

平成 30 年 9 月 14 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10498

研究課題名(和文)半月板損傷におけるヘパラン硫酸およびその酵素の働きと新規治療法の開発

研究課題名(英文) Role of Heparan Sulfate 6-O endosulfatase and establishment of the novel meniscal scaffold

研究代表者

大槻 周平 (Otsuki, Shuhei)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：20589840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヘパラン硫酸脱硫酸酵素(Sulf)が軟骨や椎間板での恒常性維持の役割について検討してきたが、半月板変性および修復に関わる役割についてはわかっていない。今回、半月板におけるSulfの発現を観察し、半月板修復のメカニズムについて検討を深め、新規治療法の開発を行うことを目的とした。その結果、Sulf-1は半月板表層に発現し、Sulf-1 KOでは半月板内のII型collagenの発現が低下していた。この変化にはTGF/Smadのシグナル経路が関与していることがわかった。今後は新規半月板scaffoldの開発とSulf-1を効果的に作用させる検討をすすめていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Meniscal injury is treated with suture or partial meniscectomy in Japan, however irreparable injury has still to be investigated for the novel surgical technique because it goes osteoarthritic changes dramatically. Heparansulfate 6-O endosulfatases (Sulfs) had reported to be the essential factor for cartilage homeostasis and therapeutic potential for OA. In this research, We investigated the role of Sulf-1 in meniscus by using KO mice and its mechanism. As the result, Sulf-1 was associated with the meniscus homeostasis and type II collagen expression was reduced in Sulf-1 KO menisci. TGF/Smad cell signaling was accelerated with Sulf-1 supplementation, which overexpressed type II collagen. As the next step, novel meniscus therapy by using scaffold has been developed. We Scaffold involving Sulf-1 function may have a therapeutic potential in the near future.

研究分野：膝、半月板、軟骨

キーワード：半月板 ヘパラン硫酸 シート状scaffold

## 1. 研究開始当初の背景

半月板は膝関節の大腿骨と脛骨の間にある三日月型をした軟骨様の板で内側・外側にそれぞれがあり、クッションとスタビライザーの役割をはたしている。この半月板が損傷すると、膝の曲げ伸ばしの際に痛みやひっかかりを感じ、ひどい場合には、急に膝が動かなくなる“ロッキング”という状態になる。持続すれば、関節水腫を伴った関節炎が増悪し、QOLを低下させる。

半月板損傷で疼痛やひっかかりなどの愁訴が持続する場合、手術を検討する。日本における半月板治療は縫合か切除であるが、縫合しても約3割は再断裂し、結局は切除しなければならず、切除すると将来的に変形性膝関節症(Osteoarthritis:OA)になる可能性が高く、症状が重症化すると人工膝関節全置換術が必要となる。このように半月板の新規治療は喫緊の問題であるが、修復のメカニズムから新規治療の確立まで課題の多い領域である。我々は、以前から注目している、ヘパラン硫酸脱硫酸酵素(Sulf)が軟骨や椎間板での恒常性維持の役割について検討してきたが、半月板変性および修復に関わる役割についてはわかっていない。また、新規治療への足がかりが必要と考えていた。

## 2. 研究の目的

本研究では半月板自己修復機能の一端を明らかにするために、これまで軟骨や椎間板で注目してきたヘパラン硫酸脱硫酸酵素(Sulf)に着目し、半月板におけるSulfの発現を観察した。その後、半月板修復のメカニズムについて検討を深め、新規治療法の開発を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

半月板の加齢変化とSulfの発現を検討する為に、野生株マウス(WT)の膝関節を

24カ月齢まで採取し、Sulf-1,-2の発現を免疫染色で検討した。次に、半月板の恒常性維持、修復に重要な役割を果たすII型collagenとSulfの関係について、WTとSulf-1 KOマウスをII型collagenで免疫染色で発現を比較検討した。

マウスの結果をもとに、細胞レベルでの検討を進めた。軟骨細胞分化株であるATDC5を用いてSulf-1がcollagen発現に直接関わるかをimmunocytochemistry, real time PCR,そしてそのシグナル経路をTGFβ/Smadに着目してWestern blottingを行なった。

## 4. 研究成果

### マウスを用いた検討

まず半月板におけるSulfの発現について野生株のマウス1、6、12、24カ月齢までの膝関節組織を採取してSulf-1,-2の発現を観察した。その結果Sulfの発現は1カ月齢では半月板全体および関節包滑膜に多く発現していたが、加齢とともに半月板の表層に限局していく傾向にあった。この傾向は特にSulf-1の方が多く見られた。半月板機能および恒常性維持の為に表層細胞および組織が大事なことからSulf-1は半月板の恒常性維持に重要な役割を担っていることが示唆された(図1)。

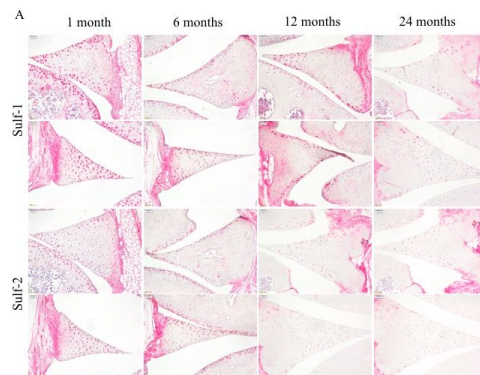


図1: マウス半月板におけるSulf-1,-2の発現

次に、半月板の主な成分で、修復過程では

多く発現する II 型 collagen の発現を WT と Sulf-1 KO マウスを用いて比較検討を行なった。その結果、WT では 6 ヶ月齢に II 型 collagen は高発現が見られたが、Sulf-1 KO マウスでは WT に比べて collagen の発現が優位に低下していた。この事からも Sulf-1 は半月板恒常性維持には重要な役割を担うと示唆された (図 2)。

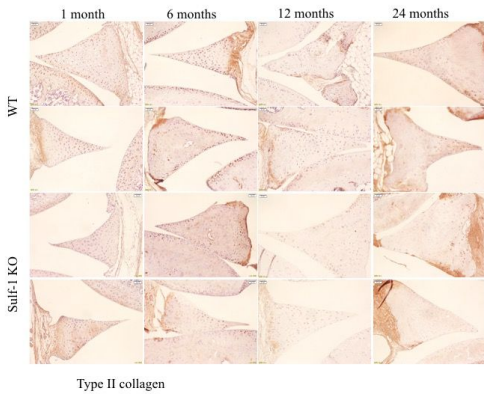


図 2: WT と Sulf-1 KO マウス半月板における II 型 collagen の発現。

### in vitro の検討

Sulf-1 が II 型 collagen の発現に直接関わっているかを検討するためにマウスの軟骨細胞株である ATDC5 を用いて検討した。培養中に Sulf-1 (100ng/ml) 添加培地と非添加培地で 2 週間細胞培養を行い、細胞染色 (immunocytochemistry) を行なった。その結果、Sulf-1 添加群のほう II 型 collagen の発現が優位に高く、real time PCR においても同様の結果が得られた。このことは軟骨細胞の成熟には Sulf-1 が優位に関わることが示唆され、Sulf-1 は半月板 inner 細胞である繊維軟骨細胞の活性化を促進する可能性が考えられた (図 3)。

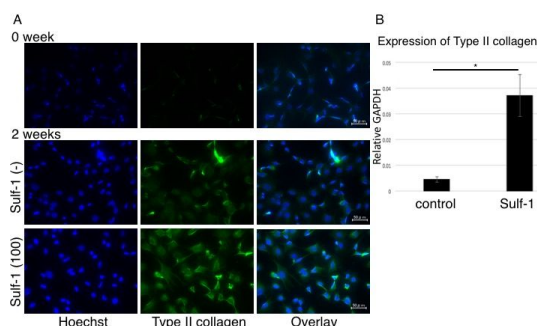


図 3: Sulf-1 の添加が II 型コラーゲン発現に及ぼす影響。(A) II 型 collagen の発現は Sulf-1 添加群のほうが高い。(B) Realtime PCR。II 型 collagen は Sulf-1 添加群の方が DNA レベルでも亢進する (\*:p<0.05)。

最後に II 型 collagen の発現に関与するシグナル伝達として TGFβ/Smad に着目した。Sulf-1 添加の有無で TGFβ 刺激後にリン酸化 Smad そして II 型コラーゲンの発現を western blotting を用いて検討した。その結果、Sulf-1 + TGFβ 刺激は Smad2/3 リン酸化を優位に更新し、72 時間後には II 型 collagen の発現も促進することがわかった。これらの結果は Sulf-1 の添加が半月板修復のための II 型 collagen 発現を亢進させ、新規治療に寄与することを期待させる結果となった (図 4)。

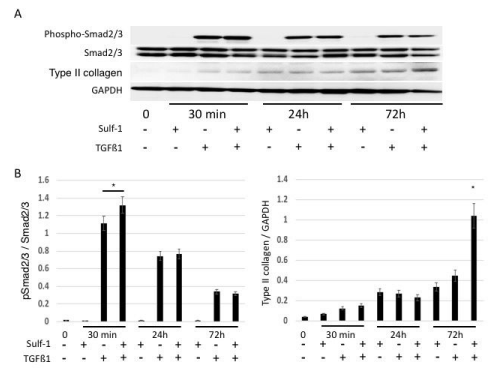


図 4: TGFβ1/Smad2/3 関連 cell signaling は Sulf-1 の刺激により活性化される。(A) Sulf-1 (100ng/ml) 刺激後に TGFβ1 (10ng/ml) を添加し、その後 72 時間までの phospho-Smad2/3, Smad2/3 そして II 型 collagen の発現 (\*:p<0.05)。

### 半月板損傷に対する新規治療と臨床応用の試み半月板損傷

半月板は膝関節内における衝撃吸収、安定性などに寄与しており、一度損傷すれば、結構の乏しい組織でもあり、細胞のみ活性化しても修復は困難な組織であると考えられる。そこで、半月板修復促進のためにシート状 scaffold の開発に取り組んでい

る。シート状 scaffold を用いて半月板治療についてはPiontekらがcollagenシートを用いて 2015 年にその有用性を報告しているが、シートの性状や修復機序を解明することにより半月板治療の改善が期待できると考えられる。我々は、半月板表層の保護ならびに細胞遊走を促進することが大事と考えて、現在も検討を進めている。うさぎの半月板に図 5 の様な水平断裂モデルを作成し、その断裂部をシートにてラッピングし、損傷部の治癒過程を 16 週まで検討している。その結果 wrapping 群の方が半月板実質部の修復が促進されたことが結果としてえられており、今後報告の予定である。将来的には半月板修復および恒常性維持のために Sulf-1 含有のシート状 scaffold などを検討することで、より早期に半月板損傷が治癒し、そして関節水腫などの合併症も引き起こさない様な evidence に基づいた新規治療の確立を継続して行なっていく予定である。

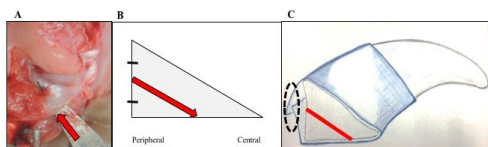


Fig 1. Image of the meniscus & scheme of surgical events  
 (A) The Horizontal tear was performed from the vascular zone outside the meniscus to the avascular zone at the tibial surface of the meniscus. B: The height outside the meniscus was the half that of peripheral meniscus wall.  
 C: The Horizontal tear was wrapped with SEAMDURA® and sutured with the capsule outside the meniscus.

図 5：うさぎの半月板水平断裂モデルの確立と wrapping 治療

## 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. Kosuke Nakagawa, Shuhei Otsuki et al. Histological analysis of the wrapping treatment for meniscal horizontal tears in rabbit model. Orthopaedic Research Society.2018.3. New Orleans.
2. 大槻周平. 新規半月板 scaffold の開発と再生医療の可能性ーブタ膝を用いた検討ー.2018.3.日本再生医療学会.横浜.
3. Shuhei Otsuki. Potential of Meniscus Regeneration with Novel Meniscal Scaffold made by Polyglycolic Acid.2018.4. ICRS. Macau
4. Shuhei Otsuki. Potential of Meniscus Regeneration with Novel Meniscal Scaffold made by Polyglycolic Acid. 2018.6. APKASS. Sydney

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

大槻周平 (OTSUKI Shuhei)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：20589840

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

中川浩輔(NAKAGAWA Kosuke)

大阪医科大学・医学研究科・大学院生