

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19380178

研究課題名(和文)：COMP断片化とMMP活性に基づく、関節疾患の分子病態学的研究

研究課題名(英文)：Analysis of COMP fragments and MMP activities of arthritis

研究代表者

三角 一浩 (MISUMI KAZUHIRO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：10291551

研究成果の概要(和文)：[研究1] 馬の滑液および血清中 COMP 測定のためのサンドイッチ ELISA 法の確立\_\_ 馬の関節軟骨由来の COMP に対する複数のモノクローナル抗体についてエピトープマッピングを行うとともに、それらを組合せて sandwich ELISA による COMP 測定系を検討した。mAb2A11 を固層化抗体として用い、mAb11F10 をビオチン化抗体として用いる直接 sandwich 法(SE)を確立し、関節症(OA)馬と健常馬より採取した滑液および血清を用いて、COMPを定量し、従来法(inhibition法、IE)と比較した。SE法ではOA馬の血清COMP値も健常馬群と比較して有意に高い値を示した一方で、IE法では血清COMP濃度に両群間で有意差はなかった。SE法による滑液および血清中のCOMP濃度は、mAb11F10を用いたときのIE法の結果と高い相関を示した。新しく確立した sandwich ELISA 法は滑液および血清中のCOMP濃度の測定法として高い信頼性を持ち、特に血清のような非特異的な影響の大きい検体に対しても inhibition ELISA 法に比べより高い特異性を示すことが明らかとなった。

[研究2] SKG マウスの免疫介在性関節炎の進行を予測する分子マーカーの検討\_\_ 6週齢のSKGおよびBALB/cマウスを用いて、ラミナリンで誘導される関節炎の進行に伴うCOMPとマトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)-3の血中濃度の推移を検討した。SKGマウスでは、希釈血漿中のMMP-3は関節炎の臨床スコアの悪化と正の相関を示した。一方、希釈血漿中のCOMP濃度は、臨床症状の進行を反映しなかった。安楽死によって得た血清中のCOMPおよびMMP-3濃度はいずれも、対照群であるBALB/cと比較して有意に高い値を示した。COMPおよびMMP-3の血清レベルはいずれも関節炎マウスで上昇するけれども、同一個体から繰り返し採血して測定値を得るには適さない。一方、MMP-3濃度は希釈血漿を用いた場合においても、SKGマウスにおける関節炎の進行を表わす客観的な分子マーカーであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：[Study 1] Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine synovial fluid and serum.\_\_ New monoclonal antibodies (mAbs) were elicited against equine cartilage COMP, their epitopes were determined, and a sandwich ELISA was developed. The concentrations of COMP in synovial fluid and sera from OA cases were measured by the new sandwich ELISA as well as by the previous inhibition ELISA and compared with concentrations in normal joints and horses. Sandwich ELISA with the combination of unlabeled 2A11 × biotinylated 11F10 mAbs detected a significant increase in COMP levels in both serum and SF from OA cases compared with levels in normal animals. Measurement of serum COMP with sandwich ELISA could be useful in identifying horses with OA.

[Study 2] Effect of chronic autoimmune arthritis on the blood level of biomarkers in SKG mice.\_\_ Six-week-old SKG and BALB/c mice were intraperitoneally injected with laminarin. Once weekly for 17 weeks, the severity of arthritis was scored and blood was collected in heparinized tubes. SKG mice exhibited increased arthritis scores 3 weeks after inoculation with laminarin, and histological analysis at 18 weeks confirmed synovitis and

destruction of cartilage and subchondral bone. MMP-3 concentrations in diluted plasma from SKG mice increased starting at 8 weeks after inoculation and were positively correlated with increased arthritis scores. MMP-3 concentrations did not change in BALB/c mice. COMP and MMP-3 concentrations in serum obtained at 18 weeks after inoculation were higher in SKG mice compared to BALB/c mice. Increased concentrations of both COMP and MMP-3 in serum could be potential markers of arthritis in SKG mice. MMP-3 concentrations in plasma could be also an indicator of chronic arthritis in SKG mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：変形性関節症、関節リウマチ、細胞外マトリックス、診断マーカー、軟骨、滑膜】

### 1. 研究開始当初の背景

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) は軟骨の細胞外基質構成分子の1つであり、関節疾患モデル動物の軟骨損傷の指標、あるいは変形性関節症 (OA) や慢性関節リウマチ (RA) 患者の関節破壊予後の診断マーカーとしての有用性が期待されている。モデル動物では滑液と血清を、人の臨床では血清を用いたサンドイッチ ELISA 測定系が確立され、近年キット製品化された。しかしながら、これらの系では動物由来のサンプルを測定するには制限があった。

COMP 測定キットを用いた多くの研究では、血清マーカーとしての病態検出の感度や特異度を再評価したとき、最新の生化学マーカーである尿中Ⅱ型コラーゲン C テロペプチド (CTXⅡ) よりも関節症の検出感度・特異度共に低い傾向が示されていた。しかしながら、尿中 CTXⅡは骨コラーゲンである CTXⅠとの相関を示すことから、必ずしも軟骨の基質代謝のみを反映する分子ではないという考え方も提唱されている。

COMP は軟骨の他にも、滑膜・半月板・腱・靭帯に分布することが知られているが、これら軟骨以外の組織損傷と関連した血中レベルの変化は報告されていない。臨床医学においては、血清 COMP 値は尿中 CTXⅡと同等の予後予測マーカーであることを示す変形性関節症患者からの予後調査結果も示されてい

る。

### 2. 研究の目的

本研究は、軟骨基質に由来する COMP と基質分解の主役である MMPs に着目し、動物の自然発症性関節症 (OA) 例あるいは疾患モデル動物を用いて、軟骨破壊の進行に伴う滑液・血清・尿中の COMP 濃度・断片化パターンと酵素活性の変化を解析し、その関係を総合的に評価することであった。

### 3. 研究の方法

【研究1】 馬の軟骨由来COMPとその特異抗体を作成し、それら抗体を組合せることによって、滑液、血清、尿サンプル中のCOMP定量のためのサンドイッチ ELISA を確立する。

【研究2】 自然発症 RA モデル (SKG マウス) における血中 COMP およびマトリクスメタロプロテイナーゼ (MMPs) 活性を解析する。

【研究3】 コラーゲン誘発性 RA モデル (CIA ラット) を用い、各種関節基質マーカーの有用性を比較検討する。

【研究4】 運動負荷による馬の滑液・血液中の COMP 濃度の変化を評価する。

【研究5】 馬の滑液における COMP 濃度およびその断片化パターンとゼラチナーゼ活性の関係を解析する。

#### 4. 研究成果

[研究 1] 馬の滑液および血清中 COMP 測定のためのサンドイッチ ELISA 法を確立し、要旨は概要にも示した。

馬の関節軟骨由来 COMP に特異的なモノクローナル抗体 (14G4, 11F10, 2A11, 3C8) のエピトープマッピングを行うとともに、それらの組合せによる sandwich ELISA による COMP 測定系を検討した。モノクローナル抗体 2A11 と 3C8 は、極めて類似した部位を認識している一方で、11F10 のエピトープは他の 3 つの抗体とは全く異なる部位であることが確認された。11F10 と比較して、2A11 および 3C8 はタンパク分解酵素活性に対してより抵抗性のあるエピトープを認識することが示唆された。

4 つの抗体のうち 2 つの組合せを比較検討した結果、mAb2A11 を固着化抗体として用い、mAb11F10 をビオチン化抗体として用いる直接 sandwich 法 (SE) の検出精度が高いことを確認し、滑液ならびに血清中の COMP 測定系として確立した。この測定系を用いて、OA 馬と健常馬より採取した滑液および血清について、COMP を定量し、従来法 (inhibition ELISA) で得られた測定値と比較した。

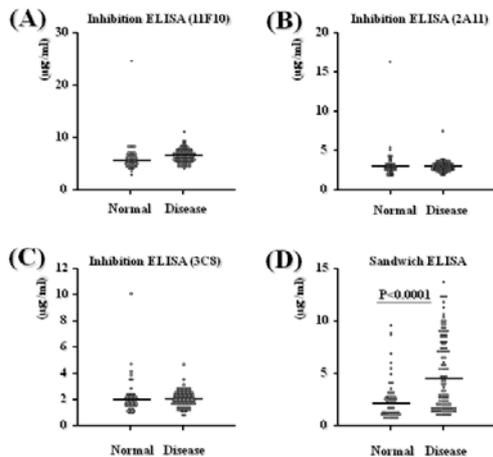


図 1. Inhibition ELISA と sandwich ELISA による血清中の COMP 濃度. Sandwich ELISA で得た血清値は、正常馬の者と比較して関節疾患の馬で有意に高値を示した (D)。

従来法の結果と同様に、SE 法による OA 関節の滑液中の COMP 濃度は、正常関節よりも有意に高い値を示した。従来法では血清 COMP 濃度に両群間で有意差はなかったものの、SE 法では OA 馬の血清 COMP 値も健常馬群と比較して有意に高い値を示した (図 1)。SE 法による滑液および血清中の COMP 濃度は、mAb11F10 を用いたときの従来法の結果と高い相関を示した。新しく確立した sandwich ELISA 法は、滑液および血清中の COMP 濃度の

測定法として高い信頼性を持ち、特に血清のような非特異的な影響の大きい検体に対しても、高い特異性を示す測定系であることが明らかとなった。

[研究 2] SKG マウスの免疫介在性関節炎の進行を予測する分子マーカーの検討についても研究要旨は概説した。

6 週齢の SKG および BALB/c マウスを用いて、ラミナリンで誘導される関節炎の進行に伴う COMP とマトリクスメタロプロテナーゼ (MMP) -3 の血中濃度の推移を検討した。ラミナリン投与後 17 週間、1 週間ごとに 50 $\mu$ l の採血をヘパリン処理したヘマト管で採血し、速やかに PBS で希釈して遠心分離し、上清 (希釈血清) を得た。また 18 週目で安楽殺した際に心臓採血し、血清を得た。希釈血漿ならびに血清中の COMP および MMP-3 濃度をそれぞれ ELISA 法で定量した。

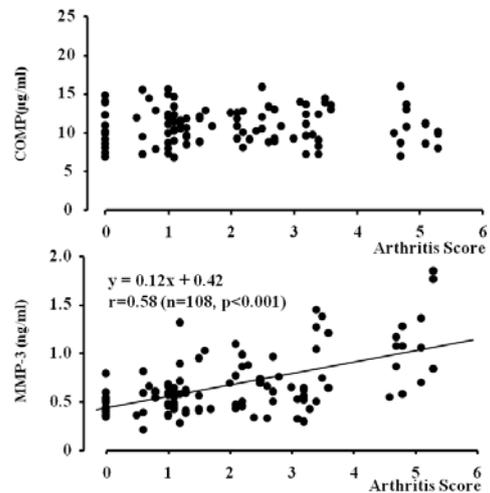


図 2-1. SKG マウスにおける血漿中の COMP および MMP-3 濃度と関節炎スコアとの相関関係. 血漿中 COMP 値はスコアとの間に正の相関を認めた (下段の散布図)。

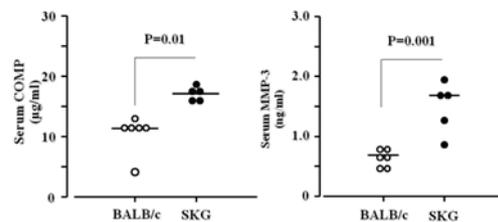


図 2-2. SKG マウスにおける血清中の COMP および MMP-3 濃度. 安楽殺の際に心臓採血して得た血清を使用した。いずれも SKG で有意に高値を示した。

SKG マウスにおいては、希釈血漿中の MMP-3 濃度は関節炎が進行するにしたがって有意に上昇し、臨床スコアとの間に有意な

正の相関を示した (図 2-1)。一方、希釈血漿中の COMP 濃度は臨床スコアと正の相関がなかった (図 2-1)。安楽殺のときに得た血清を用いたとき、血清中の COMP および MMP-3 濃度はいずれも、対照群である BALB/c と比較して有意に高い値を示した (図 2-2)。

関節炎のマウスモデルでは、これまで主観的な臨床症状スコアから重症度を示すのが一般的であった。本研究では、希釈血漿中の MMP-3 濃度が SKG マウスにおける関節炎の進行を表わす客観的な分子マーカーであることを明らかにした。

これまで血清 MMP-3 値は関節炎の重症度を示唆するマーカーとして有用であることが明らかにされている。しかし同一個体から頻回採血し血清値を得る方法は、マウスモデルでは適用困難である。本研究では、採血量を最小限にとどめ、希釈血漿を用いて測定することにより、誘発される関節炎の重症度を客観的に知ることができることを示した。

関節炎マウスの血清マーカーの測定には、多数の動物を飼育し、経時的に安楽殺して血清値を求めるのが一般的に行われる。本研究成果は必要最小数の動物を飼育し、同一個体から繰り返し採血して、血中マーカーによる関節炎の客観的な監視を可能としたものである。実験動物の福祉の点からも有益な成果と考えている。

[研究 3] コラーゲン誘発 RA モデル (collagen-induced arthritis, CIA ラット) を用い、関節基質マーカーの有用性について比較検討を行った。

8~9 週齢の Lewis ラットに牛由来 II 型コラーゲンとアジュバントを 1 週間間隔で 2 回感作させて実験的関節炎を誘導した。経時的に採血と採尿を行い、COMP を定量するとともに、C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen (CTX II) および C-reactive protein (CRP) の血中濃度の推移を検討した。2 回目の接種後 2 週間で関節の腫脹が発現し、臨床スコアはその後次第に上昇した。

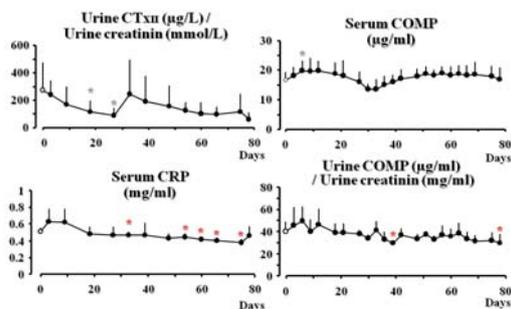


図 3. CIA ラットにおける血清中 CRP, COMP および尿中 CTX2, COMP 濃度。

コラーゲン接種に反応して、血清 CRP 値は一過性に有意に上昇したものの、スコアの悪化と一致した変化を認めなかった。これと同様に血清 COMP 値も、接種後一過性に上昇した (図 3)。一旦低下した血清 COMP 値は再上昇の傾向は示したものの、臨床スコアの上昇と正の相関は示さなかった。尿中 COMP 値も同様に臨床スコアと一致した変化を示さなかった。軟骨基質マーカーとして信頼性の高い、CTX II は、接種前値が高く次第に低下する傾向があり、関節炎の進行と関連した変化を見出すことができなかった。

CIA ラットを使った実験では、血清中の CRP と COMP 値が一過性に上昇した。それぞれ抗原接種に伴う一過性の全身的な炎症や滑膜炎を反映していることが示唆された。関節軟骨の破壊は比較的軽微であり、関節軟骨の破壊に関連した軟骨代謝マーカーの変動も検証されなかった。疾患モデルを用いた運動負荷試験前後におけるマーカー分子の変動を調べる必要性が示唆された。

[研究 4] 運動負荷による馬の滑液および血液中の COMP 濃度の変化について検討を行った。

4 頭のサラブレッド種成馬を用いた。試験期間中は、供試馬はすべて通常どおりの調教メニューを継続した。2 週間で合計 4 回の規定運動負荷試験を行った。規定運動負荷試験はすべてトレッドミル上で行い、1 回の規定運動負荷試験における基本的な運動負荷 (走行速度で表示) は、1.8m/秒で 2 分間、3.6 m/秒で 5 分間、6.0 m/秒で 1 分間、7.0 m/秒で 1 分間、8.0 m/秒で 1 分間、9.0 m/秒で 1 分間、10.0 m/秒で 1 分間、11.0 m/秒で 1 分間、そして 12.0 m/秒で 1 分間とした。実際の最大運動負荷・運動時間は、各時期における馬の運動能力により異なり、体力が限界に達した時点で運動を終了した。運動負荷試験前と、各速度での運動時間内の最後の 10 秒間、運動負荷試験終了 1 分後、3 分後、5 分後、10 分後に頸静脈に留置したカテーテルから採血を行い、血清を得た。

運動負荷によって血清 COMP 値は上昇した。運動前と比較すると運動時の血清 COMP 値は 1.2~1.5 倍に上昇し、運動後 5 分以内に低下傾向となり、運動前値に復することが示された (図 4)。運動負荷により血清中の COMP レベルが上昇することは関節から血液への COMP の汲みだしが運動によって高まっている可能性が示唆された。このことを検証するために、規定運動負荷試験前後における滑液中の COMP 濃度を測定したところ、滑液中の COMP は運動によって血中に汲み出されるという仮説が実証された。

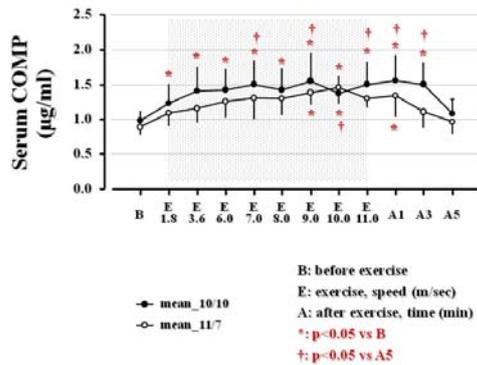


図 4. トレーニング前後における馬のトレッドミル規定運動負荷試験中および後の血清 COMP 値の変化. 運動負荷によって血清値は上昇し、運動後に低下している. トレーニングを行うことによって、その上昇曲線は下方に移動している.

また運動負荷による血清 COMP 値の上昇曲線を 1 ヶ月間のトレーニング期間をはさんで比較すると、トレーニング後の曲線はトレーニング前曲線よりも低く推移することが示唆された (図 4)。この結果はこれまでに育成馬で認められた知見と相反する結果であった。すなわち、成馬においては、育成期に一旦高まった軟骨代謝は鎮静化している可能性が示唆された。発育期及び成熟期では、トレーニングに対する軟骨基質代謝の変化が異なる可能性が示唆された。

[研究 4-2] 育成トレーニング前の馬を対象としたトレッドミル上での規定運動負荷試験前後における血清 COMP 値の変動を検討している。成馬と同様に、運動負荷によって血清中の COMP 濃度は上昇することがこの時期の若い馬においても確認されている。育成馴致ならびに初期トレーニングを済ませた後で同規定運動負荷による試験を実施し、得られた血清を用いた COMP 測定を計画しており、関節から血中への COMP の湧出効果に対する身体トレーニングの影響について検証している。

[研究 5] 関節症の馬の滑液における COMP 濃度およびその断片化パターンとゼラチナーゼ活性の関係について解析を行った。

関節疾患のある馬の滑液 108 検体について、独自に開発したサンドイッチ ELISA を用いて COMP を定量するとともに、同 ELISA システムに使用しているモノクローナル抗体 2A11 および 11F10 を用いたウェスタンブロッティングにより滑液中に出現する COMP フラグメントの分子サイズを解析した。あわせて、同滑液中の MMP-2 および -9 活性をゼラチンゼイモグラフィーにて評価し、各標準酵素活性と対比させて両酵素の活性値 (相対値) を求

めた。なお、滑液中の MMP-2 および 9 活性は、プロ酵素として活性を評価した。

滑液中の COMP フラグメントは、抗体 11F10 を使用したとき、 $>250$  kDa、 $250\sim 160$  kDa、 $160\sim 80$  kDa、 $80$  kDa  $>$  の 4 つに、抗体 2A11 を使用したとき、 $>260$  kDa、 $260\sim 175$  kDa、 $175\sim 100$  kDa、 $100\sim 50$  kDa、 $50 >$  kDa の 5 つに区分された。この区分は抗体 14G4 を用いたバンドパターンとは若干異なっていた。これらのバンドパターンをスキャンして画像撮り込みし、専用の画像処理ソフト (NIH イメージ) を使用して、陽性シグナルの百分比を求めた。さらに ELISA で求められた滑液中 COMP 値に各バンドの百分比を乗じることによって各バンドの滑液中濃度とした。

滑液中の COMP 濃度と MMP-2、9 活性の関係解析したところ、COMP 値と MMP-9 との間に有意な負の相関関係が確認された。このことは、関節症の持続した関節由来滑液中の MMP-2,9 活性が高く、COMP 濃度が低下していたというこれまでの結果を支持するものであった (図 5-1)。

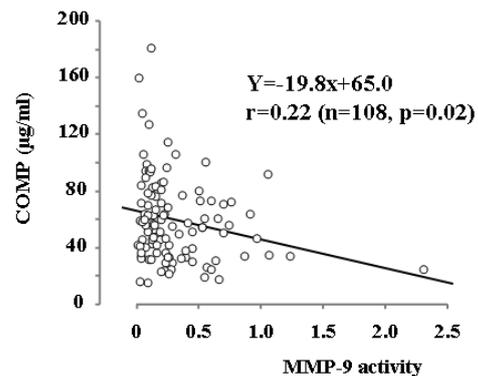


図 5-1. 関節疾患のある馬の滑液中 MMP-9 活性と COMP 濃度との関係. 2 つのパラメータ間には有意な負の相関がある。

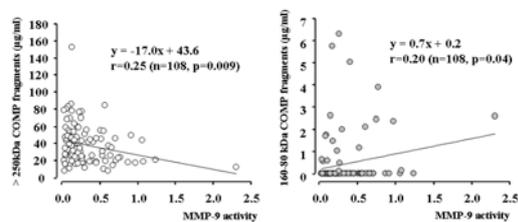


図 5-2. 関節疾患のある馬の滑液中 MMP-9 活性と断片化した COMP 濃度との関係. MMP-9 活性の高まりは、 $>250$  kDa の断片の発現と負の相関をする (左図)、一方  $160\sim 80$  kDa の断片との間には正の相関がある (右図)。

さらに MMP-2、9 活性と各 COMP フラグメントとの相関関係を解析したところ、MMP-9 活性は、抗体 11F10 によるウェスタンブロッティングで検出される  $>250$  kDa

の滑液中 COMP フラグメント濃度と有意な負の相関を示す一方で、160~80 kDa の滑液中フラグメント濃度と有意な正の相関が認められた (図 5-2)。MMP-9 活性値は、160~80kDa の小フラグメント (百分比) との間にも有意な負の相関を確認した。これらのことは、関節疾患のある関節において MMP-9 のプロ酵素が増えた滑液中では、抗体 11F10 で検出される 250kDa 以上の比較的大型サイズの COMP 分子フラグメント濃度が減少する一方で、断片化が進行した小型フラグメント濃度が増えていることを示唆している。

滑液中の MMP-2 活性は、滑液中 COMP 濃度との間に相関関係がなく、260~175kDa のフラグメントの百分比ならびに滑液中濃度と負の相関を示したのみであった。滑液中の MMP-2 活性は、MMP-9 と比較して、損傷に伴う関節軟骨および滑液中の COMP の断片化に大きく寄与していないと考えられた。MMP-2 および 9 は変形性関節症における軟骨基質分解や再構築に関わる主な酵素である。今回の研究から、馬の関節症由来の滑液中 COMP のフラグメント解析によって、MMP-9 活性の高まりが予測できる可能性が示唆された。

関節軟骨より抽出・精製した COMP 分子に MMP-9 を反応させると、酵素の濃度ならびに反応時間に依存して分子の断片化が起こることが確認されている。現在は、MMP-9 の作用による 160~80kDa の COMP フラグメントの発現を、酵素-基質反応実験で検証することで、このフラグメントがどのような分子切断を受けているか検証している。

本研究結果から、馬の滑液中の OOMP 濃度の上昇と断片化を検出することで関節軟骨の劣化・破壊・変性が診断できるようになった。これらのことは X 線で検出できない馬の関節軟骨病変の存在を臨床診断するために極めて有用である。さらに抗体 11F10 によるウェスタンブロットを行なうことにより、160-80kDa のフラグメントが検出される滑液では MMP-9 活性の高まりが示唆され、その現象を再現し確定する段階まで研究は進んでいる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yamanokuchi K, Tagami M, Nishimatsu E, Shimizu Y, Hirose Y, Komatsu K, and Misumi K. Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein in equine synovial fluid and serum. Equine Vet. J. 41, 41-46 (2009). 査

読有

2. Yamanokuchi K, Yabuki A, Yoshimoto Y, Arai K, Fujiki M, and Misumi K. Gene and protein expression of cartilage oligomeric matrix protein associated with oncogenesis in canine tumors. J. Vet. Med. Sci. 71, 499-503 (2009). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 坂本 英一, 佐藤 隆祐, 金 善熙, 藤木 誠, 三角一浩. 「馬滑液中の cartilage derived retinoic acid sensitive protein (CD-RAP) / melanoma inhibitory activity (MIA) の測定」 第 22 回日本ウマ科学会 於 東京 (2009).
2. 山之口和人, 矢吹 映, 藤木 誠, 三角一浩. 「免疫電子顕微鏡的手法を用いた犬の乳腺腫瘍細胞で産生される Cartilage oligomeric matrix protein の検討」 第 148 回日本獣医学会 於 鳥取 (2009)
3. 金城亜紀子, 宇都直子, 瀬戸山健太郎, 新井恒, 三角一浩. 「モデル動物における軟骨基質分子マーカーの変化」 第 146 回日本獣医学会 於 宮崎 (2008).
4. 山之口和人, 広瀬遥子, 田上正明, 三角一浩. 「ウマの滑液および血清中の cartilage oligomeric matrix protein (COMP) 定量のための Sandwich ELISA 法の開発」 第 20 回日本ウマ科学会 於 東京大 (2007).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三角 一浩 (MISUMI KAZUHIRO)  
鹿児島大学・農学部・教授  
研究者番号: 10291551

### (2) 研究分担者

藤木 誠 (FUJIKI MAKOTO)  
鹿児島大学・農学部・准教授  
研究者番号: 60305167

上村 亮三 (KAMIMURA RYOZOU)  
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・准教授  
研究者番号: 30253884

瀬戸山 健太郎 (SETOYAMA KENTAROU)  
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・助教  
研究者番号: 00372805