られた。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た。また、靭帯細胞に NK1R アゴニスト添加によるすることにより、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 NK1R 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 NK1R 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。

以上のとおり、本研究は SP が OA における靭帯変性と強い関連性があることを明らかにし、SP が内軟骨性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可能性が示された。今後、SP が内軟骨性骨化を抑制する詳細なメカニズム、薬剤としての SP が有効性を示す投与方法や投与量、有害事象の解明など行われることにより、SP を標的とした靭帯変性の予防の治療効果が期待できる。すなわち、本研究は OA における靭帯変性の臨床的問題点の解決に資するものとして高く評価できる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。