

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20019

研究課題名(和文) 滑膜に発現するパールカンの調整による変形性膝関節症の骨棘制御

研究課題名(英文) Regulation of osteophyte formation in knee osteoarthritis by modulating the function of perlecan expressed in synovium

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症(膝OA)の病態は多岐にわたるが、我々は滑膜に発現するヘパリン硫酸プロテオグリカン・パールカンの膝OA骨棘形成における滑膜炎への機能を検討した。滑膜のパールカン欠損により、膝OA早期の関節軟骨変性に差は認めず、骨棘形成は抑制され、滑膜炎が促進した。滑膜のパールカンは、滑膜間葉系細胞の軟骨分化能のみならず、滑膜の炎症にも役割を持ち骨棘形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As the pathology of knee osteoarthritis (knee OA) is diverse, we focused on synovitis and osteophyte formation in the knee OA. The aim of this study was to investigate the role of perlecan expressed in synovium in the early stage of synovitis and osteophyte formation in knee OA. The absence of synovial perlecan suppressed osteophyte formation and enhanced synovitis, although there was no difference in articular cartilage degeneration in the early stage of knee OA. These results suggest that that perlecan plays an important role for not only the cartilage differentiation from synovial mesenchymal cells but also for the synovial inflammation, which may be involved in osteophyte formation.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性膝関節症 滑膜 骨棘 パールカン 軟骨分化

## 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を起こす膝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まだまだ乏しく、疾患修飾型治療法は存在せず、改善型治療法が主たる治療法である。

膝OAは軟骨変性を病態の主座とする疾患であるが、半月板・軟骨下骨・骨棘・滑膜等関節内のさまざまな組織が病態に関わると考えられている(Felson, Nature Med, 2006; Goldring, Arthritis Rheum, 2011)。さらに、膝OAの臨床症状においても、軟骨変性だけでなく、東大のROADスタディーでは、骨棘がADL低下にかかわると報告され(Muraki, Arthritis Rheum, 2011), また我々も、滑膜炎と膝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相関することを示した(Liu, Kaneko, Clin Rheumatol, 2010; Ning, Kaneko, Int Orthop, 2011)。このように、膝OAに関わる病態は多岐であり、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。

我々は、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)。また、滑膜に存在するMSCsへ力学的負荷などが誘因となり、内軟骨性骨化の過程と類似し、軟骨を経て骨へと分化する骨棘(von den Berg, Osteoarthritis Cartilage, 2007)に着目し、滑膜に発現するパールカンに焦点をあて、膝OAの骨棘形成に果たす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。パールカン欠損マウス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し、パールカンが軟骨分化に必須である(Hirasawa et al., Nat Genet, 1999 & 2001)。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。近年、神経や骨髄ニッチにおけるMSCsの増殖や分化の制御にパールカンが関与する可能性が示唆されている(Soulez, Stem Cells 2010; Kerever, Hirasawa, Stem Cell Res, 2014)。さらに我々は、パールカンが

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示した(Ishijima, Kaneko, Matrix Biol, 2012)。

我々は、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, Hirasawa, Matrix Biol, 2010)に、膝不安定性膝OA誘発モデルおよびTGF- $\beta$ 関節内注射による骨棘誘発モデルを用いた研究から、滑膜のパールカン欠損による骨棘形成抑制を示し、TGF- $\beta$ が関与する膝OAの骨棘形成過程におけるパールカンの重要性をin vivoにて示した(Kaneko et al., Matrix Biol, 2013)。改変マウスから滑膜を採取してin vitroの実験を行うために、確立されていなかったその採取法を開発した(Futami, Kaneko et al., PLOS One, 2012)。その方法を用いて採取したパールカンの欠損した滑膜MSCsは、軟骨への分化を経て、骨棘へ分化する過程の初期段階が抑制されることをin vitroにおいても示した(定月他, 第29回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014)。これまでの研究成果により、滑膜のパールカンの膝OAの軟骨分化の過程を介した骨棘への役割を示してきたが、いまだその機序に関して不明な点が残る。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、膝OAに対するパールカンの治療応用へ向け、滑膜MSCsから軟骨分化を経て骨棘形成に至る過程での滑膜パールカンの作用機序の解析することである。

## 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パールカンを発現するように回復させたパールカン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である。このマウスは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せず(滑膜パールカン欠損マウス)、滑膜パールカンの機能解析が可能となる(Xu et al, Matrix Biol, 2010; Kaneko et al., Matrix Biol, 2013)。実験は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) マウス滑膜採取

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, et al., PLoS One, 2012)。

### (3) 形態学的解析

光学顕微鏡を用いて、滑膜パールカン欠損マウスおよびコントロールマウスの滑膜を観察した。

(4) 滑膜発現因子の網羅的解析

滑膜パールカン欠損マウスとコントロールとマウスから採取した滑膜をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

(5) mRNAの解析

マウス滑膜よりmRNAを採取し、Real time-PCR法を用いてCCL21およびCCR7の発現を解析した。

(6) 免疫染色

採取した滑膜のパラフィン切片を用いて、CCL21およびCCR7の免疫染色を行い、その発現量をタンパク質レベルで確認した。

(6) 膝OAモデル

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モデルを用いた(Kamekura et al, 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1週で行った。

(7) 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。3.5mm厚の冠軸断面にて膝関節を評価した。染色はサフラニン0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 et al., Osteoarthritis Cartilage 2005; Glasson et al., Osteoarthritis Cartilage 2010)。軟骨評価は、構造とプリテオグリカン量の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。骨棘は大きさと成熟度で評価し、サイズは4段階(0-3)、成熟度は5段階(0-4)で評価した。滑膜はヒト滑膜炎のLoeuilleスコアに従い、滑膜表層細胞数・滑膜下層の炎症細胞浸潤・表面フィブリン沈着・新生血管数・線維化・血管周囲浮腫の6項目を各4段階(0-3)で評価した(Loeuille et al., Arthritis Rheum, 2005)。

(8) 免疫染色

膝関節のパラフィン切片を用いて、CCL21およびCCR7の免疫染色を行った。組織学的に染色強度について検討した。

(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) 滑膜形態学的変化

滑膜パールカン欠損滑膜とコントロール滑膜では光学顕微鏡を用いたその形態にはなかった。

(2) 網羅的解析結果

滑膜パールカン欠損マウスとコントロールマウスから採取した滑膜をDNAマイクロアレイ法にて網羅的に解析した。滑膜パールカン欠損滑膜において、コントロール滑膜の2倍以上発現の亢進している2遺伝子を検出した。2倍以上発現の亢進している遺伝子はCCL21, Mmrn1であった。そのうち、CCケモカインのサブファミリーで、CCR7と結合し、さらにヘパラン硫酸プロテオグリカンと強い結合性を持つことが報告されているCCL21[Chemokine (C-C motif) ligand 21]に注目した。

(3) 滑膜のCCL21およびCCR7の発現

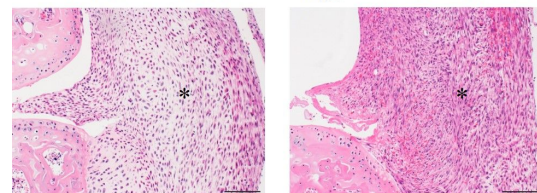
マウス滑膜のmRNAの発現を確認すると、滑膜パールカン欠損滑膜において、コントロール滑膜に比べ、CCL21およびCCR7の発現が上昇していた。また、採取組織の免疫染色においてもCCL21およびCCR7の発現は滑膜パールカン欠損滑膜でコントロールに比して高かった。

(4) 膝OAモデル組織学的変化

コントロールマウスおよび滑膜パー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1週においても軟骨変性に有意な差は認めなかったが、骨棘形成、滑膜炎は偽手術側に対して膝OA変化を呈していた。

コントロールマウスに比して、滑膜パールカン欠損マウスでは軟骨棘を含む骨棘の大きさに差はなかったが、成熟が遅れており、統計的にも滑膜パールカン欠損マウスの骨棘成熟スコアは、コントロールマウスに比し有意に低値であった。さらに、滑膜表層細胞数、炎症細胞浸潤、表層のフィブリン沈着、新生血管、繊維化、血管周囲浮腫にて評価した滑膜炎スコアは、滑膜パールカン欠損マウスの滑膜炎が、コントロールマウスの滑膜炎より炎症が強く、統計学的にも滑膜炎スコアは滑膜パールカン欠損マウスでコントロールマウスより有意に高値であった(図1)。

図1：膝OA後1w：滑膜炎  
コントロールマウス 滑膜パールカン欠損マウス



\*：滑膜炎

(5) 膝OAモデルマウスのCCL21およびCCR7の発現

滑膜パールカン欠損マウスの滑膜において、コントロール滑膜に比べ、CCL21およびCCR7の染色性が高く、その発現は亢進していた。

本研究の結果から、滑膜MSCsの軟骨分化能のみならず、滑膜の炎症も骨棘形成に関与する可能性が示唆された。滑膜パールカンは滑膜の炎症を制御し、滑膜MSCsの軟骨分化を促進する働きがある可能性があり、その経路にCCL21およびCCR7の関与が示唆された。

今後のさらなる研究が必要となるが、膝OAの滑膜炎および骨棘の分子機序の新たな知見を示した。膝OAの滑膜炎および骨棘は2次的変化であるが、その痛みや日常生活動作への影響は大きく、近年注目がさらに集まっており、「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ことを期待される。さらに、現在臨床応用が進められている滑膜からの軟骨再生の効率化へ向け、炎症のコントロールによる効率的な軟骨分化の獲得等に新知見供与できる可能性も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

1. Shimura Y, Kurosawa H, Tsuchiya M, Sawa M, Kaneko H, Liu L, Makino Y, Nojiri H, Iwase Y, Kaneko K, Ishijima M: Serum interleukin 6 levels are associated with depressive state of the patients with knee osteoarthritis irrespective of disease severity. Clin Rheumatol. (査読有) DOI: 10.1007/s10067-017-3826-z, 2017
2. 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. 35(4):837-846, 2017 (査読有) DOI: 10.1002/jor.23318
3. Hada S, Ishijima M, Kaneko H, Kinoshita M, Liu L, Sadatsuki R, Futami I, Yusup A, Takamura T, Arita H, Shiozawa J, Aoki T, Takazawa Y, Ikeda H, Aoki S, Kurosawa H, Okada Y, Kaneko K: Association of medial meniscal extrusion with medial tibial osteophyte distance detected by T2 mapping MRI in patients with early-stage knee osteoarthritis. Arthritis Res Ther. 19(1):201, 2017 (査

- 読有) DOI: 10.1186/s13075-017-1411-0
4. Liu L, Ishijima M, Kaneko H, Sadatsuki R, Hada S, Kinoshita M, Aoki T, Futami I, Yusup A, Arita H, Shiozawa J, Takazawa Y, Ikeda H, Kaneko K: The MRI-detected osteophyte score is a predictor for undergoing joint replacement in patients with end-stage knee osteoarthritis. Modern Rheumatology. 27(2):332-338, 2017 (査読有) DOI: 10.1080/14397595.2016
  5. Sugawara Y, Ishijima M, Kurosawa H, Shimura Y, Kaneko H, Liu L, Futami I, Iwase Y, Kaneko K: Preoperative timed single leg standing time is associated with the postoperative activity of daily living in aged disabled patients with end-stage knee osteoarthritis at six-months after undergoing total knee arthroplasty. Mod Rheumatol. 27(2):326-331, 2017 (査読有)DOI: 10.1080/14397595.2016

〔学会発表〕(計 6件)

1. 有田 均, 金子 晴香ら(10名中2番目): パールカンが関連する膝滑膜間葉系細胞の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析. 第49回日本結合組織学会学術大会, 2017
2. 有田 均, 金子 晴香ら(11名中2番目): パールカンにより制御される滑膜間葉系細胞の遺伝子の網羅的解析. 第32回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017
3. Mayuko K, Kaneko H, et al. (11名中2番目): Perlecan regulates chondrogenic differentiation from synovial mesenchymal cells via Smad and MAPK signaling pathways. OARSI 2016 World Congress, 2016
4. 木下 真由子, 金子 晴香ら(12名中2番目)パールカンによる滑膜間葉系細胞からの軟骨分化制御. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会. 2016
5. 木下 真由子, 石島 旨章, 金子 晴香ら(8名中3番目)パールカンによる滑膜間葉系細胞からの軟骨分化制御. 第48回日本結合組織学会学術大会, 2016

6. 研究組織

(1)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

(2)研究協力者

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