

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590381

研究課題名（和文）分子量によって異なるヒアルロン酸の関節域への作用

研究課題名（英文）The effects to damaged joints by using hyaluronic acid with various molecular weight

研究代表者

宇月 美和 (UZUKI MIWA)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50305992

研究成果の概要（和文）：本研究では関節内でのヒアルロン酸(HA)の合成系と分解系の検討を行い、それらのバランス、およびHAの低分子化による細胞障害作用について検討した。その結果、関節リウマチ(RA)関節内でのHA分子量の低下は、高分子HAの分解、低分子HAの合成およびHA分解酵素(Hyal)の亢進に基づくものであることが証明された。また、Hyalは滑膜組織で産生された後に、関節液そのもののHAの低分子化をもたらすほかに軟骨組織のHAの分解などにも関与し、軟骨基質の変性や軟骨細胞のアポトーシスから関節の破壊をもたらすものと思われた。

研究成果の概要（英文）：We examined the expression of hyaluronic acid (HA) synthases (HASs) and Hyaluronidases (Hyal) in damaged articular tissues, and the relationship between them. We also examined the cytotoxicity of HA with low molecular weight (MW) in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). In active inflammatory stage of RA, inflammatory cells in synovial tissue produce HAS-3 and the cells may synthesize HA with low MW. In active inflammatory stage of RA, the number of positive cells of hyaluronidase (Hyal)-1 and Hyal-2 increased and HA may be degenerated to lower MW. In some RA cases have high activity of Hyal in synovial fluid. HA with low MW may cause dysfunction of synovial fluid as lubricant and it also has proinflammatory effects, so the balance between HAS1, 2, 3 or Hyals may be important to maintain the joint's function normal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：関節リウマチ、ヒアルロン酸、ヒアルロニダーゼ、分子量、関節液

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節組織は様々な細胞外マトリックスによって構成されているが、ヒアルロン酸(HA)

はそのような構成要素の一つである。HAはNアセチルグルコサミンとDグルクロン酸の二糖の繰り返しからなる直鎖状の多糖類で、生

体内には分子量数百万の高分子のものから4糖や6糖単位のオリゴ糖まで様々な分子量のものが存在している。興味深いのはHAが分子量によって異なる機能を持つことである。

例をあげると、高分子のHAはNF- $\kappa$ Bやサイトカインを抑制し、血管新生や炎症を抑制する作用が認められるのに対して、低分子のHAはその逆の作用を示す。

(2) 関節組織内では、HAは関節液や軟骨での粘弾性をもたらす物質として物理的な保護作用を示すことが知られている。関節リウマチ(RA)は慢性炎症性の関節疾患で長期の罹患により関節の破壊や機能障害をきたすが、患者の関節液中のHAの濃度や分子量が健常人に比較して低下する一方で血清中のHA濃度は高値となる。関節液中のHA低分子化の機序などについては不明な点が多く、関節内でのHAの代謝については十分には解明されていない。上述のように低分子HAは炎症反応を亢進する他に、破骨細胞の分化誘導を促進し、関節炎や骨破壊に影響を及ぼすものと考えられる。

(3) 本研究に関連する国内外の研究動向は、関節内でのHAの合成や分解に関する研究は動物の系や、ヒトの場合でも培養系が多く、関節内でのHAの代謝についての組織学的な検討は多くはない。また、HAの分解活性についてもヒアルロニダーゼの種類の間定までは至っていない。

(4) 申請者らのこれまでの研究成果については、RAにおける炎症や骨破壊の機序および関節内でのHAの代謝に関して、国際学会での発表や論文発表など数多くの業績を持つ。また、ヒト関節炎における様々な蛋白分解酵素の発現や軟骨細胞のアポトーシスについても検討している。

## 2. 研究の目的

### (1) 関節組織におけるヒアルロン酸合成酵素と分解酵素のバランス

- ① HAの合成活性と合成酵素の分布：主なHA合成酵素にはHyaluronic acid synthase (HAS)-1, HAS-2, HAS-3があり、産生するHAの分子サイズは異なっている(HAS-1, 2 > 3)。正常関節ではHAS-1, 2が優位であるが、病的な関節ではこのバランスの崩れが予想される。ここでは関節組織での各HA合成酵素の分布やHA合成活性を検討する。
- ② HA分解酵素の分布と活性：主なHA分解酵素にはHyaluronidase (Hyal)-1, Hyal-2などがあり、分解されて生じるHAのサイズには特徴がある。Hyal-2に分解

されたHAは中間サイズであり、Hyal-1に分解されたHAはオリゴ糖である。オリゴ糖化したHAは強い炎症惹起作用を持っているが、ここではすでに作成済みのHyal-1とHyal-2の抗体およびオリゴプローブを用いて関節組織でのHyal-1, 2の分布を検討する。

### (2) 患者検体を用いた、病的関節におけるHAの代謝の検討

- ① 関節炎患者の関節液、血清中に含まれるHAの濃度や分子量を測定し、さらにザイモグラフィーで血中や関節液中のHA分解活性を定量化する。
- ② すでに作成済みのHyal-1とHyal-2の抗体を用いて、western blottingを行い、血中や関節液中のHyal蛋白を証明する。
- ③ RAの関節組織におけるアポトーシス細胞の分布およびHAS-3やHyalの陽性細胞の分布を比較し、低分子HAがアポトーシスに関与する可能性を検討する。
- ④ 上記の結果に加えて、HAやコラーゲンをはじめとする関節組織内の基質の分布などとの比較をおこない、アポトーシスにおちいった細胞の周囲の環境(HAの分子量や合成活性、Hyalの活性や分布、基質の種類・分布)の解析をおこなう。
- ⑤ 以上により、ヒト関節炎の関節組織でのHAの代謝(合成、分解)を検討し、アポトーシスとの関連を検討する。

### (3) 低分子HAによる組織傷害作用の検討

- ① 関節炎モデル動物の関節内に種々の分子量のHAを投与し、軟骨基質や軟骨細胞に与える影響を検討するほか、アポトーシス誘導に与える影響を検討する。
- ② 種々の分子量のHAとあらかじめincubationされた関節液でザイモグラフィーを行い、HA分解活性に与える影響を検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) 材料の採取：整形外科的な手術の際に軟骨組織や滑膜組織の採取を行う。手術前には同一患者より血清と関節液の採取もおこなう。
- (2) 軟骨および滑膜でのHA合成酵素および分解酵素の発現：手術時や剖検時に得られた軟骨組織や滑膜組織を用いて、HA合成酵素 HAS-1, HAS-2, HAS-3 および分解酵素 Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3のmRNA (*in situ hybridization*)および蛋白(免疫組織化学)の分布を調べる。
- (3) 軟骨基質の成分の解析：軟骨基質(HAやコンドロイチン硫酸、I型、II型コラー

ゲンなど)について、組織学的に分布や染色性を検討し、画像解析装置にて定量化する。

- (4) 軟骨細胞および滑膜細胞での接着分子の発現: 軟骨細胞や滑膜細胞でのCD44などの発現を確認する。
- (5) 軟骨細胞のアポトーシスと軟骨基質、接着分子との関係: TUNEL法で軟骨細胞のアポトーシスを検出し、3), 4)の結果と比較する。アポトーシス陽性細胞の周囲の基質の環境について解析を行なう。
- (6) 定量化と検討: 3)~5)についてそれぞれの陽性細胞の分布や傾向を検討し、疾患による発現量の差を明らかにする。
- (7) 各種分子量のHAによるアポトーシス誘導や抑制能の差: 実験的関節炎モデル動物や滑膜細胞の培養系にオリゴ糖を含む種々の分子量のHAを投与してHAの直接作用を調べるほかに、アポトーシスへのHAによる阻害能を検討する。
- (8) HA合成酵素と血清、関節液中のHA分子量: (2)と同一患者から採取した血清と関節液についてHAの分子量や濃度をhigh performance liquid chromatographyを用いて測定し、組織でのHA合成酵素の種類や発現量の差と血清や関節液中のHA分子量や濃度との相関を検討する。
- (9) HAの分解活性の測定系の確立: HAの分解活性の定量系をHA添加ゲルを用いたザイモグラフィで確立し、血清や関節液でのヒアルロニダーゼ活性を測定する。ゲルに用いるHAは種々の分子量のものを用いる。
- (10) ヒアルロニダーゼ蛋白の証明: すでに作成されたモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いてHyal-1とHyal-2のwestern blottingをおこない、血清や関節液中のHyal蛋白を証明する。
- (11) (9)のHA添加ゲルを用いたザイモグラフィで、患者サンプルを種々の分子量のHAと反応させた後に同様な検討を行い、Hyal活性の変化を検討して、関節炎患者に対するHAの関節内投与による影響の機序を検討する。

#### 4. 研究成果

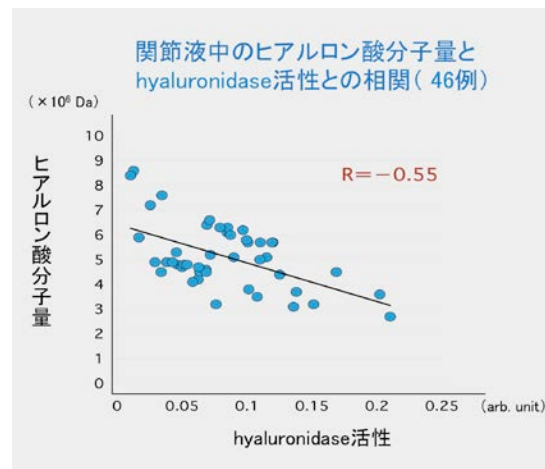
- (1) 対照例の滑膜ではHAS-1, HAS-2が優位であるのに対して、炎症が高度なRAの滑膜では、HAを分解する酵素のHyal-1, Hyal-2と低分子HAを合成するHAS-3の増加がみられ、HAS-3の陽性細胞数は滑膜の炎症の程度と正の相関を示した( $r=0.563$ ,  $p<0.005$ )。
- (2) 滑膜組織でのHAS-3陽性細胞数と関節

液中のHA分子量は負の相関を示した( $r=-0.51$ ,  $p<0.005$ )。

(3) RA症例の関節液中ではHAの分子量、濃度が低下し、血中ではHA濃度の上昇もみられた。RAでは炎症が高度であるほど関節内のHAの低分子化が促進されていることが証明された。

(4) ザイモグラフィでHyalの活性を検討すると、炎症が高度なRA患者の関節液中のHyal活性は対照例や炎症の陳旧化したRAと比較して高値となっていた。

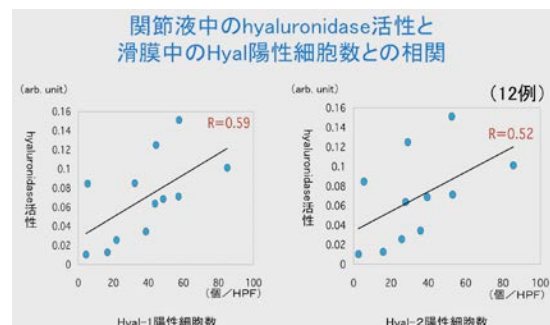
(5) 関節液中で(4)のHyal活性の高いRA症例で関節液中のHA分子量が低下している傾向がみられ、負の相関を示していた。



(6) 関節液中のHA分子量は滑膜組織中のHyal-1, Hyal-2陽性細胞数と負の相関を示していた。

(7) 免疫組織化学や *in situ* hybridizationでは、Hyal-1, 2は滑膜表層細胞に発現を認め、RAの活動期において高度に認められた。

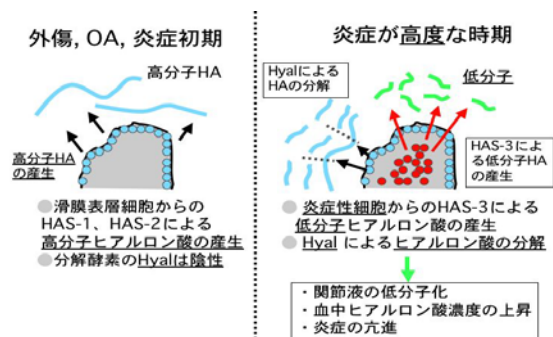
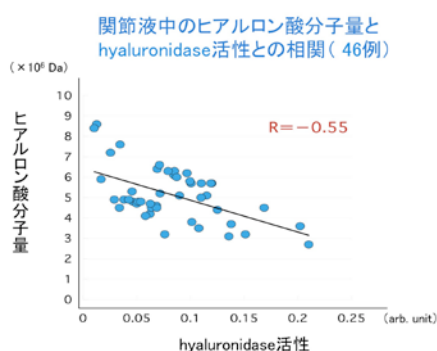
(8) 滑膜組織でのHyal-1, Hyal-2陽性細胞数について(7)の結果と(4)のザイモグラフィの結果は相関しており、滑膜組織中のHyal-1, Hyal-2陽性細胞数の多い症例の関節液でHyal活性が高いという傾向を示した。



(9) Western blottingでのHyal-1, Hyal-2蛋白質の結果も(4)のザイモグラフィーによる関節液中のHyal活性や(7)の免疫組織化学、*in situ* hybridizationによる滑膜組織でのHyal-1, Hyal-2の結果と相関していた。(10)軟骨組織については、表層の部分ほどの症例もHA, プロテオグリカンなどの基質の減少がみられたが、深部においては、基質が保たれている傾向がみられた。

(11)ザイモグラフィーでは、高分子HAとあらかじめ反応させた後の関節液でHyal活性が低下していた。

(12)変形性関節症モデルに高分子HAを投与すると、対照群に比較してII型コラーゲンなどの基質の減少や軟骨細胞のアポトーシスが有意に減少しており、細胞増殖マーカー(MTR1)が陰性となす軟骨細胞が増加していた



## 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 10 件)

- ① Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, Murakami K, Uzuki M, Shimamura T and Sawai T: Interleukin-6 upregulates expression of ADAMTS-4 in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis. 15: 36-44(2012). (査読有)
- ② Sasaki Y, Uzuki M, Nohmi K, Kitagawa

H, Kamataki A, Komagamine M, Murakami K, Sawai T: Quantitative measurement of serum hyaluronic acid molecular weight in rheumatoid arthritis patients and the role of hyaluronidase. Int J Rheum Dis. 14: 313-19(2011) (査読有)

- ③ Uzuki M, Kamataki A, Watanabe M, Sasaki N, Miura Y, Sawai T: Histological analysis of esophageal muscular layer from 27 autopsy cases with mixed connective tissue disease (MCTD). Pathology - Research and Practice. 207: 383-90(2011) (査読有)
- ④ Ouchi N, Uzuki M, Kamataki A, Miura Y, Sawai T: Cartilage destruction is partly induced by the internal proteolytic enzymes and apoptotic phenomenon of chondrocytes in relapsing polychondritis. J Rheum. 38(4): 730-37(2011) (査読有)
- ⑤ 石黒直樹、岩館克治、澤井高志: 実験的変形性膝関節症に対する高分子量ヒアルロン酸(平均分子量270万HA)スベニールと架橋型ヒアルロン酸(Hylan G-F20)SYNVIISCの作用比較. 関節外科. 29(12): 112-124(2010) (査読有)
- ⑥ 宇月美和、鎌滝章央、佐々木喜子、徳永勢二、澤井高志: 関節リウマチにおけるヒアルロン酸の合成と分解について. 臨床リウマチ. 22: 337-43(2010) (査読無)
- ⑦ 宇月美和、澤井高志: 生検による病理学的検査. 日本臨床 68(増刊号5) 関節リウマチ 寛解を目指す治療の新時代: 270-275(2010) (査読無)
- ⑧ 佐々木喜子、宇月美和、駒ヶ嶺正隆、澤井高志: 関節リウマチ患者血清中のヒアルロン酸の分子量測定法とヒアルロニダーゼ活性に関する検討. 岩手医誌. 61(2): 83-92(2009) (査読有)
- ⑨ Yoshida W, Uzuki M, Nishida J, Shimamura T, Sawai T: Examination of *in vivo* gelatinolytic activity in rheumatoid arthritis synovial tissue using newly developed *in situ* zymography and image analyzer. Clin Exp Rheumatol 27: 587-93(2009) (査読有)
- ⑩ 澤井高志、宇月美和: 関節リウマチにおける関節炎の破壊に関する最近の病理学的話題. Clinical Calcium. 19(3): 33(325)-46(338)(2009) (査読無)

〔学会発表〕（計 28 件）

- ① 鎌滝章央、村上賢也、澤井高志：関節リウマチ患者滑膜における特徴的な炎症の原因細胞の電子顕微鏡的解析. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 20 回国際リウマチシンポジウム、平成 23 年 7 月 17 日～20 日、神戸.
- ② 宇月美和、窪田綾子、澤井高志、中村卓司、宮崎芳安、勝呂 徹：生物学的製剤投与前後での滑膜組織の変化. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 20 回国際リウマチシンポジウム、平成 23 年 7 月 17 日～20 日、神戸.
- ③ 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、村上賢也、嶋村 正、澤井高志：IL-6 による RA 患者由来 FLS における ADAMTS-4、5 の発現への影響とシグナル伝達経路の解析. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 20 回国際リウマチシンポジウム、平成 23 年 7 月 17 日～20 日、神戸.
- ④ 村上賢也、鎌滝章央、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチにおける CD14 陽性細胞の役割. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 20 回国際リウマチシンポジウム、平成 23 年 7 月 17 日～20 日、神戸.
- ⑤ 宇月美和、窪田綾子、澤井高志、勝呂 徹、赤坂喜清、猪股直美、中村卓司、宮崎芳安、石井壽晴：生物学的製剤投与前後での滑膜組織の変化. 第 100 回日本病理学会総会、平成 23 年 4 月 28～30 日、横浜.
- ⑥ 赤坂喜清、小野一郎、石川由起雄、猪股直美、宇月美和、深澤由里、藤田和子、石井壽晴：サイトカイン制御による創傷治癒線維芽細胞アポトーシス発現の意義. 第 100 回日本病理学会総会、平成 23 年 4 月 28～30 日、横浜.
- ⑦ 宇月美和、横尾智子：関節リウマチ (RA) 患者関節内のヒアルロン酸 (HA) の分解. 第 65 回東邦医学会総会、平成 23 年 11 月 10～11 日、東京.
- ⑧ 澤井高志：関節疾患におけるヒアルロン酸の動態－関節リウマチを中心に. 東北関節疾患研究会、平成 22 年 11 月 27 日、仙台.
- ⑨ 村上賢也、澤井高志、鎌滝章央、嶋村正：関節リウマチの慢性化機構における CD14 陽性細胞の役割. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 19 回国際リウマチシンポジウム、平成 22 年 4 月 22～25 日、神戸.
- ⑩ 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、嶋村正、澤井高志：IL-6 刺激により RA 患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞における ADAMTS-4 の発現が亢進した. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 19 回国際リウマチシンポジウム、平成 22 年 4 月 22～25 日、神戸.
- ⑪ 宇月美和、澤井高志、益田郁子：CPPD 結晶沈着症患者の関節組織における ANK 陽性細胞の特徴. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 19 回国際リウマチシンポジウム、平成 22 年 4 月 22～25 日、神戸.
- ⑫ 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、嶋村正、澤井高志：Bv8 の関節リウマチ滑膜における発現解析. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 19 回国際リウマチシンポジウム、平成 22 年 4 月 22～25 日、神戸.
- ⑬ 澤井高志：炎症性関節炎におけるヒアルロン酸の動態. 第 37 回日本肩関節学会、平成 22 年 10 月 8 日～9 日、仙台.
- ⑭ 赤坂喜清、小野一郎、石川由起雄、猪俣尚美、宇月美和、深澤由里、藤田和子、石井壽晴：創傷治癒の線維芽細胞アポトーシスにおける FAK と Akt キナーゼの関与とサイトカイン制御の意義. 第 99 回日本病理学会総会、平成 22 年 4 月 27～29 日、東京.
- ⑮ 鎌滝章央、石田睦子、村上賢也、宇月美和、澤井高志：ゼラチンコートフィルムを用いた関節液の包括的なゼラチン分解活性測定法の開発. 第 25 回日本臨床リウマチ学会、平成 22 年 11 月 27～28 日、東京.
- ⑯ 赤坂喜清、小野一郎、石川由起雄、深澤由里、宇月美和、木下利雄、猪股直美、石井壽晴：サイトカイン制御による線維芽細胞死発現の意義と癒痕抑制. 第 40 回日本創傷治癒学会平成 22 年 12 月、東京.
- ⑰ 加藤幸夫、本田清昌、坂井裕大、西村正宏、菊地寿幸、澤井高志：関節内注射した高分子ヒアルロン酸の軟骨と滑膜への浸透性. 第 24 回日本臨床リウマチ学会、平成 21 年 11 月 20～21 日、盛岡.
- ⑱ 宇月美和：関節リウマチにおけるヒアルロン酸の合成と分解について. 第 24 回日本臨床リウマチ学会、平成 21 年 11 月 20～21 日、盛岡.
- ⑲ 黒瀬理恵、一戸貞文、堀内三郎、黒瀬頭、澤井高志、嶋村 正：変形性膝関節症の関節液由来間葉系細胞による軟骨修復に向けた検討. 第 24 回日本臨床リウマチ学会、平成 21 年 11 月 20～21 日、

- 盛岡
- ⑳ 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、西田 淳、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対するIL-6 刺激による蛋白分解酵素ADAMTS-4, ADAMTS-5 の発現動態. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 21 年 4 月 23～26 日、東京
- 21 宇月美和、佐々木喜子、越智隆弘、澤井高志：GFPマウス由来骨髄細胞を移植したマウスに関節炎を誘導した際の骨髄細胞の動態. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 21 年 4 月 23～26 日、東京
- 22 佐々木喜子、宇月美和、能見健司、西田淳、駒ヶ嶺正隆、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者の血中ヒアルロン酸分子量. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 21 年 4 月 23～26 日、東京
- 23 佐々木喜子、宇月美和、能見健司、北川広進、駒ヶ嶺正隆、嶋村 正、澤井高志：関節リウマチ患者血清中のヒアルロン酸分子量測定法とヒアルロニダーゼに関する検討. 第 10 回岩手軟骨懇話会、平成 21 年 1 月 30 日、盛岡
- 24 鎌滝章央、澤井高志：培養軟骨細胞におけるヒアルロン酸分解酵素の発現へのサイトカインの影響の解析. 第 8 回岩手骨代謝研究会、平成 21 年 3 月 5 日、盛岡
- 25 宇月美和、村井一範、石田陽治、佐々木喜子、越智隆弘、石井壽晴、澤井高志：GFPマウス由来骨髄細胞を移植したマウスに関節炎を誘導した際の骨髄細胞の動態. 第 98 回日本病理学会総会、平成 21 年 5 月 1～3 日、京都
- 26 宇月美和、佐々木喜子、能見健司、北川広進、澤井高志：関節リウマチの滑膜組織におけるヒアルロン酸の代謝. 第 22 回日本軟骨代謝学会 2009 年 3 月 7 日、名古屋.
- 27 佐々木喜子、宇月美和、能見健司、北川広進、駒ヶ嶺正隆、嶋村正、澤井高志：関節リウマチ患者の血中ヒアルロン酸分子量. 第 22 回日本軟骨代謝学会 2009 年 3 月 7 日、名古屋.
- 28 Fujiki K, Yakusiji F, Tomiyama J, Uzuki M, Nakamura M, Uchida T, Miller DM, Taniguchi K: The Alternative Strategy for Cancer by Japanese Herbal medicine. International Forum of

Regional and Targeting Therapies for Cancer (RTTC) 2009, 2009 年 11 月 7～8 日、上海、中国.

〔図書〕 (計 2 件)

- ① Yoshida W, Kamataki A, Uzuki M, Sawai T: Evaluation of *in vivo* proteolytic activity. In: Osteoarthritis -Diagnosis, Treatment and Surgery, ed. by Chen Q. InTech, Rijeka, Croatia. 265-274(2012, 2)
- ② Kamataki A, Yoshida W, Ishida M, Murakami K, Ochi K, Sawai T: Simple method using gelatin-coated film for comprehensively assaying gelatinase activity in synovial fluid. In: Principles of osteoarthritis - Its definition, character, derivation and modality-related recognition-, ed. by Rothschild BM. InTech, Rijeka, Croatia. 419-428 (2012, 2)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇月 美和 (UZUKI MIWA)  
岩手医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50305992

### (2) 研究分担者

澤井 高志 (SAWAI TAKASHI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00125577