

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462389

研究課題名(和文) レニン・アンジオテンシン系の変形性膝関節症の発症および進行に与える影響

研究課題名(英文) Effects of local Renin-angiotensin system on development and progression of knee osteoarthritis(OA)

研究代表者

赤木 将男 (AKAGI, Masao)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：00273441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：トレッドミルを用いてC57/BL6マウスおよびつくば高血圧マウス(THM)を強制走行させた。走行開始後2、4、6、8週にて左膝関節を摘出し組織学的に評価した。THMのOAスコアは4週以降有意に高く、8週後にはOAマーカー発現の有意な亢進が認められた。また、THMではRASコンポーネントであるアンジオテンシンII 1型受容体(AT1R)、AT2R、ACE、アンジオテンシノーゲンの発現が認められ、AT1R、AT2Rは走行開始後経時的な発現亢進が認められた。RAS系の亢進しているTHMは運動負荷によるOAを発症しやすく、OAの発症と進展には局所RASが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：C57/BL6 mice and Tsukuba hypertensive mice (THM) were forced to run on a treadmill. The lateral compartments of the left knees were evaluated histopathologically using the OARSI score. Additionally, expressions of AT1R, AT2R, ACE1, and angiotensinogen were evaluated immunohistologically, after 8 weeks of running. In the THM, expressions of AT1R and AT2R in chondrocytes were evaluated each week, to clarify when AT1R and AT2R were expressed and involved in cartilage degeneration. The mean OARSI scores of the lateral knee compartment were significantly higher in the THM than in the C57BL/6 mice after 4, 6, and 8 weeks ($P<0.05$). Expressions of RAS components were detected in the THM but not in the C57BL/6 mice after 8 weeks. In the THM, expression of AT1R and AT2R were detected after 2, 4, 6, and 8 weeks, but not at 0 weeks. Activation of the RAS could accelerate expression of AT2R on chondrocytes and murine knee OA developed which mechanical stress of the forced running.

研究分野：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：変形性膝関節症 レニン・アンジオテンシン系 つくば高血圧マウス 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は加齢に伴い様々な関節の変形・疼痛・機能障害を生じ、患者の運動機能を著しく損なう疾患である。一方、高血圧症・高脂血症・糖尿病などの生活習慣病も著しく増加しており社会問題化している。多くの疫学調査の結果では、高血圧症は膝OAの独立した危険因子とされ、高血圧症と膝OAの間には共通の病因・病態があることが示唆されてきた。関節炎とレニン・アンジオテンシン系(RAS)との関連においては、炎症滑膜組織においてアンジオテンシンII 1型受容体(AT1R)の発現が亢進し、その受容体の阻害薬(AT1R Blocker, ARB)を投与すると関節腫張が軽減することが示されている。しかし、関節軟骨変性に局所RASが関与するかは明らかではない。

2. 研究の目的

高血圧症発症の因子であるレニン・アンジオテンシン系(RAS)の亢進が変形性膝関節症(OA)に関与をつくば高血圧自然発症マウス(Tsukuba hypertensive mouse, THM)を用いて *in vivo* にて明らかにすることである。すなわち、RAS系の亢進は高血圧症の発症に関与するのみならず軟骨組織の変性、すなわち変形性関節症発症にも関与を示し、変形性関節症の保存的および薬物的治療に新たな可能性を示すことである。

3. 研究の方法

(1) 筑波理化学研究所の深水昭吉博士より供与を受けた THM (background: CB57/BL6) の交配・繁殖を医学部動物実験施設で行い、実験群を作成する。9週令オスの CB57/BL6 wild type mice (コントロール群) および THM (実験群) をマウス専用トレッドミルにて強制的に走行させ(25m/分、30分、週5日)、0、2、4、6、8週間の走行負荷後に安楽死させ左膝関節(各群 n=10)を摘出し、HE染色組織標本を作成、関節軟骨組織の変性程度を OARSI (Osteoarthritis Research Society International) Score を用いて定量評価する。また、正常軟骨の主要な構成蛋白である2型コラーゲン発現、OA軟骨に特徴的な蛋白発現とされている10型コラーゲン発現、MMP-13、ADAM-TS5の発現を評価する。

(2) RASコンポーネントであるアンジオテンシンII 1型受容体(AT1R)、AT2R、ACE、アンジオテンシノーゲンの発現を免疫組織化学的に評価する。

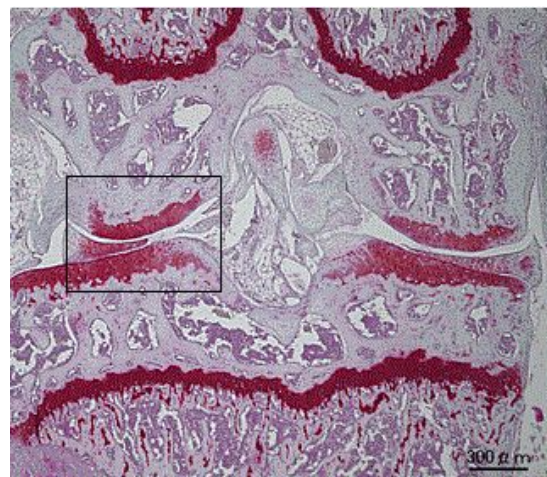
(3) AT1R および AT2R の経時的な発現状況を0、2、4、6、8週間の走行負荷後に免

疫組織化学的に評価する。

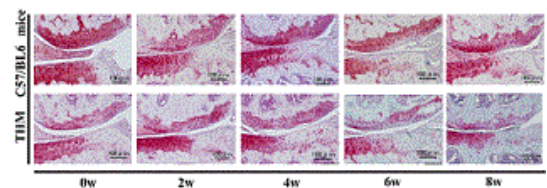
4. 研究成果

(1) マウス専用トレッドミルにて強制的に走行させ0、2、4、6、8週間の走行負荷後に OARSI スコアにて評価をおこなった。膝関節内側コンパートメントでは両群に有意な差を認めなかったが、外側コンパートメントには THM 群で有意に軟骨変性の程度が強かった(図1)。また、8週間の走行負荷後には THM にて2型コラーゲンの発現低下が認められ、10型コラーゲン、MMP-13、ADAM-TS5の発現亢進が認められた(図2)。

A



B



C

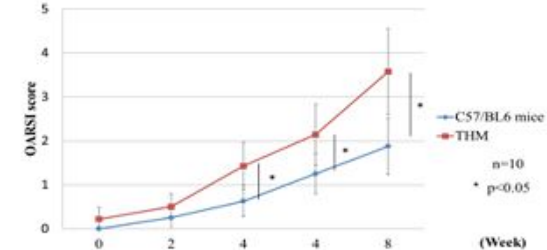
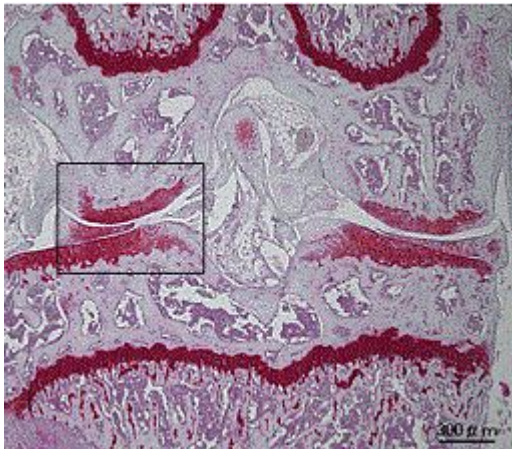


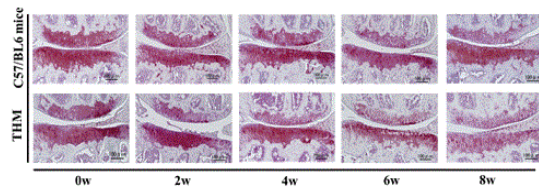
図1. 膝外側コンパートメントの経時的な軟骨変性の進行。A: 評価部位。B: CB57/BL6マウスとTHMの関節軟骨組織の経時的な変化。C: 軟骨変性の程度の定量化(OARSIスコアを使用)。両群ともに走行負荷により

OA 変化の進行が認められたが、THM においてより強い変化が認められた。

A



B



C

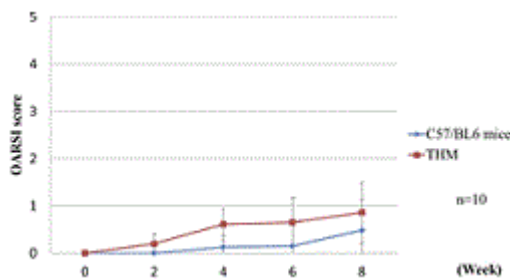


図 2 . 膝内側コンパートメントの経時的な軟骨変性の進行。 A: 評価部位。 B: C57/BL6 マウスと THM の関節軟骨組織の経時的な変化。 C: 軟骨変性の程度の定量化 (OARSI スコアを使用)。 両群ともに走行負荷による OA 変化の進行はわずかであった。

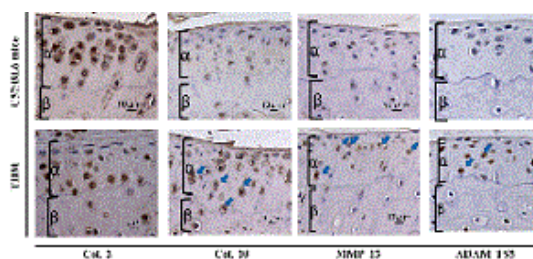


図 3 . 強制走行 8 週後の 2 型コラーゲン、および肥大分化マーカーの免疫染色結果。

(2) THM において 8 週後の強制走行負荷後には、軟骨細胞の肥大分化マーカーである 10 型コラーゲン、MMP-13、ADAM-TS5 発現が亢進し、正常軟骨細胞のマーカーである 2 型コラーゲンの発現が低下していた。コントロールの C57BL/6 マウスでは 2 型コラーゲンの発現が十分に認められる (図 3) 。

(3) THM において 8 週間の強制走行負荷後には RAS コンポーネントであるアンジオテンシン II 1 型受容体 (AT1R)、AT2R、ACE、アンジオテンシノーゲンの発現が認められた。CB57/BL6 マウスにおいては AT1R の美弱な発現以外に、RAS コンポーネントの発現は認められなかった (図 4) 。

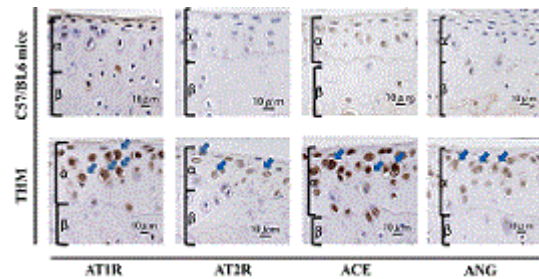


図 4 . 8 週間の強制走行負荷後の RAS コンポーネントの免疫組織染色結果

(4) THM においては、0、2、4、6、8 週間の走行負荷により AT1R および AT2R は経時的に発現が亢進した (図 5) 。

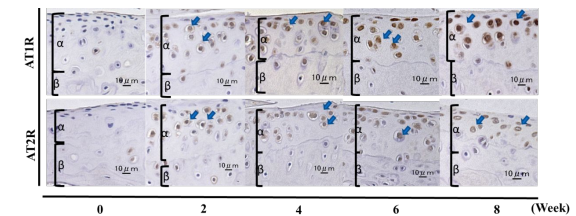


図 5 . THM における 0、2、4、6、8 週間の走行負荷後の AT1R および AT2R の免疫組織染色結果

以上の結果より、強制走行による膝関節への機械的負荷により作成される軽症の OA は THM においてより重症化することが示された。高血圧による軟骨下骨への虚血が軟骨変性に関与する可能性もあるが、今回

の研究では、病理学的にそのような所見はなかった。機械的負荷と高濃度の AT II の相乗効果による AT1R と AT2R の発現亢進が OA の重症化に關与している可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Hashimoto K, Mori S, Oda Y, Nakano A, Sawamura T, Akagi M.
Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1-deficient mice show resistance to instability-induced osteoarthritis. Scand J Rheumatol. 2016, 22:1-11 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

Activation of the Renin-Angiotensin system introduces osteoarthritis.
Yamagishi K, Tsukamoto I, Akagi M.
Osteoarthritis Research Society International (OARSI) 2015
World Congress, Seattle, Washington, 2 May 2015. Washington State Convention Center(Washington)

レニン・アンギオテンシン系の亢進による OA 変化の検討
山岸孝太郎 墳本一郎 橋本和彦 赤木將男
第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
2014 年 10 月 10 日 城山観光ホテル(鹿児島市)

高血圧による OA 変化: つくば高血圧モデルマウスを用いた検討
山岸孝太郎、墳本一郎、井上紳司、橋本和彦、赤木將男
第 73 回近畿大学医学会、2014 年 7 月 26 日
近畿大学医学部(大阪狭山市)

高血圧による OA 変化: つくば高血圧モデルマウスを用いた検討
山岸孝太郎 墳本一郎 井上紳司 橋本和彦 赤木將男
第 27 回日本軟骨代謝学会 2014 年 2 月 28 日
京都府医師会館(京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤木 將男 (AKAGI, Masao)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 00273441