

第12回 同窓会総会 愛橘会学術賞講演

Journal of Inflammation Research

Dovepress

open access to scientific and medical research

 Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

Efficacy of Methotrexate on Rat Knee Osteoarthritis Induced by Monosodium Iodoacetate

変形性膝関節症モデルラットに対するメソトレキサート治療の有用性検証

整形外科学講座 山梨裕貴

本研究は愛知医科大学整形外科講座と解剖学講座の共同研究

背景

- ✓ 変形性関節症(OA) : 軟骨変性が病態の首座
- ✓ 関節リウマチ(RA) : 滑膜炎が病態の首座

→ ただし、OAとRAの病態の境界を判断は難しい

OAも過剰な自己免疫による炎症の一端であると捉えると
免疫調整による治療が有用となる可能性が想起される

目的

ラットを用いて膝OAモデルを作製し、RAのanchor drugであるメトトレキサート(MTX)による治療を行い、OAに対して免疫調整による治療が有用かを検証した。

対象と方法

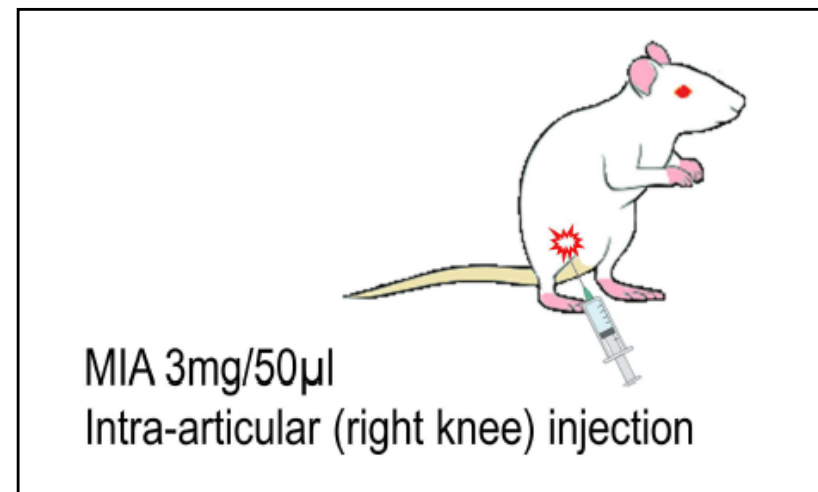
10-14週齢、300-350g、雄のWister Rat25匹を使用

OAモデル作製：右膝関節内に3mg/50ml MIA(ヨード酢酸)を投与
(左膝(健側)は処置をせずコントロール)

Overview of published papers “Osteoarthritis pain animal models/mouse models” PubMed search Jan 6, 2018.

| | % Before 2008 (total=36) | % Since 2008 (total=214) |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| <u>MIA model</u> | 41% | 54% |
| Surgical model | 28% | 33% |
| Collagenase-induced OA | N/A | 3% |
| Other OA-relevant models (ageing, obesity) | 3% | 3% |
| Inflammatory models * | 16% | 6% |
| Large animals | 19% | 7% |
| Two models side-by-side | 5% | 8% |
| Includes neurobiology | 25% | 35% |
| Assesses more than one behavior | 16% | 32% |
| Pain assessed at more than one time point | 25% | 40% |
| Assesses pain and joint damage in same animals | 33% | 43% |
| DMOAD testing with pain as secondary outcome | 5% | 11% |

* These include intra-articular administration of CFA or carrageenan in order to trigger joint damage and pain. MIA = mono-iodoacetate; DMOAD = disease-modifying osteoarthritis drug.



< R. E. Miller et al ; Best Pract Res Clin Rheumatol 2018 >

実験プロトコール

両群10匹ずつを作製

① MTX 3mg/ml/kg (MTX群)

② MTXを含まない同量の溶媒のみ(コントロール群)

(5匹は処置しないコントロールとして使用)

→ MIA投与後3日、1週、2週、3週に経口投与

| Experiment 1 / Day | 0 | 1 | 2 | 3 | - | 7 | - | 14 | - | 21 | - | 28 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|----|---|----|
| uCT (V:5, M:5) | ✓ | | | | | ✓ | | ✓ | | ✓ | | ✓ |
| Mechanical Pain Threshold (V:5, M:5) | ✓ | ✓ | | ✓ | | ✓ | | ✓ | | ✓ | | ✓ |
| RT-qPCR : DRG & spinal cord (U:5, V:5, M:5) | | | | | | | | | | | | ✓ |
| RT-qPCR : knee joint (U:5, V:5, M:5) | | | | | | | | | | | | ✓ |

| Experiment 2 / Day | 0 | 1 | 2 | 3 | - | 7 | - | 14 | - | 21 | - | 28 |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|----|---|----|---|----|
| uCT (V:5, M:5) | ✓ | | | | | ✓ | | ✓ | | ✓ | | ✓ |
| Lifting behavior (V:5, M:5) | | | | | | ✓ | | ✓ | | ✓ | | ✓ |
| Pathohistology (V:5, M:5) | | | | | | | | | | | | ✓ |

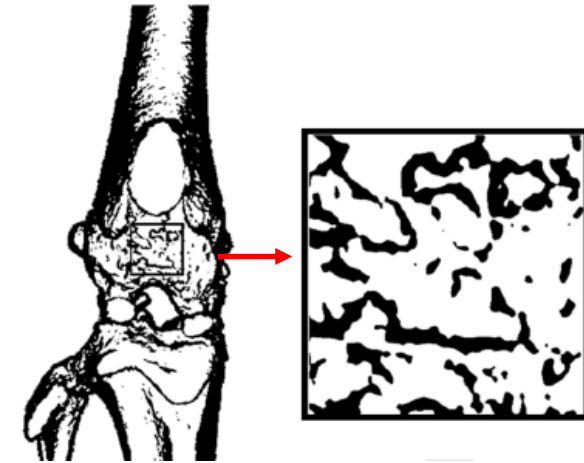
U: Untreated control, V: Vehicle group, M: Methotrexate group

I) 関節構造評価

① micro CTによる関節面の定量的評価

PF関節大腿骨側関節面の構造変化を評価

Image Jを用いて0-255からthresholdを130で二値化し損傷部位の範囲を解析



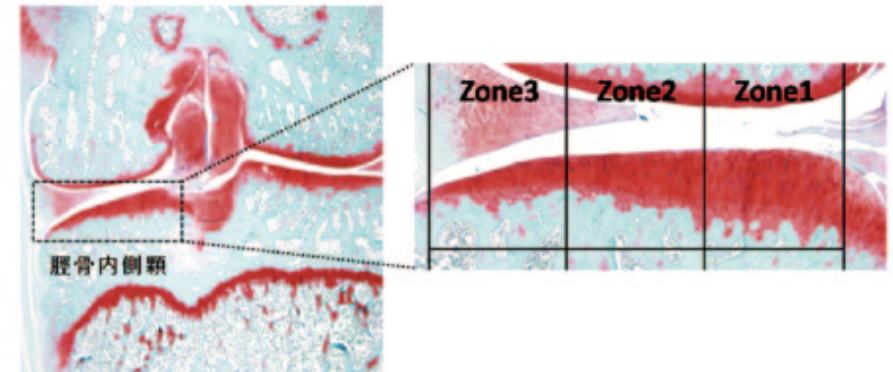
30 × 30 pixelsの範囲を評価

② 組織学的評価

MIA投与30日後に屠殺し大腿骨・脛骨の標本を作製

OARSIスコアに基づき評価：

Zone1(半月板側) ~ zone3(顆間隆起側)の3カ所を各5点で評価



| Parameter | Grade | Description |
|------------------------|-------|--|
| Cartilage degeneration | 0 | No degeneration |
| | 1 | Minimal degeneration; 5-10% of the total projected cartilage area affected by matrix or chondrocyte loss |
| | 2 | Mild degeneration; 11-25% affected |
| | 3 | Moderate degeneration; 26-50% affected |
| | 4 | Marked degeneration; 51-75% affected |
| | 5 | Severe degeneration; greater than 45% affected |

< Gerwin N et al ; Osteoarthritis Cartilage 2010 >

Ⅱ) 疼痛行動評価

③ 足引っ込め反射誘発時の閾値

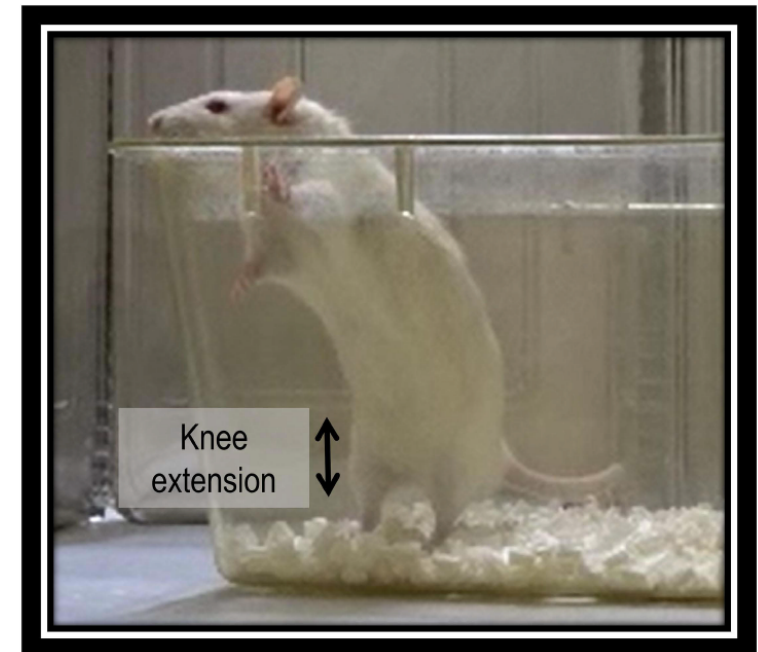
両肢の内側膝関節裂隙および腓腹筋筋腹に対し
フォースゲージで直線的に圧力(10g/s)をかけた
閾値を測定



④ 立ち上がり回数

10分間の立ち上がり数を評価

高さ18cmのケージに入れて目がケージの上縁
を超えたら1回とカウント



Ⅲ) Real time PCR検査

⑤ L3-4 DRG(脊髄後根神経節)

炎症性マーカー: IL-1 β , IL-6, TNF- α

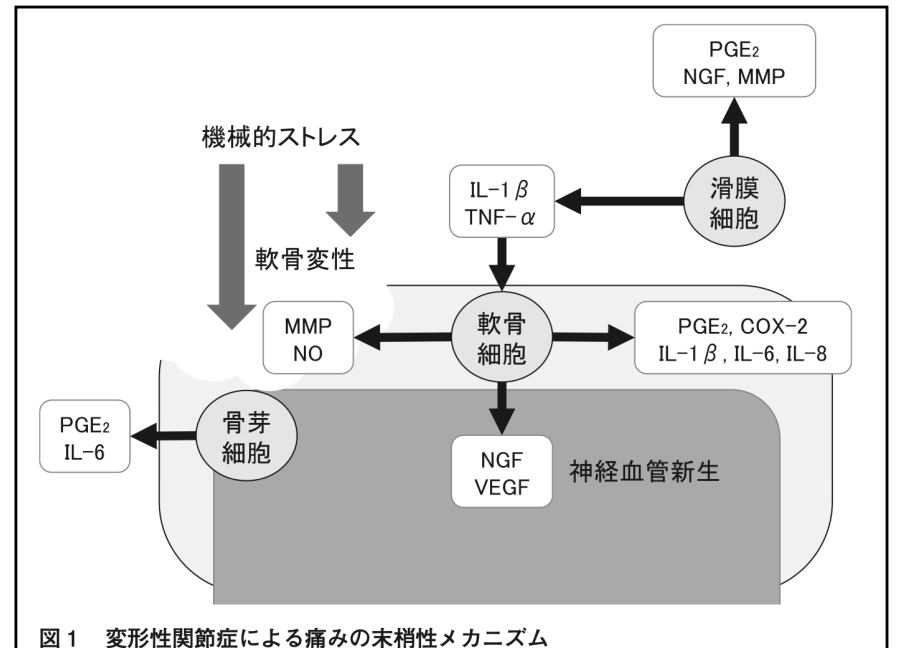
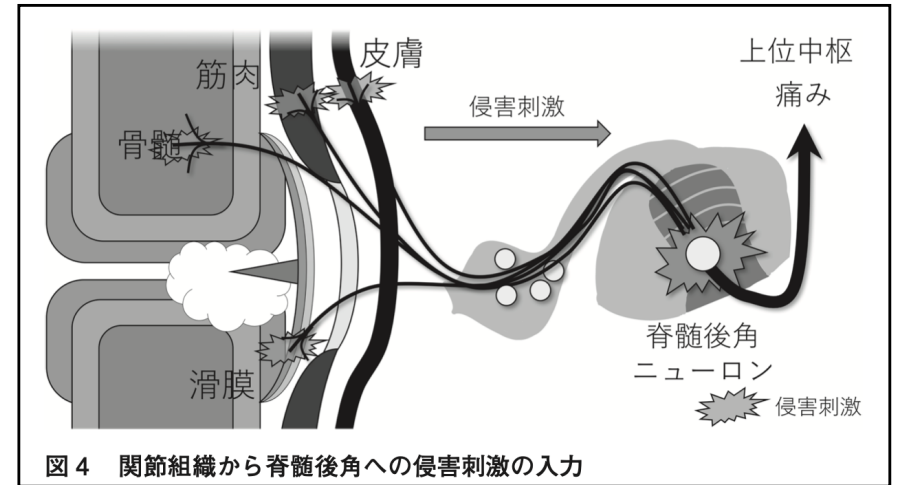
侵害受容関連タンパク : TRPV1, BDNF
Subsatnce P

⑥ 大腿遠位軟骨

プロテアーゼ : MMP3, MMP13

炎症性マーカー :
IL-1 β , IL-6, TNF- α , NF-kB, Tmem 147, CCL2

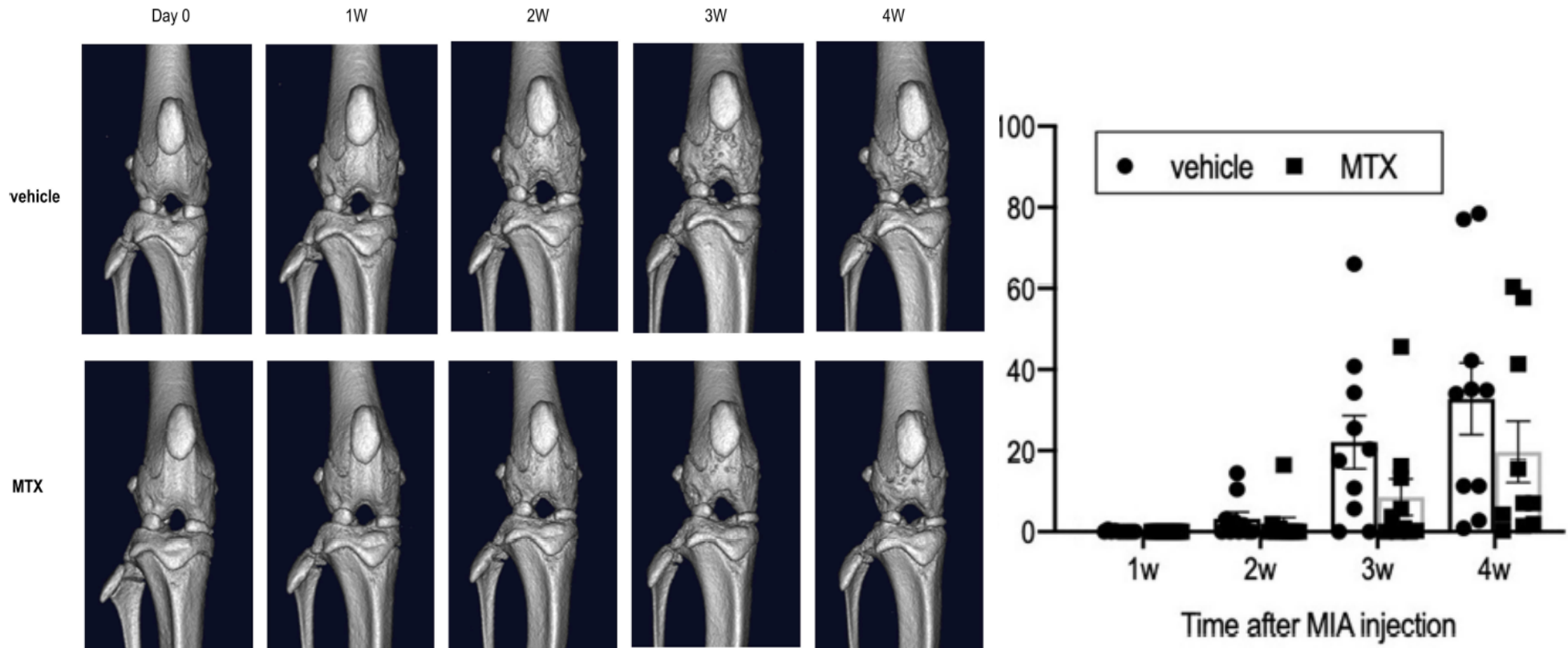
侵害受容関連タンパク : NGF



< 石田ら; 日本ペインクリニック学会誌 2018 >

統計解析 : 分散分析, Mann-Whitney U, P値 < 0.05 有意差あり

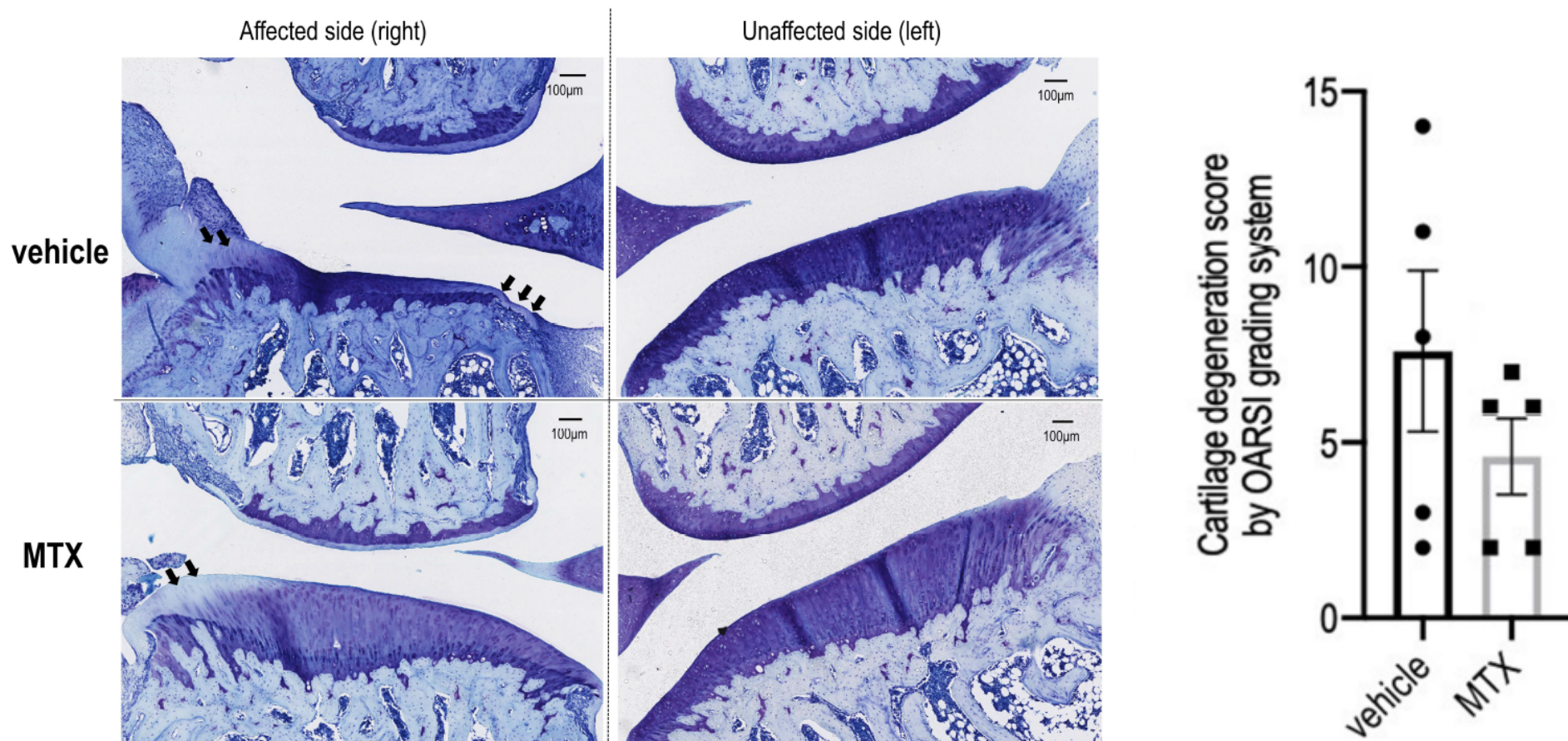
結果① micro CTによる関節面の定量的評価



| Day | 7 | 14 | 21 | 28 |
|------------------|------|------|-------|-------|
| 平均損傷範囲 コントロール | 0.1% | 3.2% | 22.1% | 32.8% |
| MTX | 0.0% | 1.9% | 8.6% | 19.7% |

MTX群は損傷範囲は少ないが有意差は認めなかった(4w P=0.20)

結果② OARSIスコアによる組織学評価



<トルイジンブルー染色>

コントロール群 7.6 ± 5.1 v.s MTX群 4.6 ± 2.4

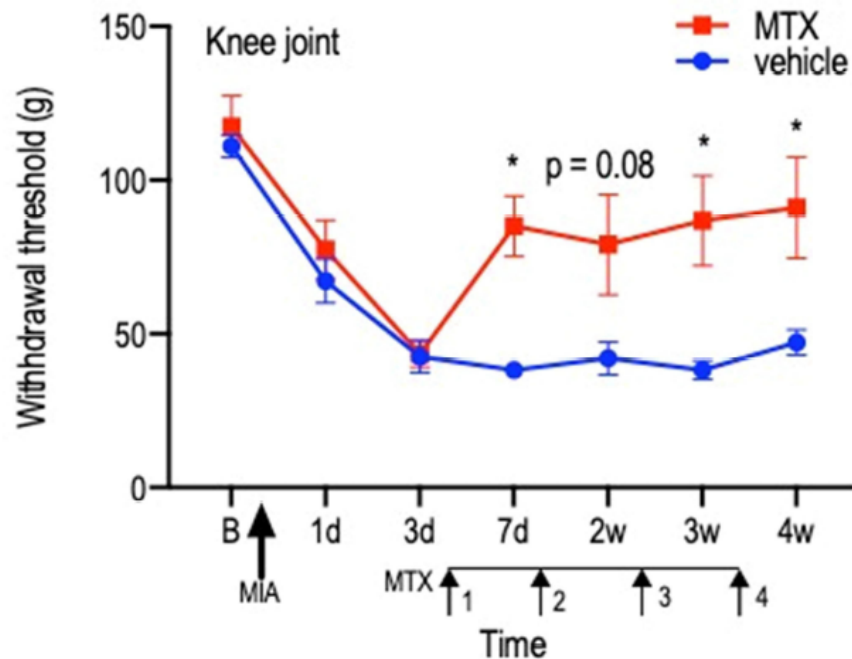
MTX群はスコアが低い有意差は認めなかった (4W P=0.28)

結果③足引っ込め反射誘発の閾値

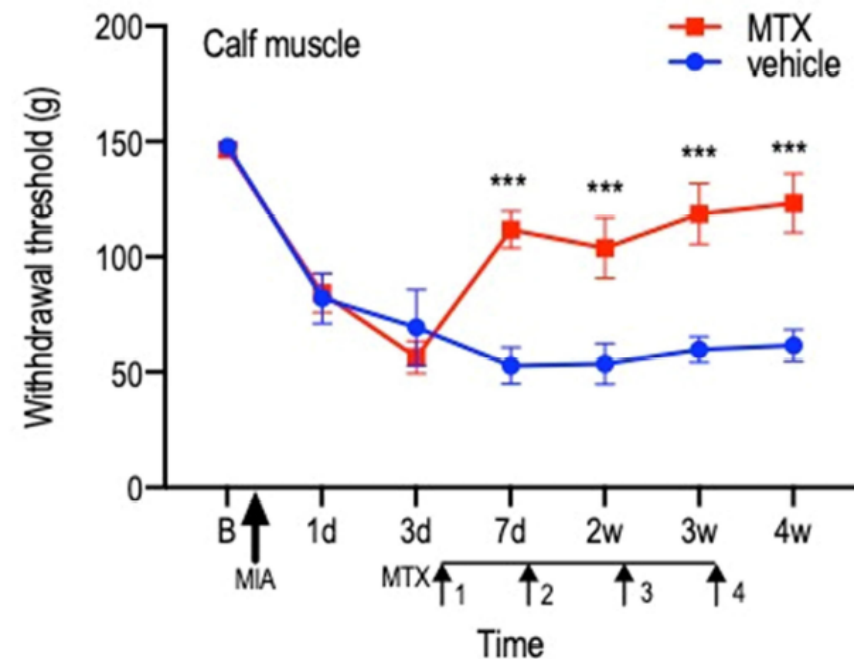
<内側膝関節裂隙>

<腓腹筋筋腹>

A

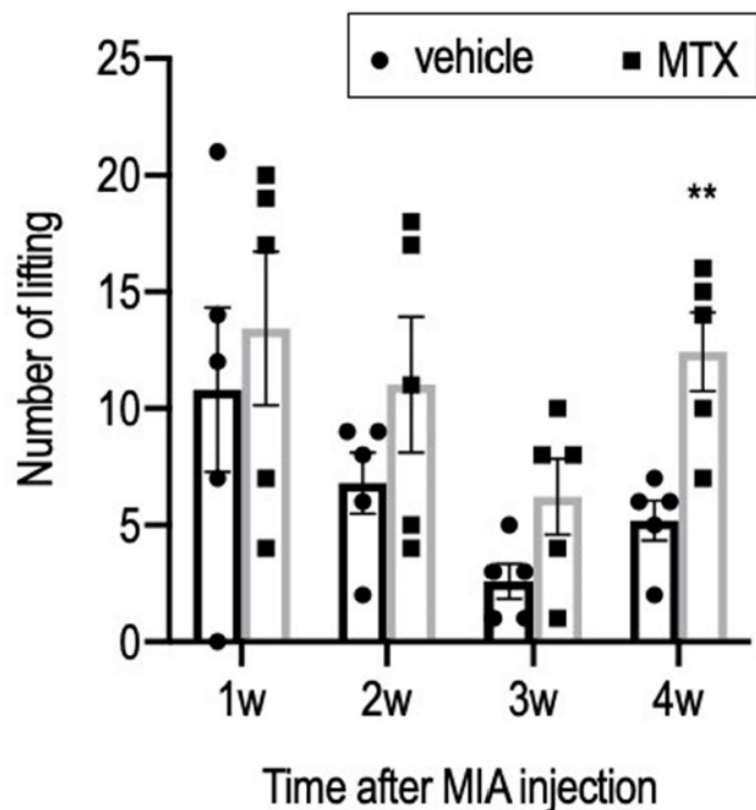


B



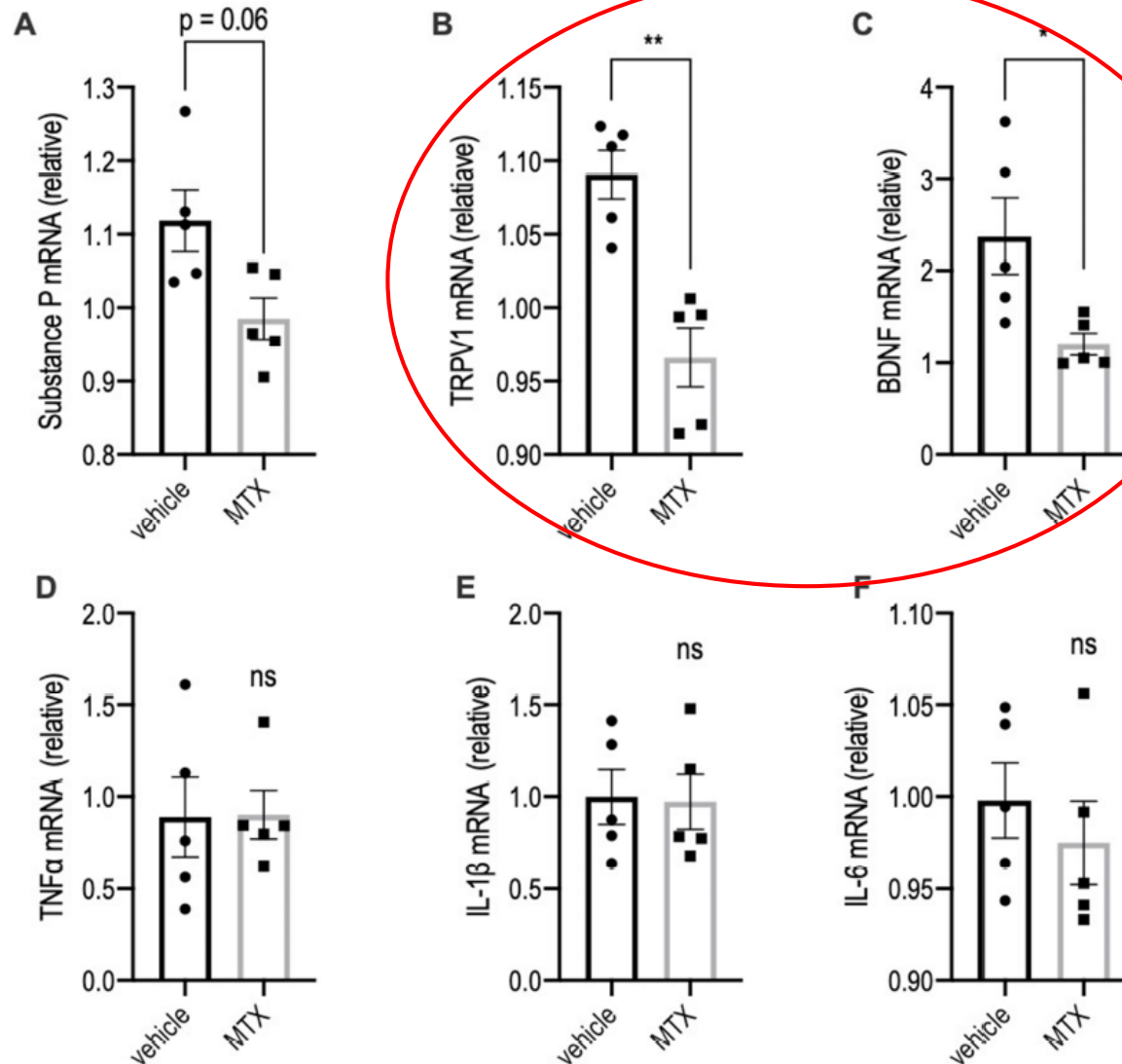
MIA投与後1週以降、内側膝関節裂隙および腓腹筋筋腹共にMTX群で有意に反射誘発閾値の上昇を認めた
(1週、2週、3週、4週いずれも $P < 0.05$)

結果④立ち上がり回数



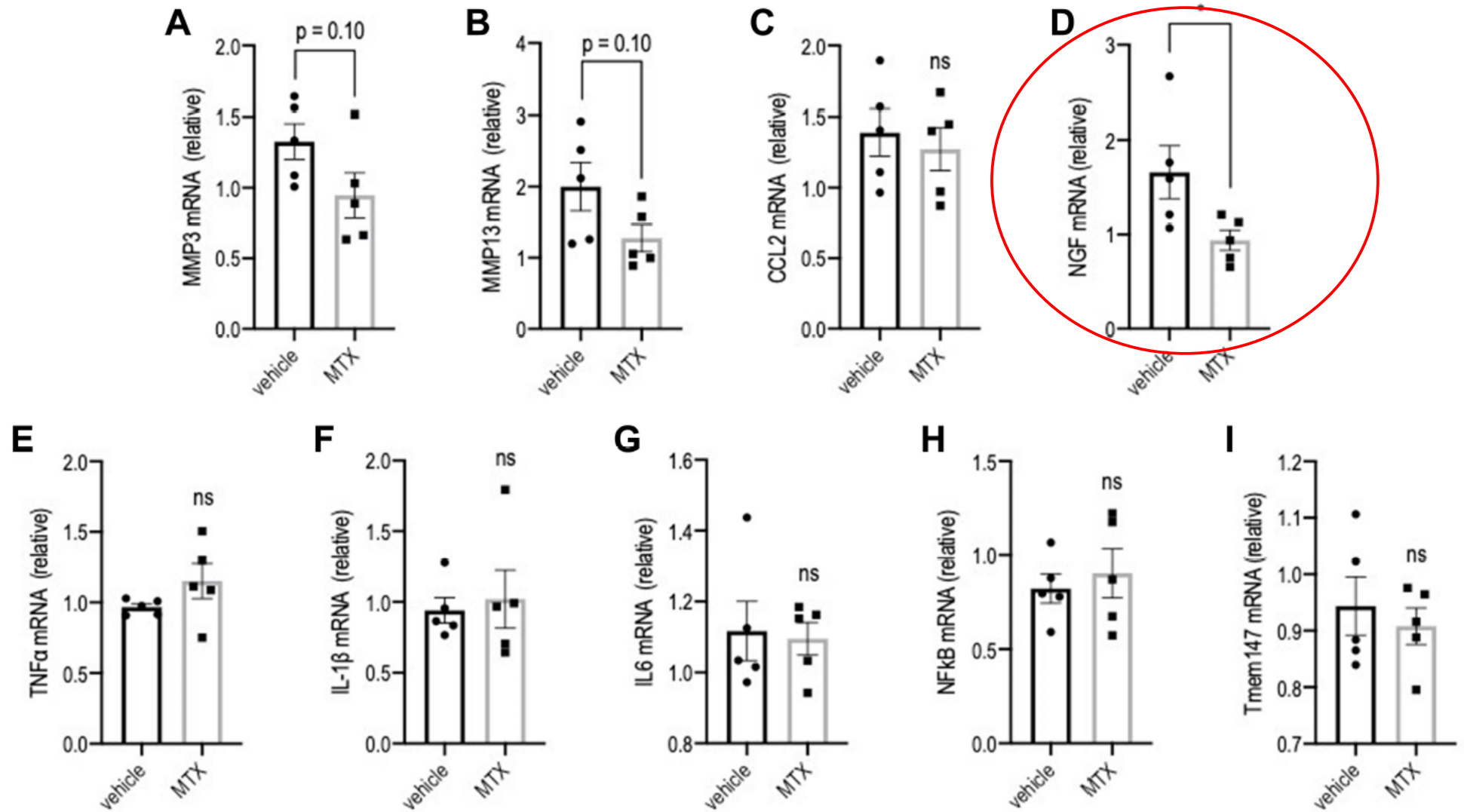
全体を通して立ち上がり回数に有意差は認めないが
4週時点でMTX群は立ち上がる回数が多かった

結果⑤ (Real time PCR L3-4 DRG)



MTX群では侵害受容に関するTRPV-1, 神経栄養因子BDNFが有意に抑制された
TNF- α , IL-1 β , IL-6といった炎症性マーカーは有意差を認めなかった

結果⑥ (Real time PCR 大腿軟骨)



NGFのみMTX群にて抑制された

炎症性マーカーやプロテアーゼに有意差は認めなかった

考察

MTXは葉酸代謝を阻害し、核酸・タンパク合成を抑制する免疫抑制剤
RAでは滑膜細胞増殖を抑制し症状を抑えるanchor drugとして使用

- OAではRAと同様に炎症性サイトカインの放出抑制が進行抑制や痛みの治療に繋がる

< Philip G C et al ; Nat Reumatol. 2019 >

- MTXは炎症反応を誘導するNF- κ Bの活性化を阻害する

< Spurlock CF et al ; Arthritis Reumatol. 2014 >



MTXがOAにおいても炎症を抑制し
OA進行を予防する可能性が期待



L3-4 DRGにおけるBDNF / 大腿軟骨におけるNGF 抑制

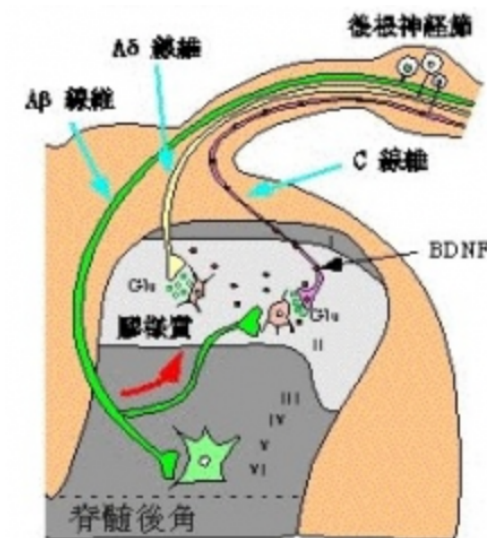
BDNF : brain-derived neurotrophic factor 脳由来神経栄養因子

- 神経栄養因子のひとつで、中枢神経に多く存在する
- 損傷を受けた末梢神経における神経障害性疼痛の発症に関与

NGF : nerve growth factor: 神経成長因子

- TrkA (tropomyosin receptor kinase A)を活性化し熱・機械刺激などによる侵害受容器の感作を起こす→痛みに関与する神経

BDNF/ NGF共に神経細胞の分化増殖・樹状突起伸長作用があり侵害受容反応を促進



L3-4 DRGにおけるBDNF / 大腿軟骨におけるNGF 抑制

- 末梢のBDNFはMIA誘発OAの**痛み遷延**に関与

< Gowler et al ; Pain 2020 >

- BDNFは脊髄内の興奮性のモジュレーターであり**中枢感作のメカニズム**に寄与している

< B J Kerr et al ; J. Neurosci. 1999 >

- NGFの全身投与はDRGにおける**BDNF増加**に関与

< Apfel SC et al ; Mol Cell Neurosci. 1996 >



DRGのBDNF抑制・末梢組織のNGF抑制は、MTXによる侵害受容経路の抑制を示唆



立ち上がり回数増加や膝関節・下腿痛覚閾値上昇の疼痛行動が改善

MTXの関節破壊予防効果について

- micro-CTや組織学的評価で**関節破壊予防傾向**はあるが有意差はなし
- 大腿軟骨における**MMP-3**や**MMP-13**の有意差もなし

→ MTXに関節破壊予防効果があるとは言えない

臨床におけるOAに対するMTXの報告

- 2019 OARSIガイドライン: MTXはOAに対して推奨されない
- MTX投与で中等度～高度膝OAの6ヶ月後の痛み・WOMACスコアが改善

< Enteshary-Moghaddam A et al ; Anesth Pain Med 2019 >

過去の良好な成績は疼痛が改善することが寄与している可能性

Limitation

- サンプルサイズが少ない(各群 N=5)
- MTXの投与方法が1パターンのみ
(容量や投与の頻度で結果が異なる可能性がある)
- 28日以降の慢性期における効果が不明
- MTXの中枢神経に関する影響が評価されていない

結語

- MTXはMIA誘発OAモデル動物に対して、関節破壊や軟骨変性の有意な進展抑制効果を示さなかったが、疼痛行動の改善を認めた
- DRGのBDNF発現抑制や大腿軟骨のNGF発現抑制は、動物の疼痛行動改善に関連する所見であると考えられた