

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861213

研究課題名(和文)変形性膝関節症に関連する滑膜の力学的負荷応答機序におけるパールカンの機能

研究課題名(英文)Role of perlecan for proliferation and differentiation of synovial mesenchymal cells

研究代表者

二見 一平 (Ippei, Futami)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30722516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は変形性膝関節症の骨棘形成に関節軟骨辺縁近傍の滑膜に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンのパールカンが必須であり、滑膜間葉系細胞(mSMCs)が力学的負荷に応答することを示してきた。本研究ではパールカンの滑膜における力学負荷応答機序を、細胞を用いて検証した。関節内では軟骨のみにパールカンを発現し滑膜では発現のないマウスと対照マウスより滑膜を採取しmSMCsを培養したのち、力学的負荷応答能及び増殖能を検討した。mSMCsに伸展刺激をかけ、至適強度は5%、0.5Hzであり、その強度では増殖能に差はなかった。以上よりパールカンは伸展刺激に対するmSMCsの増殖に必須ではないと結論付けた。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that perlecan, a heparan-sulfate proteoglycan (Hspg2), was essential for osteophyte formation in knee osteoarthritis and also that synovial mesenchymal cells (mSMCs) were responded to mechanical stress. In this study, we examined the role of perlecan in the proliferation and differentiation of SMCs, using a recently established mouse synovial cell culture method. Primary SMCs isolated from Hspg2<sup>-/-</sup>Tg (Hspg2<sup>-/-</sup>;Col2a1-Hspg2Tg<sup>-/-</sup>) mice, in which the perlecan-knockout was rescued from perinatal lethality, lack perlecan. It has found that the 5% stretching with 5Hz interval was the adequate condition of the stretching for mSMCs and that no significant differences of the proliferation of mSMCs isolated from Hspg2<sup>-/-</sup>Tg were observed in comparison to those isolated from control mSMCs. In conclusion, synovial perlecan is not required for the proliferation of mSMCs in response to mechanical stress.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性膝関節症 滑膜 間葉系細胞 骨棘 力学的負荷

1. 研究開始当初の背景

滑膜は、関節の裏打ち構造をとり、関節液の産生を通じて関節内の恒常性維持を司る。また、豊富な増殖能と軟骨や骨といった同じ間葉系組織への分化能をもつ。これを応用して、滑膜間葉系幹細胞を含んだ滑膜細胞を用いて軟骨再生を行う臨床応用がすでに始まっているが、その効率の制御など課題が多い。一方、運動器慢性疾患にも関与している。それは変形性膝関節症(以下、膝OA)の骨棘形成である。

膝OAは、関節軟骨の変性と摩耗が病態の首座であるが、半月板や軟骨下骨、骨棘、そして滑膜も病態に関与する(Felson, *Nature Med*, 2006; Englund, *Arthritis Rheum*, 2009; Goldring, *Arthritis Rheum*, 2011)。申請者らは、膝OAの臨床症状は、滑膜炎の程度と強く相関することを示してきた(Liu, *Futami, Clin Rheumatol*, 2010; Ning, *Futami, Int Orthop*, 2011)。従来、膝OAの骨棘への関心は低かったが、近年骨棘は臨床症状の特にADL低下の増悪因子であることが明らかとなっている(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つつあり、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。

OAでは、その主病変としての関節軟骨の変性のうち、(軽微な)外傷など膝関節内への局所的に過剰な力学的負荷がかかると関節軟骨は摩耗する。この摩耗した関節軟骨片は、滑膜を刺激し、滑膜から炎症性サイトカインが放出される。これはマトリックスメタロプロテアーゼなどのタンパク分解酵素の発現を亢進し、さらに関節軟骨の変性と摩耗を助長する。同時に、関節軟骨辺縁に存在する滑膜間葉系幹細胞を刺激し、滑膜間葉系幹細胞は軟骨分化をする。軟骨細胞へと分化した滑膜間葉系幹細胞は、胎生期の内軟骨性骨化と類似した過程を辿り、軟骨を経て骨へと分化することで骨棘が形成される(von den Berg, *Osteoarthritis Cartilage*, 2007)。申請者らは、この滑膜に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種であるパールカンに注目し、膝OAの骨棘形成に果たすパールカン役割について研究を進めてきた。

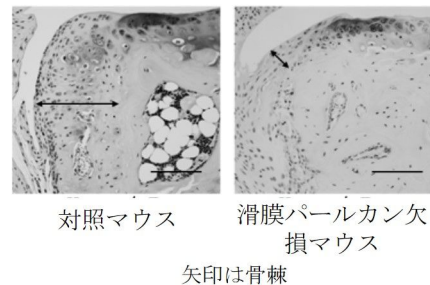
パールカンは、細胞外マトリックスとして基底膜に発現し、また基底膜のない軟骨や滑膜にも発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、成長因子や細胞と受容体の結合を通して接着し、細胞増殖や分化を制御する。また、種々のマトリックスと結合してマトリックスの接着剤として働き、組織層を支え、その機能保全に必要と考えられている。研究協力者の平澤恵理博士と山田吉彦博士は、パールカン欠損マウスの作成とヒト遺伝子疾患の

解析から、マウスやヒトでパールカンの機能完全欠損は、致死性軟骨異形成症を発症することを明らかにした。このことから、パールカンは軟骨の分化に必須の分子であると考えられている(Hirasawa, *Nat Genet*, 1999, 2001)。

申請者らは、パールカンが血管内皮細胞増殖因子(VEGF)シグナルの調整を介して、内軟骨性骨化の血管侵入にも関与することを、*in vivo*にて示した(Ishijima, *Futami, Matrix Biol*, 2012)。

また、申請者らは、研究協力者が作成した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ため滑膜パールカンの機能解析ができるマウス(Hspg2-/-Tgマウス)(Xu, *Matrix Biol*, 2010)に、膝不安定性膝OA誘発モデルを行った研究を行い、パールカンが膝OAの骨棘形成に関与することを*in vivo*にて示した(図1)(Kaneko, *Futami, Matrix Biol*, 2013)。

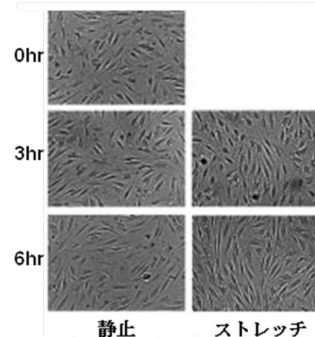
図1. 滑膜パールカン欠損による骨棘形成制御



前述の如く、膝OAの骨棘には、関節内への過剰な力学的負荷が、直接的にも関節的にも関与していることが明らかとなっている。しかし、力学的負荷に起因する何らかの刺激から骨棘が形成される機序については、いまだ不明な点が多いというのが現状である。

われわれは、ストレッチチャンパーを用いた研究を行い、ヒト滑膜細胞が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することを示した(図2)(Sakamoto, *Futami, J Orthop Res*, 2010)。

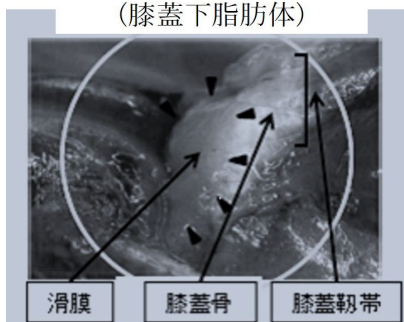
図2. ストレッチによる滑膜細胞の偏向



さらに、遺伝子改変マウスの滑膜を用い *in*

*in vitro* の実験を行うには、マウスの膝関節から正常滑膜を採取し培養する方法の確立が必要であった。申請者らは、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の培養法を確立した(図3)。

図3. マウス滑膜の採取  
(膝蓋下脂肪体)



そして、この採取した滑膜細胞が骨・脂肪・軟骨に分化し、幹細胞としての能力を備えることを示した(Futami, Ishijima, PLOS One, 2012)。

これにより、マウス滑膜細胞を用いた *in vitro* の研究が可能となった。

パールカンは骨格筋や骨細胞において力学的負荷受容シグナルを制御する働きを持つことが示されている(Xu, Arakawa-Hirasawa, Matrix Biol, 2010)(J Bone Miner Res, 2013)。しかし、滑膜においてパールカンが力学的負荷受容機序に関与しているか否かの検討は行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、前述の如く、それまでの研究成果を基に、われわれが確立したマウス膝滑膜細胞培養法を用いて得た *Hspg2*<sup>-/-</sup>-Tg マウスの培養滑膜細胞にストレッチチャンバーを用いた実験を行うことで、パールカンが滑膜の力学的負荷応答機序にどのような作用を有するかを *in vitro* にて検証することを目的とした。

## 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である。そこで、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のパールカン発現を回復させたトランスジェニックマウスを作成した。このマウスをパールカン欠損マウスと掛け合わせ生まれたマウスは、生存及び生殖が可能となり、関節内では軟骨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。本研究では、10週のマウスを用い、対照として、ワイルド型を用いた。

### (2) 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%コラゲナーゼに15分間反応させ、初代培養細胞を採取した。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。

### (3) マウス滑膜細胞の至適力学的負荷の設定

ストレックス社製ストレッチチャンバーに滑膜パールカン欠損マウス滑膜と対照マウス滑膜をまいた(50,000個/cm<sup>2</sup>)。10%, 0.1Hz, 10%, 0.5Hz, 15%, 0.5Hz, 20%, 0.5Hz, 5%, 0.5Hzの5パターンのストレッチ刺激を2または4時間加え、刺激後のチャンバーへの細胞の接着比を単位面積当たりで算出した。

### (4) 滑膜細胞の力学的負荷に対する応答能

ストレックス社製ストレッチチャンバーに滑膜パールカン欠損マウス滑膜と対照マウス滑膜をまいた(50,000個/cm<sup>2</sup>)。至適力学的負荷でストレッチ刺激を加え、細胞増殖能を計測した。

### (5) 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。5.0×10<sup>5</sup> cells/10μLの細胞の細胞塊を作りシャーレ上に静置した。そのマイクロマス軟骨誘導培地500μL中で37℃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10ng/mlトランスフォーミング増殖因子(TGF)-β3, 100nMデキサメタゾン, 50μg/mlアスコルビン酸, 40μg/mlプロリン, 100μg/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、12時間および72時間培養した。

### (6) 組織学的評価

マイクロマスに4%パラホルムアルデヒドに15分固定後、pH2.5のアルシアンブルーで2時間染色し、写真を撮影した。

### (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(Sox9, Sox5, Col2a1, PPAR)の発現量を解析した。

### (8) タンパク発現量の解析

培養細胞よりタンパク質を採取し、Western Blotting法を用いて解析した。軟骨

分化における TGF- $\beta$  の下流シグナルである (Smad2/3 および p38MAPK) のリン酸化タンパク量を解析した。

#### (9) 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) マウス滑膜細胞の力学負荷に対する応答能におけるパルカンの機能解析

マウス滑膜細胞の至適力学的負荷の設定滑膜パルカン欠損マウスと対照マウスの膝関節から初代滑膜細胞が単離及び培養は可能であった。これらの細胞に我々がヒト滑膜細胞に行っていた伸展刺激 10%, 0.1Hz で刺激を行ったが、細胞が接着表面からはがれた。次に、伸展条件および波長などの各種ストレス条件を 10%, 0.5Hz, 15%, 0.5Hz, 20%, 0.5Hz, 5%, 0.5Hz の 4 パターンで検討し、5%, 0.5Hz が至適条件であると設定した。

#### マウス滑膜細胞の増殖能

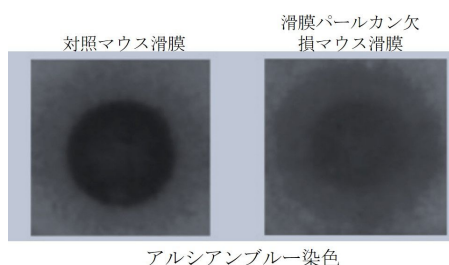
上記至適条件において、滑膜パルカン欠損マウスと対照マウスの増殖能を検討したところ 2 群間に差は認められなかった。つまり、滑膜に発現するパルカンは、マウス滑膜細胞の伸展刺激による増殖能には必須の分子ではないことが明らかとなった。

#### (2) マウス滑膜細胞の軟骨分化能におけるパルカンの機能解析

##### 組織学的分析

滑膜パルカン欠損マウス滑膜と対照滑膜から 3 次元培養にて軟骨分化誘導すると、誘導後 72 時間後のアルシアンブルー染色によるプロテオグリカン合成量は、滑膜パルカン欠損滑膜で対照マウス滑膜に比して有意に少なかった(図 4)。

図4. マイクロマス培養



##### 分子生物学的解析

上記と同様に滑膜パルカン欠損マウス滑膜と対照マウス滑膜から 3 次元培養にて軟骨分化誘導し、誘導後 12 時間後、Sox9, Sox5, Col2a1, PPAR の mRNA の発現が、いずれも滑膜パルカン欠損マウス滑膜において対

照マウス滑膜に比べ有意にその発現が低下していた。この滑膜パルカン欠損滑膜にパルカンを添加して軟骨誘導すると、Sox9 の発現は濃度依存的に回復した。

次に、この軟骨分化誘導に関わるシグナル経路をタンパク質レベルで解析すると、滑膜パルカン欠損マウス滑膜で、TGF- $\beta$  による Smad2/3 および p38 MAPK のリン酸化が対照マウス滑膜と比較して有意に低下していた。

以上から、パルカンは伸展による力学的負荷における滑膜パルカン欠損マウス滑膜の増殖に影響を与えなかった。また、パルカンは TGF- $\beta$  による Smad2/3 および p38MAPK を介した滑膜細胞の軟骨分化に促進的に作用しており、滑膜細胞の軟骨分化誘導過程を制御している可能性が示唆された。

滑膜の豊富な増殖能と特に軟骨への分化能をより効果的かつ効率的に制御できれば、軟骨再生のみならず、OA といった疾患の新たな治療法の開発にも有益となる可能性がある。しかし、その滑膜の機能に関しては不明な点も多い。本研究において、滑膜とパルカンの機能の一部を解明したことにより、滑膜の新たな基礎的知見を得ることができた。今後これらの知見は、軟骨再生医療のみならず、力学的負荷の影響の大きい、膝 OA の特に骨棘の分子機構の解明や形成制御等の治療につながる可能性がある。

### 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 12 件)

Sadatsuki R, Kaneko H, Kinoshita M, Futami I, Nonaka R, Culley KL, Otero M, Hada S, Goldring MB, Yamada Y, Kaneko K, Arikawa-Hirasawa E, Ishijima M: Perlecan is required for the chondrogenic differentiation of synovial mesenchymal cells through regulation of Sox9 gene expression. J Orthop Res, 2016  
doi:10.1002/jor.23318(査読あり)

Yusup A, Kaneko H, Liu L, Ning L, Sadatsuki R, Hada S, Kamagata K, Kinoshita M, Futami I, Shimura Y, Tsuchiya M, Saita Y, Takazawa Y, Ikeda H, Aoki S, Kaneko K, Ishijima M: Bone marrow lesions, subchondral bone cysts and subchondral bone attrition are associated with histological synovitis in patients with end-stage knee osteoarthritis: A cross-sectional study.

Osteoarthritis Cartilage, 23, 1858-64, 2015 doi: 10.1016/j.joca.2015.05.017 (査読あり)

Hada S, Kaneko H, Sadatsuki R, Liu L, Futami I, Kinoshita M, Yusu A, Saita Y, Takazawa Y, Ikeda H, Kazuo 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 knee osteoarthritis: A cross-sectional study. Osteoarthritis Cartilage, 21, 1179-84, 2014 doi: 10.1016/j.joca.2014.07.021 (査読あり)

Ishijima M, Kaneko H, Kubota M, Liu L, Sadatsuki R, Hada S, Kinoshita M, Yusup A, Futami I, Sakamoto Y, Shimura Y, Naito K, Watari T, Saita Y, Takazawa Y, Kim SG, Ikeda H, Nagaoka I, Arikawa-Hirasawa E, Kurosawa H, Kaneko K: Osteoarthritis of the knee as one of the major musculoskeletal diseases responsible for locomotive syndrome: The role of synovitis in pain.

Juntendo Medical Journal, 60, 300-11, 2014 (査読あり)

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, 67, 218-222, 変形性膝関節症の診断と治療, 2015 (査読なし)

〔学会発表〕(計5件)

Kinoshita M, Kaneko H, Ishijima M, Sadatsuki R, Futami I, Hada S, Arita H, Shiozawa J, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, Kaneko K: The mechanism of perlecan in the chondrogenic differentiation from synovial mesenchymal cells. OARSI 2016, アムステルダム(オランダ)

木下真由子, 金子晴香, 石島旨章, 定月亮, 二見一平, 平澤恵理, 山田吉彦, 金子和夫: 滑膜間葉系細胞の軟骨分化におけるパールカンの作用機序. 第29回軟骨代謝学会, 2016年2月20日, 広仁会館(広島県, 広島市)

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30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015年10月22日, 富山国際会議場(富山県富山市)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二見一平 (FUTAMI, Ippei)

順天堂大学・医学部・整形外科整形外科スポーツ診療科・非常勤助教

研究者番号: 30722516