

令和 3 年 5 月 2 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09024

研究課題名(和文) ヒアルロン酸の変形性関節症に関する分子生物学的解析

研究課題名(英文) The role of hyaluronic acid in osteoarthritis

研究代表者

松本 和 (Matsumoto, Kazu)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40422711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒアルロン酸(HA)は関節軟骨の主要構成成分の一つで、関節機能の維持、恒常に重要な役割を果たしている。HA合成酵素であるHAS2は、軟骨におけるHA合成の中心的な役割を担う分子として知られる。変形性関節症(Osteoarthritis, OA)ではHAの減少や低分子化が認められ、HAがOAの発症と密接に関わっていることは間違いない。

本研究では、その知見を踏まえ、ヒトのOA発症に及ぼすHAの役割について分子生物学的観点からメカニズムを解明しようとするものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒアルロン酸(HA)は関節軟骨の主要構成成分の一つで、発生時に関節軟骨特異的にHas2をノックアウトすると、関節形成が遅延する。このことより、HAは正常な関節軟骨の発生に必須の分子であると考えられる。また、HAはOAの治療薬として使用されるが、実際、OAの関節軟骨や関節液ではHAの低分子化が生じており、また、HA関節内投与において、関節軟骨の変性を遅らせることが可能なため、HAはOA発症や進行においても重要な役割を演じていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hyaluronic acid (HA) is one of the major component in joint cartilage. HA plays an important role, and maintain the joint function. HA synthase-2 (HAS2) is as known that it plays a central role of HA synthesis in joint cartilage. Osteoarthritis (OA) characterized the loss of HA and molecular weight loss in cartilage matrix, and these facts should affect the OA progression.

Therefore, we examined the role of HA in OA using molecular biological technique.

研究分野：整形外科

キーワード：ヒアルロン酸 変形性関節症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軟骨は細胞成分に乏しく、その90%は細胞外マトリックスによって構成される。細胞外マトリックスは二大構成成分であるコラーゲン繊維と、プロテオグリカン会合体で構成され、後者の主要構成成分の一つがヒアルロン酸である。ヒアルロン酸は、プロテオグリカンやリンク蛋白と結合し、関節軟骨の発達や機能維持に極めて重要な働きを演じている。

ヒアルロン酸合成酵素であるHAS2は、軟骨におけるヒアルロン酸合成の中心的な役割を担う分子として知られるが、関節表面のヒアルロン酸の役割はいまだ不明である。ヒアルロン酸は変形性関節症では減少し、分子量が低下することが知られており、これらの事実はヒアルロン酸の欠乏がOAの発症と密接に関わっている可能性を示唆している。

本研究は、その知見を踏まえ、ヒトのOA発症に及ぼすヒアルロン酸の役割について分子生物学的観点からメカニズムを解明しようとするものである。

2. 研究の目的

ヒアルロン酸 (Hyaluronic Acid, HA) は関節軟骨の主要構成成分の一つで、関節機能の維持、恒常に重要な役割を果たしている。変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) の治療にHAは関節注射として使用されているが、その効果については controversial である。これまでにHAの関節機能維持での役割について詳細に検討した報告は無い。申請者らは *Has2* flox/flox マウス (*Has2* cKO マウス) を所有しており、本研究ではヒアルロン酸がOAの発症に関与しうるか、またそのメカニズムについて検討を加える。この知見がヒトに適用できれば、ヒトのOAの機序解明と創薬に大きく貢献しうると思われる。そこで、本研究では、

1. *Has2* cKO マウスを使用してヒアルロン酸のOAへの関与を明らかにする。
2. ヒアルロン酸がどのようにOAへ関与するのか、そのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

Has2 コンディショナルノックアウトマウス (*Has2^{f/f}* マウス) を使用し、マウスラインの確立を目標とする。作製予定のラインは以下に示し、順次、解析実験を開始していく。

1. *Prg4-Cre* x *ROSA*, *Col2a1CreERT2* x *ROSA* マウスラインの確立。
2. *Has2^{f/f}* x *Prg4-Cre*, *Has2^{f/f}* x *Col2a1CreERT2* マウスラインの確立。

1. *Prg4-Cre* x *ROSA* マウスラインの確立と *Cre* 発現の検討.

Prg4 (Lubricin) は関節表面潤滑の重要な構成要素の一つで、*Prg4-Cre* マウスは *Prg4* Promoter 領域の 3kb を使用して作製された *Cre* マウスである。その発現はマウスでは関節形成の終了した E14.5 以降に認められる。本解析ではまず、*Prg4-Cre* x *ROSA* マウスラインを確立し、その発現パターンを確認する。

2. *Has2^{f/f}* x *Prg4-Cre* マウスラインの確立.

Has2^{f/f} マウスは当大学へ譲り受ける予定である。*Prg4* (Lubricin) は関節表面特異的に発現するため、*Has2^{f/f}* x *Prg4-Cre*, *Has2^{f/f}* x *Col2a1CreERT2* マウスラインを確立することで、軟骨および関節表面特異的なヒアルロン酸の役割を解析することが可能となる。

Cre 発現の検討.

Prg4 Cre, *Col2a1CreERT2* の発現を LacZ 染色にて確認する。関節は膝関節を中心に解

析する。Prg4 は E14.5 以降に発現することが知られているため、E14.5、E16.5、生後 0 日、4 週齢のマウスでその発現を確認する。

Has2^{fl/fl} x Prg4-Cre マウスラインの解析 .

まず本ラインでは自然発症型の OA を発症するかどうかを膝関節を中心に解析する。解析は生後 0 日、4 週齢、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月のマウスを使用して 組織染色、免疫学的組織染色、in situ hybridization (ISH)、エックス線学的解析を行う。

4 . 研究成果

今回の研究で使用した、*Prg4-Cre x ROSA* マウスでは、Prg4 は関節軟骨、肋軟骨での発現が認められた。しかし、成長軟骨では発言が認められないことより、関節軟骨特異的に発言していると考えられる。また、一部腱成分で発現が認められた (図 1 A-G)。

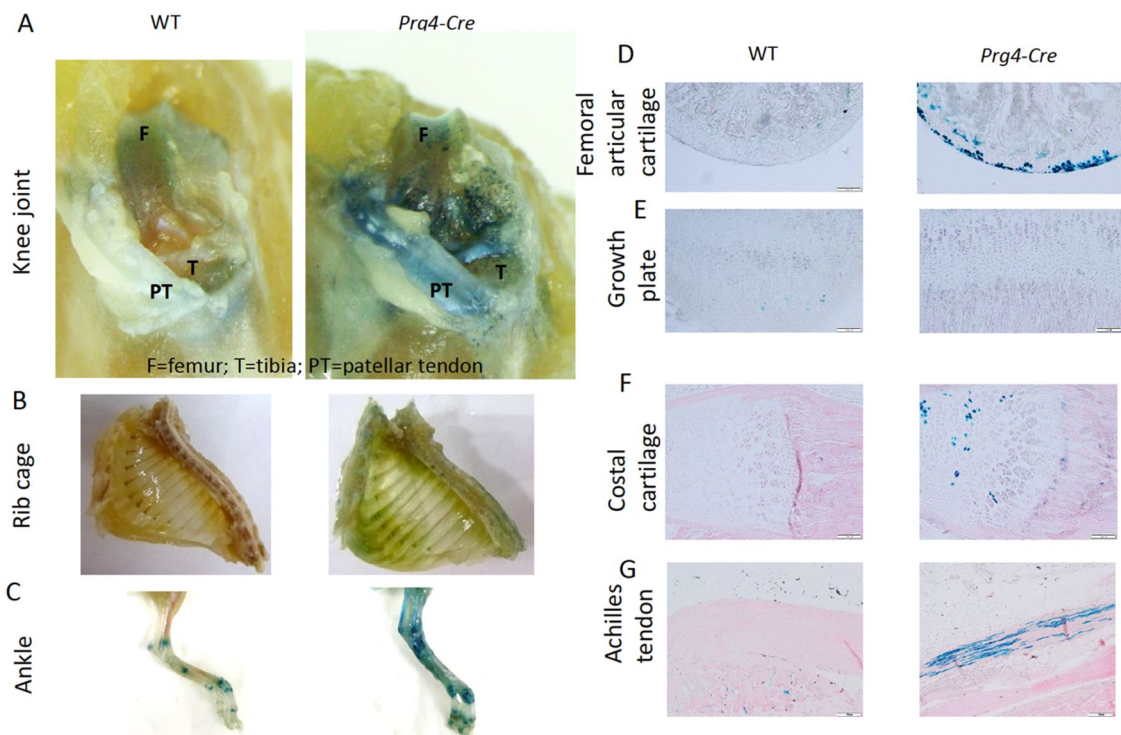


図 1 . Prg4-Cre の発現パターン .

Has2 を関節軟骨特異的にノックアウトすると関節形成が阻害される (図 2) ことから、関節軟骨において HA は必須の分子であると考えられる。

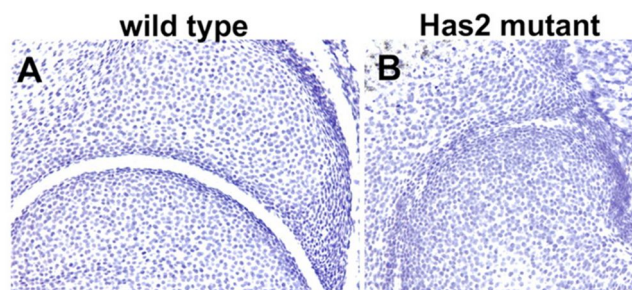


図 2 . E14.5 マウスにおける関節形成 . A: Wild type, B: Has2 ノックアウトマウス

現在、*Has2^{fl/fl} x Prg4-Cre* マウスラインにおいて、関節軟骨での HA の役割の詳細について検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 秋山 治彦 (Akiyama Haruhiko) (60402830) | 岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701) | |
| 研究分担者 | 小川 寛恭 (Ogawa Hiroyasu) (70464104) | 岐阜大学・大学院医学系研究科・特任助教 (13701) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |