

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18075

研究課題名（和文）変形性膝関節症滑膜でのヒアルロン酸分解酵素発現と関節液中ヒアルロン酸分解解析

研究課題名（英文）Expression of hyaluronan-degrading enzymes in osteoarthritic synovium is involved in the hyaluronan degradation in synovial fluids

研究代表者

塩澤 淳（Shiozawa, Jun）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：30868857

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：変形性膝関節症（膝OA）はきわめて罹患率の高い疾患であり、力学的負荷が誘因となり緩徐に進行する変性疾患と考えられている。OA関節軟骨破壊の発症・進展において関節軟骨中ヒアルロン酸（HA）-アグリカンネットワーク分解と関節液中ヒアルロン酸分解が重要な役割を果たしていると推定されているが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。本研究では、近年発見された新規ヒアルロン酸分解酵素（HYBIDとTMEM2）とアグリカン分解酵素（ADAMTS）がOA関節軟骨破壊に必須な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、膝OA滑膜組織や関節軟骨組織で過剰産生されたHYBIDとADAMTS4が、関節軟骨中HA-アグリカンネットワークや関節液中HA分解に寄与し、OA関節軟骨破壊に必須であることを証明した。これらの研究成果は、HYBIDの活性阻害剤開発や、アグリカン分解酵素のADAMTS4に対するヒト型抗体の臨床応用により、OA進展抑制に繋がる可能性を示唆しており、膝OAに対する新規治療法開発に繋がるのが期待される。

研究成果の概要（英文）：Osteoarthritis (OA) of the knee, the most common joint disease, is considered to be a slowly progressive degenerative condition caused by mechanical stress. Although hyaluronic acid (HA)-aggrecan network degradation in articular cartilage and hyaluronan degradation in joint fluid play important roles in the onset and progression of OA articular cartilage destruction, the detailed molecular mechanisms remain unclear. In this study, we demonstrate that recently discovered novel hyaluronan-degrading enzymes (HYBID and TMEM2) and the aggrecan-degrading enzyme (ADAMTS) play essential roles in OA articular cartilage destruction.

研究分野：変形性膝関節症

キーワード：変形性膝関節症 細胞外マトリックス代謝 ヒアルロン酸-アグリカンネットワーク分解 HYBID TMEM2  
ADAMTS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(膝 OA)は罹患率の高い疾患であり、膝関節痛に伴う日常生活動作(ADL)の制限は生活の質(QOL)の低下を引き起こすとともに生活習慣病の誘因となり、本邦における健康寿命延伸の妨げとなっている。近年、膝 OA に関する研究対象は末期 OA から早期 OA にシフトしており、その病態解明は極めて重要な研究課題となっている。本研究では、関節軟骨細胞外マトリックス分解と関節液中ヒアルロン酸(HA)分解が OA 発症・進展に関わるとの仮説を立て、早期膝 OA における細胞外マトリックス分解酵素の機能解析に注目して研究を実施した。

## 2. 研究の目的

膝 OA 関節軟骨破壊は、関節液中 HA 分解による荷重分散機能低下による間接的な経路と関節軟骨中の細胞外マトリックス分解を介した直接的経路により進展していくと考えられる。これまでの研究報告から、関節軟骨の HA アグリカンネットワーク分解・消失が OA 関節軟骨破壊の最初のステップであることが知られており、HA 分解には新規ヒアルロニダーゼ HYBID (hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization) と TMEM2 (transmembrane protein 2) が中心的な役割を担い、アグリカン分解にはアグリカン分解能を有する ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) ファミリー分子が関わりとされている。しかし、これら遺伝子のヒト膝 OA 関節組織における発現や発現調節機構は十分に分かっていない。そこで、本研究では(1)膝 OA 滑膜組織における HYBID と TMEM2 の発現と関節液中 HA 濃度と分子量との関係、(2)膝 OA 関節軟骨組織における HYBID と TMEM2 の発現と HA 分解機構解析、(3)OA 滑膜組織におけるアグリカン分解性酵素 ADAMTS ファミリー分子の発現と発現調節機構について解析を進め、OA 関節軟骨破壊早期に起こる HA アグリカンネットワーク分解機構を研究した。

## 3. 研究の方法

### (1) 膝 OA 滑膜組織における HYBID と TMEM2 の発現と関節液中 HA との関係：

HYBID と TMEM2 の発現プラスミドを用いて OA 滑膜組織における絶対的発現量と局在を mRNA コピー数測定と免疫染色で検討した。加えて、免疫二重蛍光染色法にて、HYBID の発現を詳しく調べた。入院時と人工膝関節全置換術時(TKA)時に採取した血清 HA と関節液中 HA 濃度は ELISA 法を用いて測定し、関節液中 HYBID タンパク濃度はリコンビナント HYBID を用いたウエスタンブロットのデータから standard curve を用いて算出した。OA 進行のリスク因子と報告された関節液中 HA 低分子化率(全 HA 量に対する HA 分子量が 1000kDa 以下の割合の比率)はゲル濾過法で解析した。また、培養 OA 滑膜線維芽細胞での HYBID 発現調節因子を解析し、HYBID と TMEM2 を siRNA でノックダウン後、蛍光標識高分子 HA を添加し、HA 分解活性をゲル濾過法にて調べた。さらに、培養滑膜線維芽細胞を OA 関節で産生される 12 種類のサイトカインなどの因子(IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-6、VEGF、basic FGF、Histamine、Prostaglandin E2、IGF-1、IL-8、TNF- $\beta$ 、CCL5)で刺激し、定量 PCR とイムノブロット法で HYBID と TMEM2 の発現変化を検討した。

### (2) 膝 OA 関節軟骨組織における HYBID と TMEM2 の発現と HA 分解機構解析：

手術時に採取した OA と正常関節軟骨組織での HYBID と TMEM2 の絶対的発現量を mRNA コピー数測定法で調べ、免疫組織学的局在を検討した。また、培養 OA 関節軟骨細胞での HYBID と TMEM2 発現を siRNA によりノックダウンし、蛍光標識高分子 HA を添加し、HA 分解活性を滑膜細胞と同様にゲル濾過法で調べた。さらに、関節炎でよくみられる 10 種類の因子(IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-6、VEGF、basic FGF、Histamine、Prostaglandin E2、IGF-1、IL-8)で培養関節軟骨細胞を刺激し、定量 PCR とイムノブロット法で HYBID と TMEM2 の発現と発現調節機構を解析した。

### (3) 膝 OA 滑膜組織でのアグリカン分解性 ADAMTS 分子の発現と発現調節機構解析：

手術時に採取した OA 滑膜組織における 9 種類のアグリカン分解性 ADAMTS 分子(ADAMTS1、4、5、8、9、15、16、18、20)の発現を RT-PCR と定量 PCR で解析し、ADAMTS4 の免疫組織学的局在を調べた。培養 OA 滑膜線維芽細胞を IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、VEGF、HB-EGF で単独および共刺激し ADAMTS 分子発現変化を定量 PCR とイムノブロット法で解析した。また、サイトカイン刺激下における下流細胞内シグナル経路を各種阻害剤処理で調べ、ADAMTS4 発現に対する効果を検討した。

## 4. 研究成果

ヒト膝 OA 滑膜組織での HYBID 発現は、正常滑膜組織に比べて有意に亢進していたが、TMEM2 発現は両群において変化を認めなかった、OA 滑膜での HYBID mRNA 発現レベル

は関節液中の HA 低分子化率と HYBID タンパク濃度と正の相関を示したが、血清および関節液中 HA 濃度とは相関を示さなかった。一方、TMEM2 mRNA 発現レベルは関節液中 HA 低分子化率、血清および関節液中 HA 濃度いずれとも相関を示さなかった。また、培養 OA 滑膜線維芽細胞を 12 種類の因子で刺激したところ、HYBID は IL-6 で有意に発現亢進し、HA 分解活性も亢進することが実証された。HYBID 発現調節因子が IL-6 であることを確認するため、培養 OA 滑膜線維芽細胞に IL-6 と抗ヒト IL-6 レセプター抗体 (Tocilizumb) を添加して検討したところ、HYBID 発現は対照群と同程度まで抑制され、未刺激 OA 滑膜線維芽細胞を Tocilizumb 単独処理すると HYBID 発現は最大で 30%程度まで抑制された。また、siRNA での HYBID のノックダウンにより HA 分解活性は完全に消失したが、TMEM2 のノックダウンでは HA 分解活性は変わらなかった。さらに、OA 滑膜組織の蛍光免疫染色では、HYBID は滑膜線維芽細胞で発現しており、IL-6 は滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージで発現することが証明された。これらの結果から、ヒト膝 OA 滑膜組織では IL-6 のオートクライン/パラクライン系を介して HYBID が過剰発現され、関節液中の HA 低分子化に関わることが明らかとなった (Am J Pathol 190: 1046-1058, 2020)。

ヒト膝 OA 関節軟骨組織での HYBID 発現は正常軟骨に比べ有意に亢進していたが、TMEM2 発現には変化はみられず、免疫組織学的評価では HYBID は正常に比べて OA の関節軟骨における軟骨細胞に強く免疫染色されたが、TMEM2 は正常と OA の関節軟骨細胞に同程度免疫染色された。培養 OA 関節軟骨細胞での HA 分解活性をゲル濾過法で測定したところ、HYBID の siRNA によるノックダウンでのみ消失したが、OA 滑膜線維芽細胞と同様に TMEM2 のノックダウンでは HA 分解活性は消失しなかった。本申請者らが実施してきたこれまでの実験から、培養 OA 関節軟骨細胞では HYBID は TNF- $\alpha$  で発現亢進することは知られている (Am J Pathol 188: 2109-2119, 2018)。一方、滑膜線維芽細胞では IL-6 が HYBID 発現を亢進することから、OA 関節軟骨細胞での反応を検討した。その結果、IL-6 は HYBID 発現を亢進し、その刺激効果は Tocilizumb 添加により完全に抑制された。次いで、IL-6 と TNF- $\alpha$  で OA 関節軟骨細胞を共刺激したところ、HYBID 発現は相加的に発現上昇することが明らかとなった。一方、IL-1 $\alpha$  刺激では HYBID 発現は亢進しなかったが、可溶性 IL-6 受容体存在下では HYBID 発現が亢進した。この作用は、IL-1 $\alpha$  刺激により IL-6 産生は亢進するも可溶性 IL-6 受容体産生亢進がないことに基づくことが証明された。TMEM2 発現は 10 種類のサイトカインで刺激しても全く変化しなかった。これらの結果から、ヒト OA 関節軟骨組織では IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$  (+ 可溶性 IL-6 受容体) の作用で発現亢進した HYBID が関節軟骨中 HA 分解により関節軟骨破壊が進行することが示唆された (Sci Rep 12: 17242, 2022)。

アグリカン分解活性を有する ADAMTS1、4、5、8、9、15、16、18、20 分子の OA 滑膜組織での発現を RT-PCR とリアルタイム PCR で解析したところ、ADAMTS4 のみが正常滑膜組織に比べて発現亢進していた。免疫組織学的局在を解析すると ADAMTS4 は主に滑膜表層細胞で産生されていることが明らかとなった。培養 OA 滑膜線維芽細胞を 5 種類のサイトカイン・増殖因子で刺激したところ、IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  刺激で ADAMTS4 が最も高く発現亢進したが VEGF、HB-EGF では不変であった。ADAMTS4 発現は IL-1 $\alpha$  + TNF $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$  + TGF- $\beta$ 、IL-1 $\alpha$  + TGF- $\beta$  + TNF- $\alpha$  刺激で相乗的に亢進した。細胞内伝達経路阻害実験により、IL-1 $\alpha$  で発現誘導した ADAMTS4 は主として TAK1 を介しており、TNF- $\alpha$  誘導性 ADAMTS4 発現は TAK1 と NF- $\kappa$ B 経路を介することを証明した。また、TGF- $\beta$  刺激性 ADAMTS4 発現は TAK1 経路を介しており、TNF- $\alpha$  誘導性発現は TNF- $\alpha$  阻害剤であるヒト型抗ヒト TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体 (Adalimumab) により完全に阻害された。さらに、IL-1 $\alpha$  + TGF- $\beta$  + TNF- $\alpha$  刺激下での ADAMTS4 発現は Adalimumab と TAK1、NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤を組み合わせることで完全に阻害されることを示した (Lab Invest 102: 102-111, 2022)。

以上の研究成果より、OA 滑膜組織と関節軟骨組織で過剰発現された細胞外マトリックス分解酵素 (HYBID と ADAMTS4) は、関節液中 HA 分解や関節軟骨 HA-アグリカンネットワーク分解を介して、間接的および直接的経路で関節軟骨破壊に関わることが明らかとなり、それらの阻害剤開発により早期膝 OA 関節軟骨破壊抑制に繋がる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shiozawa Jun, de Vega Susana, Yoshinaga Chiho, Ji Xang, Negishi Yoshifumi, Momoeda Masahiro, Nakamura Tomomi, Yoshida Hiroyuki, Kaneko Haruka, Ishijima Muneaki, Okada Yasunori	4. 巻 12
2. 論文標題 Expression and regulation of recently discovered hyaluronidases, HYBID and TMEM2, in chondrocytes from knee osteoarthritic cartilage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22230-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Cilek Mehmet Zeynel, de Vega Susana, Shiozawa Jun, Yoshinaga Chiho, Miyamae Yuka, Chijiwa Miyuki, Mochizuki Satsuki, Ito Masatoshi, Kaneko Haruka, Kaneko Kazuo, Ishijima Muneaki, Okada Yasunori	4. 巻 102
2. 論文標題 Synergistic upregulation of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by cytokines and its suppression in knee osteoarthritic synovial fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 102 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00685-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 塩澤淳、石島旨章、岡田保典	4. 巻 39(6)
2. 論文標題 変形性膝関節症における軟骨細胞外マトリックス分解の分子病態	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharma Medica	6. 最初と最後の頁 19-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34449/J0001.39.06_0019-0023	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 塩澤淳、石島旨章、岡田保典	4. 巻 64(3)
2. 論文標題 早期変形性膝関節症におけるヒアルロン酸分解酵素HYBID (CEMIP/KIAA1199) の意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 253-261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18888/se.0000001645	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jun Shiozawa, Susana de Vega, Mehmet Z. Cilek, Chiho Yoshinaga, Tomomi Nakamura, Shinya Kasamatsu, Hiroyuki Yoshida, Haruka Kaneko, Muneaki Ishijima, Kazuo kaneko, and Yasunori Okada	4. 巻 190
2. 論文標題 Implication of HYBID (Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization) in Hyaluronan degradation by Synovial Fibroblasts in Patients with Knee Osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1046-1058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 塩澤淳, 岡田保典	4. 巻 71
2. 論文標題 HYBID (KIAA1199/CEMIP)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床雑誌整形外科	6. 最初と最後の頁 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15106/j_seikei71_354	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Jun Shiozawa, Haruka Kaneko, Lizu Liu, Adili Arepati, Takako Aoki, Jun Tomura, Suguru Wakana, Keiji Kobayashi, Shinnosuke Hada, Youngji Kim, Yuichiro Machiyama Takuya Yamamura, Mitsuaki Kubota, Muneaki Ishijima
2. 発表標題 Synovitis of osteoarthritis of the knee is associated with bone marrow abnormality in elderlies -The Bunkyo Health Study
3. 学会等名 2023 OARSI World Congress
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jun Shiozawa, Susana de Vega, Chiho Yoshinaga, Xang Ji, Yoshifumi Negishi, Masahiro Momoeda, Tomomi Nakamura, Hiroyuki Yoshida, Haruka Kaneko, Muneaki Ishijima, Yasunori Okada
2. 発表標題 Expression and regulation of recently discovered hyaluronidases (HYBID and TMEM2) in chondrocytes from knee OA cartilage
3. 学会等名 2023 OARSI World Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名	塩澤淳、Susana de Vega、良永知穂、根岸義文、百枝雅裕、中村智美、吉田浩之、金子晴香、金子和夫、石島旨章、岡田保典
2. 発表標題	新規ヒアルロニダーゼ (HYBIDとTMEM2) のヒト膝OA関節軟骨細胞におけるヒアルロン酸分解活性と発現調節機構
3. 学会等名	第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	塩澤淳、Susana de Vega、良永知穂、根岸義文、百枝雅裕、中村智美、吉田浩之、金子晴香、金子和夫、石島旨章、岡田保典
2. 発表標題	関節軟骨破壊に関わる新規ヒアルロン酸分解酵素 (HYBIDとTMEM2) の変形性関節症 (OA) 関節軟骨での発現調節機構
3. 学会等名	第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	塩澤淳、金子晴香、吉田圭一、小林慶司、東村潤、若菜傑、待山祐一郎、山村拓也、齋田良知、久保田光昭、石島旨章
2. 発表標題	滑膜炎は中高年の早期変形性膝関節症の進行リスク因子である -OAデータの縦断研究解析
3. 学会等名	日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (JOSKAS-JOSSM 2022)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Jun Shiozawa, Susana de Vega, Mehmet Z. Cilek, Chiho Yoshinaga, Tomomi Nakamura, Shinya Kasamatsu, Hiroyuki Yoshida, Haruka Kaneko, Kazuo Kaneko, Muneaki Ishijima, Yasunori Okada
2. 発表標題	IL-6-mediated overexpression of HYBID (hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization) in osteoarthritic synovium is implicated for hyaluronan degradation in synovial fluids in patients with knee osteoarthritis
3. 学会等名	2022 OARSI World Congress (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 塩澤淳、金子晴香、岡田保典、石島旨章
2. 発表標題 新規ヒアルロニダーゼ HYBID CEMIP/KIAA1199 ) と近縁遺伝子 TMEM2 CEMIP 2 ) の発現調節機構 と OA 関節軟骨破壊での役割
3. 学会等名 第12回 Orthopedic Research Club ( 招待講演 )
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩澤淳、Susana de Vega、良永知穂、中村智美、吉田浩之、金子晴香、石島旨章、岡田保典
2. 発表標題 HYBIDとTMEM2の変形性膝関節症関節軟骨におけるヒアルロン酸分解活性解析と発現調節因子の検討
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩澤淳、Susana de Vega、良永知穂、中村智美、吉田浩之、金子晴香、金子和夫、石島旨章、岡田保典
2. 発表標題 新規ヒアルロニダーゼHYBID及びTMEM2の膝OA関節軟骨組織における機能解析
3. 学会等名 第13回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩澤淳、Susana de Vega、Mehmet Z. Cilek、良永知穂、中村智美、笠松慎也、吉田浩之、石島旨章、金子晴香、金子和夫、岡田保典
2. 発表標題 変形性膝関節症滑膜組織でのIL-6を介したHYBID過剰発現は関節液中ヒアルロン酸低分子化に関わる
3. 学会等名 第12回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩澤淳, Susana de Vega, Mehmet Z. Cilek, 良永知穂, 中村智美, 笠松慎也, 吉田浩之, 石島旨章, 金子晴香, 金子和夫, 岡田保典
2. 発表標題 変形性膝関節症滑膜組織でのHYBID過剰発現は関節液中ヒアルロン酸 (HA) 分解に関わる
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩澤 淳, de Vega Susana, 中村 智美, 吉田 浩之, 金子 晴香, 石島 旨章, 金子 和夫1, 岡田 保典
2. 発表標題 変形性膝関節症 (膝OA) の関節軟骨組織におけるヒアルロン酸分解酵素 (HYBIDとTMEM2) の発現と発現調節機構
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関