

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592241

研究課題名(和文) タンパク分解酵素とその内因性阻害因子のバランスに着目した変形性関節症の病態解明

研究課題名(英文) Changes in expression of proteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in advance of osteoarthritis

研究代表者

山口 鉄生 (YAMAGUCHI, Tetsuo)

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・准教授

研究者番号：80569731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト軟骨での軟骨変性の初期変化と変形性関節症(OA)の進行過程を検証した。関節軟骨のタンパク質分解酵素(MMP1,2,3,ADAMTS5)と内因性阻害因子(TIMP1,2,3,4)に着目した。TIMP-2,3,4の発現は初期OAでタンパク質分解酵素の発現上昇に先立って低下していた。また末期OAにおいては軟骨変性、非変性部、ともに発現が低下していた。MMP13とADAMTS5の発現は初期OAでは変化は無く、末期OAで増加していた。TIMP-2,3,4の発現低下はOAにおける軟骨変性の進行に重要な意味を持っているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Gradual loss of cartilage matrix is a hallmark of pathology of osteoarthritis (OA). Previous studies have shown that the expression of several proteinases play a pivotal role in cartilage breakdown. In this study, we investigated the expression of key proteinases (MMP-13, ADAMTS-5) together with that of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) within cartilage from normal, early, or advanced OA knee joints, paying special attention to the regional difference within cartilage tissue. The result of this study has shown that the expression of TIMP-2, 3 and 4 reduced in cartilage where early OA changes occur, before the elevation of MMP-13 and ADAMTS-5 expression. The result of this study might shed light on a novel aspect of OA pathology.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：変形性膝関節症 MMP TIMP 病態解明 早期変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性関節症 (osteoarthritis, OA) では軟骨細胞において matrix metalloproteinases (MMPs) と a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) などのタンパク分解酵素の発現が誘導され、これらが軟骨基質の変性をもたらす。MMPs と ADAMTS の活性は内因性の活性阻害因子である tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) や alpha2-macroglobulin によって阻害される。軟骨に発現する MMPs と TIMPs のバランスは OA の進行に重要な意義を持ち、末期 OA ではこれらのバランスが破綻した状態と考えられている。しかしこれまで関節軟骨におけるタンパク分解酵素とその内因性阻害因子のバランス破綻がいつ、どのような機序で生じてくるのかについては解明されていない。

(2) タンパク分解酵素の中でも MMP-13 と ADAMTS5 が関節軟骨の変性に最も関与が深いと考えられている。しかし実際にヒトの OA でこの2つの酵素だけで軟骨変性を引き起こすわけではなく、他のタンパク分解酵素の発現も亢進しており、それらの軟骨変性への関与も報告されている。また、これまでにわれわれは OA 軟骨組織からの抽出液に相当量の MMP-1,2,3 が含まれていることを明らかにしており、ヒト OA の軟骨変性において MMP-13 と ADAMTS5 以外の因子にも着目する必要があると考えている。

2. 研究の目的

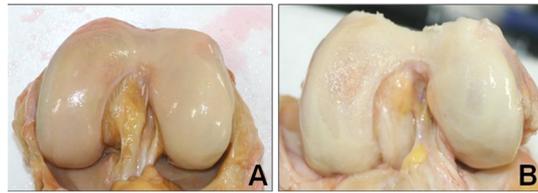
関節軟骨の恒常性は種々のタンパク分解酵素とそれらの活性を抑制する内因性阻害因子との良好なバランスにより保たれている。関節内の環境により、そのバランスは微妙に変化する。われわれはタンパク分解酵素と比べ、それほど注目されなかった内因性阻害因子に着目し、OA の特に初期段階におけるバランス変化とそのメカニズムを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 検体の調整

解析に用いる末期 OA の軟骨は Kellgren-Lawrence 分類のあるいはに相当し、人工関節置換の際に膝関節の肉眼的変性部、非変性部からそれぞれ採取する。正常および初期 OA の病期分類については先行研究に従い (Aigner T, et al. *Arthritis Rheum* 2006), 肉眼的に軟骨変性の無いものを正常とし (図 1. A), 線維化や軟化があるが進行したびらんが無いものを初期 OA (図 1. B) と定義して、剖検例の膝関節から採取する。正常、初期 OA、末期 OA の各病期それぞれ 10 例から軟骨を採取する。

図 1



(2) 軟骨からの RNA の抽出

軟骨を変性の程度で分け、さらにレーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション (LCM) を用いて層ごとに分離する。LCM は当研究室では既に手法として確立され、日常的に使われている (Fukui, et al. *Arthritis Rheum* 2008). 分離された部位ごとに RNA を抽出する。軟骨に含まれる MMP-1,2,3,13, ADAMTS5, TIMP1,2,3,4 の発現を部位ごとに real-time PCR により定量的に評価する。

(3) 軟骨からのタンパク質の抽出 (軟骨抽出液)

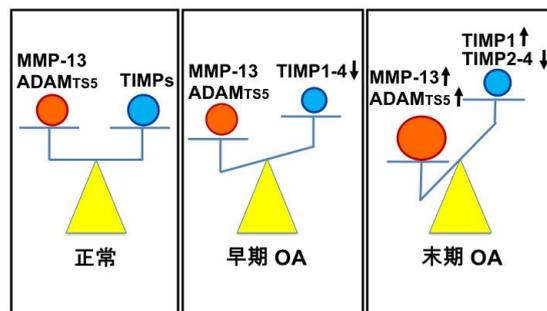
採取した軟骨組織を変性部と非変性部に分け、軟骨からのタンパク質分解酵素、阻害因子の抽出は冰冷した塩酸グアニジンとプロテアーゼ阻害剤を含むリン酸緩衝生理食塩水中で組織を破砕する。

4. 研究成果

ヒト軟骨での軟骨変性の初期変化と OA の進行過程を検証した。タンパク質分解酵素 (MMP1,2,3, ADAMTS5) と関節軟骨の内因性阻害因子 (TIMP1,2,3,4) に着目しており、real-time PCR による解析では、TIMP2,3,4 は MMP13, ADAMTS5 に先立って初期 OA で変化していた。また、MMP13 と ADAMTS5 の発現は初期 OA では変化は無く、末期 OA で増加していた (図 2)。

図 2

MMP-13 & ADAM-TS5 と TIMPs のバランス

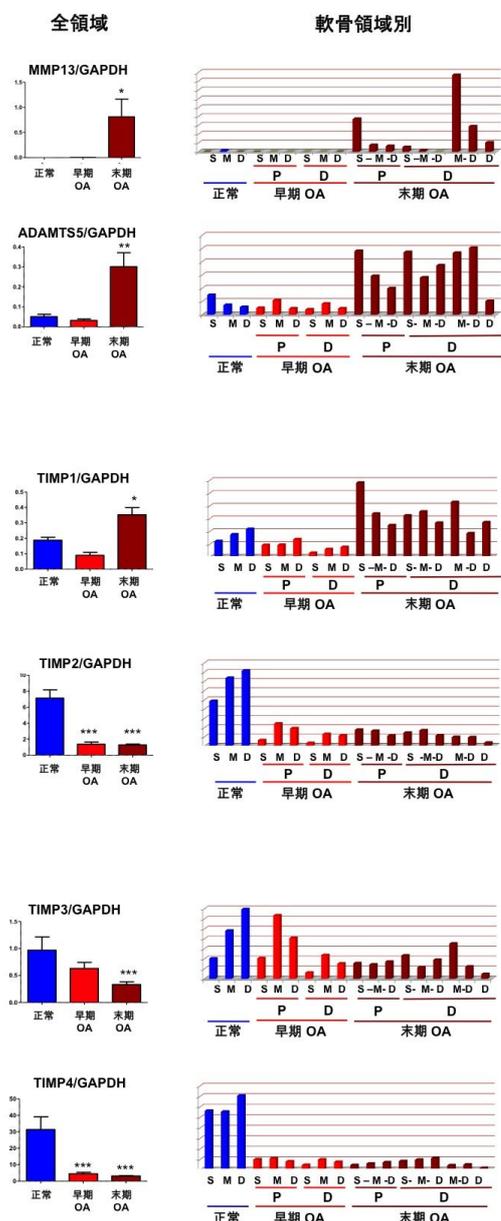


TIMP については、TIMP-1 は初期および末期 OA 軟骨で対照軟骨に比して発現が亢進する傾向があったが、TIMP-2,3,4 の発現は初期、末期 OA 軟骨で対照軟骨に比べすべて半分以下に低下していた。領域別に見た場合、2 種のタンパク分解酵素の発現は初期、末期 OA いずれも軟骨の変性部と非変性部の間に明らかな差が見られなかったのに対し、TIMP-2,3,4

の発現は初期,末期 OA とも軟骨変性部で低下していた(図 3).さらにヒト軟骨抽出液に含まれる各因子のタンパク発現を Luminex システムおよび ELISA で検証した結果,real-time PCR による解析と概ね同様の変化を示していた.以上の結果をまとめると,MMP13, ADAMTS5 と TIMPs のバランス関係は,正常の軟骨では保たれているが,初期 OA では TIMPs の発現が低下し,相対的に catabolic な方向へ傾くと考えられる.また末期 OA では MMP13 と ADAMTS5 が大きく増加し,さらに catabolic な方向へ進んでいると考えられる.TIMP-2,3,4 の発現は初期 OA でタンパク分解酵素の発現上昇に先立って低下していた.また末期 OA においては軟骨変性,非変性部,ともに発現が低下していた.TIMP-2,3,4 の発現低下は OA における軟骨変性の進行に重要な意味を持っているのかもしれない.

図 3

S:浅層, M:中層, D:深層, P:非変性部, D: 変性部



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 1 件)

1. Tanaka N, Ikeda Y, Yamaguchi T, Furukawa H, Mitomi H, Nakagawa T, Tohma S, Fukui N. 5 1 integrin induces the expression of noncartilaginous procollagen gene expression in articular chondrocytes cultured in monolayers. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(5):R127
DOI: 10.1186/ar4307

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 福井 尚志, 田中 信帆, 池田 泰子, 山口 鉄生, 十字 琢夫, 増田 公男, 森 俊仁 : 変形性膝関節症において VEGF-A の活性阻害は滑膜病変を軽減することで治療効果を示す可能性がある, 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会, 6月20-22 日, 2013年, 札幌コンベンションセンター (北海道).

2. 福井 尚志, 田中 信帆, 池田 泰子, 山口 鉄生 : 変形性膝関節症において血管内皮細胞増殖因子 A の活性阻害は治療効果を示すか 予備的検討の結果, 日本整形外科学会総会, 2013年5月23-26日, 広島グリーンアリーナ (広島県).

3. 福井 尚志, 田中 信帆, 池田 泰子, 山口 鉄生, 増田 公男, 十字 琢夫, 森 俊仁 : 変形性膝関節症において VEGF-A の活性阻害は関節液中の MMP-1 の濃度を有意に低下させる, 日本整形外科学会総会, 2013年5月23-26日, 広島グリーンアリーナ (広島県).

4. 福井 尚志, 田中 信帆, 池田 泰子, 山口 鉄生, 田代 俊之, 桂川 陽三 : 変形性関節症では血管新生が滑膜病変を引き起こす重要な機序である, 日本整形外科学会基礎学術集会, 2012年10月26-27日, ウィルあいち (愛知県).

5. 福井 尚志, 田中 信帆, 池田 泰子, 山口 鉄生, 田代 俊之, 桂川 陽三 : 変形性関節症では変性軟骨から荷重によって血管新生を誘導する因子が放出される, 日本整形外科学会基礎学術集会, 2012年10月26-27日, ウィルあいち (愛知県).

6. 福井 尚志, 田中 信帆, 和気 昌弘, 池田 泰子, 山口 鉄生 : 変形性関節症では血管新生が滑膜病変を引き起こす, 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会, Vol.37, No.4, 61頁, 2012年7月19-21日, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県).

7. 田中 信帆, 池田 泰子, 和気 昌弘, 山口 鉄生, 福井 尚志 : 変形性関節症では変性軟骨から荷重によって血管新生を

誘導する因子が放出される,日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会,2012年7月19-21日,沖縄コンベンションセンター(沖縄県).

8. 福井 尚志, 田中 信帆, 石田 暁, 池田 泰子, 山口 鉄生, 宮本 恵成, 田代 俊之, 桂川 陽三: 変形性関節症では軟骨変性部においてIGFシグナルの低下によって基質産生が低下している,日本整形外科学会基礎学術集会,2011年10月20-21日,ベトナム文化ホール(群馬県).
9. 山口 鉄生, 大森 舞子, 田中 信帆, 和気 昌弘, 池田 泰子, 宮本 恵成, 田代 俊之, 桂川 陽三, 沢辺 元司, 福井 尚志: 変形性関節症における軟骨変性には局所的なTIMPの発現低下が関与する,日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会,2011年6月16-18日,札幌コンベンションセンター(北海道).
10. 田中 信帆, 石田 暁, 大森 舞子, 和気 昌弘, 池田 泰子, 山口 鉄生, 宮本 恵成, 田代 俊之, 桂川 陽三, 福井 尚志: 変形性関節症では軟骨変性部でIGFシグナルの低下によって基質産生が低下している,日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会,2011年6月16-18日,札幌コンベンションセンター(北海道).
11. 福井 尚志, 山根 昌治, 田中 信帆, 田中 こなぎ, 池田 泰子, 増田 理亜子, 山口 鉄生: 複数の既知バイオマーカーの組み合わせによる変形性膝関節症の病態評価の試み,日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会,2011年6月16-18日,札幌コンベンションセンター(北海道).

〔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

<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/261430/work-ja.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 鉄生(YAMAGUCHI Tetsuo)

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部 准教授

研究者番号: 80569731

(2)研究分担者

福井 尚志(FUKUI Naoshi)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・政策医療企画部・特別研究員

研究者番号: 10251258

(3)研究協力者

田中 信帆(TANAKA Nobuho)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・政策医療企画部・研究員
研究者番号: 60530920