

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 22 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791411

研究課題名（和文） 変形性関節症における関節軟骨、関節液中のタンパク分解酵素の活性に関する包括的解析

研究課題名（英文） Comprehensive measurement of proteinases and proteinase inhibitors within osteoarthritic knee cartilage and synovial fluid collected from osteoarthritic knee joints

研究代表者

岩澤 三康（IWASAWA MITUYASU）

独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）

統括診療部・整形外科 医師

研究者番号：60574093

研究成果の概要（和文）：ヒトの変形性関節症（OA）罹患軟骨と対照軟骨からタンパク抽出液を調整し、抽出液中の種々のタンパク分解酵素の濃度および内因性阻害因子の濃度を定量した。解析の結果から従来 OA における軟骨変性の主役とされてきた MMP-13 は抽出可能なタンパク量としては比較的少なく、コラーゲンの分解を司るコラゲナーゼとしては MMP-1 がもっとも多いこと、さらに MMP の活性化に関与する plasmin の活性が OA 軟骨変性部において増加していることが明らかになった。また膝 OA 症例から採取した関節液の解析から、OA の関節液には多量の MMP-1, 2, 3 が含まれていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In order to determine the amounts of proteinases within OA cartilage, proteins were extracted from cartilage matrix, and concentrations of various proteinases were determined by ELISA and Luminex, together with those of endogenous proteinase inhibitors. Synovial fluid was collected from OA knees, and the amounts of proteinases and endogenous inhibitors were determined as well. The results of our analysis revealed that OA cartilage contains various kinds of proteinases besides MMP-13 and ADAMTS-4 and 5, which have been supposed to be primary proteinases in OA. Again, our study has revealed that the synovial fluid from OA joints contains considerable amounts of MMP-1, 2 and 3 together with TIMP-1 and 2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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： 変形性関節症・タンパク分解酵素

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)では長期にわたり軟骨基質の変性・消失が進行する。関節軟骨の主要な構成要素はII型コラーゲンとアグリカンであるが従来の研究からII型コラーゲンの変性についてはMMP-13が、またアグリカンの変性についてはADMTS-4および5が重要とされている。しかしOA軟骨では種々のタンパク分解酵素が発現されており、軟骨基質の変性・消失に関わるタンパク分解酵素はこれらだけとは限らない。さらに変形性膝関節症では関節液中に多量のタンパク分解酵素が存在するという報告もあるが、これらがOAにおける軟骨基質の変性喪失にどのように関与しているのかは分かっていない。OAにおける軟骨変性が本当はどの酵素の働きで引き起こされるのかという問題は、極めて基本的ではあるが明確な回答が未だに得られていない。

本研究では第一にヒト膝関節の軟骨からタンパク抽出液を調整し、そこに含まれるタンパク分解酵素の量、活性を調べることでヒトのOA軟骨の変性に関与するタンパク分解酵素を、その関与の程度とともに明らかにすることを試みた。第二にヒトOA膝関節から関節液を採取し、それに含まれるタンパク分解酵素の濃度を内因性阻害剤の濃度とともに検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は第一にヒト膝OA関節の軟骨に存在するタンパク分解酵素および内因性阻害因子の量を調べることでヒトのOA軟骨の変性に関与するタンパク分解酵素を、その関与の程度とともに明らかにすることであり、第二にヒトOA膝関節から関節液を採取し、それに含まれるタンパク

分解酵素の濃度を内因性阻害剤の濃度とともに検討することである。

3. 研究の方法

研究は国立病院機構相模原病院の倫理審査委員会の承認を得て行われた。OA軟骨は人工関節置換の際にヒト膝関節から採取した。OAでは手術が行われるような末期の関節であっても軟骨変性は関節軟骨全体に起こるのではなく一部の軟骨は肉眼的にほとんど変性のない状態で残っている。軟骨の変性が明らかな部位とそうでない部位ではタンパク分解酵素の発現や活性が異なっている可能性が考えられる。そこで本研究ではOA関節からの軟骨を肉眼的な変性部と非変性部に分けて採取した。

組織抽出液中のタンパク濃度の計測ではタンパクの抽出法で結果が大きく左右される。本研究では軟骨の湿重量を計測したのちまずPBS中でhomogenizerを用いて組織を破碎し、そののち破碎された組織を0.1% triton 添加PBS中に移してさらに可溶化されたタンパクを回収、次いで6M グアニジン塩酸塩溶液でタンパクを抽出という3段階の方法でタンパクを抽出、それぞれの段階で抽出された種々のタンパクを定量、あるいは酵素活性を計測した。

今回の検討ではMMPについてはMMP-1, 2, 3, 13について計測を行い、またMMPに対する内因性の阻害因子であるTIMPについてもTIMP-1, 2, 3の濃度をそれぞれ計測した。In vivoにおいてMMPの活性化にはplasminが重要な役割を果たすことが知られている。このため本研究では抽出液中のplasminの活性についても検討を行った。得られた計測値はhomogenizeに用いた軟骨片の湿重量で標

準化して解析を行った。

関節液についてはOA症例のうち関節液の採取が可能であった症例を対象に穿刺によって関節液を採取、遠心することで細胞成分等を除去したのち種々のMMPおよびTIMPの量を計測した。以上の計測には主にBioRad社製BioPlexを用いた。plasminの活性は市販の計測キット(AssayPro)を用いた。

4. 研究成果

(1) OA軟骨からのタンパク抽出液の解析結果

OA軟骨からはコラゲナーゼとしてMMP-1が多量に抽出され、MMP-13の抽出量をほとんどの検体で大きく上回った。OA軟骨変性部と非変性部の比較ではMMP-1, 2, 3, 13およびTIMP-1, 2, 3, 4のどの因子についても有意の差を認めず、これらの因子の組織中の存在量はOA軟骨の変性部と非変性部の間で大きな違いがないことが推察された。一方プラスミン活性についてはOA軟骨変性部からの抽出液において有意に高く、変性部OA軟骨からの抽出液では非変性部のOA軟骨からの抽出液の3倍以上のplasmin活性が計測された。

OAで見られる軟骨変性は部位によって著しく異なる。進行例でも軟骨変性部において軟骨基質が完全に失われて軟骨下骨が露出しているのに対し非変性部では軟骨が少なくとも肉眼的には正常に近い外観を呈していることも少なくない。このような変性の局在性には荷重の集中といった要素のほか、基質の分解、変性に関する酵素の活性が軟骨の部位によって異なっている可能性も考えられる。今回の研究結果からOA軟骨変性部と非変性部の間ではタンパク分解酵素や内因性阻害剤の組織中の濃度

(存在量)は大きく変わらないものの、MMPの活性化に関するplasminの活性が変性部において亢進していることが明らかになった。OAの研究においてMMPの活性化の問題は従来あまり着目されてこなかったが、今回の検討結果はMMPの活性化の局所的な亢進がOAにおける軟骨基質の分解・喪失に関与している可能性を示すものである。Plasminの活性発現にはurokinaseが関与することが知られている。今後軟骨抽出液を用いてurokinaseの定量および活性の測定を行い、またMMPの活性化の比率も合わせて測定することを予定しているが、これらを計測することによってヒトOAにおける軟骨基質の変性の詳細を明らかにすることができると考えている。

(2) 膝OA症例からのタンパク抽出液の解析結果

OA症例から採取した関節液についてMMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13を計測したところ、関節液中にはMMP-1, 2, 3が多量に存在するがMMP-7, 8, 9, 13は極めて微量にしか存在しないことが明らかになった。より早期の症例で外来で保存的に治療された早期、中期の症例から採取した関節液と進行例で人工関節置換を行われた末期の症例から手術の際に採取した関節液中のMMP-1, 2, 3の計測結果を図1に示す。病期の低い症例の方が関節液中のMMP-1, 2, 3のいずれも濃度が高いという結果になった。TIMPの計測ではTIMP-1, 2の濃度が高くTIMP-3, 4はほとんどの症例で計測限界以下であった。TIMP-1の濃度は早期、中期の症例は平均で1.25 µg/ml、末期の症例では平均で0.55 µg/mlであり、TIMP-2の濃度は早期、中期の症例は平均で0.65 µg/ml、末期の症例では平均で0.32 µg/mlといずれも早期、

中期の症例で高い傾向があった。

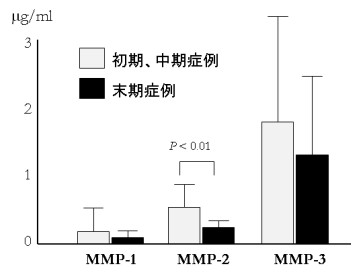


図1. OA膝関節から採取した関節液中のMMP-1, 2, 3の濃度を示す。結果は初期、中期の症例および末期の症例を分けて示した。

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 0件)

Determination of the amounts of various proteinases and endogenous inhibitors within OA and control cartilages. Iwasawa M, et al. (投稿準備中)

Synovial fluid from osteoarthritic knee joints contains various proteinases and proteinase inhibitors. Iwasawa M, et al. (投稿準備中)

[学会発表](計 0件)

軟骨中に含まれるタンパク分解酵素の定量. 岩澤三康ほか. (平成24年度に発表を予定)

[図書](計 0件)

なし

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩澤三康 (IWASAWA MITSUYASU)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)統括診療部・整形外科医師

研究者番号: 60574093

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし