

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592258

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸合成酵素に着目した変形性膝関節症の新たな病態の解明

研究課題名(英文)Alterations in the Chondroitin Sulfate Chain in Human Osteoarthritic Cartilage of the Knee

研究代表者

松本 和(Matsumoto, Kazu)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40422711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：コンドロイチン硫酸(CS)は、関節軟骨中に含まれるグリコサミノグリカンである。本研究の目的は、変形性膝関節軟骨中のCSの構造、合成の変化を調査し、それらの変化の軟骨変性に対する影響を検討する事である。人工膝関節置換術を受けた末期変形性膝関節症24膝の大腿骨内側顆部、外側顆部加重部から軟骨を採取し、mRNA、グリコサミノグリカンを抽出しCS合成酵素遺伝子発現レベル、CS構造を解析した。結果として、変性が進行した軟骨では、CS含有量、分子量が低下し、更に、CS合成酵素遺伝子の発現が低下していた。本研究の結果は、関節軟骨内のCSの構造変化が、変形性関節症の進行に関与している事を示唆すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to determine whether the structure of chondroitin sulfate (CS) in cartilage is reflected by the degree of cartilage degeneration in patients with osteoarthritis (OA) of the knee. Two osteoarthritic cartilage samples were obtained from each femoral condyle of 24 knees with end-stage OA. Histological grade was determined according to the Mankin score. The CS concentrations and chain length were determined using HPLC and gel filtration chromatography, respectively. Expression of the gene encoding CS glycosyltransferase was evaluated using qPCR. As a results, the mean CS concentration and chain length were significantly lower and shorter in the more degraded cartilage. Genes expressions encoding CS glycosyltransferases were expressed at lower levels in the degraded cartilage. In the osteoarthritic knee, the CS concentration and chain length were reduced closer to the more degraded cartilage with decreasing CS glycosyltransferase gene expression.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：コンドロイチン硫酸 変形性膝関節症

1. 研究開始当初の背景

軟骨は細胞成分に乏しく、その90%は細胞外マトリックスにて構成される。細胞外マトリックスはコラーゲン繊維と、プロテオグリカン会合体で構成され、後者の主成分の一つがコンドロイチン硫酸である。コンドロイチン硫酸は軟骨の水分保持機能など、軟骨細胞の機能維持に重要な役割を持っている。ほ乳類でのコンドロイチン硫酸合成酵素は chondroitin sulfate synthase 1 (CSS1), chondroitin polymerizing factor (CHPF), chondroitin sulfate synthase 3 (CSS3), chondroitin polymerizing factor 2 (CHPF2), chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (CSGALNACT1), chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (CS-GALNACT2)の6種類が同定されている。申請者らは世界ではじめて CSS1 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、同酵素の欠損が変形性関節症の自然発症の原因となることを突き止めた。本研究はその知見を踏まえ、ヒトの変形性膝関節症発症におよぼす同酵素の挙動および、変性関節軟骨でのコンドロイチン硫酸の構造の解析を行い、変形性関節症とコンドロイチン硫酸の関連について臨床医学的観点から解明使用とするものである。

2. 研究の目的

変形性関節症(osteoarthritis:以下 OA)は関節軟骨の破綻を主体とする疾患である。コンドロイチン硫酸(chondroitin sulfate:以下 CS)は関節軟骨の主要構成成分であるアグリカンの構成成分であり、ほ乳類では、以下の6つのCS合成酵素が同定されている:chondroitin sulfate synthase 1 (CSS1), chondroitin polymerizing factor (CHPF), chondroitin sulfate synthase 3 (CSS3), chondroitin polymerizing factor 2 (CHPF2), chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (CSGALNACT1), chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (CS-GALNACT2)。これらの酵素が細胞内のゴルジ体内で協調的に作用することでCSが合成されるが、これまでに、OA軟骨でのCSの分子量、含有量、硫酸化といったCSの構造変化、CSの合成の変化についてはほとんど知られていない。本研究の目的は、ヒト膝関節軟骨においてCSの構造変化が、軟骨変性や膝関節の変形と関連しているかどうか、変性軟骨でのCS合成について検討する事である。

se 2 (CS-GALNACT2)。これらの酵素が細胞内のゴルジ体内で協調的に作用することでCSが合成されるが、これまでに、OA軟骨でのCSの分子量、含有量、硫酸化といったCSの構造変化、CSの合成の変化についてはほとんど知られていない。本研究の目的は、ヒト膝関節軟骨においてCSの構造変化が、軟骨変性や膝関節の変形と関連しているかどうか、変性軟骨でのCS合成について検討する事である。

3. 研究の方法

対象は人工膝関節置換術を受けた末期OA膝24膝(Kellgren/Lawrence分類 Stage もしくは)。手術時に大腿骨内側・外側顆部の荷重部からそれぞれ関節軟骨を採取し、肉眼的に変性がより強い軟骨を lesion cartilage, 対側顆部の軟骨を remote cartilage と設定した。(図1A)

1) 軟骨変性の程度について、採取した軟骨を Safranin O/FastGreen 染色後、modified Mankin score を用いて評価し、lesion cartilage と remote cartilage の間で paired *t*-test を用いて比較した。

2) 採取軟骨からCSを抽出し、CS含有量・CS分画についてHPLCを用いて、CS分子量についてゲルろ過クロマトグラフィーを用いて測定し、lesion cartilage と remote cartilage の間で paired *t*-test を用いて比較した。

3) 採取軟骨から mRNA を抽出し、CS合成酵素遺伝子発現に関してリアルタイム RT-PCR 法を用いて測定し、lesion cartilage と remote cartilage の間で paired *t*-test を用いて比較した。

4) 膝関節の変形の程度は、膝関節立位正面レントゲン写真を用いて大腿脛骨角 (femorotibial angle:以下FTA)を測定し、FTA と CS 分子量・CS 含有量の相関を Pearson の積率相関係数を用いて評価した。加えて年齢とCS分子量・CS含有量の相関を Pearson

の積率相関係数を用いて評価した。

4. 研究成果

1) modified Mankin score の結果から, lesion cartilage が remote cartilage よりも変性が強度であった。(6.92±3.22 vs 4.42±2.36, $P < 0.05$)。(図 1B)

2) lesion cartilage で, 平均 CS 含有量と分子量が remote cartilage よりも低値であった (平均 CS 含有量: 12.04±5.20 vs 14.84±4.86 μg/mg wet weight, $P < 0.01$, 平均 CS 分子量: 5.36±1.46 vs 6.19±1.84 kDa, $P < 0.05$)。CS 分画は 2 部位間で明らかな差は認めなかった。(図 1C)

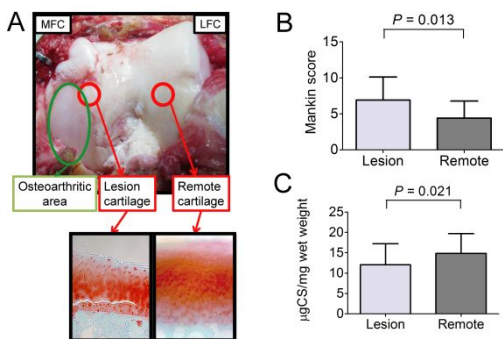


図 1

3) lesion cartilage で, 6 つの CS 合成酵素遺伝子のうち *CHPF*, *CSGALNACT1*, *CSGALNACT2* の発現が有意に低下していた。(図 2)

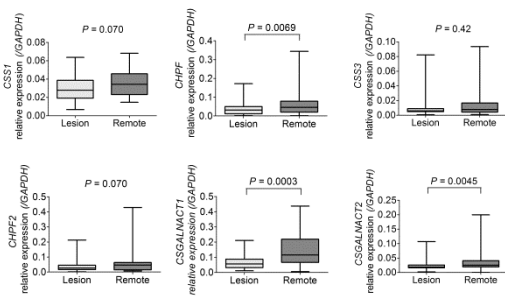


図 2

4) CS 構造と年齢との相関関係に関して, CS 分子量は年齢と負の相関を示し, 高齢であるほど CS 分子量が低下することが示唆された。(図 3AB)

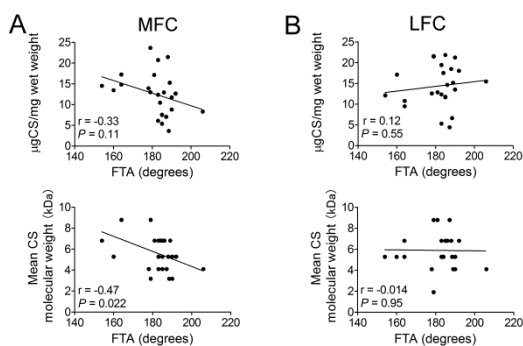


図 3

4) CS 構造と膝関節変形の相関関係に関して, 大腿骨内側顆部において, CS 分子量と FTA は負の相関を示し, 膝の内反変形が強いほど大腿骨内側顆部では CS 分子量が低下することが示唆された。(図 4AB)

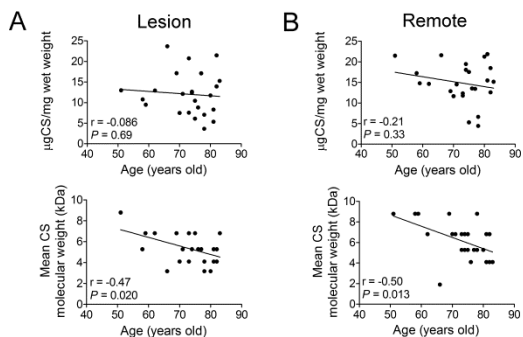


図 4

考察及び結論

本研究で, 変性が進行した膝関節軟骨では, CS 含有量, 分子量が低下し, 更に, CS 合成酵素遺伝子の発現が低下していた。以前の *in vivo* study で, *CSgalnact1* null mice が関節軟骨低形成, 軟骨内アグリカン総量の低下, アグリカンの異化亢進を呈し, CS が軟骨代謝に寄与していると報告されている。本研究の結果は, 関節軟骨内の CS の構造変化が, 軟骨異化を亢進させ変形性関節症を進行させている可能性を示唆しており, 関節軟骨での CS 合成酵素の調節や, CS 構造を維持させることにより軟骨変性を予防しうると考えられる。変性が進行した膝関節軟骨では, CS 含有量, 分子量が低下し, 更に, CS 合成酵素遺伝子の発現が低下していた。

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 1 件)

Daichi Ishimaru, Nobuo Sugiura,
Haruhiko Akiyama, Hideto Watanabe,
Kazu Matsumoto

Alterations in the chondroitin sulfate chain
in human osteoarthritic cartilage of the
knee.

Osteoarthritis Cartilage. 22, 250-258
(2014)(査読有り)

[学会発表](計 4 件)

Daichi Ishimaru, Nobuo Sugiura,
Haruhiko Akiyama, Hideto Watanabe,
Kazu Matsumoto

Alterations in the chondroitin sulfate chain
in human osteoarthritic cartilage of the
knee.

2014 Annual Meeting Orthopaedic
Research Society New Orleans (USA)
2014/3/15-3/18

石丸 大地、杉浦 信夫、秋山 治彦、渡
辺 秀人、松本 和 末期変形性膝関節症に
おける関節軟骨内コンドロイチン硫酸鎖の
構造変化

第 27 回日本軟骨代謝学会 2014/2/28-3/1
東京医科歯科大学 (東京都文京区)

石丸 大地、杉浦 信夫、秋山 治彦、
渡辺 秀人、松本 和 末期変形性膝関節症
における関節軟骨内コンドロイチン硫酸鎖
の構造変化

第 32 回日本骨代謝学会 2014/7/24-7/26
大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

石丸 大地、杉浦 信夫、秋山 治彦、渡
辺 秀人、松本 和 末期変形性膝関節症に
おける関節軟骨内コンドロイチン硫酸鎖の
構造変化

第 29 回日本整形外科基礎学術集会
2014/10/9-10/10

城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 和 (MATSUMOTO Kazu)

岐阜大学 医学部附属病院 准教授

研究者番号：40422711

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：