

平成 21年 6月 16日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591766

研究課題名（和文） 変形性関節症の軟骨修復機転における血管内皮増殖因子の役割

研究課題名（英文） Involvement of Vascular Endothelial Factor in the remodeling process of Osteoarthritic Cartilage

研究代表者

榎本 宏之（ENOMOTO HIROYUKI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10256315

研究成果の概要：

変形性関節症（OA）は運動機能低下をきたし、診断と治療の進歩が期待される。我々は血管内皮増殖因子（VEGF）が修復機転である軟骨表層の滑膜性パンヌス下に高発現することを確認した。パンヌスで VEGF 受容体が発現していたことから、VEGF が滑膜遊走を促進していることが示唆された。また、VEGF 阻害剤は、OA で特徴的な骨棘形成を抑制したことから、変性軟骨の滑膜被覆および骨棘形成における役割が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、軟骨、血管新生、軟骨変性

## 1. 研究開始当初の背景

急速に進行する高齢化社会で変形性関節症（以下 OA）の罹患患者数は増加しており、関節機能障害とその治療に関する社会的経済的コストは多大である。OA の病因病態は依然として不明な点が多いが、病態を一層解明して新たな治療戦略を構築することは多大な社会貢献につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

我々は変性軟骨由来の VEGF が血管内皮細胞を含む滑膜組織に対して走化促進作用をもち、滑膜細胞から軟骨細胞への化生や骨棘形成に至る過程で重要な役割を果たしているとの仮説に基づき以下の三点を解明することを目的に研究した。

線維性滑膜パンヌスおよびそれにより被覆された関節軟骨や骨棘における

VEGF およびその受容体の発現

OA 軟骨細胞由来 VEGF の滑膜に対する juxtacrine 作用、とくに滑膜の走化性、メタロプロテアーゼ産生に対する作用

動物 OA モデルにおける VEGF の滑膜パンヌス形成や骨棘形成における関与、および VEGF 作用調節による病態調整の可能性

### 3. 研究の方法

#### 滑膜パンヌス、骨棘における VEGF および受容体の発現と局在の検討

転写レベルでの発現 (RT-PCR): 人工関節置換術時に得られた骨軟骨片から、total RNA を抽出し VEGF アイソフォームおよびその受容体の発現を RT-PCR にて検討。

VEGF mRNA の発現局在の検討 (*in situ* hybridization) VEGF 発現と局在 (免疫染色)パンヌスで覆われた関節軟骨、滑膜パンヌス組織内で VEGF およびその受容体の局在を検討。滑膜パンヌス内で VEGF およびその受容体を発現する細胞の同定 (免疫 2 重染色 およびに 2-colored Fluorescence Activated Cell Sorting: FACS): 滑膜組織内で VEGF およびその受容体を発現する細胞種を 2-colored FACS にて検討。

#### VEGF の OA 滑膜細胞に対する作用の検討

人工関節置換術時に得られた OA 滑膜細胞を培養し以下の *in vitro* アッセイを行った。

滑膜細胞に対する VEGF の走化作用の検討: Wang ら(1994)の方法に準じて 8 $\mu$ m 孔の modified Boyden chamber (Invasion assay kit) に 5 x 10<sup>5</sup> cell/ml の濃度で播種し、下のウェルへ VEGF165 を各種濃度で添加。24 時間後に上部ウェルに残存した細胞数をカウントし、移動した細胞数を吸光度計で測定して VEGF 無添加群と比較検討。同様に TGF- $\beta$ 1、bFGF を添加した際の効果について

も検討し、VEGF の効果と比較検討。滑膜細胞によるメタロプロテアーゼ産生に対する VEGF の効果: OA 滑膜細胞に VEGF165 を 1, 10, 50 ng/ml 添加して total RNA を抽出。転写および蛋白レベルでの MMP-1, 3, 13, MT1-MMP, aggrecanase 活性をもつ ADAMTS-1, 4, 5, 9 発現に対する効果を定量 RT-PCR を用いて検討した。

#### 実験 OA モデルにおける VEGF の役割についての検討

Blom らの方法 (2004) に準じて 1 unit の type VII コラゲナーゼを隔日で 2 回関節内に注入する HE および Safranin-O 染色にて滑膜炎、軟骨変性、滑膜パンヌス、骨棘形成などの変化を組織学的に検討し、VEGF の発現および局在を免疫染色で検討。van den Berg らの方法 (1994) に準じて TGF- $\beta$ 1 を隔日で 3 回関節注入する。最終注射から 2 週間後に屠殺して と同様の検討。

#### VEGF 作用調節による OA の滑膜、骨、軟骨病変の進行抑制効果の検討 (*in vivo*)

コラゲナーゼ群に対して、可溶性 flt-Fc をコラゲナーゼ注入直後に関節内へ注入した群 (可溶性 flt 群) を作成する。滑膜増生の程度、新生血管数、滑膜パンヌスの程度、軟骨変性の程度、骨棘の大きさを 2 群間で比較検討する。可溶性 flt-Fc に対して、抗 VEGFR-2(flkl-1, KDR) 中和抗体を用いた場合の変化についても検討。TGF- $\beta$ 1 投与 OA モデルに対しても と同様に抑制効果を検討する。

### 4. 研究成果

OA 変性軟骨を覆う滑膜パンヌスおよび骨棘における VEGF の発現について検討したところ、転写レベルでは恒常的に VEGF121, VEGF165, VEGF181 の 3 種のアイソフォームを発現していた。また、受容体は変性部の

軟骨細胞、変性部を覆う線維性パンヌス、骨棘で発現していた。本結果は変性軟骨、滑膜パンヌス、骨棘いずれの組織においても VEGF および受容体が発現し、その作用点として autocrine、paracrine、juxtacrine に作用する可能性が示唆された。これまで、VEGF の OA 軟骨における発現はその変性、破壊に関与すると考えられてきたが、軟骨修復機転においても病態に関与することが示唆された。また、VEGF は in vitro において OA 滑膜細胞に対する走化作用を有することが判明した。変形性関節症の軟骨変性および修復機転における VEGF の役割について引き続き検討した。すでに我々は変性軟骨由来の VEGF が autocrine に作用した場合の効果について報告しているので、滑膜細胞とくに損傷軟骨表面を覆う滑膜パンヌスへの作用、損傷軟骨が修復された後の骨棘形成における作用を中心に検討した。平成 19 年度に滑膜パンヌスおよび骨棘における VEGF の発現、そして VEGF の滑膜細胞への走化作用の結果をふまえ、平成 20 年度は in vivo における VEGF の軟骨修復機転への関与、そして VEGF 作用阻害剤による影響を検討することにより、TGF-beta を介さない、VEGF の修復機転への直接作用を明らかにした。また、マウス関節炎モデルを作製して以下の知見を得た。Blom らの方法に準じて作製したコラゲナーゼ誘導関節炎モデルでは関節内で骨棘形成が確認され、VEGF はヒトと同様に軟骨変性度に比例して発現が高かった。また、変性した軟骨を覆う滑膜パンヌス、骨棘部線維軟骨組織において高発現していた。van den Berg らの方法による TGF-beta 誘導関節炎モデルにおいても骨棘形成と関節内線維化がみられ、骨棘部位に VEGF が発現していたことから、TGF-beta の骨棘形成作用の 1 部が TGF-beta を介していることを確認する

ことができた。現在、これらの OA モデルマウスに可溶性 flt-Fc または抗 VEGFR-2 抗体を投与した際の変化について検討中である。中間解析では、滑膜組織中の毛細血管の増殖が抑制され、軟骨の変性が抑制されている。また、骨棘の形成も抑制されている。現在、これらの新知見につき定量評価の方法を検討中であり、平成 21 年度中に学会発表および論文作成を完了する予定である。

#### 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 3 件)

Naito S, Shiomi T, Okada A, Kimura T, Chijiwa M, Fujita Y, Yatabe T, Komiya K, Enomoto H, Fujikawa K, Okada Y. Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol Int* 2007, 57(11):703-711.

Kobayashi A, Naito S, Enomoto H, Shiomi T, Kimura T, Obata K, Inoue K, Okada Y: Serum levels of matrix metalloproteinase-3 (Stromelysin 1) for monitoring synovitis in rheumatoid arthritis. *Arch Pathol Lab Med* 2007, 131(4):563-570

榎本宏之、Apte SS、岡田保典：変形性膝関節症の軟骨破壊と修復機転におけるプロテアーゼと血管内皮増殖因子の関与、別冊整形外科 53: 42-26, 2008

以上すべて査読誌

[学会発表](計 3 件)

Enomoto H, Kobayashi S, Saito S, Momohara S, Niki Y, Inoue K, Toyama Y, Suda Y, Clinical significance of cytokines in synovial fluid as predictive markers of joint destruction. In Annual Meetings of American Academy of Orthopaedic Surgeon, Las Vegas, USA, 25<sup>th</sup> Feb 2009

Enomoto H, Vasanji A, Birk D, Apte SS,  
MT1-MMP regulates collagen fibril growth  
in tendon and ligament, In Orthopaedic  
Research Society, Las Vegas, USA, 21th Feb  
2009

Enomoto H, Somerville R, Mielke K,  
Powell Kand Apte SS, The evolutionarily  
conserved, homologous metalloproteases  
ADAMTS9 and ADAMTS20 cooperate in closure  
of the mouse secondary palate. In  
Orthopaedic Research Society, San  
Francisco, USA, 4<sup>th</sup> Mar 2008

〔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〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎本 宏之 (ENOMOTO HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10256315

### (2) 研究分担者

二木 康夫 (NIKI YASUO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10276298

### (3) 連携研究者