

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861316

研究課題名(和文)変形関節症における変性軟骨のコラーゲンネットワーク再構築

研究課題名(英文)Regeneration of collagen network in the degenerated articular cartilage

## 研究代表者

桑田 卓(Kuwata, Suguru)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：80509000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨の機能を保持するためには、コラーゲンの生理的架橋(クロスリンク)によるコラーゲンネットワークの構築と維持が重要である。クロスリンクの形成量を規定する酵素はリジルオキシダーゼ(LOX)である。変形性関節症においてLOXおよびクロスリンク量がどのように変化し、軟骨の力学的性質とどのように関連するかについては不明である。日本白色家兔の変形性膝関節症モデルを作成して調査した。軟骨変性の進行とともにGAGの含有量が低下するものの、クロスリンク量に有意な変化を認めなかった。変性軟骨で粘弾性が低下する傾向にあったものの、クロスリンク量との間に有意な関係を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Construction of the collagen network (collagen crosslink) is important to maintain the function of articular cartilage. Formation of the collagen crosslink is related to lysyl oxydase (LOX). In osteoarthritis, the change of LOX and crosslink is unclear. The association between crosslink and mechanical property of cartilage is unclear. I investigated the association between crosslink and osteoarthritis with the Japanese white rabbits. Content of GAG in the cartilage decreased with progress of the cartilage degeneration. On the other hand, the change of crosslink was not significant. Viscoelasticity of the degenerated cartilage decreased with progress of the cartilage degeneration. It did not have relation between viscoelasticity and quantity of crosslink.

研究分野：関節外科

キーワード：変形性関節症 関節軟骨 コラーゲンネットワーク リジルオキシダーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

日本国内で症状を有す変形性膝関節症患者は約1,000万人、潜在的な患者数は約3,000万人と推定されており、高齢化に伴ってその数はますます増加すると考えられている。

関節軟骨はいったん損傷あるいは変性を生じると自己修復を期待できない組織である。軟骨損傷の治療は、理学療法や消炎鎮痛剤の内服、ヒアルロン酸製剤の関節内注射といった保存療法のほか、手術療法として鏡視下骨穿孔術(骨髄由来細胞を誘導して線維軟骨による被覆を期待する手法)、骨軟骨柱移植術(本来の硝子軟骨での被覆を目的に膝関節内の非荷重部から採取した骨軟骨柱を移植する手法)などが用いられている。さらに近年では再生医学を利用した軟骨細胞移植が Brittberg ら(1994)により、またアテロコラーゲンゲルに軟骨細胞を包埋して3次元培養する組織工学的手法が Ochi ら(2000)によって臨床応用されてきた。

しかしながら変形性膝関節症では、荷重面の軟骨が広範囲に変性するためこれらの手法では対応が困難であり、最終的には人工膝関節置換術により除痛をはかる以外に有効な手段がないのが実情である。

関節軟骨の機能は主にグリコサミノグリカン(GAG)と type コラーゲンにより維持されている。加齢とともにこれらの含有量が減少し、荷重に対する粘弾性や剛性、水分保持能力、マトリックスプロテアーゼ(MMP)に対する抵抗性が低下するために軟骨変性が徐々に進行する。

これまでさまざまな成長因子やサイトカインにより軟骨細胞を刺激して、GAG 量や type コラーゲン量の増加を促進する研究が行われてきた。

しかしながら培養軟骨細胞組織の研究において、これらの含有量が単に増加するのみでは軟骨組織の力学的な機能は正常の硝子軟骨に及ばないことが示されている。

したがって軟骨機能を保持するためには、GAG と type コラーゲンのほかに第3の要素としてコラーゲンの生理的架橋(クロスリンク)によるコラーゲンネットワークの構築と維持が重要であると推察される。

クロスリンクの形成量を規定する酵素はリジロキシダーゼ(LOX)である。培養軟骨組織に LOX の阻害剤である  $\beta$ -アミノプロピオニトリル(BAPN)を付加するとクロスリンク量が減少し、同量の GAG とコラーゲンが含有された軟骨組織と比較して力学的

強度や MMP に対する抵抗性が低下することが報告されている(Asanbaeva 2008、Bastiaansen-Jenniskens 2008)。

一方、コラーゲン架橋のうち加齢に伴って増加することが知られている非生理的な AGEs (Advanced Glycation End products) 架橋は、非酵素的な酸化もしくは糖化反応により形成されるコラーゲン架橋であり力学的強度を低下させるものである。

変形性関節症の進行過程において LOX の発現量およびコラーゲンクロスリンク量がどのように変化し、軟骨の力学的性質とどのように関連するかについては全く不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の仮説を検証することにより変形性関節症の病態解明に新しい方法を提供するとともに、新しい治療法の可能性を探求することである。

- 仮説 : 加齢とともに関節軟骨内の LOX 発現量とクロスリンク量は減少する。
- 仮説 : 関節軟骨の力学的機能は LOX 発現量とクロスリンク量に依存する。
- 仮説 : 変性軟骨に LOX を負荷するとクロスリンク量が増加し力学的機能が正常軟骨に近づく。

以上の仮説に基づいて、下記の3項目を解明することを最終目標とした。

関節軟骨マトリックス内の LOX 発現量とクロスリンク量が変形性関節症の進行とともにどのように変化するかを明らかにする。

力学的機能が低下した変性軟骨では LOX 発現量とクロスリンク量がどのように変化しているかを明らかにする。

変性軟骨に LOX を付加することでクロスリンク量がどのように影響を受け、力学的機能がどのように変化するかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

日本白色家兔の前十字靭帯を切離して変形性膝関節症モデルを作成した。

術後 3、6、9、12 か月で安楽死させ、関節軟骨を直径 2 mm の円柱状に採取し凍結重量を測定し(図 1、図 2) 組織学的評価(変性の進行度)および 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB) assay により GAG の測定を行った。非手術側をコントロールとした。



図 1 日本白色家兔の膝関節。大腿骨内側顆から直径 2 mm の軟骨を円柱状に採取した。

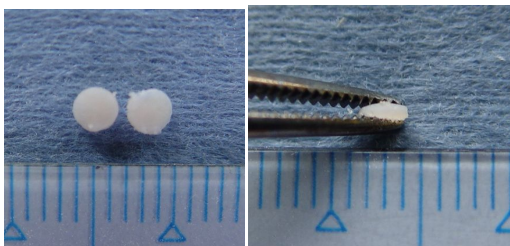


図 2 採取した関節軟骨

高速液体クロマトグラフィーによりヒドロキシプロリンの定量と、コラーゲンクロスリンク量としてヒドロキシリジルピリジノリンおよびリジルピリジノリンを定量し、クロスリンク量をコラーゲン分子ごとの残基数として明らかにした。

力学的評価を、インストロン力学万能試験機を用いて応力緩和挙動を測定した(図 3)。

一定の変位速度で初期厚の 20%まで圧縮変位を負荷し、その後一定時間保持することで挙動を観測した(図 4)。これにより変性軟骨の剛性や水分保持能を比較した( Lee 1981, Zhu 1993, Miyata 2004)。

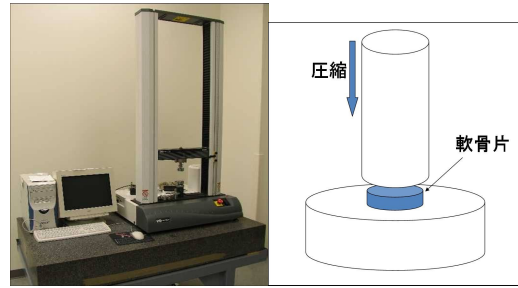


図 3 インストロン力学万能試験機を用いた圧縮試験

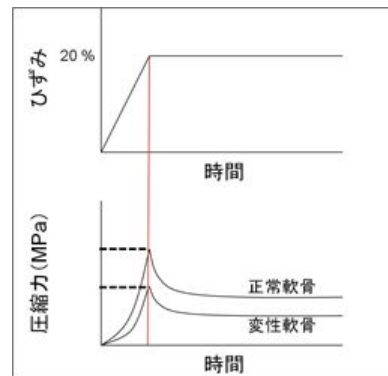


図 4 圧縮力-時間曲線

### 4. 研究成果

関節軟骨の変性の進行度を組織学的評価、生化学的評価、力学的評価であらわし、コラーゲンクロスリンク量との関連を調査した。

術後週数の進行とともに、軟骨の組織学的変性が進行し、術後 6 ヶ月までに GAG の含有量は 20.0-30.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  から 0.0-3.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  にまで低下した(図 5)。

一方で、軟骨変性の進行度および GAG 含有量とコラーゲン分子ごとのクロスリンク量との間に有意な関連を認めなかった。

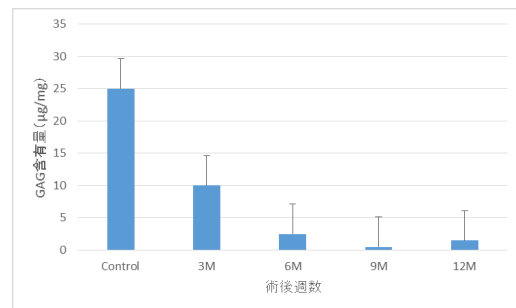


図 5 GAG 含有量と術後週数

力学的評価では、術後週数の進行とともに、軟骨の粘弾性は低下し、術後 12 ヶ月までに 0.85-1.2 MPa から 0.12-0.62 MPa にまで低下した（図 6）。変性軟骨において粘弾性が低下する傾向にあったものの、個体によって低下の程度に大きなばらつきを認めた。

一方で、粘弾性とコラーゲン分子ごとのクロスリンク量との間に有意な関連を認めなかった。

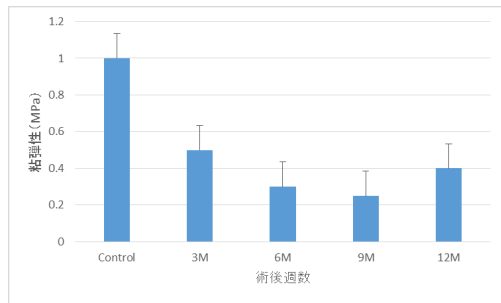


図 6 粘弾性と術後週数

今回用いた評価方法では、軟骨変性とクロスリンク量との関連を明らかにすることができなかった。したがって軟骨の変性の進行度を評価する方法として、より詳細な解析が必要である可能性があり、質量分析による二糖解析を試みている。この結果とクロスリンク量との関連を明らかにできるならば最終的な仮説の検証が可能となる。

軟骨変性の進行度とクロスリンク量との関連を証明することができれば、日本白色家兔の変形性膝関節症モデルへ各種濃度の LOX を負荷することにより、クロスリンク量をコントロールして、軟骨に対する生化学的影響の評価が可能になる。さらにこの生化学的変化と力学特性の変化の関連を評価できる。

関節軟骨への LOX の付加がクロスリンクを増加させ得るならば、関節軟骨の力学的機能や MMP に対する抵抗性を増加させて変形性関節症の進行を抑制する有効な手段になる可能性がある（図 7）。

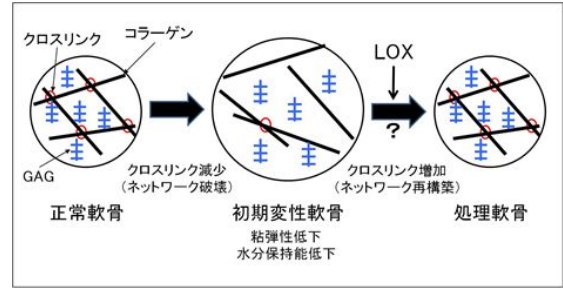


図 7 変性軟骨に LOX を負荷することでクロスリンク量が増加しコラーゲンネットワークが再構築され正常な力学的機能を回復する可能性がある。

## 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 0 件)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
 桑田 卓 (KUWATA SUGURU)  
 島根大学・医学部・助教  
 研究者番号：80509000

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者