

学 位 論 文 の 要 約

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	眞弓 徳大 ^{まゆみ のりひろ}
<p>主論文の題名</p> <p>Association of bisphosphonate with bone loss and pain-related behaviour in an adjuvant-induced osteoporosis model (アジュバント誘発性骨粗鬆症モデルにおけるビスホスホネートと骨量減少および疼痛関連行動との関連)</p> <p>Norihiro Mayumi, Hiroki Wakabayashi, Gaku Miyamura and Akihiro Sudo</p> <p>Modern Rheumatology,00,2013,1-10 Published:August 24,2023 doi: 10.1093/mr/road085</p> <p>主論文の要約</p> <p>Introduction (導入)</p> <p>関節リウマチ (RA) は慢性かつ進行性の自己免疫疾患であり、免疫応答によりRAの関節炎が惹起され、骨軟骨破壊に繋がる。また、RA患者では、椎体骨折および非椎体骨折のリスクが健常者の約2倍高いといわれている。不動や慢性炎症による骨の粗鬆化だけでなく、免疫応答の異常により破骨細胞経路が活性化され、骨粗鬆症や局所の骨破壊に至る。</p> <p>疾患病理のメカニズムを解明するためにRAの動物モデルは広く使用されている。最も一般的に使用されるモデルは、ラットおよびマウスを用いたアジュバント誘発性関節炎とコラーゲン誘発性関節炎である。また、自己免疫を発症させる遺伝子を有した自然発症モデルも存在する。一方、RA患者では、炎症が起きている関節の近隣関節における疼痛をしばしば訴えるが、関節炎の進行過程における近隣関節の骨量減少や疼痛に関して動物モデルを用いた基礎的研究の報告はない。</p> <p>Objectives (目的)</p> <p>RA は滑膜炎と進行性の骨軟骨破壊を伴う疾患であり、続発性骨粗鬆症を呈する。関節炎所見が乏しいにも関わらず症状を訴えることがあり、炎症関節が周囲関節に影響を及ぼす可能性がある。本研究の目的は、足関節炎モデルを用いて近隣関節である膝関節の骨形態計測および組織学的検討を行い、炎症周囲関節の影響を評価すること</p>			

と、確立した動物モデルを用いて骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネートによる治療効果を検討することである。

Methods (方法)

第一の研究は関節炎誘発性骨粗鬆症モデル（以下 AO モデル）の確立である。8 週齢の雌 ddY マウスを用いて、右足背に完全フロイントアジュバント（CFA）20 μ l を皮下注射した AO 群、右足背に生理食塩水 20 μ l を皮下注射した対照群の右膝関節における骨形態計測を行い、CFA もしくは生理食塩水を注射後 3 日、7 日、14 日、21 日、28 日と経時的に評価した（各群 5 匹）。骨形態計測はマイクロコンピュータ断層撮影（ μ CT）を用いて、当該膝関節の大腿骨遠位骨幹端および脛骨近位骨幹端を計測した。また、組織学的検討として当該膝関節の HE 染色を行い、膝蓋下脂肪体炎症スコアにて関節炎の程度を評価した。

第二の研究では、AO モデルの疼痛関連行動の評価とビスホスホネート（アレンドロネート：ALN）投与による治療効果の検討を行った。8 週齢の雌 ddY マウスを用いて、AO 群に CFA 投与後 7 日目から 14 日目まで ALN40 μ g/kg を週 2 回皮下注射した AO-ALN 群と、AO 群に生理食塩水を同量皮下注射した未治療群（AO-生食群）、そして生理食塩水 20 μ l を右足背に投与し、投与後 7 日目から 14 日目まで生理食塩水を ALN と同量皮下注射した対照群を作成した。

ALN もしくは生理食塩水を注射後 14 日目に当該膝関節の骨形態計測評価、疼痛評価、組織学的評価を行った。疼痛関連行動の評価は von Frey filament を用いた逃避行動を起こす最小刺激強度(閾値)、up-down method を用いた 50%閾値にて行った。直接膝関節を刺激する事でより正確に膝関節における疼痛を評価した。組織学的評価は膝蓋下脂肪体炎症スコアに加え、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色を施行し、当該膝関節の脛骨近位骨幹端における TRAP 陽性細胞数を計算し、破骨細胞数とした。また免疫組織学的検討として膝関節の知覚を支配している L4 後根神経節におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）の染色を行い、その発現割合を評価した。

Results (結果)

第一の研究における μ CT による骨形態計測では、CFA もしくは生食を投与後 7 日および 14 日目において AO 群では対照群と比較して骨密度(BV/TV)、骨梁数(TB.N)が有意に低下すると共に骨梁間隔(Tb.Sp)が有意に増加し、骨量の減少を認めた。一方、投与後 3 日、21 日、28 日目では AO 群と対照群では有意差を認めなかった。AO 群での膝関節における膝蓋下脂肪体炎症スコアは CFA 投与側では非投与側と比較し、CFA 投与 3 日から 14 日目まで有意に上昇していたが、投与 21 日目以降では有意差を認めなかった。

第二の研究における μ CT による骨形態計測では、AO-ALN 群は未治療群である AO-生食群と比較し、BV/TV および TB.N が有意に増加するとともに Tb.Sp は有意に低下し、骨量の改善が認められた。また当該膝関節周囲の閾値、50%閾値は AO-生食群

と比較し、AO-ALN群で有意に改善していた。組織学的検討では、当該膝関節における膝蓋下脂肪体炎症スコアはAO-生食群では対照群と比較し有意に増加し、AO-ALN群ではAO-生食群と比較し有意に低下していた。また発症後14日目の脛骨近位骨幹端におけるTRAP染色陽性細胞数は、AO-生食群では対照群と比較して有意に増加していた。一方AO-ALN群ではAO-生食群と比較し有意に減少していた。またL4後根神経節におけるCGRP染色を用いた免疫組織学的検討では、CGRP陽性ニューロンの割合はAO-生食群において、対照群よりも有意に多く、またAO-ALN群ではAO-生食群よりも有意に少なかった。

Discussion (考察)

RAは慢性の滑膜炎および進行性の骨軟骨破壊を伴う自己免疫疾患で、様々なサイトカイン等の炎症関連因子の影響を受ける。炎症や関節破壊はRAにおける疼痛の良く知られた原因であるが、関節炎の程度とは不釣り合いなほど著明な疼痛を訴える患者が存在する。また、RA患者は全身性および局所性の骨量減少をもたらす。全身性の骨量減少は疾患経過の早期より始まり、持続的な炎症、グルココルチコイドの使用、不動、障害、サルコペニア、および加齢や閉経などの危険因子によって引き起こされるRAの関節外合併症である。これらのことから関節腫脹が乏しい場合の疼痛では骨粗鬆症性疼痛が関与する可能性を示唆していると考えられる。そこで本研究では、関節炎誘発性骨粗鬆症モデルを開発および確立することを目的とした。RAにおける疼痛には侵害受容性疼痛および末梢感作/中枢神経系の調節メカニズムが関与する。今回AOモデルでは、関節炎誘発部位の近隣関節において、骨量および疼痛閾値の減少、関節炎の増悪が観察された。アジュバント誘発性関節炎が続発性骨粗鬆症を引き起こすことは既に報告されているが、疼痛関連行動の評価はされていない。von Frey filamentは通常後足を刺激して疼痛評価をする。本研究ではvon Frey filamentを用いて膝関節の疼痛評価へ応用した。今回AOモデルにおいて、CFA注射後7日目から14日目にかけて、近隣関節において関節炎が増悪し、骨量が有意に減少した。そこで薬剤投与実験では、CFA投与後7日目から14日目までALNを投与し、AOの予防ではなく治療の観点からアプローチした。その結果、ALNの投与により炎症関節近隣膝関節における骨量および疼痛閾値の有意な改善を認めた。また、過去の報告では骨粗鬆症動物モデルにおけるALNの疼痛抑制効果は一次ニューロンである後根神経節での一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリーVメンバー1 (TRPV1) およびCGRP発現レベルの減少との関連が報告されており、本研究でもそれに倣いL4後根神経節におけるCGRP染色を用いた免疫組織学的検討を行い、CGRP発現レベルと疼痛の関連を見出した。更に膝蓋下脂肪体炎症スコアを用いた評価により、ALN治療は骨構造を改善するだけでなく、関節炎も改善する事が示唆された。実際、以前の研究では、in vivo およびin vitro研究において、ALN治療がインターロイキン1 β 、インターロイキン6、腫瘍壊死因子 α などの炎症性サイトカインを有意に減少させることが報告されており、本研究でも炎症性サイトカインの関与の可能性も示唆された。

Conclusion (結論)

動物モデルは、疾患病理のメカニズムを解明し、潜在的な生物学的標的を特定するために広く使用されている。今回の研究により、関節炎を惹起した部位の隣接関節の骨量減少および炎症の波及を明らかにした。また、ビスホスホネート治療は破骨細胞増加を抑制することで骨量減少を抑制し、疼痛関連行動と組織学的評価により痛覚過敏を抑制することを見出した。続発性骨粗鬆症を有し、関節症状残存を認める RA などの関節炎疾患患者の疼痛に対し、ビスホスホネートが有効である可能性を示した。