

学 位 論 文 の 要 旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 乙 生命医科学専攻 臨床医学系講座 運動器外科学・腫瘍集学治療学分野	氏 名	すずき よしあき 鈴木 慶 亮
-----	--	-----	--------------------

主論文の題名

Intra-articular injection of rebamipide prevents articular cartilage degeneration in murine posttraumatic osteoarthritis models

主論文の要旨

【目的】

変形性関節症（OA）は高齢者における有病率が非常に高いが、軟骨変性抑制効果を持つ薬剤はほとんどない。われわれは軟骨変性抑制効果を持つ薬剤として胃粘膜保護薬であるレバミピドに注目している。レバミピドは過去に主に消化管領域において粘膜保護作用、抗炎症作用、抗酸化ストレス作用などの有用性に関する報告が多数存在している薬剤であり、現在は角膜保護作用も報告されたため、点眼薬も市販されており、臨床使用の拡大が期待される薬剤である。レバミピドの持つ抗炎症作用、抗酸化ストレス作用などが変形性関節症の治療および進行抑制に有用であると考え、関節軟骨への影響を検討することとした。今回、外傷性変形性膝関節症（PTOA）モデルマウスを用いてレバミピドの関節内投与の軟骨変性抑制効果を検討し、また、*in vitro* において培養軟骨細胞を用いてレバミピドの軟骨変性抑制効果を検討した。

【方法】

8 週齢オスの BALB/c マウスを用い、全身麻酔下に両側の後肢前十字靱帯と膝内側側副靱帯を切除し PTOA モデルとした。手術直後より生理食塩水、レバミピド 0.1mg/ml、1mg/ml、10mg/ml を週 1 回関節内投与した。マウスは術後 6 週で屠殺後、組織切片を作成し H-E 染色、サフラニン O 染色を行い、軟骨変性の評価である Mankin score と Glasson score、滑膜炎の評価である synovitis score を用いて組織学的評価を行った。また、Ⅱ型コラーゲンの免疫染色も行った。評価基準として手術処置・関節投与を行わないマウスモデルも作成した（untreated non-OA model）。

培養軟骨細胞はヒトの人工膝関節手術時に切除した軟骨より単離し採取した。単離したヒト軟骨細胞を 5-7 日間の単層培養後、IL-1 β を添加し炎症を惹起後にレバミピド投与を行った。レバミピドの濃度は 0 μ M、100 μ M、500 μ M、2500 μ M としてそれぞれ投与し、レバミピド投与後 24 時間で培養軟骨細胞を回収した。回収した軟骨細胞を用いてリアルタイム PCR にて各種サイトカインを評価した。検査項目は軟骨の基質に関連する COL2A、COL10A、aggrecan (ACAN)、炎症性サ

イトカインである NF- κ B、IL-1 β 、TNF α 、軟骨基質の分解へ作用する catabolic factor である matrix metalloproteinase (MMP)3、MMP13、A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs (ADAMTS)5、軟骨基質の合成へ作用する anabolic factor である tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)3、TGF β 、FGF2 の発現を検証した。

【結果】

マウス膝軟骨の組織像はコントロール群、0.1mg/ml 投与群ではプロテオグリカンの減少、軟骨変性を認めたが、1mg/ml 群・10mg/ml 群では軟骨は平滑であり保たれていた。Mankin score ではコントロール群(7.00)、0.1mg/ml 群(5.75)、1mg/ml 群(3.63)、10mg/ml(3.75)であり、1mg/ml 群・10mg/ml 群でコントロール群よりも有意に軟骨変性を抑制していた($p<0.01$)。Glasson score ではコントロール群(2.50)、0.1mg/ml 群(2.50)、1mg/ml 群(1.13)、10mg/ml 群(1.00)であり、1mg/ml 群・10mg/ml 群でコントロール群よりも有意に軟骨変性を抑制していた($p<0.01$)。滑膜炎の評価の synovitis score でも同様に、コントロール群(3.50)、0.1mg/ml 群(3.50)、1mg/ml 群(1.00)、10mg/ml(1.50)であり、1mg/ml 群・10mg/ml 群でコントロール群よりも有意に滑膜炎を抑制していた($p<0.01$)。

リアルタイム PCR ではレバミピド投与により COL2A の発現は 500 μ M(2.1 : $p<0.05$)、2500 μ M(2.6 : $p<0.01$)において有意に増加していたが、COL10A、ACAN は明らかな変化を認めなかった。炎症性サイトカインである NF- κ B はコントロールと比較し 500 μ M (0.54, $p<0.05$)、2500 μ M(0.45, $p<0.01$)で、IL-1 β は 500 μ M (0.39, $p<0.01$)、2500 μ M(0.095, $p<0.01$)で、TNF α は 500 μ M (0.31, $p<0.05$)、2500 μ M(0.14, $p<0.01$)でそれぞれ有意に発現を抑制していた。軟骨基質の catabolic factor である MMP3 はコントロールと比較し、2500 μ M(0.34, $p<0.05$)で、MMP13 は 2500 μ M(0.25, $p<0.01$)、ADAMTS5 は 2500 μ M(0.44, $p<0.01$)でそれぞれ有意に発現を抑制していた。軟骨基質の anabolic factor である TIMP3 はコントロールと比較し、2500 μ M(2.57, $p<0.05$)で、TGF β は 2500 μ M(1.96, $p<0.05$)、FGF2 は 2500 μ M(2.31, $p<0.01$)でそれぞれ有意に発現を増幅していた。

【考察】

PTOA モデルマウスにおけるレバミピドの関節内投与はコントロール群と比較して有意に軟骨の変性を抑制しており、滑膜炎も減少していた。レバミピドの関節内投与は OA の進行を予防できる可能性が考えられた。また、軟骨細胞培養において II 型コラーゲンの有意な増加を認めており、レバミピドは NF- κ B、IL-1 β 、TNF α などの炎症性サイトカインや MMP3、MMP13、ADAMTS5 などの軟骨基質の catabolic factor を有意に抑制していた。炎症性サイトカインの増加や catabolic factor の増加が OA を進行させるとされているため、これらのサイトカインを抑制することがレバミピドの軟骨変性抑制効果の主要因である可能性が考えられた。レバミピドは TIMP3、TGF β 、FGF2 などの軟骨基質の anabolic factor も有意に増加させていた。今回検討したレバミピドの抗炎症作用や MMP3 などの catabolic factor の抑制は、消化管などの他の細胞においても同様に報

告されており、レバミピドは軟骨細胞においても消化管細胞・角膜細胞と同様に有用な効果を認めたものと考えられた。

【結論】

レバミピドの関節内投与は軟骨変性抑制効果を認め、軟骨細胞培養においても catabolic factor の抑制作用、抗炎症作用を認め、軟骨変性を抑制すると考えられた。レバミピドは新たな OA 進行抑制薬になる可能性が示唆された。