

COX-2 阻害薬、メロキシカムの関節軟骨分解酵素産生抑制作用

— 変形性膝関節症患者を対象にした効果の解析 —

村松邦彦¹⁾、浅野和仁²⁾

1) 村松整形脳神経外科医院

2) 昭和大学保健医療学部

要 旨

COX2阻害薬、メロキシカム(MEL)の関節軟骨分解酵素産生に及ぼす効果を変形性膝関節症(膝OA)患者を対象に検討した。Grade IIIに分類される膝OA患者に1日1回10mgのメロキシカムを3ヶ月間経口投与した。初診時と薬剤投与開始3ヶ月目に膝関節から関節液を採取、同液中の細胞外マトリックス分解酵素(MMP)ならびに軟骨破壊産物 Catilage oligomeric matrix protein (COMP), neopeptide created by the cleavage of type II collagen (C2C), crosslinked C-telopeptide fragments of type II collagen (CTX-II)をELISA法によって測定した。膝OA患者に3ヶ月間MELを経口投与し、関節液のMMP-2, MMP-9, TIMP-1ならびにTIMP-2含有量を調べたところ、MMP-2ならびにMMP-9の有意な減少が観察されたものの、関節液のTIMP-1、TIMP-2含有量では薬剤投与前後で有意な差は認められなかった。次に、関節液中のCOMP、C2C、CTX-II含有量を調べたところ、薬剤投与によりこれら関節軟骨破壊物質の著大な減少が観察された。これらの結果は、MELの経口投与を受けた膝OA患者では罹患関節内においてMMP産生が抑制、さらにはコラーゲンの分解が阻止されることにより関節軟骨の破壊が妨げられ、これら一連の反応によって膝OA病態の進展が調節されている可能性があることを示唆しているであろう。

Key Words : メロキシカム、変形性膝関節症、細胞外マトリックス分解酵素、関節液、コラーゲン破壊、抑制

緒 言

変形性関節症(OA)は一般的に関節軟骨や関節構成成分の退行性変性と、それに続く軟骨・骨の破壊および関節組織の増殖性変化の結果発症する疾患と定義され、これらの病理・組織学的変化が膝関節で生じたものが膝OAである。膝OAの発生頻度は50歳を過ぎると急激に増加し、2008年度で痛みを伴う膝OA患者数は820万人、X線学的所見の認められるヒトは2,400万人におよび¹⁾、これら患者の約10%が

日常生活に支障をきたしているとされ²⁾、発症予防や治療において今後より重要性が増大する疾患であると考えられている。膝OAの臨床症状の特徴は徐々に進行する膝の痛み・変形・機能障害であるが、疼痛の訴えが最も多い³⁾。また、病態の進行につれ、膝関節軟骨の変性や骨の著しい変形により関節可動域制限は著明となり⁴⁾、日常生活動作の著しい悪化をきたす。

膝OAの治療では、疼痛の弱い発症初期の患者はグルコサミンやコンドロイチン等の健康補助食品の

摂取により症状の緩和を図っているとされている^{5, 6)}。また、鍼灸治療などの東洋医学的療法により治療を受けている患者も多いと考えられている⁷⁾。一方、これらの処置による膝 OA 病態の進展抑制が不十分な患者は医療機関を受診するものの、ここでも主に運動療法、電気療法や超音波療法が行われ^{6, 7)}、手術療法は膝関節の変形や関節破壊の著明な場合に限られている。膝 OA の医療機関における保存的療法には上述した理学的療法以外にも非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の経口投与やヒアルロン酸、ステロイドの関節内注射等の薬物療法が行われている⁸⁾ものの、その治療機序に関しては不明な点が多い。

OA 関節では関節軟骨表面の粗造化と軟骨細胞配列の乱れ、さらには軟骨層の亀裂、消失が観察される。また、軟骨の線維化や線維束形成などの変化や関節辺縁部の骨棘形成も認められ、この種の組織学的変化を組織リモデリングと呼び⁹⁾、本反応発現、進行には細胞外マトリックス分解酵素(MMP)が必須の役割を果たしていると考えられている^{10, 11)}。さらに、膝 OA 関節では上述した組織学的変化に加え、多核白血球の浸潤を伴った関節内水腫も観察される。関節内水腫の発現には滑膜下微小血管の透過性亢進が重要¹²⁾で、この透過性亢進にも MMP が重要な役割を果たしている¹⁰⁾。このような観点から膝 OA の発症や増悪化に及ぼす MMP の役割を解析するための検討がいくつか行われ、膝 OA の病態進展に伴って血清¹³⁾や関節液中¹⁴⁾の MMP 濃度が上昇することが報告されている。また、著者らは膝 OA の薬物療法で繁用されているメロキシカム(MEL)を対象に膝 OA 関節由来線維芽細胞の MMP 産生に及ぼす効果を検討し、本剤が臨床用量で炎症性刺激による当該細胞からの MMP 産生を抑制することを観察、前記の報告と併せ、NSAIDs の治療機序の一つとして薬剤の MMP 産生抑制が関連している可能性があることを報告した^{15, 16)}。しかしながら、NSAIDs 投与患者体内における MMP 産生に及ぼす薬剤の効果については不明な点が多い。そこで今回、MEL を投与した膝 OA 患者から関節液を採取し、MMP 含有量の変動を観察するとともに、膝 OA 関節で認められる組織学的変化の発現検索に重要であると考えられている関節コラーゲン破壊産物、いわゆる関節マーカーの検出を試みたのでその

結果を報告する。

方 法

対 象

本研究の対象者は2007年8月から2008年6月までの間に関節の腫脹、疼痛を主訴に村松整形外科医院を受診した患者で、腰野の方法¹⁷⁾の方法により Grade III に分類される膝 OA 患者12名であった。患者の内訳は女性7名(58歳~79歳、平均70.5歳)、男性5名(66歳~85歳、平均72歳)であった。実験に用いた関節液は昭和大学医の倫理委員会において承認された内容を口頭と文書で説明、理解が得られ、書面による承諾を得られた症例のみから採取したものである。

薬剤の投与期間と関節液の採取

本研究で治療に用いた薬剤は MEL で、その投与期間は初診後3ヶ月間であった。

MMP ならびに TIMP の測定

採集後-80℃で保存してあった関節液の matrix metalloproteinase (MMP) ならびに tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 含有量を市販の ELISA キット(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)を用いて測定した。測定の対象とした MMP ならびに TIMP の種類は MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2で、それぞれの測定限界は 0.37ng/ml、0.6ng/ml、51.0ng/ml、3.0ng/ml であった。また、同時に関節液の蛋白量を蛋白量測定試薬(Biorad Protein Assay Reagent; Biorad, Hercules, CA, USA)を用いて測定し、MMP, TIMP 含有量を蛋白質 1 mg に換算した。

関節組織破壊産物の測定

関節液に含まれる関節組織破壊産物を市販の ELISA キットを用いて測定、蛋白量1 mg 当りに換算した。本研究で対象とした関節破壊産物は Catilage oligomeric matrix protein (COMP), neopeptide created by the cleavage of type II collagen (C2C), crosslinked C-telopeptide fragments of type II collagen (CTX-II)で、測定限界はそれぞれ10 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml であった。

炎症性サイトカインの測定

関節液の炎症性サイトカインを市販のヒトELISAキット(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)を用いて測定、蛋白量1 mg 当たり換算した。本実験で測定したサイトカインはIL-1 β , TNF- α で、測定限界はそれぞれ1.0 pg/ml ならびに1.6 pg/ml であった。

統計学的検討

得られた値の有意差検定を one-way ANOVA によって行い、危険率0.05%以下をもって有意と判定した。

結 果

MEL 投与による関節液 MMP 含有量の変動

膝 OA 患者に3ヶ月間 MEL を経口投与し、関節液の MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ならびに TIMP-2 含有量を調べた。図1に示したように薬剤投与前に平均90.23ng/mg protein であった MMP-2 含有量は薬剤投与後には平均67.26ng/mg protein と統計学的に有意に減少した。また、関節液の MMP-9 含有量も上記と同様に3か月の MEL 投与により有意に減少した(投与前平均87.76ng/mg protein、投与後平均35.87ng/mg protein)。一方、関節液の TIMP-1、TIMP-2 含有量は薬剤投与前後で有意な差は観察されなかった。次に、MMP-2 と TIMP-2 ならびに MMP-9 と TIMP-1 の比率を調べたところ、MMP-9 と TIMP-1 の比率が MEL 投与により統計学的に有意に減少していた。

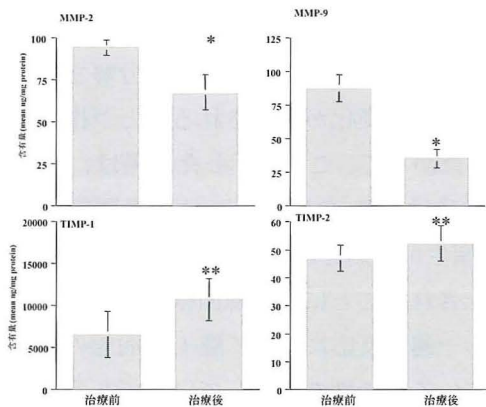


図1. メロキシカム投与による変形性膝関節液の細胞外マトリックス分解酵素含有量の減少

MMP-2, matrix metalloproteinase-2; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *, 治療前との間に有意差あり; **, 治療前との間に有意差なし。

MEL 投与による関節破壊産物の変動

膝 OA 患者に3ヶ月間 MEL を経口投与し、関節液の COMP, C2C, CTX-II 含有量を調べた。図3に示したように、薬剤投与前に平均74.2ng/mg protein であった COMP 含有量は3か月の薬剤投与によって平均39.3ng/mg protein と有意に減少した。C2C、CTX-II 含有量もこれとほぼ同様であった。すなわち、これら両分解産物の治療前関節液含有量はそれぞれ190.9 \pm 26.2ng/mg protein, 691.6 \pm 118.5ng/mg protein、で3か月の薬剤投与後には15.9 \pm 11.3ng/mg protein、258.0 \pm 71.9ng/mg protein と有意に減少した(図3)。

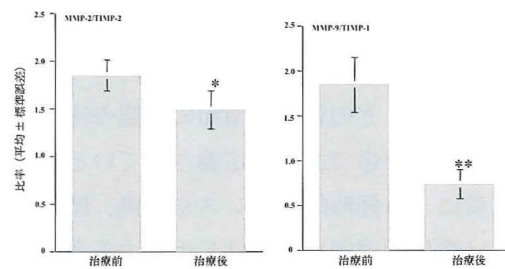


図2. 変形性膝関節液中の MMP と TIMP の比率
*, 治療前との間に有意差なし; **, 治療前との間に有意差あり。

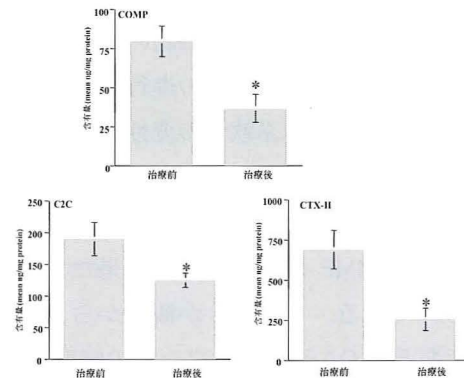


図3. メロキシカム投与による変形性膝関節液中のコラーゲン分解産物の減少
*, 治療前との間に有意差あり。

COMP, cartilage oligomeric matrix protein; C2C, neopeptide created by the cleavage of type II collagen; CTX-II, crosslinked C-telopeptide fragments of type II collagen.

MEL 投与による関節液の炎症性サイトカイン含有量の変動

OA 患者に3ヶ月間 MEL を経口投与し、関節液の IL-1 β ならびに TNF- α 含有量を調べた。図4に示したように、IL-1 β ならびに TNF- α とも薬剤投与の影響を受けず、薬剤投与前後でそれらサイトカイン

ン含有量に有意な差は認められなかった。

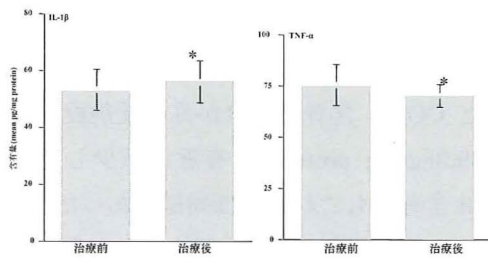


図4. メロキシカム投与による変形性膝関節液の炎症性サイトカイン含有量の変動

*.治療前との間に有意差なし.

考 察

OA は関節を構成する組織に退行性ならびに増殖性変化が起き、その結果、関節の形態や機能に変化が認められる疾患であると定義されている。本症は加重負荷による経時的ストレスや外傷、肥満、加齢さらには遺伝的素因などをはじめとする多因子要素が関与して発症する関節疾患である。また、関節部における生化学的さらには免疫学的異常も本症発現の重要な因子であることが推察されている^{18, 19)}。一方、OA 患者関節では軟骨細胞の肥厚や異常増殖が認められるとともに、病態の進行に伴って軟骨下層から石灰化層におよぶ軟骨の変性やコラーゲン配列様式の変化等に至ることが報告されている^{17, 20)}。この種の組織学的変化を組織リモデリングと呼び、その発生には MMP が必須の役割を果たしていることが知られている。このようか観点から、関節疾患の代表である膝 OA や関節リウマチの病態形成と MMP の関連性を検討する解析がいくつか行われ、これら疾患の発症・増悪化には MMP が重要な役割を果たしていることが報告され、MMP 阻害剤(inhibitor)がこれら関節疾患の治療薬として期待されている。

膝 OA の薬物療法では MEL をはじめとした NSAIDs の経口投与やヒアルロン酸、ステロイドの関節内投与が行われている^{21, 22)}。そこで今回、膝 OA 薬物療法に用いられている NSAIDs から MEL を選択、MEL 投与患者関節液中の MMP 含有量ならびに関節マーカー濃度を測定し NSAIDs の関節リモデリングに及ぼす効果を検討した。まず、MEL 投与後3ヶ月目に採取した関節液と投与前のそれにおける

MMP 含有量を調べたところ、MMP-2ならびに MMP-9含有量が MEL 投与によって有意に減少した。一方、生体内における MMP の活性は同時に産生される TIMP によって調節されている²³⁾。そこで、MEL 投与患者から採取した関節液の TIMP 含有量を調べたところ、関節液の TIMP-1、TIMP-2含有量は両者ともに治療の影響を全く受けなかった。

正常な膝関節に力学的ストレスが負荷されるとコラーゲン線維から構成されている軟骨が収縮、組織内に含有されている水分を放出することにより力の分散を図っているものの、膝 OA 患者では発症初期であっても関節軟骨のコラーゲン線維の変性が起きていることから、関節に加わる力の分散が不十分で、関節への繰り返しの強い力学的負荷によりコラーゲン線維の断裂や変性がより進行、その結果 OA 病態の増悪化が起きるとされている¹³⁾。また、このストレスが滑膜細胞や軟骨細胞からの MMP-2や MMP-9、さらにはアグリカナーゼ等の産生を誘発することも報告されている²⁴⁾。これらの報告から、膝 OA の進展と MMP の関連性については、関節に加わった力学的ストレスによりコラーゲン線維の断裂や変性が生じるとともに、滑膜細胞や軟骨細胞から産生されたアグリカナーゼがコラーゲン線維の周囲を覆う軟骨基質の成分であるプロテオグリカンを分解、その結果、より多くのコラーゲン線維が露出し、コラーゲンの破壊されやすい環境が作られる。その後、関節内で行われたコラーゲン鎖の特異的分解酵素である MMP-2や MMP-9によってコラーゲンが修復に長時間を必要とする小さな分子に分解され、関節軟骨の不可逆的变化が誘発されることが推察されている。したがって、ここに示した結果は、MEL の経口投与を受けた膝 OA 患者では罹患関節内において MMP 産生が抑制され、その結果、コラーゲンの分解が阻止されることにより関節軟骨の破壊が妨げられ、これら一連の反応によって膝 OA 病態の進展が調節されている可能性を示唆しているであろう。

コラーゲンは triple helix を基本構造とする安定な分子で、MMP はこの安定な分子を triple helix の 3 : 1 の部位で特異的に切断する。おおくの MMP は proenzyme の状態で細胞外に分泌され、MMP-3やその他の蛋白分解酵素によって活性化される。また、

MMP には上述したようにその阻害作用を示す物質である TIMP が組織内には存在するため²⁵⁾、実際の酵素活性を知るためには MMP 自体の測定のみならず、特異的分解産物を測定する方法が非常に有効であるとされている²⁶⁾。そこで次に、コラーゲンの破壊産物である COMP, C2C さらには CTX-II を測定することにより MEL の関節軟骨破壊抑制作用について調べた。その結果、MEL 投与患者関節液内の COMP, C2C, CTX-II 含有量は、投与前と比較し、有意に減少していることが判明した。このことは、MEL 投与により、関節内におけるコラーゲンの破壊が抑制されていることを明示するとともに、この破壊抑制が OA 病態進行阻止と密接に関連していることを示唆しているであろう。

MMP の産生は上述した力学的負荷によるのみならず各種炎症性サイトカイン刺激によっても増加するとされている。そこで、上述した MEL の MMP 産生抑制機序を関節液内の炎症性サイトカイン濃度を測定することによって検討したところ、関節液内の IL-1 β と TNF- α 濃度は MEL 投与によってみるべき影響を受けず、両サイトカイン濃度には MEL 投与前後で有意な差は観察されなかった。このことは、経口投与された MEL が罹患関節に移行、直接、関節構成細胞の MMP 産生系に作用し、その産生を抑制している可能性を示唆している。

膝 OA はその病態の進行状況によって Grade 0 から Grade VI に分類される¹⁷⁾。本研究では Grade III に分類される患者を対象に MEL の MMP 産生に及ぼす効果を *in vivo* において検討し、本薬剤が MMP 産生抑制作用を有することを明らかにしたものの、今後対象とする OA の Grade を変え、薬剤の MMP 産生に及ぼす効果を検討する必要があるであろう。

文 献

- 1) 吉村典子, 村木重之, 岡 敬之 他: 変形性関節症の基礎と臨床 変形性関節症の疫学研究. ROAD(Research on Osteoarthritis Against Disability) プロジェクト. 第52回日本リウマチ学会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム 抄録集52回・17回, 168, 2008.
- 2) 千田益生: 運動療法. 関節外科, 29: 1021-1027, 2010.
- 3) 斎藤知行: 変形性膝関節症の疼痛発生メカニズム. 関節外科, 21: 23-30, 2002.
- 4) 林 郁雄: 変形性膝関節症のリハビリテーション. リウマチ科, 1: 592-602, 1989.
- 5) 中村 洋: 変形性関節症に対するグルコサミン, コンドロイチン硫酸. 関節外科, 21: 81-87, 2002.
- 6) 長瀬千秋: 変形性膝関節症に対する東洋医学的治療. 関節外科, 21: 77-80, 2002.
- 7) 椎野泰明: 運動療法. 関節外科, 21: 70-76, 2002.
- 8) 村澤 章: 装具療法. 関節外科, 21: 59-62, 2002.
- 9) 鳥巢岳彦: 変形性膝関節症に対する関節内注入療法. リウマチ科, 1: 609-617, 1989.
- 10) Neidhart M, Hauser N, Paulsson M: Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. Br J Rheum, 36: 1151-1160, 1997.
- 11) Hashimoto N.: Effect of erythromycin on matrix metalloproteinase-9 and cell migration. J Lab Clin Med, 137: 176-183, 2000.
- 12) Lechapt-Zalcman E, Escudier E.: Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in nasal polyps. J Pathol, 193: 233-241, 2000.
- 13) 西田圭一郎: OA の病態と発展—形態的面的から— 関節外科, 22: 26-32, 2006.
- 14) Takahashi M, et al.: Relationship between radiographic grading of osteoarthritis and the biochemical markers for arthritis in knee osteoarthritis. Arthritis Research Therapy, 6: 209-212, 2003.
- 15) 浅野和仁, 江黒 剛, 田中宏典 他: 変形性膝関節症患者関節液からのマトリックス蛋白分解酵素の検出. 関節外科, 25: 1209-1214, 2006.
- 16) 浅野和仁, 大下優介, 酒井美佐子 他: 変形性膝関節症由来関節線維芽細胞からのマトリックス分解酵素産生に及ぼすメロキシカムの効果. 薬理と治療, 32: 273-280, 2004.
- 17) Asano K, Sakai M, Matsuda T, et al.: Suppression

- of matrix metalloproteinase production from synovial fibroblasts by meloxicam *in vitro*. J Pharm Pharmacol, 58: 359-366, 2006.
- 18) 腰野富久：膝蓋大腿関節障害の病態と治療. 日本リウマチ関節外科会誌, 6 : 173-180, 1987.
- 19) 江黒 剛, 浅野和仁, 久光 正 他：変形性膝関節症患者関節液からのNOの検出. 昭和医誌, 64 : 1-6, 2004.
- 20) 小磯宗弘, 佐藤和恵, 浅野和仁 他：変形性膝関節症患者関節液からのフリーラジカルの検出. 関節外科, 19 : 104-108, 2000.
- 21) 西田圭一郎, 那須義久, 藤原一夫 他：OAの病態と発展—形態的面から— . 関節外科, 22 : 26-32, 2006
- 22) 佐野 統：非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs):特にCOX-2阻害剤. 関節外科, 21 : 33-46, 2002
- 23) 宗圓 聡：ヒアルロン酸関節内注射. 関節外科, 21 : 47-51, 2002
- 24) Sadowski T, Steinmeyer J.: Effects of non-steroidal and anti-inflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by bovine articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage, 9: 407-415, 2001.
- 25) Okada Y, Takeuchi N, Tomita K, et al.: Immunolocalization of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 48: 645-653, 1989.
- 26) 小嶋俊久, 石黒直樹：OAの診断 2) OAに対する biomaker の有用性—軟骨代謝マーカー：コラーゲン代謝を中心に— Osteoarthritis Update 1: 22-25, 2008.

Attenuating effect of a COX-2 inhibitor, meloxicam on the tissue remodeling observed in keen osteoarthritis *in vivo*.

Kunihiko MURAMATSU¹⁾, Kazuhito ASANO²⁾

¹⁾ Muramatsu Clinic

²⁾ Division of Physiology, School of Nursing and Rehabilitation Sciences, Showa University

Abstract

The present study was undertaken to examine the influence of COX-2 inhibitor, meloxicam on tissue remodeling in keen osteoarthritis through evaluation of levels of both MMP and cartilage degradation products in synovial fluids by ELISA. Oral administration of meloxicam caused the suppression of MMP appearance in synovial fluids, when the agent was administered for 3 months. Treatment of patients with keen osteoarthritis with meloxicam for 3 months also suppressed the levels of cartilage degradation products, COMP, C2C and CTX-II. These results strongly suggest that meloxicam prevents the development of keen osteoarthritis through the inhibition of harmful tissue remodeling in keen.

Key Words: osteoarthritis, matrix metalloproteinase, meloxicam, COMP, C2C, CPII, *in vivo*

