

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861343

研究課題名(和文)変形性膝関節症の骨棘形成後期におけるパールカン機能解析

研究課題名(英文)The functional analysis of perlecan in the late stage of osteophyte formation in knee osteoarthritis

研究代表者

金子 晴香(Kaneko, Haruka)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50445516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症(膝OA)の骨棘は、滑膜間葉系細胞が内軟骨性骨化に類似した過程を辿り形成されるが、その機序の理解は十分ではない。ヘパラン硫酸プロテオグリカンのパールカンは、軟骨や滑膜に存在し、軟骨形成に必須の細胞外基質である。本研究では、関節軟骨辺縁の滑膜に発現するパールカンの欠損により、骨棘形成が、その早期過程と同様後期でも抑制されることを示し、滑膜のパールカンが骨棘形成の全過程において促進的に機能することを示した。

研究成果の概要(英文)：Osteophyte in knee osteoarthritis (knee OA) is formed from the mesenchymal cells present in the synovial membrane. The developmental process of osteophyte is similar to that of an endochondral ossification. However, it is still unclear their molecular mechanisms. Perlecan is a heparan sulfate proteoglycan present in the extracellular matrix of cartilage and synovium and is one of the essential factors for the cartilage development. The aim of this study was to investigate the role of perlecan expressed in the synovial membrane adjacent of the edge of articular cartilage in the late stage of osteophyte formation in knee OA. The absence of synovial perlecan suppressed the osteophyte formation in the late stage of knee OA. The results of the present study suggests that perlecan expressed in the synovial membrane promotes osteophyte formation in the late stage, in addition to the early stage, of knee OA.

研究分野：変形性関節症

キーワード：変形性膝関節症 骨棘 滑膜 軟骨分化 パールカン

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会の日本では健康寿命を延ばすことが政策の一つとして取り上げられている。ロコモティブシンドロームとは運動器の障害により要介護になるリスクの高い状態を示し、その代表的な疾患として膝関節痛や膝可動域制限、関節変形を起こす変形性膝関節症(膝 OA)が挙げられる。膝 OA は推定患者 2500 万人以上と報告されており (Muraki, *Osteoarthritis Cartilage*, 2009), 健康寿命を延伸させる上でその対策が必要である。しかし、膝 OA の分子レベルの病態の理解は乏しく、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、半月板や軟骨下骨、骨棘、そして滑膜も従来以上に病態に関与すると考えられている (Felson, *Nature Med*, 2006; Englund, *Arthritis Rheum*, 2009; Goldring, *Arthritis Rheum*, 2011)。例えば、東大 ROAD スタディーの解析では、骨棘は特に ADL 低下の増悪因子であることが明らかとなった (Muraki, *Arthritis Rheum*, 2011)。膝 OA には様々なサブタイプが存在すると考えられ、分子レベルの病態を解明する上で骨棘や滑膜に焦点を置くことも重要と考える。我々は、膝 OA の臨床症状は、従来考えられてきた関節軟骨の変性や摩耗の程度以上に、滑膜炎の程度と強く相関することを示した (Liu, Kaneko, *Clin Rheumatol*, 2010; Ning, Kaneko, *Int Orthop*, 2011)。さらに、滑膜細胞は力学的負荷への応答能をもち、線維芽細胞や筋細胞で認められる細胞外カルシウム流入機構とは異なる機序で力学的負荷に応答していることを示した (Sakamoto, Kaneko, *J Orthop Res*, 2010)。

骨棘は、関節辺縁に形成される骨隆起であり、骨棘が形成される辺縁に存在する滑膜の滑膜間葉系(幹)細胞(MSCs)が何らかのシグナルを受け増殖し、続いて軟骨へ分化し軟骨棘を形成する。さらに、そこへ血管侵入に伴い軟骨から骨へと置換され骨髓腔を形成する。この骨棘形成過程は、発生期の内軟骨性骨化に類似している (von den Berg, *Osteoarthritis Cartilage*, 2007)。この過程にトランスフォーミング増殖因子-1(TGF- β 1)、骨形成タンパク質-2(BMP-2)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、インスリン様成長因子 1(IGF-1)をはじめとする各種成長因子が関与するが、その機序についてはいまだ明らかでない部分が多く残されている。さらに、骨棘形成の分子レベルでの機序のみならず、臨床的意義も不明な点が多い。従って、骨棘の病態解明は、膝 OA の病態の理解の発展にもつながると考える。

パールカンは、細胞外マトリックスとしてすべての基底膜と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。ヒト及びマウスにおいてパールカ

ンが完全に欠損すると、軟骨形成不全を示し胎生致死となる (Hirasawa, *Nat Genet*, 1999; 2001)。よってパールカンは正常な軟骨形成に必須の機能を有している。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その接着剤として働き、細胞の機能保全の機能をもつ (Whitelock, *Biochemistry*, 2008)。末期 OA の軟骨において、パールカンの発現亢進が報告されており (Tesche, *Osteoarthritis Cartilage*, 2004)、また、膝 OA の滑膜にパールカンは発現し、初代滑膜培養細胞のパールカンの発現は TGF- β 1 刺激により上昇することも報告されている (Dodge, *Lab Invest*, 1995)。よって、膝 OA の発症機構にパールカンの関与が示唆される。しかし、膝 OA におけるパールカンの機能解析は進んでいない。

2. 研究の目的

我々は、これまでの膝 OA に対する滑膜の研究成果から膝 OA の病態の中でその発生に滑膜が関与する骨棘形成に注目した。本研究の目的は、膝 OA において、滑膜細胞が軟骨分化し骨棘を形成する過程において、パールカンのどのような役割を担っているかを明らかにすることである。特に、その骨棘形成過程の中期および後期の解析を中心に行った。

3. 研究の方法

(1) マウス

パールカン欠損マウスは胎生致死のため、型コラーゲンのプロモーター/エンハンサーを用いて軟骨に発現するパールカンを回復させたトランスジェニックマウスを作成し、このマウスをパールカン欠損マウスと掛け合わせた。これらマウスから生まれるマウスは生存及び生殖が可能となり、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) (Xu, *Matrix Biol*, 2010; Ishijima, *Matrix Biol*, 2012)。従って、滑膜パールカンの機能解析が可能となる。In vivo モデルでは 11 から 12 週齢の雌マウスを用い、コントロールとしては同腹のヘテロ型マウスを用いた。In vitro では 10 週齢の雌マウスを用い、コントロールとしては同腹の野生型マウスを用いた。

(2) 膝 OA モデル

本研究では、2 種類の膝 OA モデルを用いた。1 つ目は内側側副靭帯の切離と内側半月板を切除する膝不安定性による内側 OA モデルである (Kamekura, *Osteoarthritis Cartilage* 2005)。対側には関節包を切開して縫合するのみの偽手術を施行した。評価は術後 4 週と 8 週に加えて 12 週で行った。2 つ目は骨棘形成を誘導する TGF- β 1 関節内注射モデルを用

いた(van Lent, Arthritis Rheum 2004). 皮膚小切開から TGF- β 1 を 200ng 含む液体を 6 μ l 関節内に 1 日おきに 3 回注射し, 注射終了 1 週間および 2 週後に膝関節を評価した.

(3) 組織学的評価

膝関節を 4%パラホルムアルデヒドに 48 時間浸し, 固定後, 10%エチレンジアミン四酢酸脱灰液にて 10 日間脱灰したのち, パラフィン切片を作成した. 3.5 mm厚の冠軸断面にて膝関節を評価した. 染色はサフラン O ファーストグリーン染色を用いた. 膝関節内側コンパートメントを OARSI histopathology initiative の推奨する方法を用いて OA の半定量化を行った (Kamekura, Osteoarthritis Cartilage 2005; Glasson, Osteoarthritis Cartilage 2010). 軟骨評価は, 構造とプロテオグリカン量の 2 項目を用い, 構造は 8 段階 (0, 0.5, 1-6), プロテオグリカン量は 6 段階 (0-5) で評価した. 滑膜は滑膜表層の重層化の程度を 4 段階 (0-3) で評価した. 骨棘は大きさで評価し, サイズは 4 段階 (0-3) 成熟度は 5 段階 (0-4) で評価した.

(4) 免疫染色

パラフィン切片を用いて, α 1(I) 型および α 2(I) 型コラーゲンおよびパルカンの免疫染色を行った. 組織学的に染色形態について検討した.

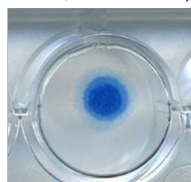
(5) マウス滑膜細胞培養

我々が以前に報告した方法を用いて, マウス膝蓋下脂肪体部に付着している滑膜を採取した (Futami, PLoS One, 2012). 採取した滑膜を細かくしたのち, 0.1%コラーゲナーゼに 15 分間反応させ, 初代培養細胞を得た. その後継代を行い, 4 継代目の細胞を以下の実験に用いた.

(6) 滑膜細胞の軟骨誘導

3 次元培養である, マイクロマス培養の方法を用いて軟骨誘導を行った (図 1). 5.0×10^5 cells/10 μ L の細胞の細胞塊を作りシャーレ上に静置した. そのマイクロマスを軟骨誘導培地 500 μ l 中で 37 $^{\circ}$ C にて培養した. 軟骨誘導培地は, 高グルコースダルベッコ改変イーグル培地中に 10 ng/ml TGF- β 3, 100 nM デキサメタゾン, 50 μ g/ml アスコルビン酸, 40 μ g/ml プロリン, 100 μ g/ml ピルビン酸, 1:100 希釈した ITS premix (Sigma) を用いた. 培地は 3 日に 1 回交換し, 3 日および 14

図1 マイクロマス培養



アルシアンブルー染色

日間の培養を行った.

(7) mRNA の解析

培養細胞より mRNA を採取し, Real time-PCR 法を用いて解析した. 軟骨分化マーカー (α 1(I) 型コラーゲン, α 2(I) 型コラーゲン) にて分化を確認し, 血管新生に関わる成長因子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現等について定量した.

(8) 統計学的解析

多群間比較には分散分析を用い, 2 群間の比較は独立 T 検定を行った. 有意差 5 パーセント未満を統計学的有意とした.

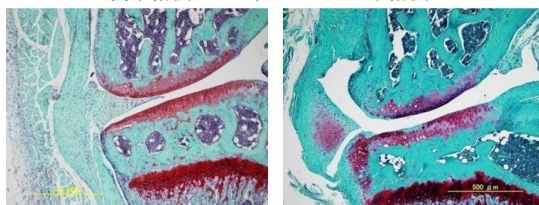
4. 研究成果

(1) 膝不安定性内側 OA モデル

組織学的 OA 変化

コントロールマウスおよび滑膜パルカン欠損マウスに膝不安定性内側 OA モデルを作成すると, 偽手術側と比較し, 手術施行後 4 週・8 週・12 週で軟骨変性及びプロテオグリカン量減少そして滑膜炎の変形性膝関節症性変化を呈していた (図 2). 一方, コントロールマウスでは認められる骨棘形成が, 滑

図 2 (1) 膝不安定性内側 OA モデル
偽手術側 手術側



膝関節内側

膜パルカン欠損マウスでは抑制されており, 統計的にも滑膜パルカン欠損マウスの骨棘スコアは, コントロールマウスに比し有意に低値であった. コントロールマウスの手術施行後 4 週の骨棘はいまだ軟骨成分が中心であるが, 術後 8 週および 12 週において, 骨棘の大きさのみならず骨棘の成熟度スコアが増加し, 軟骨成分が骨成分のある骨棘に成熟したのに対し, 滑膜パルカン欠損マウスでは有意な変化は認められなかった.

骨棘内の軟骨の分化

滑膜パルカン欠損マウスの骨棘では, 軟骨の成熟分化度を表す α 1(I) 型コラーゲンおよび α 2(I) 型コラーゲンの発現がコントロールマウスに比し低下しており, 術後週数が経過しても同様であった. コントロールマウスでは, 軟骨細胞の配列が整っているのに対し, 滑膜パルカン欠損マウスではその配列が乱れていた.

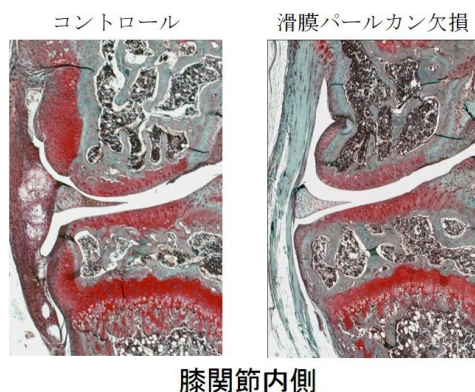
(2) TGF- β 1 関節内注射モデル

組織学的 OA 変化

上記の如く, 滑膜パルカンの膝 OA 骨棘形

成への関与が認められたことから、TGF- β 関節内投与による骨棘形成モデルを用いて、さらに骨棘形成の機序を検討した。TGF- β の関節内投与により、コントロールマウス及び滑膜パールカン欠損マウスではともに骨棘が形成されたが、滑膜パールカン欠損マウスの骨棘は、コントロールマウスの骨棘と比較して、サイズと成熟度がともに有意に低値であった(図 3)。コントロールマウスにおいても TGF- β の投与のみでは軟骨成分のみの骨棘が形成され、骨棘の骨分化までは至らなかった。

図 3 (2) TGF- β 関節内注射モデル



(3) 滑膜細胞の軟骨誘導

コントロールマウス滑膜細胞では、軟骨の主成分である II 型コラーゲンの軟骨誘導後期 14 日後の発現は、軟骨誘導 3 日後に比し、有意に増加したのに対し、滑膜パールカン欠損マウス滑膜細胞では、軟骨誘導 3 日後も 14 日後も、コントロールマウス滑膜細胞と比べ発現が低かった。さらに、VEGF は、コントロールマウス滑膜細胞では軟骨誘導後期 14 日後において、3 日後に比べ明らかな発現の上昇を認めたのに対し、滑膜パールカン欠損マウス滑膜細胞では、その発現が 3 日後でも 14 日後でも認められなかった。

以上から、滑膜に発現するパールカンは、膝 OA 発症時に滑膜に存在する間葉系幹細胞から発生する骨棘の形成過程の中・後期においても、促進的に機能することが示唆された。

骨棘の臨床的意義は長く不明であり、機序を解明し制御する試みは国内外で行われていない。本研究において、骨棘とパールカンの機能の一部を解明したことにより、OA の病態の新たな分子機構という基礎的知見を得ることができた。骨棘形成早期に加え、中後期の知見を得ることにより、さらなる骨棘形成機序の解明につながる。今後これらの知見は「滑膜パールカンの発現量調整による骨棘形成制御」という新たな膝 OA 治療法開発につながる可能性と、滑膜からの軟骨再生の効率化の新知見供与の可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. Ishijima M, Kaneko H, Kaneko K, The evolving role of biomarkers for osteoarthritis, *Ther Adv Musculoskel Dis*, 6, 144-53, 2014 (査読有)
7. 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 4 件)

1. Kaneko H, Sadatsuki R, Culley K, Otero M, Futami I, Hada S, Hirasawa-Arikawa E, Yamada Y, Kaneko K, Goldling MB, Ishijima M. OARSI2013, 2013 年 4 月 18-23 日, 2013, Philadelphia, USA. *Osteoarthritis Cartilage*, 21 Suppl, S43, 2013
2. 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 cells. 2014, Osteoarthritis Research Society International (OARSI), 2014年4月, Paris, France. Osteoarthritis Cartilage, 22, S439, 2014

3. 定月亮, 石島 旨章, 金子 晴香, 二見一平, 劉 立足, Yusup Anwarjan, 羽田 晋之介, 木下 真由子, Goldring Mary B., Yamada Yoshihiko, 平澤 恵理, 金子 和夫. パールカンによる滑膜間葉系細胞の維持ならびに分化誘導の制御. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014年10月, 鹿児島, 鹿児島
4. 定月亮, 石島旨章, 金子晴香, 羽田晋之介, 木下真由子, 金子和夫, 平澤恵理. パールカンは SOX9 遺伝子発現制御を介して滑膜間葉系細胞の軟骨分化誘導を制御する. 第47回日本結合組織学会学術大会, 2015年5月, 東京, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 晴香 (KANEKO, Haruka)

順天堂大学大学院・医学研究科・整形外科・
運動器医学・助教

研究者番号：50445516