

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380170

研究課題名（和文） 動物の関節疾患に伴う関節構造破壊に対するグリコサミノグリカンの構造安定効果

研究課題名（英文） Structural protective effects of glycosaminoglycans on articular distraction in joint diseases in animals

研究代表者

奥村 正裕 (OKUMURA MASAHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：80260397

研究成果の概要（和文）：

ヒトおよび動物の変形性関節症の症状改善薬として関節内投与ヒアルロン酸（HA）および多硫酸化ペントサン（PPS）が使用されている。外因性HAは、培養滑膜線維芽細胞および軟骨細胞において長鎖の内因性HAの産生を促進させる効果が示された。また、PPSは培養軟骨細胞内においてp38およびERKのリン酸化を抑制することでその下流のNF- $\kappa$ Bの核内移行およびMMPの産生を抑制することが示唆された。これらのメカニズムが、HAおよびPPSの臨床的な軟骨保護作用の発現の説明の一部になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Intra-articular hyaluronic acid (HA) and subcutaneous pentosan polysulfate sodium (PPS) have been used for the management of pain and inflammation of osteoarthritis (OA) in humans and animals. As the results of this study, it was indicated that exogenous HA could stimulate both synovial fibroblasts and chondrocytes to produce endogenous long chain HA which contribute stabilization of cellular environment of articular chondrocytes. It was also suggested that PPS could inhibit interleukin (IL)-1 $\beta$ -induced phosphorylation of p38 and extracellular signal-regulated kinase (ERK), then suppress nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and matrix metalloproteinase-3 production in cultured chondrocytes. on interleukin (IL)-1 $\beta$  stimulated chondrocytes. These data would translate the clinical efficacy of these molecules for clinical chondroprotective effects of HA and PPS in animals with OA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学

キーワード：関節疾患・グリコサミノグリカン

軟骨細胞・滑膜細胞

## 1. 研究開始当初の背景

犬の全飼育頭数の約20%程度がなんらか

の関節疾患を有していると考えられている (Johnston, 1997)。関節疾患は、その構造的、生体力学的あるいは解剖学的特性から、

その罹患関節の機能を決定的に改善させる治療法はなく、多くの場合、対症療法薬として非ステロイド性抗炎症薬が用いられている。

関節症/関節炎発症時には、滑膜における炎症性変化に関連して、関節構造、特に関節軟骨基質に傷害を受け、関節軟骨が本来有する生体力学的、生化学的特性を喪失し、関節機能が著しく低下する。一方、硝子軟骨である関節軟骨は、豊富な細胞外基質を少数の軟骨細胞で維持する特性から、一度傷害を受けると自立的な修復能力には極めて限界があり、その修復を促進する手法も確立されていない。

医学および獣医学臨床において、関節症/関節炎には関節軟骨構造分子あるいは関節液構成成分の投与により、症状の緩和が得られることが経験的に知られている。これは、関節症/関節炎によってダメージを受けた関節構造に対して、その構成分子あるいはその類似構造を有する物質を供給することで関節構造の修復・恒常性維持するために利用されることが期待されているからである。たとえば、硫酸あるいは塩酸グルコサミン、コンドロイチン硫酸などの経口投与、関節液の主要成分であるヒアルロン酸の関節内投与など、それぞれの症状緩和効果が臨床的な多中心的分析で確認されている。一方、理論的には、これらムコ多糖に分類される高分子がその投与経路において構造を維持した状態で吸収され、また、肝臓における代謝を経過して、本来の構造で利用される量は極めて限定的であることが容易に想像できる。すなわち、これらの物質が直接的あるいは間接的にどのようなメカニズムで、何に対してどのように効果を発揮しているかを明確に説明できる証拠は限られている。特に、動物の治療を担う獣医学臨床において、自然発症の関節症/関節炎発症時のこれら物質の効果発現についての情報はほとんどない。

## 2. 研究の目的

動物身体を構成する細胞の周りにはそこで必要な水分をしっかりと蓄え、組織をしなやかかつ堅強に保持するために、ムコ多糖による骨格構造が形成されている。それらのグリコサミノグリカンには、細胞への栄養輸送や代謝のシグナルとして生体の恒常性を維持させることが知られている。

本研究の目的は、関節炎発症時の軟骨異化（破壊）に対して、外因性のグリコサミノグリカンがいかにか代謝を調節するかを検討し、病態修飾薬としての効果の程度およびその発現機構を解明することである。外因性グリコサミノグリカンのうち、植物（ヨーロッパナ）から抽出され、動物（犬）

の関節疾患の症状改善薬として利用されている多硫酸ペントサン、また、関節内に投与され、関節症症状の改善のために使用されているヒアルロン酸について、その効果発現機構、特に関節軟骨細胞の炎症反応性への干渉作用、および関節内環境改善効果発現機構についてそれぞれ検討した。

## 3. 研究の方法

正常な馬の関節軟骨細胞、滑膜線維芽細胞、犬の関節軟骨細胞を分離した。軟骨細胞については、高密度単層培養を実施した。また、滑膜から分離した細胞は、滑膜線維芽細胞として培養した。

### (1) ヒアルロン酸の滑膜線維芽細胞に対する効果

使用した滑膜線維芽細胞は、関節鏡下手術時に採取し、上記方法で培養した。培養馬滑膜線維芽細胞に対して、培養液に低分子量（分子量 800K）および高分子量（6000K）のヒアルロン酸を添加し、その細胞の反応を検索した。細胞の反応は、細胞の生存性およびヒアルロン酸合成酵素（HAS）の3つのアイソタイプの産生反応をそれぞれ real time PCR 法で検討した。

### (2) ヒアルロン酸の軟骨細胞に対する効果

馬軟骨細胞は、関節疾患以外の理由で安楽殺された馬の関節から採取した軟骨から分離した。犬軟骨細胞は、Legg-Calve-Perthes病を発症し、切除された大腿骨頭から肉眼的に正常と判断された領域の軟骨から分離した。培養馬軟骨細胞および培養犬関節軟骨細胞は高密度単層で実施した。ヒアルロン酸の作用については、培養液に低分子量（分子量 800K）および高分子量（6000K）のヒアルロン酸を添加し、それぞれの軟骨細胞の反応を検索した。細胞の反応は、細胞の生存性およびヒアルロン酸合成酵素（HAS）の3つのアイソタイプの産生反応をそれぞれ real time PCR 法で検討した。さらに、ヒアルロン酸の結合部位である軟骨細胞表面の CD44 に対して抗 CD44 抗体（IM-7）を作用させ、その反応の変化を検討した。

### (3) 多硫酸ペントサンの軟骨細胞に対する効果

培養犬軟骨細胞を用いて、以下の検討を実施した。多硫酸ペントサンの細胞に対する作用の変化として、細胞を IL-1 $\beta$  で刺激後、活性化される古典的な MAP キナーゼのリン酸化、

その反応の結果生じる NF- $\kappa$ B の核内移行、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) -2, 3 および 9 の mRNA 発現などを評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒアルロン酸の効果

外因性ヒアルロン酸は培養滑膜線維芽細胞および培養軟骨細胞において内因性ヒアルロン酸の生成活性を亢進し、その反応は CD44 への親和性に部分的に依存することが示唆された。この反応は低分子量ヒアルロン酸においてより顕著であり、高分子ヒアルロン酸では弱いことが示唆された。IL-1 の存在によって炎症性反応を発現した培養滑膜線維芽細胞では、分子量の小さいヒアルロン酸を生成する傾向がみられたが、培養液に外因性ヒアルロン酸を添加することによって分子量の高いヒアルロン酸の生成する反応が誘導されていることが示唆された。

外因性ヒアルロン酸の軟骨細胞に対する効果も培養滑膜線維芽細胞における反応とほぼ同様であり、外因性のヒアルロン酸が内因性のヒアルロン酸の産生を亢進させる反応、およびより高分子のヒアルロン酸の産生を亢進させる反応がみられた。これらの反応は、CD44 を遮断する抗体を使用することで部分的に抑制されることが確認されたことから、外因性ヒアルロン酸の作用は CD44 を介して細胞に影響を与えると推測された。

また、これら外因性ヒアルロン酸の作用は、培養環境下では、馬および犬の間に種差はみられなかった。さらに、高分子量および低分子量のヒアルロン酸は、ともに同様の作用がある傾向がみられたが、低分子量のヒアルロン酸の方がより明確な反応があることが示された。

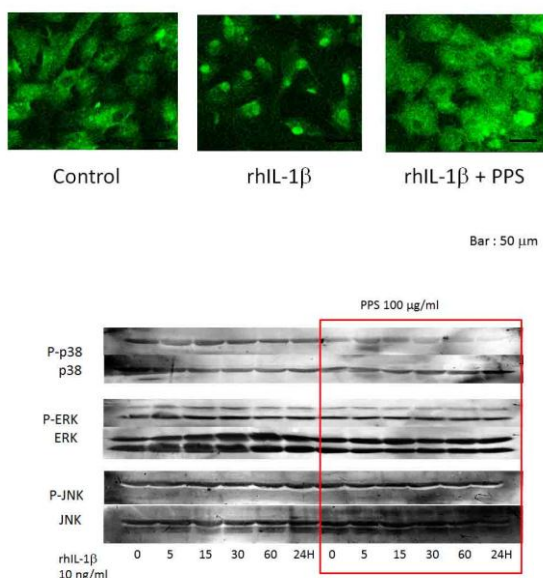
以上の結果から、関節内に投与されるヒアルロン酸によって、関節内の滑液の粘稠度など関節内環境が改善され、それが臨床的な症状改善効果の一部である可能性が示唆された。

##### (2) 多硫酸ペントサンの効果

炎症環境下にある培養犬軟骨細胞に対して多硫酸ペントサンナトリウムは、炎症による軟骨細胞の細胞外基質異化反応を和らげることによって軟骨保護作用を発現することが示唆された。

培養犬軟骨細胞をリコンビナントヒト IL-1 $\beta$  を添加した培養液で培養すると、MAP キナーゼ経路がリン酸化され、NF- $\kappa$ B の核内移行が起これ、その結果 MMP が産生誘導されることを確認した。その環境に多硫酸ペントサンを添加すると、MAP キナーゼのうち、p38

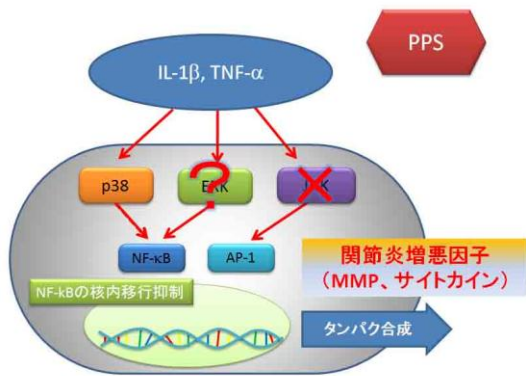
および ERK のリン酸化が抑制され、NF- $\kappa$ B の核内移行が著しく抑制されることが確認された。多硫酸ペントサンナトリウムのこの反応が JNK ではみられず、また、AP-1 には干渉しないことから、多硫酸ペントサンナトリウムが細胞内に取り込まれた後、特定の MAP キナーゼの活性を補足する因子に干渉しているのではないかと考えられた。



#### 結語

以上の結果から、多硫酸ペントサンナトリウムの関節症に対する症状改善効果は、関節軟骨細胞の炎症性反応を低減させることによる軟骨保護効果も一因である可能性が示された。

本研究では、硫酸化されたグリコサミノグリカンである多硫酸ペントサンナトリウムおよび硫酸鎖を持たないグリコサミノグリカンであるヒアルロン酸について、その臨床効果発現機構の一部を培養細胞環境下で再現し、説明することができた。ただし、培養環境下における軟骨細胞および滑膜線維芽細胞の挙動には体内でのそれら細胞におけるそれと必ずしも同一ではなく、より体内環境を再現できるモデルを用いた検討が必要である。また、作用に関する投与経路と代謝系、そして作用条件に関する影響も十分考慮した上で、説明することが必要である。



## 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 10 件)

- ① Sunaga T, Pro-apoptotic effects of tepoxalin, acycloxygenase/lipoxygenase dual inhibitor, on canine synovial fibroblasts.、J Vet Med Sci、査読有、74、2012、745-750
- ② Sunaga T, Inhibitory effects of pentosan polysulfate sodium on MAP-kinase pathway and NF-κB nuclear translocation in canine chondrocytes in vitro.、J Vet Med Sci、査読有、74、2012、707-711
- ③ Edamura K, Comparison of oral robenacoxib and carprofen for the treatment of osteoarthritis in dogs: a randomized clinical trial.、J Vet Med Sci、査読有、74、2012、1121-1131
- ④ Sano T, Comparison of oral robenacoxib and ketoprofen for the treatment of acute pain and inflammation associated with musculoskeletal disorders in cats: a randomised clinical trial.、Vet J、査読有、193、2012、397-403
- ⑤ Lettry V, Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay to detect keratan sulfate in equine serum.、Japanese Journal of Veterinary Research、査読有、57、2010、207-212
- ⑥ Lettry V, Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells.、Japanese Journal of Veterinary Research、査読有、58、2010、5-15
- ⑦ Lettry V, Divergent diagnosis from arthroscopic findings and identification of CPII and C2C for detection of cartilage degradation in horses.、Japanese Journal of

Veterinary Research、査読有、57、2010、197-206

[学会発表] (計 9 件)

- ① Oh N, clinical efficacy and its mechanism to restore synovial fluid quality, The transient effects of COX-2 inhibitor on osteogenic differentiation in canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells.、World congress on Osteoarthritis OARSI2013、平成 25 年 4 月 18 日～21 日、Marriott Philadelphia Downtown (USA)
- ② Okumura M, Intra-articular injected hyaluronic acid, a disease modifying osteoarthritis agent in canine arthropathy.、16th European Society of Veterinary Orthopaedics and Traumatology Congress、平成 24 年 9 月 14 日、Bologna Congress Center (Italy)
- ③ 奥村正裕、犬の骨折治療時の非ステロイド性抗炎症薬投与骨折治癒とシクロオキシゲナーゼ阻害について、第 83 回獣医麻酔外科学会、平成 23 年 12 月 3 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ④ 奥村正裕、小動物の関節疾患、第 32 回動物臨床医学会、平成 23 年 11 月 20 日、大阪国際会議場 (大阪市)
- ⑤ OKUMURA M, ATRIX METALLOPROTEINASE-2 and -9 ACTIVITIES IN OSTEOARTHRITIC SYNOVIAL FLUIDS IN THOROUGHBRED HORSES、World Equine Veterinary Congress、平成 23 年 11 月 5 日、Novotel Hyderabad Convention Centre (India)
- ⑥ 須永隆文、犬関節軟骨細胞における外因性ヒアルロン酸のヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現に対する効果、第 152 回日本獣医学会、平成 23 年 9 月 20 日、大阪府立大学 (堺市)
- ⑦ 奥村正裕、犬の関節疾患 Update、日本獣医臨床フォーラム東北大会 (招待講演)、平成 23 年 3 月 6 日、仙台国際会議場 (宮城県)
- ⑧ 奥村正裕、犬の関節疾患、動物臨床医学会 (招待講演)、平成 22 年 11 月 20 日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑨ OKUMURA M, Mechanism of anti-inflammatory effect of PSGAG in cultured equine synoviocytes and chondrocytes.、3rd World Veterinary Orthopaedic Congress、平成 22 年 9 月 15 日、Bologna congressi (Italy)

〔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

奥村 正裕 (OKUMURA MASAHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：80260397

### (2) 研究分担者

高木 哲 (TAKAGI SATOSHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50396305

細谷 謙次 (HOSOYA KENJI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：50566156