

## 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 24 年 6 月 8 日現在

機関番号： 34401  
 研究種目： 研究活動スタート支援  
 研究期間： 2010～2011  
 課題番号： 22890217  
 研究課題名（和文） 関節軟骨維持におけるヘパラン脱硫酸酵素（Sulf）の役割  
 研究課題名（英文） Role of Sulf in Cartilage Metabolism

研究代表者  
 大槻 周平（Otsuki Shuhei）  
 大阪医科大学・医学部・助教  
 研究者番号： 20589840

研究成果の概要（和文）：変形性膝関節症において、過度の荷重負荷領域は、軟骨変性とその周囲に軟骨先駆細胞マーカーである STRO-1 陽性細胞や細胞塊(cluster)が見られた。一方、荷重が少なく正常軟骨に近い状態に見える外側では、生物活性は低いことがわかった。本研究で適度な荷重負荷は膝関節内の軟骨恒常性維持に不可欠であり、細胞数変化には Sulf や Erk 活性に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Abnormally increased mechanical load due to varus deformity is associated with cartilage degradation in the medial condyle. Interestingly, the tissue damage caused by mechanical stress activates a cellular response that leads to proliferation of STRO-1 positive progenitor cells and cluster formation. On the other hand, thick non-degenerated cartilage in the lateral compartment that experiences reduced load due to varus deformity shows low-density single chondrocytes that appear to have reduced proliferative and biosynthetic activity. Appropriate mechanical stress appears critical for maintaining cartilage homeostasis and early restoration of normal mechanical load in both compartments of the knee may prevent cell and tissue damage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
総計	2,240,000	672,000	2,912,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 整形外科学

キーワード： Sulf、ヘパラン硫酸、加齢、変形性関節症、軟骨

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(OA)は軟骨変性を伴う最も頻度の高い退行性関節疾患の一つである。その主な原因としてあげられる過度の荷重負荷は、さまざまな分子シグナルを誘導(もしくは制御)することで軟骨変性を促進する。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの1つであるパルカンは、荷重負荷により過剰発現することがすでに報告されているが、メカニズムは不明な部分が多い。

## 2. 研究の目的

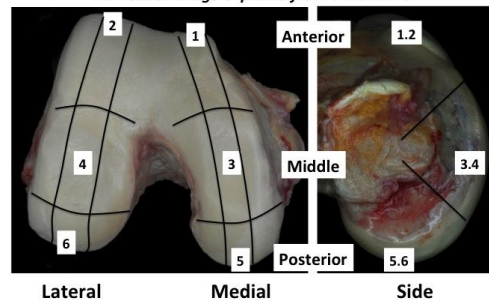
近年我々は、関節軟骨において新規ヘパラン硫酸脱硫酸酵素(Sulf)が軟骨変性に影響を及ぼすことを報告した。本研究の目的は、変形性膝関節症における荷重負荷と組織および細胞変化を部位別に検討することと、荷重負荷によって誘導(制御)された分子シグナルはSulfによって多角的に調整されているのではないかという仮説のもと、荷重を加えた軟骨組織でのSulfの発現と分子シグナル活性との関係を解明することである。

## 3. 研究の方法

1) ヒト軟骨におけるSulfの発現と膝関節OAとの関係を明らかにするため、内反型OAによって人工関節手術を受けた患者から、大腿骨内、外側顆の軟骨を採取した(n=20, 下図)。それらの部位別に軟骨内の細胞形状や性質をSafranin O染色で観察した。また免疫染色は、Sulfと軟骨前駆細胞のマーカーの一つであるSTRO-1の染色を行い、陽性細胞の発現を調べた。

## Location of Cartilage Explants

Harvest cartilage explants from 6 locations.



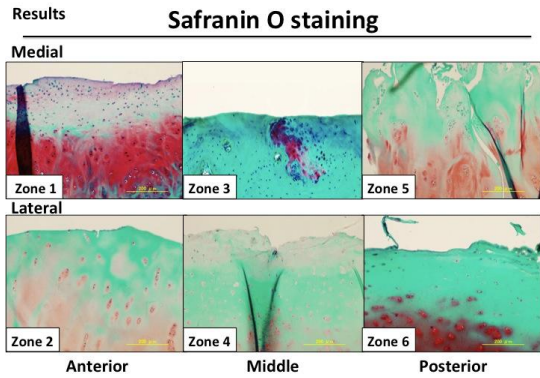
2) 次に上記の変化における荷重負荷の関与を調べる為に、直径6mm径の牛軟骨組織を採取し、それらに荷重を加え、Live/Dead assayにて細胞死や免疫反応を検討した。

ウシ軟骨にさまざまな荷重負荷を加えて、その後組織を採取し、Sulfの発現を検討した。荷重負荷の変化に伴う軟骨細胞数の変化などは、パルカンから細胞外へ分泌されるFGF2/Erkシグナルが関与しているのではと考え検討を深めている。

## 4. 研究成果

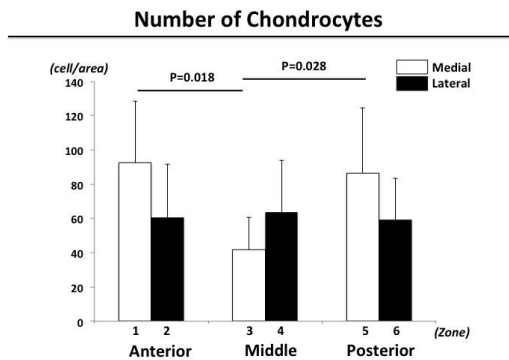
1) 軟骨組織と荷重負荷との関係では、内反変形の強い大腿骨ではzone3で軟骨消失が見られた。興味深い事に、その周辺のzone1,5で細胞凝集塊(cluster)や増殖変化(hypercellularity)がみられた。一方荷重負荷があまりかからない外側顆部(zone2,4,6)では軟骨の厚さは保たれていたが、Safranin Oで染色性は落ちて、細胞密度も低く、形状は単細胞型が多かった(下図)。

(図) 荷重負荷の多い内側の軟骨は薄い



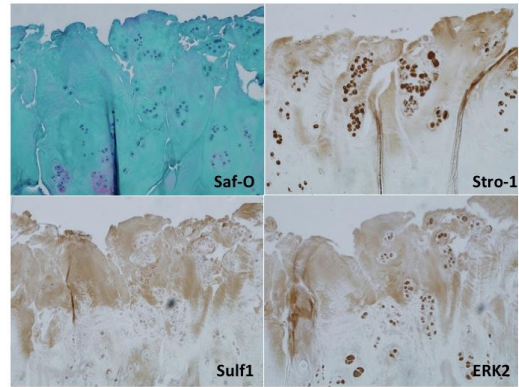
細胞数が増加しているのに対し、荷重負荷の少ない外側の軟骨は厚く、細胞数は減少していた。

細胞数は、zone1, 5 に比して zone3 で優位に減少していた (下図)。次に細胞数の部位別変化のしくみについて免疫染色を用いて検討を深めた。



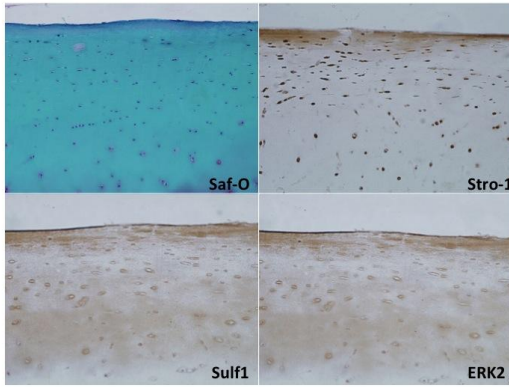
(図) 内側側の前後側は荷重部に比べ優位に細胞数が増加している。

免疫染色の結果では、過度の荷重負荷領域では、軟骨変性とその周囲に Sulf, STRO-1 陽性細胞や cluster が見られ、変性軟骨の周辺で修復機転が生じている可能性が示唆された。また、Erk 陽性細胞も多く見られた (下図)。



(図) 変性軟骨では表層の繊維化と、STRO-1, Erk2 の発現が増加している。

また、荷重負荷の減少した外側では、単細胞型の軟骨細胞が多く見られ、軟骨内グルコサミノグリカン濃度の低下や Sulf や STRO-1, Erk の発現は少なかった。以上より、Sulf は MSC マーカーと同様に荷重負荷により発現を変化させる事から、適度な荷重負荷は膝関節軟骨の恒常性維持に重要であり、その過程で Sulf は軟骨細胞数調節に FGF2/Erk pathway を通じて影響を及ぼしている事が示唆された (下図)。

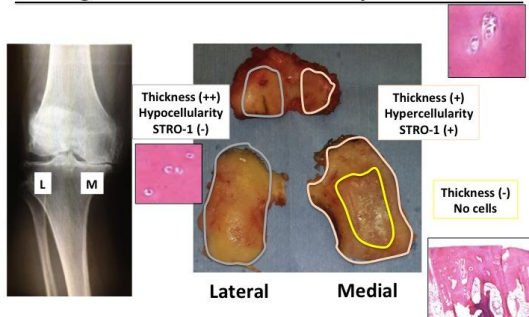


(図) 荷重減少領域では軟骨表層は保たれていても STRO-1, Sulf, Erk の発現は減少している。

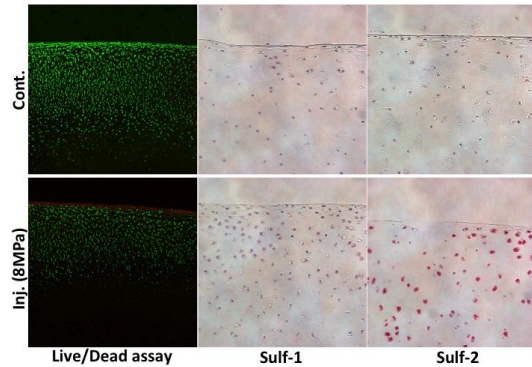
人工関節手術を受けるような末期変形性関節症の場合でも自己修復能は機能し、変性軟骨周囲で細胞数の増加がみられた。一方荷重負荷をあまりうけない外側軟骨は細胞数、グルコサミノグリカン濃度ともに低下し、STRO-1 陽性細胞もほとんど存在せず質の低下が示唆された(下図)。この軟骨細胞数や形状の変化には、Erk の発現が関与している事からも、FGF/Erk pathway の活性化が関与している事が示唆された。

2) 8MPa の負荷をかけて細胞死及び Sulf の発現変化を Live/Dead assay, 免疫染色で検討したところ、ストレス後に軟骨細胞は表層を中心に細胞死が広がっていた。また、Sulf の発現を免疫染色で調べたところ、Sulf1, 2 どちらも負荷後に過剰発現がみられたが、特に Sulf2 が表層から中間層にかけて

#### Cartilage Thickness and Cell Density in Varus Knee



陽性細胞が多くみられた(下図)。



今後、メカニカルストレスを加えた軟骨組織から細胞を採取し、Sulf 発現が増加したことのメカニズムやそれに関連した病態について、FGF2/Erk を中心に検討を深めていく予定である。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①Otsuki S. et al: Cartilage Thickness and Chondrocyte Density in Human Osteoarthritic Knee Joints. April. 25<sup>th</sup>, 2012. Barcelona Spain.

#### 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・助教  
研究者番号：20589840