

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592281

研究課題名(和文) 滑膜間葉系幹細胞に着目したパールカンによる変形性膝関節症の骨棘形成制御

研究課題名(英文) Regulation of the osteophyte formation in knee osteoarthritis by the management of the mesenchymal synovial cell differentiation via synovial perlecan expression

研究代表者

石島 旨章 (Ishijima, Muneaki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70365576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症(膝OA)の病態の一つである骨棘は、関節軟骨近傍の滑膜に存在する間葉系細胞(SMCs)が軟骨分化し、内軟骨性骨化と同様の過程を経て骨に置換される。パールカンは、軟骨や滑膜の細胞外基質に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、軟骨分化に必須の分子である。本研究では、関節内ではパールカンが滑膜にのみ発現し軟骨には発現しないマウスは、誘導した膝OAの骨棘が形成の初期段階から抑制されることをin vivoにて示し、滑膜のパールカンが骨棘形成に促進的に機能し、その機能制御による骨棘形成制御の可能性を示した。さらにその機序の解析のため、マウス膝滑膜の初代培養法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Osteophyte associated with knee osteoarthritis (OA) is a bony outgrowth formed at the margins of the affected joint through endochondral ossification-like processes. However, its mechanism and pathogenesis are unclear. Perlecan (Hspg2), a heparan sulfate proteoglycan, is expressed in many extracellular tissues and plays critical roles in skeletal development and diseases. The aim of the present study is to identify the role of synovial perlecan in osteophyte formation using perinatal lethality rescued perlecan-knockout mice (Hspg2<sup>-/-</sup>Tg) wherein perlecan expression is lacking in the synovial and other tissues, except for cartilage. In this study, the osteophyte formation in Hspg2<sup>-/-</sup>Tg mice was significantly reduced in comparison to that in control mice. In addition, we established a primary mouse synovial cell culture method, which may shed light on the mechanistic insight into the role of synovial perlecan in the chondrogenic differentiation of the the synovial mesenchymal cells.

研究分野：変形性膝関節症

キーワード：変形性膝関節症 パールカン 滑膜間葉系細胞 骨棘

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(膝 OA) は、関節変形や膝関節痛そして関節可動域制限を招き、日常生活動作(ADL)を著しく障害する慢性疾患である。しかし、膝 OA は未だ分子レベルの病態解明が進まず、進行を阻害できる、いわゆる「疾患修飾型治療法」は存在せず、「症状改善型治療法」が主たる治療法である。

膝 OA の病態や臨床症状は、関節軟骨の変性と摩耗が第一義的原因との考え方が主流であるが、これに加えて半月板や軟骨下骨そして滑膜も従来以上に関与すると考えられてきている (Felson, *Nature Med*, 2006; Englund, et al, *Arthritis Rheum*, 2009; Goldring et al, *Arthritis Rheum*, 2011)。

従来、膝 OA の骨棘への関心は低かったが、近年骨棘が単なる関節軟骨の摩耗という膝 OA の病態の本質に対する 2 次的現象であり、臨床的には意味のないものであるとする考え方に変化が出てきた。それは主に膝 OA に対する疫学調査の結果から、ヒトにおける膝 OA の自然経過がより詳細に解明されてきたことと深く関連している。

東京大学の疫学調査である Research on Osteoarthritis Against Disability (ROAD) スタディーの解析では、関節軟骨の摩耗を反映する単純 X 線による関節裂隙狭小化は、膝 OA 患者の疼痛程度と関連した。一方で、骨棘形成程度は、膝 OA の疼痛程度とは関連せず、ADL 低下の増悪因子であることが明らかとなった (Muraki et al, *Arthritis Rheum*, 2011)。従って、骨棘の制御は膝 OA の治療ターゲットになりうる可能性がある。

骨棘は、従来関節軟骨辺縁部の骨膜から形成されると考えられてきた。しかし、骨棘が形成される箇所の骨膜のさらに表層を滑膜が覆うという解剖学的構造と、関節内における間葉系幹細胞(MSCs)の供給源としての滑膜のもつ機能についての理解が深まってきた。そして、MSCs が増殖し、軟骨分化を経て骨へと分化することで形成される骨棘の形成過程は、発生期の内軟骨性骨化に類似しているが (von den Berg et al, *Osteoarthritis Cartilage*, 2007), その MSCs の供給源として滑膜が機能を有することが徐々に受け入れられてきている。しかし、骨棘形成の分子レベルでの機序については、不明な点が多く、この発生を制御する試みはわずかであった。

パールカンは、細胞外マトリックスとして基底膜に発現し、また基底膜のない軟骨や滑膜にも発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンである。パールカンは、成長因子や細胞と受容体の結合を通して接着し、細胞増殖や分化を制御し、また種々のマトリックスと結合してマトリックスの接着剤として働き、組織層を支え、その機能保全に必要と考えられている。

研究分担者の平澤博士(順天堂大学)と研究協力者の山田博士(米国・国立衛生研究所(NIH))は、パールカン欠損マウスを作成した。

さらに、ヒトにおいてもこの分子の遺伝子欠損者の解析を行った。その結果、マウスやヒトでパールカンの機能完全欠損では、致死性の軟骨異形成症を発症することを明らかになった。さらに、パールカンの部分欠損のあるヒトでは、神経-筋接合部の異常に伴うミオトニアと変形性関節症を呈することが明らかとなった。このことより、パールカンが軟骨分化に必須の機能を有すること、そしてこの分子が異常をきたすと、他の分子では代償できない機能を有することを示している (Arikawa-Hirasawa, Yamada, et al, *Nat Genet* 1999, *Nat Genet* 2001, *Nat Neuroscience* 2002, *Am J Hum Genet* 2002)。

上記のように、細胞機能と組織保全に重要なパールカンは軟骨形成過程に必須の機能を有することが明らかとなった一方で、軟骨形成過程の初期からこの分子が必須の役割を担っているため、軟骨発生の後期におけるパールカンの機能についての理解は必ずしも十分ではなかった。さらには、変形性膝関節症を含めた運動器慢性加齢性疾患における機能と役割については、十分な検討が行われていなかった。特に、パールカン遺伝子欠損マウスは、胎生致死のため、マウスを用いた機能解析が行えないという障害もあり、解析が十分には行われていなかった。

## 2. 研究の目的

われわれは、パールカンという分子の解析とともに、膝 OA の病態及び臨床症状についての解析を継続してきた。多くの膝 OA 研究が関節軟骨を研究対象としてきたのに対し、われわれは、膝 OA の滑膜に注目して研究を進めてきた。主な成果は、膝 OA の臨床に重要な疼痛と主とした臨床症状が、膝関節内の滑膜炎と関連することを示してきたことである (Liu, *Ishijima et al, Clin Rheumatol*, 2010; Ning, *Ishijima et al, Int Orthop*, 2011; *Ishijima, et al, Arthritis Res Ther*, 13, R22, 2011)。そして前述の如く、膝 OA の骨棘は、従来と異なり、ADL 低下という臨床的意義を持つ病変であること、そして病態としては滑膜に存在する MSCs から発生することが明らかとなってきた。

以上より、本研究では、膝 OA 骨棘形成に滑膜 MSCs が多分化能を示す際に、パールカンが機能を有するかを検討し、その機序を明らかにすることで骨棘形成を制御するための基盤形成を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 滑膜に発現するパールカンの機能解析を行うにあたり、遺伝子改変マウスを用いた実験を可能となるためには、マウス膝関節から滑膜を採取し培養する必要がある。しかし、従来、マウス膝関節から採取した滑膜の初代培養法は確立されていなかった。

そこでわれわれは、ヒト滑膜細胞を培養増殖し、軟骨欠損に対する臨床応用を行っている

る東京医科歯科大学整形外科・軟骨再生学の関矢博士との共同研究にて、マウス膝関節から滑膜を採取し、滑膜由来間葉系細胞 (Synovial mesenchymal cells; SMCs) を培養する方法の確立を目指した。

具体的には、体重 20-25 g マウスの膝滑膜から滑膜由来細胞の分離と培養を試みた。得られた細胞の自己複製能、増殖能、表面抗原の発現、骨・脂肪・軟骨への多分化能を検討した。対象として骨髄間質細胞と筋由来間質細胞を用いた。

(2) パールカン欠損マウスは、軟骨形成不全により胎生致死となる。そこでパールカン欠損マウスを用いて、パールカンを軟骨でのみ発現させ、軟骨形成不全を修復し非周産期致死性の遺伝子改変マウスを用いた。このマウスは関節内では軟骨にのみパールカンを発現し、滑膜にはパールカンを発現しない [滑膜パールカン欠損マウス (Per<sup>-/-</sup>Tg マウス) (Xu, *Arikawa-Hirasawa, Yamada, et al, Matrix Biol, 2010*)].

滑膜パールカン欠損マウス (Hspg<sup>-/-</sup>Tg) とコントロールマウス (Hspg<sup>+/-</sup>Tg) を用いて、下記の既知の 2 種類の *in vivo* 膝 OA モデルを行い、滑膜から発生する骨棘形成過程におけるパールカンの機能を検討した。

- ① 内側側副靭帯切離と内側半月板除去による関節不安定性による OA モデル (Kamekura *et al, Osteoarthritis cartilage 2005*)
- ② 膝関節内への TGF- $\beta$  注射 による OA モデル (van den Berg *et al, Osteoarthritis cartilage 2007*)

→術後 1・2・4・8 週後の組織学的解析を行い、滑膜に発現するパールカンの有無により、OA 発症及びその進行の相違を検討した。具体的には、組織学的な OA 評価法 (亀倉らの方法 [Kamekura *et al, Osteoarthritis cartilage 2005*] や, OARSI (Osteoarthritis Research Society International, 国際関節症学会) の方法) に従い、関節軟骨の変性と摩耗、滑膜炎そして骨棘形成の程度を評価した。関節軟骨の評価: HE, サフラニン-O, パールカン, II 型コラーゲン, X 型コラーゲン 等

滑膜炎の評価: HE  
骨棘形成の評価: HE, サフラニン-O, パールカン, II 型コラーゲン, X 型コラーゲン, VEGF, PCNA, p-smad2 等

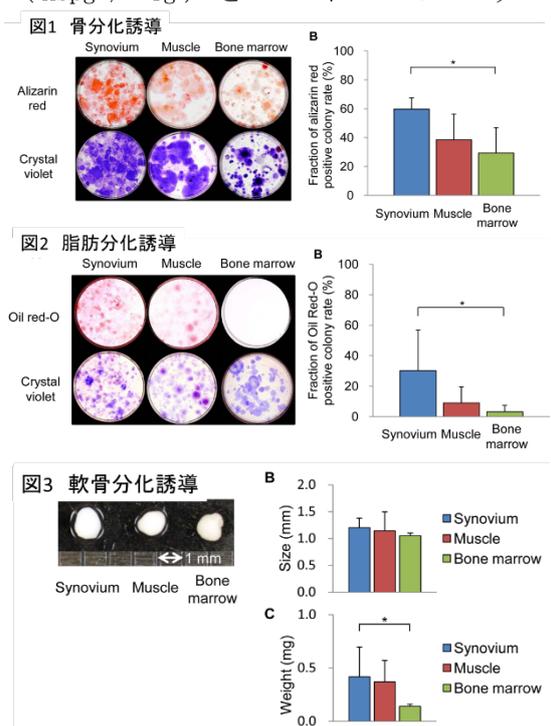
(3) Hspg<sup>-/-</sup>Tg 及び Hspg<sup>+/-</sup>Tg マウスの SMCs を用い、MSCs の増殖や骨・軟骨・脂肪などへの多分化能を検討し、間葉系幹細胞ニッチに発現するパールカンの制御機構を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 10 週齢 Balb/c マウス膝関節内の滑膜から滑膜由来細胞を分離・培養するには、従来のヒトやウサギそしてラットに用いる条件では不適當であり、コラーゲナーゼ濃度を 1/3, 処理時間を 1/4 以下にする至適条件を設定した。

滑膜由来細胞はすべて継代可能であったのに対し (100%), 筋由来間質細胞の 70%, 骨髄間質細胞の 50% に比し有意に継代能が優れていた ( $p < 0.05$ ). 増殖能は、筋由来間質細胞と同等 ( $p = 0.134$ ), 骨髄間質細胞より有意に優れていた ( $p < 0.01$ ) (各  $n = 10$ ). 滑膜由来細胞の表面抗原の発現は、CD29, 44, 106, 117, Sca-1 で骨髄及び筋由来間質細胞と同様の傾向を示し、CD140 $\alpha$  にて有意に高かった。滑膜由来細胞の骨 (図 1)・脂肪 (図 2)・軟骨 (図 3) 分化能は、骨髄及び筋由来間質細胞と比較して同等もしくはより高かった。

(2) 前述の如く、滑膜パールカン欠損マウス (Hspg<sup>-/-</sup>Tg) とコントロールマウス



(Hspg<sup>+/-</sup>Tg) に対して、2 種類の膝 OA モデル (①と②) を行った。

① コントロールマウス (Hspg<sup>+/-</sup>Tg) に関節不安定性による膝 OA を誘導すると、関節軟骨の変性と摩耗、そして関節軟骨辺縁には骨棘の形成を認めた。一方、滑膜パールカン欠損マウス (Hspg<sup>-/-</sup>Tg) では、関節軟骨の変性と摩耗といった膝 OA 変化を生じ、その程度は、コントロールマウスと同程度であった。しかし、関節辺縁に認める骨棘形成は、コントロールと比較して、有意に小さく、成熟度も有意に骨棘形成が阻害された (図 4)。

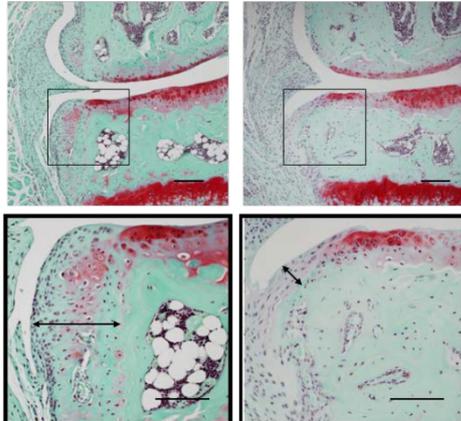
骨棘部分の II 型コラーゲンの発現を、免疫染色にて検討すると、コントロールマウスに比べて、滑膜パールカン欠損マウスでは、明らかにその発現が低下していた (図 5)。

同様に、骨棘部分の X 型コラーゲンの発現も、コントロールマウスと比較して、その発現が有意に低下していた (図 5)。

骨棘部分の細胞増殖程度についての検討を、PCNA の免疫染色によって行ったところ、コントロールマウスと比較して、滑膜パールカン欠損マウスでは PCNA の染色性が有意に低下していた。すなわち、滑膜パールカンは骨棘形

図4

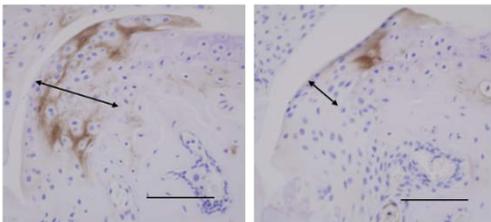
①内側膝OA  
コントロール 滑膜パールカン欠損



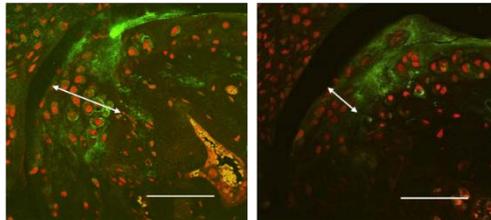
サフランインOファーストグリーン染色

図5

コントロール 滑膜パールカン欠損



II型コラーゲン



X型コラーゲン

成を促進する作用を有することが明らかとなった。

次に、骨棘形成には TGF- $\beta$  が深く関与することが知られているため、コントロールマウスと滑膜パールカン欠損マウスの骨棘部分の Smad2/3 のリン酸化の程度を検討した。そして、滑膜パールカン欠損マウスの骨棘部分の Smad3 のリン酸化は、野生型マウスと比較して低値であった。

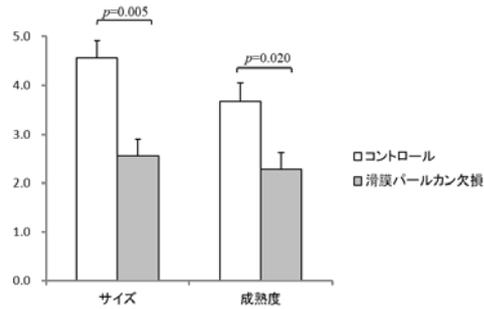
② TGF- $\beta$  関節内注射による骨棘形成モデルを用いて、①で認めた滑膜パールカン欠損マウスにおける膝 OA の骨棘形成阻害効果についてさらに検討した。

その結果、コントロールマウスでは、関節内への TGF- $\beta$  の注射により骨棘形成を認めた。一方、滑膜パールカン欠損マウスでは、膝関節内への TGF- $\beta$  注射による骨棘形成が、コントロールマウスと比較して、サイズおよび成熟度の双方ともに有意に阻害されていた(図6)。

以上より、滑膜に発現するパールカンは、膝 OA に伴う骨棘形成に関与することを明らかにした。

骨棘は、滑膜に存在する間葉系細胞が、軟骨

図6



細胞へと分化することに端を発し、その後は成長板軟骨の形成メカニズムと同様に、内軟骨性骨化の過程を経て形成される。一方で、近年、膝関節内では、滑膜由来の間葉系細胞が日常起こり得る関節軟骨の軽微な損傷に対しても損傷部位に動員され、滑膜細胞が軟骨細胞へと分化することで損傷部位を修復している可能性が示唆されている。

このことから、滑膜に存在する間葉系細胞が、何らかの刺激により軟骨細胞に分化するという現象は、場合によって生体防衛的に機能し、またある時は疾患の進行に深く関与することが示唆される。本研究結果から、滑膜に発現するパールカンを制御することで、滑膜間葉系細胞からの軟骨分化を制御し、膝 OA といった疾患について、従来にはなかったまったく新しい視点からのマネジメントの可能性が提示されたと考える。

## 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 20 件)

1. Ishijima M, Suzuki N, Hozumi K, Matsunobu T, Kosaki K, Kaneko H, Hassell J, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, Perlecan modulates VEGF signaling and is essential for vascularization in endochondral bone formation. *Matrix Biol*, 31, 234-245, 2012 (査読有)
2. Futami F, Ishijima M, Kaneko H, Tsuji K, Ichikawa-Tomikawa N, Sadatsuki R, Arikawa-Hirasawa E, Muneta T, Sekiya I, Kaneko K, Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium. *PLOS One*, 7, e4551, 2012 (査読有)
3. Kaneko H, Ishijima M, Futami I, Ichikawa N, Yamada Y, Kurosawa H, Kaneko K, Arikawa-Hirasawa E, Synovial perlecan is required for osteophyte formation in knee osteoarthritis. *Matrix Biol*, 32, 178-187, 2013 (査読有)
4. Kaneko H, Ishijima M, Futami I, Kaneko

- K, et al., Reference intervals of serum hyaluronic acid corresponding to the radiographic severity of knee osteoarthritis in women. *BMC Musculoskeletal Disorder*, 14, 34, 2013 (査読有)
5. Shimura Y, Kaneko H, Futami I, Kaneko K, Ishijima M, et al, The factors associated with pain severity in patients with knee osteoarthritis vary according to the radiographic disease severity: A cross-sectional study, *Osteoarthritis Cartilage*, 21, 1179-84, 2013 (査読有)
  6. Ishijima M, Kaneko K, et al, Intra-articular hyaluronic acid injection versus oral non-steroidal anti-inflammatory drug for the treatment of knee osteoarthritis -a multicenter, randomized, open-label, non-inferiority trial, *Arthritis Res Ther*, 16, R18, 2014 (査読有)
  7. Hada S, Kaneko H, Kaneko K, Ishijima M, The degeneration and destruction of femoral articular cartilage shows a greater degree of deterioration than that of the tibial and patellar articular cartilage in early stage osteoarthritis: A cross-sectional study, *Osteoarthritis Cartilage*, 21, 1179-84, 2014 (査読有)
  8. Liu L, Ishijima M, Kaneko H, Kaneko K, et al, Disability for daily living is a predictor for joint replacement in patients with end-stage knee osteoarthritis, *J Bone Miner Metab*, 32, 192-99, 2014 (査読有)
  9. Ishijima M, Kaneko H, Kaneko K, The evolving role of biomarkers for osteoarthritis, *Ther Adv Musculoskel Dis*, 6, 144-53, 2014 (査読有)
  10. 石島旨章, 黒澤尚, 金子和夫, 変形性膝関節症におけるバイオマーカーの有用性 -バイオマーカーで捉える初期変形性膝関節症-, *Bone Joint Nerve*, 4, 75-83, 2012 (査読無)
  11. 石島旨章, 金子晴香, 金子和夫 他, 変形性膝関節症の病態・診断・治療の最前線, *順天堂医事雑誌*, 59, 138-151, 2013 (査読無)
  12. 石島旨章, 金子晴香, 金子和夫 他, 変形性膝関節症, *医学と薬学*, 70, 721-734, 2013 (査読無)
  13. 金子晴香, 二見一平, 定月亮, 平澤恵理, 山田吉彦, 金子和夫, 石島旨章. 変形性膝関節症の骨棘形成, パールカンの滑膜間葉系細胞制御による治療介入の可能性. 別冊整形外科 変形性膝関節症の診断と治療, 67, 218-222, 2014 (査読無)

[学会発表] (計 10 件)

1. Kaneko H, Sadatsuki R, Culley K, Otero M, Futami I, Hada S, Hirasawa-Arikawa E, Yamada Y, Kaneko K, Goldring MB, Ishijima M. OARSI2013, 2013 年 4 月 18-23 日, 2013, Philadelphia, USA. Osteoarthritis Cartilage, 21 Suppl, S43, 2013
2. 定月亮, 石島旨章, 金子晴香, 二見一平, 羽田晋之介, 劉立足, Anwarjan Yusup, 平澤恵理, 金子和夫. ヘパラン硫酸プロテオグリカン・パールカンによる滑膜間葉系細胞の軟骨分化制御機構の解析. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2013 年 10 月, 幕張, 千葉
3. 石島旨章, 変形性膝関節症における臨床症状と病態の連関のエビデンス, 広島県臨床整形外科医会招待講演, 2013 年 8 月, 広島, 広島
4. Sadatsuki R, Kaneko H, Futami I, Hada S, Culley KL, Otero M, Dragomir C, Kinoshita M, Goldring MB, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E, Kaneko K, Ishijima M, Role of perlecan in chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation of synovial mesenchymal calls. 2014, Osteoarthritis Research Society International (OARSI), 2014 年 4 月, Paris, France. *Osteoarthritis Cartilage*, 22, S439, 2014
5. 石島旨章, 変形性膝関節症の病態と下肢筋力, 第 6 回膝 OA と運動・装具療法セミナー招待講演, 2014 年 7 月, 浜松, 静岡
6. 石島旨章, 労働者における膝の痛みの影響と対策, 栃木県労災保険指定医協会招待講演, 2014 年 6 月, 宇都宮, 栃木

[図書] (計 5 件)

1. 石島旨章, 桜庭景植, 金子和夫, 理学・運動療法, 運動器の痛み プライマリケアシリーズ 膝と大腿部の痛み, 129-136, 2012, 南江堂, 東京
2. 石島旨章, 変形性膝関節症・保存療法, ベスト×ベストシリーズ「変形性関節症 (股関節・膝関節)」, 192-207, 2012, 研友出版, 東京
3. 石島旨章, 池田浩, 金子和夫, 歩行補助具, 変形性膝関節症の運動療法ガイド-保存的治療から術後リハまで-, 152-54, 2014, 日本医事新報社, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石島 旨章 (ISHIJIMA MUNEAKI)

順天堂大学大学院・医学研究科・整形外科

科・運動器医学・准教授

研究者番号: 70365576

(2)研究分担者

平澤恵理 (ARIKAWA-HIRASAWA ERI)

順天堂大学大学院・医学研究科・老人性疾患  
病態・治療研究センター・前任准教授

研究者番号：50245718

(3)連携研究者

関矢一郎 (SEKIYA ICHIRO)

東京医科歯科大学大学院・整形外科 軟骨再  
生学・教授

研究者番号：10345291