

高齢者の変形性関節症の成因および病態に 関する総合的研究

(H10-長寿-009)

平成11年度厚生科学研究費補助金長寿科学総合研究事業
研究成果報告書

平成12年3月

主任研究者 岩 田 久
(名古屋大学医学部教授)

高齢者の変形性関節症の成因および病態に関する総合的研究

主任研究者 岩田 久 名古屋大学医学部整形外科教授

研究要旨 研究の概要

変形性関節症は運動機能障害やQOLの低下を生じるため、その対策は高齢者医療において非常に重要な課題である。本研究の目的は、総合的に変形性関節症の成因および病態を解明し、さらに変形性関節症の治療法の開発に貢献することにある。主任研究者の岩田は、変形性関節症(OA)・慢性関節リウマチ(RA)関節液中のMMP、TIMP濃度に異なる相関を認めた。プロテオグリカン(PG)分解物とMMP・TIMPとの間に相関はなく、他の物質による分解が推察された。PGとコラーゲン代謝は両疾患で病期で異なる事、OAではRAに比較し、早期での代謝亢進が明らかとなった。石黒は軟骨細胞による関節破壊の解明を目的に検討、ヒト軟骨組織由来細胞株HCS-2/8でのTNF- α によるCOX-2, MMP-1, 3の遺伝子発現の増加はNF- κ Bの活性化を介する事を示した。軟骨破壊での軟骨細胞の役割を示し、細胞内伝達経路の一つNF- κ Bの活性化の関与と、抑制による関節破壊抑制の可能性を示唆した。原田は、変形性脊椎症重症度の進行と全身の骨量および軟部組織量との関係を腰椎MRIとDEXAによる骨量測定とBody Compositionで縦断的に検討した結果、椎間板変性進行の大きい群は、小さい群より全身骨骨量の減少が少なく、全身因子としての骨量が変形性脊椎症の進行に関連している可能性を示した。渡辺は変形性関節症の病態にTGF- β がその細胞内シグナル伝達分子Smadにより、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現を調節している可能性を見いだした。軟骨細胞cDNAライブラリーより、Smadと相互作用してTGF- β シグナルを調節する細胞骨格因子filaminを同定した。山田は、OAではRAに比べ滑液中OCIF濃度が高く、膝関節症重症度に依存し濃度が上昇する事を示した。OCIF産生源は軟骨細胞と滑膜細胞と推定されており、膝関節症重症度依存的にOCIF濃度が増加した理由は、関節軟骨障害に対する代償機構と考えられる。

分担研究者

石黒直樹（名古屋大学医学部・講師）
原田 敦（国立療養所中部病院・医長）
渡辺 研（国立長寿医療研究センター・室長）
山田芳司（国立長寿医療研究センター・室長）

A. 研究目的

岩田は関節液中の各種物質測定と臨床所見との対比により関節破壊の機序を理解する事、そして臨床的に用いる関節症マーカー（関節破壊指標物質）の開発を目的とした。石黒は軟骨破壊における軟骨細胞の役割、細胞内の伝達機構を検討する事を目的とした。原田は脊椎における変形性関節症である変形性脊椎症の発症機序や進行機序に関して全身的因子との関連を解明する事を目的とした。山田は関節液中のOCIFとTGF- β 1濃度を測定することにより、変形性膝関節症の発症進展におけるこれらのサイトカインの関節局所での役割を明らかにすることを目的とした。渡辺は骨格組織において、形態形成、組織形態維持、再生機構役割を担うTGF- β の、フィブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックス分子の発現を調節と、ヒアルロン酸合成酵素Has2の遺伝子発現を誘導することを関連づけ、分子レベルでの検討を行うことにより、

関節形態形成、維持、再生機構に関する知見を得る事を目的とした。

B. 研究方法

岩田はOA膝関節液55名分、RA63名分を対象とした。膝関節レントゲン写真検査は全員に行った。関節液中MMP-1,-2,-3,-8,-9及びTIMP-1,-2はELISA法にて、コンドロイチン4硫酸、6硫酸、ヒアルロン酸は酵素処理にて2糖に分解後HPLCにて測定した。ケラタン硫酸は5-D-4 epitopeをELISAにて測定した。Type II collagen C-propeptideの測定にはELISA法を用いた。846 epitopeはカナダマギール大Robin Poole博士の協力によって測定した。レントゲン写真分類は軽度・中等度・重度の3段階に分類した。関節液中の物質間での相関関係及び、病態の進展と各種物質濃度の関連を検討した。

石黒はヒト軟骨組織由来細胞株HCS 2/8を用いてTNF- α を1時間作用させ細胞を回収し、細胞核分画を利用してEMSA法にて転写因子NF- κ Bの活性化を観察した。また、TNF- α を6時間作用させCOX-2, MMP-1, 3の遺伝子発現をNorthern法にて観察した。更にProteasome inhibitorを用いてNF- κ Bの活性化及びI κ Bの分解、各遺伝子の発現に与える影響を調べた

原田は閉経後女性で3年以上経過後に同一検査を行い得たの40名を解析対象とした。椎間板変化を定量的に評価できるMRIを用いて計測した。面積計算ソフトにより、第1腰椎・第2腰椎間椎間板(L1/2)から第4腰椎・第5腰椎間椎間板(L4/5)までの4つの平均椎間板面積を計測し、前後方へ突出する4つの平均突出椎間板面積と平均椎間板突出率を算定した。骨量は、DEXA腰椎前後像骨密度(BMD)、全身骨BMDおよび各年齢補正值(%)を計測した。全身骨測定時に得られるBody Compositionから総軟部組織量、脂肪量、Lean mass、Bone mass content(BMC)を求めて、椎間板計測値との関連を検討した。

山田は変形性膝関節症160例および慢性関節リウマチ40例から治療目的で採取した滑液中のOCIFおよびTGF- β 1濃度を別々のELISA法で測定した。また変形性膝関節症60例および健康者60例から得られた血清OCIF濃度を測定した。渡辺はマウスES細胞由来BAC遺伝子ライブラリーより、マウスHas2 cDNAをプローブとしてスクリーニングを行い、陽性クローンを得た。マウスHas2 cDNAの5'端に相当する部分をプローブとして検索を行い、exon 1に相当する部分のDNA断片を単離した。マウスHas2遺伝子プロモータの解析は、シフェラーゼをレポーター遺伝子とするレポーター発現実験により行った。TGF- β シグナルは、TGF- β 1による処理、もしくは、活性型TGF- β 受容体、不活性型TGF- β 受容体、SmadのcDNAをレポーターと同時にトランスフェクションすることにより検討をおこなった。マウスSmad5 cDNAをベクター(pAS2-1)に組み込み、ヒト軟骨細胞cDNAライブラリーとともに酵母を形質転換して、相互作用陽性のマーカーとするHis非依存性増殖をもとにスクリーニングを行った。得られた陽性クローンからDNAを調製し、大腸菌での選択から、相互作用を示したクローンのプラスミドDNAを単離した。単離したプラスミドについては、遺伝子の同定、確認を行った。

C. 研究結果

岩田の研究ではOA・RA両疾患でMMP・TIMP産生の調整の違いが示唆された。PG分解物由来と考えられるコンドロイチン6硫酸・ケラタン硫酸とMMP・TIMP濃度の相関が見られず、プロテオグリカン分解には他の酵素(群)の関与が疑われた。プロテオグリカンの合成はOAでは進行初期に亢進し、コラーゲンの合成は軟骨マトリックスの破壊が進行した中等度の関節症で高まる変化を示した。RAではこれら物質の合成低下が末期に明らかとなる変化が見られた。マトリックス合成が病期に強く影響を受けることが両疾患で観察された。石黒の研究ではHCS-2/8細胞において、TNF- α によって活性化されるNF- κ Bは、p50-p65 heterodimerを

形成しており、TNF- α 濃度依存性にDNA結合能は上昇した。COX-2, MMP-1, 3の遺伝子発現も、TNF- α によって濃度依存性に増加した。COX-2, MMP-1, 3のTNF- α による遺伝子発現の増加は、Proteasome inhibitorによって著明に抑制された。原田の研究ではCompositionで縦断的に検討した結果、椎間板変性進行の最も大きい群は、最も小さい群より全身骨骨量の減少が少なく、全身因子としての骨量が変形性脊椎症の進行に関連している可能性が示唆された。他の軟部組織量は関連がなかった。山田の研究ではOAではRAに比べ滑液中OCIF濃度が約2倍高く、さらにX線診断による膝関節症の重症度に依存してその濃度が上昇した。また滑液中のOCIF濃度は変形性膝関節症では血中濃度の約8倍、慢性関節リウマチでは約4倍といずれも血中濃度に比較し高値であった。滑液TGF- β 1濃度は膝関節症では血中の約1/50と低値であり、重症度との関連は認められなかった。OCIFとは逆に慢性関節リウマチの滑液TGF- β 1濃度は膝関節症に比べ2-3倍高値であった。渡辺はマウスHas2遺伝子をクローニングし、exon 1上流領域にプロモータ活性があることをホタルルシフェラーゼ活性によるレポーター発現実験により同定した。プロモータ活性は0.3 kbpのコンストラクトにおいても検出された。この0.3 kbpコンストラクトではTGF- β 応答性は検出されなかったことから、TGF- β 応答は0.3 kbpには存在しない可能性が示された。2.3 kbp及び1.0 kbpコンストラクトをTGF- β 応答性実験に用いたところ、そのレポーター活性がSmad7共存下で抑制されたことから、Has2遺伝子発現誘導にSmad経路が関与していること、及び、上流1.0 kbp以内にTGF- β 応答エレメントが存在する可能性が示された。軟骨細胞でSmad経路の制御に関わる因子の同定をyeast two hybrid screeningにより行った。Smad5に結合する分子としfilaminを得た。filamin欠損細胞を用いて、filaminは、Smad経路に対して正の制御を行っている事を明らかとした。

D. 考察

1. MMP, TIMP濃度の検討では、関節液中でMMP-3はMMP-1, TIMP-1濃度と相関を示した。FreeのTIMPがMMPの活性阻害に働くことを考えるとMMPの濃度上昇に伴いTIMP-1濃度上昇が観察されたことはMMPの阻害に働く防御反応とも考えられる。一方コラーゲンとPGの再生に関わるType II collagen C-propeptideとコンドロイチン硫酸846epitopeについては関節症の進行による差が見られむしろ合成系が病態に深く関わる可能性を示唆した。石黒の研究の結果では高分子量HAは、低分子量HAとの高次構造の違いやレセプターへの拮抗により、異なった細胞内シグナルの伝達を行っている可能性があり、ECMの分子量

の違いが細胞の代謝に影響を及ぼしうることが示された。また今回の結果から高分子量HAの抗炎症効果は軟骨ではなく、滑膜に対して存在する可能性を考える必要がある。原田の研究では骨量に加えて軟部組織量と椎間板突出率との関係は低いながら正の相関を示し、骨のみでなく軟部組織も椎間板変性に関連すると考えられた。筋肉量に相当するLean Massが椎間板変性と低い正の相関を持つことは、今後の検討を要する。山田の研究ではTGF- β 1はOCIFを介して骨リモデリングに重要な役割を果たしていると考えられる。滑液ならびに血液中のOCIF濃度の上昇は、破骨細胞による骨吸収の亢進に起因する骨量減少に対する生体の代償機構と考えられる。現在、滑液中OCIF濃度と傍関節骨破壊との関連について検討中である。さらに我々は雪印乳業生物科学研究所との共同研究により破骨細胞分化促進因子(Osteoclast differentiation factor, ODF)のsoluble formについてもその滑液および血清中の濃度を測定中である。渡辺の研究ではTGF- β によるHas2遺伝子の誘導がSmad依存性である可能性が示された。Smadは、TGF- β 受容体キナーゼにより、受容体と離れ、Smad4との会合、核内へ移動し、転写調節を行う。SmadはMAP kinase経路により、核内移行が制御されている。軟骨細胞でのSmad結合タンパクの検索により、細胞骨格因子filaminを同定した。filaminはMEK1やSEK1などのMAPK経路のキナーゼも結合することが知られており、前述のSmad経路とMAPK経路のクロストークの場を提供している可能性がある。filaminは、インテグリン β 鎖との結合も見いだされており、細胞骨格と細胞接着のconjunctionに機能していることが示唆され、細胞遊走や細胞形態と密接な関係があることを意味し、関節軟骨において、軟骨細胞がメカニカルストレス等により細胞形態が変化した場合、TGF- β 応答性が変化し、Has2発現調節を通じたヒアルロン酸合成、ならびに細胞外マトリックス誘導に変化をもたらす可能性が考えられる。TGF- β -細胞外マトリックス-細胞接着の3因子がそれぞれ相互作用を直接的、間接的に及ぼし、関節形態維持・再生に関わっていることが考えられた。

E. 結論

1, PG合成はOAの進行初期に亢進し、コラーゲンの合成は軟骨マトリックスの破壊が進行した中等度の関節症で高まる変化を示した。RAでは末期に低下する傾向が見られ、両疾患でマトリックス合成が病期に強く影響を受けることが示唆された。関節液中ケラタン硫酸、コンドロイチン6硫酸の濃度はMMPとは相関を示さずPG分解での他の酵素の関与が示唆された。

2, 軟骨組織由来細胞においてTNF- α が、炎症性メディエーターや、軟骨基質破壊に関わる遺伝子の発現

を増大させたことは、関節炎での軟骨基質破壊に、軟骨細胞自身が寄与していることを示唆するものと考えられた。また、その細胞内伝達経路の一つとしてNF- κ Bの活性化が関与しており、これを抑制することで、炎症のみならず関節破壊をも抑制できる可能性があると考えた。

3, 閉経後女性40名を平均4年10カ月追跡し、骨量、軟部組織量とMRIから計測した椎間板変性の変動を検討した結果、椎間板変性の進行は全身骨BMDなどの全身的因子と関連を持ち、別に行った横断調査でもレプチンなど全身液性因子との関連がみられた。変形性脊椎症は、その発症機序や進行機序に関して全身的因子が関連するものと考えられた。

4, OCIFは関節軟骨障害に対する防御因子としての役割を有する可能性が示唆された。この分子メカニズムを解明することにより変形性膝関節症の新しい治療法の開発が期待される。

5, ヒアルロン酸合成酵素Has2遺伝子はSmad経路を介してTGF- β により誘導されること、Smadは細胞骨格因子filaminと結合し、正の制御を受けていることが示された。

変形性関節症における関節液中の病態マーカー分子の検討

主任研究者 岩田 久 名古屋大学医学部整形外科教授

研究要旨 関節液の分析により各種関節破壊の病態理解と指標物質の開発を試みて検討した。変形性関節症(OA)・慢性関節リウマチ(RA)関節液中MMP-1,-2,-3,-8,-9及びTIMP-1,-2はELISA法、関節液中コンドロイチン4,6硫酸,ヒアルロン酸は分解後HPLCにて測定した。ケラタン硫酸は5-D-4 epitope, Type II collagen C-propeptide, 846 epitopeの測定にはELISA法を用いた。X線写真によってOA・RAの進行度を分類しそれぞれについて標的物質の関節液中濃度を比較した。関節液中のMMP, TIMP濃度の比較で両疾患に異なる相関が見られた。プロテオグリカンの分解物とMMP・TIMPとの間に相関はなく、他の物質による分解の可能性の検討が必要と推察された。プロテオグリカンとコラーゲンの代謝は両疾患で病期によって異なる事が示され、OAではRAに比較し、早い時期での代謝の亢進が見られた。

A. 研究目的

関節液中の各種の物質の測定により関節破壊の病態を明らかとすること及び臨床所見との対比を試みることににより臨床症状の変化とその時点で起こる関節破壊の機序を理解する事、そして臨床的に用いうる関節炎、関節症マーカー（関節破壊指標物質）の開発を目的とする。変形性関節症(OA)と慢性関節リウマチ(RA)での関節液中の物質測定によって両疾患の関節破壊機序の違いを検討することは、OAでの関節破壊を理解する上で重要な情報を提供しようと考え、両疾患で関節破壊を引き起こす物質・破壊により生じる物質・破壊修復に関連する物質など種々物質の関係を明らかにする目的で、マトリックスメタロプロテアーゼとその阻害物質であるTIMP, 関節軟骨基質の分解から由来すると考えられるグリコサミンガリカほか代謝指標物質を測定し、これと臨床症状、レントゲン所見との対比を試みた。

B. 研究方法

名古屋大学整形外科外来に通院中の変形性関節症患者のうち穿刺によって膝関節液を得た者55名と、慢性関節リウマチ患者63名とを対象とした。膝関節レントゲン写真検査は全員に行った。これら患者の検体は遠沈後上清のみを-80度に保存、測定に用いた。関節液中MMP-1,-2,-3,-8,-9及びTIMP-1,-2はELISA法にて測定した。コンドロイチン4硫酸,6硫酸,ヒアルロン酸は酵素処理にて2糖に分解後HPLCにて測定した。ケラタン硫酸は5-D-4 epitopeをELISAにて測定した。Type II collagen C-propeptideの測定にはELISA法を用いた。846 epitope of chondroitin sulfate はカナダマギール大Robin Poole博士の協力によって測定した。レントゲン写真分類は軽度・中等度・重度の3段階に分類した。

C. 研究結果

MMP, TIMP濃度の比較ではOA関節液中のMMP-1,3

TIMP-1に相関が見られた。しかし、RA関節液中ではこれら相関は見られず、MMP・TIMP産生の調整の違いが示唆された。両疾患でプロテオグリカンの分解物由来と考えられるコンドロイチン6硫酸・ケラタン硫酸とMMP・TIMP濃度の相関が見られず、プロテオグリカン分解には他の酵素（群）の関与が疑われた。プロテオグリカンの合成は変形性関節症では進行初期に亢進し、コラーゲンの合成は軟骨マトリックスの破壊が進行した中等度の関節症で高まる変化を示した。一方慢性関節リウマチではこれら物質の合成低下が末期に明らかとなる変化が見られた。ケラタン硫酸、コンドロイチン6硫酸の濃度も変形性関節症初期に上昇する傾向を示した。マトリックス合成が病期に強く影響を受けることが両疾患で観察された。

D. 考察

関節基質の破壊に関わる関節症の指標として関節液中で測定可能な物質は次の3種類の項目に分類される。即ち、1) 関節基質の破壊により関節液に流出したと考えられる物質：コンドロイチン6硫酸、一部の4硫酸、ケラタン硫酸、コラーゲン分解産物、各種架橋物質、2) 関節液の破壊に関わる酵素群とその阻害物質：コラゲナーゼ、ストロメライシン、白血球コラゲナーゼ、TIMP-1, TIMP-2等、3) 軟骨の再生に関わる物質 C-propeptide of Type II collagen, 846 epitope of chondroitin sulfate (Dr Robin Poole)等がある。変形性関節症・慢性関節リウマチに伴う関節液はその成因から関節病態を反映すると考えられる。関節液の分析によって関節炎、関節症の病態を明らかとしてそれらの予後予測に役立てようとの試みは臨床上役割が大きいと考えられる。関節破壊については関節基質の破壊と合成のバランスが負に傾いた状態であり、これが関節の細胞外マトリックス減少をもたらし関節破壊に繋がると思われる。MMP, TIMPの濃度の検討では、関節液中で変形性関節症でMMP-3はMMP-1,

TIMP-1濃度と相関を示した。変形性関節症にのみ FreeのTIMPがMMPの活性阻害に働くことを考えるとMMPの濃度上昇に伴いTIMP-1濃度上昇が観察されたことは興味深い。両疾患で分解産物であるケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸と分解に深く関わるコラーゲンナーゼ、ストロメライシンを初めとするMMP濃度に関係を見いだすことは出来なかった。近年 Aggrecanaseが相次いでクローニングされ、プロテオグリカンの破壊に重要な役割を果たすと言われているが、このデータもこれを間接的に指示する物とおもわれる。一方コラーゲンとプロテオグリカンの再生に関わるType II collagen C-propeptideと846 epitope of chondroitin sulfate については変形性関節症の進行による差が見られ、むしろ合成系が病態に深く関わる可能性を示唆した。慢性関節リウマチでも末期に合成の著明な低下が見られ、マトリックス合成の低下が病状と強く関連することが示唆された。他の物質については明白な差は見られなかった。これは一つには現在のレ線評価では関節破壊の結果を見ている可能性が高く、現時点の関節破壊を評価していない事の反映である為と思われた。

E. 結論

プロテオグリカンの合成は変形性関節症の進行初期に亢進し、一方コラーゲンの合成は軟骨マトリックスの破壊が進行した中等度の関節症で高まる変化を示した。一方慢性関節リウマチでは末期に低下する傾向が見られ、両疾患でマトリックス合成が病期に強く影響を受けることが示唆された。関節液中ケラタン硫酸、コンドロイチン6硫酸の濃度はMMPとは相関を示さずプロテオグリカン分解での他の酵素の関与が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1)Y. Hasegawa, T. Iwase, S. Iwasada, S. Kitamura, H. Iwata
Osteonecrosis of the femoral head associated with pregnancy
Arch Orthop Trauma Surg 119 : 112-114, 1999
- (2)S. Iwasada, Y. Hasegawa, T. Iwase, S. Kitamura, H. Iwata
Bone scintigraphy and magnetic resonance imaging after transtrochanteric rotational osteotomy
Skeletal Radiol 28 : 251-259, 1999
- (3)S. Ota, H. Muramatsu, T. Senda, Kun Zou, H. Iwata, T. Muramatsu
Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis

J Bone Mineral Res 14 : 1132-1144, 1999

(4)H. Nagaya, T. Yamagata, K. Iyoda, H. Ito, Y. Hasegawa, H. Iwata

Examination of synovial fluid and serum hyaluronidase activity as a joint marker in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients : by zymography

Ann Rheum Dis 58 : 186-188, 1999

2. 学会発表

(1)The 4th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium November 15-19, 1999 New Zealand
Meniscus Biology and Its Repair

H. Iwata, N. Takeuchi, Y. Suzuki, Y. Sagehashi, T. Yamaguchi, H. Itoh

(2)OARSI September 16-19, 1999 Austria

Repair response for round defect and radial tear in meniscus

H. Iwata, N. Takeuchi, Y. Suzuki, Y. Sagehashi, T. Yamaguchi, H. Itoh

炎症性サイトカインが軟骨細胞に与える影響
—その疾病に関連した意義について—

分担研究者 石黒 直樹 名古屋大学医学部整形外科講師

研究要旨 変形性関節症、慢性関節リウマチに代表される関節疾患における関節軟骨の破壊には、様々な炎症起因物質が関与していることが判明しているが、軟骨破壊における軟骨細胞の役割、細胞内の伝達機構に関しては未だ不明な点も多い。従来より炎症性細胞、滑膜細胞が主体であるとされているが、軟骨細胞自身による関与も示唆されている。ヒト軟骨組織由来細胞株HCS-2/8においてTNF- α によるCOX-2, MMP-1, 3の遺伝子発現の増加はNF- κ Bの活性化を介していると考えられた。この結果は、関節炎での軟骨破壊において軟骨細胞が重要な役割を担っており、その細胞内伝達経路の一つとしてNF- κ Bの活性化が関与していること、またこれを抑制することで、炎症のみならず関節破壊をも抑制できる可能性を示唆するものであると考えた。

A. 研究目的

変形性関節症、慢性関節リウマチに代表される関節疾患における関節軟骨の破壊は、不可逆的な変化であるためその治療は非常に困難である。従来より炎症性細胞、滑膜細胞が主体であるとされているが、軟骨細胞自身による関与も示唆されている。軟骨細胞は軟骨組織における唯一の細胞種であり、軟骨基質の産生と分解を行うことで、成熟軟骨組織の恒常性を維持している。しかし、軟骨破壊における軟骨細胞の役割、細胞内の伝達機構に関しては未だ不明な点も多い。そこで、ヒト軟骨組織由来細胞株HCS-2/8を用いて、腫瘍壊死因子TNF- α による転写調節因子NF- κ Bの活性化及び、炎症や軟骨基質の破壊に関わるCOX-2, MMP-1, 3の遺伝子発現に与える影響を調べた。

B. 研究方法

ヒト軟骨組織由来細胞株HCS 2/8を用いてTNF- α を1時間作用させ細胞を回収し、細胞核分画を利用してEMSA法にて転写因子NF- κ Bの活性化を観察した。また、TNF- α を6時間作用させCOX-2, MMP-1, 3の遺伝子発現をNorthern法にて観察した。更にProteasome inhibitorを用いてNF- κ Bの活性化及びIkBの分解、各遺伝子の発現に与える影響を調べた。

C. 研究結果

HCS-2/8細胞において、TNF- α によって活性化されるNF- κ Bは、p50-p65 heterodimerを形成しており、TNF- α 濃度依存性にDNA結合能は上昇した。またCOX-2, MMP-1, 3の遺伝子発現も、TNF- α によって濃度依存性に増加した。

Proteasome inhibitorは、TNF- α によるIkBの分解を阻害し、NF- κ Bの核内移行を妨げ、DNA結合能の上昇を抑制することを、それぞれWestern blot, immunocytochemistry, EMSA法を用いて、確認した。

COX-2, MMP-1, 3のTNF- α による遺伝子発現の増

加は、Proteasome inhibitorによって、著明に抑制された。

D. 考察

NF- κ BはRel homology domainを持つ種々のサブファミリーよりなる2量体で、なかでもp50-p65 heterodimerが重要であるとされている。非刺激下においては、NF- κ Bはその阻害因子であるIkBと結合した形で細胞質中に存在している。TNF- α 等の刺激によりIkBのリン酸化、さらにユビキチン化が起こり、蛋白分解酵素複合体であるProteasomeによりIkBが分解され、NF- κ Bが核内に移行する、これをNF- κ Bの活性化と呼ぶ。核内に移行したNF- κ Bは標的遺伝子上流の特異的結合部位に結合し、その遺伝子発現を増大させると考えられている。しかしながら、活性化されるNF- κ Bのサブユニットは細胞、組織により異なることが知られており、HCS-2/8細胞において、TNF- α によって活性化されるNF- κ Bは、p50-p65 heterodimerであることが明らかとなった。Proteasome inhibitorはubiquitin-proteasome pathwayによる、NF- κ B阻害因子であるIkBの分解を阻害することによりNF- κ Bの活性化を抑制すると言われている。HCS-2/8細胞においても、Proteasome inhibitorは、TNF- α による κ Bの分解を阻害し、NF- κ Bの核内移行を妨げ、DNA結合能の上昇を抑制し、COX-2, MMP-1, 3のTNF- α による遺伝子発現の増加は、Proteasome inhibitorによって、著明に抑制された。以上より、HCS-2/8細胞においてTNF- α によるCOX-2, MMP-1, 3の遺伝子発現の増加はNF- κ Bの活性化を介していると考えられた。これらの結果は、関節炎での軟骨破壊において軟骨細胞が重要な役割を担っており、その細胞内伝達経路の一つとしてNF- κ Bの活性化が関与していることを示唆するものであると考えた。

E. 結論

軟骨組織由来細胞においてTNF- α が、炎症性メディエーターや、軟骨基質破壊に関わる遺伝子の発現を増大させたことは、関節炎での軟骨基質破壊に、軟骨細胞自身が寄与していることを示唆するものと考えられた。また、その細胞内伝達経路の一つとしてNF- κ Bの活性化が関与しており、これを抑制することで、炎症のみならず関節破壊をも抑制できる可能性があると考えた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)N. Ishiguro, T. Ito, K. Miyazaki, H. Iwata
Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, and Glycosaminoglycans in Synovial Fluid from Patients with Rheumatoid Arthritis

J Rheumatol 26 : 34-40, 1999

(2)N. Ishiguro, T. Ito, H. Ito, H. Iwata, Hitenishi Jugessur, Mirela Ionescu and A. Robin Poole
Relationships of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors to Cartilage Proteoglycan and Collagen Turnover revealed by Analyses of Synovial Fluids from Patients with Osteoarthritis
Arthritis Rheum 42 : 129-136, 1999

(3)D. Kida, M. Yoneda, S. Miyaura, T. Ishimaru, Y. Yoshida, T. Ito, N. Ishiguro, H. Iwata, K. Kimata
The ShAP-HA Complex in Sera from Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis
J Rheum 26 : 1230-1238, 1999

(4)Fei Han, N. Ishiguro, T. Ito, T. Sakai, H. Iwata
Effects of sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis in rabbit knee joints
Nagoya J Med Sci 62 : 115-126, 1999

(5)酒井忠博、石黒直樹、岩田久、滝川正春
TNF刺激下の培養細胞におけるヒアルロン酸分子量の違いによる影響
臨床リウマチ 11 : 203-206, 1999

2. 学会発表

Orthopaedic Research Society
March 12-15, 2000 USA

(1)K. Kobayashi, N. Ishiguro, H. Iwata, F. Kambe, H. Seo

Vector-averaged gravity impairs THF- α induced NF- κ B activation in HOS-TE85 cells

(2)T. Ito, N. Ishiguro, H. Ito, H. Shibata, T. Oguchi, H. Iwata

mRNA expression for aggrecanase and ADMS in degenerated menisci of the knee

(3)T. Sakai, N. Ishiguro, H. Iwata, M. Takigawa, K. Fukushi, H. Seo

The effect of TNF- α in human chondrosarcoma HCS-2/8 cells

(4)H. Shibata, N. Ishiguro, T. Ito, H. Iwata, Y. Murata

Localization of TACE (TNF α Converting Enzyme) and its regulation by cytokines in human rheumatoid arthritic synovial tissue

変形性脊椎症に対するMRIによる検討—椎間板変性と骨量、筋肉量、脂肪量の関連について

分担研究者 原田 敦 国立療養所中部病院整形外科医長

研究要旨 変形性脊椎症の重症度の進行と全身の骨量および軟部組織量との関係を腰椎MRIとDEXAによる骨量測定とBody Compositionで縦断的に検討した結果、椎間板変性進行の最も大きい群は、最も小さい群より全身骨骨量の減少が少なく、全身因子としての骨量が変形性脊椎症の進行に関連している可能性が示唆された。他の軟部組織量は関連がなかった。

A. 研究目的

脊椎における変形性関節症である変形性脊椎症には、その発症機序や進行機序に関して全身的因子との関連については、明らかでない点が多く残されている。その予防や治療を進展させるためには、この点を解析して全身的因子の関わりを解明する必要がある。そのために、今年度は次の2つの研究を行った。まず、変形性脊椎症の重症度と骨量および軟部組織量との関係を縦断的に調査検討した。次いで現在まで検討されていない、骨代謝マーカーや肥満遺伝子産物であるレプチンと変形性脊椎症重症度との関係を横断的に調査した。

B. 研究方法

骨粗鬆症などで当科を受診した閉経後女性患者のうち、腰痛のある者には骨量測定とMRI撮影の意義を説明し、同意を得て両検査を行ったのは346名であった。3年以上経過後に同一検査を行い得たのは48名であったが、8名は悪性腫瘍やRAなどの重症疾患合併があったため除外し、残りの40名を解析対象とした。初回検査時の年齢は平均 67.6 ± 9.1 才、追跡期間は3年から8年まで、平均4年10ヶ月であった。初回検査時の体重は平均 $48.8 \pm \text{kg}$ 、身長は平均 $148.5 \pm 7.0\text{cm}$ 、BMIは平均 $22.1 \pm 3.1\text{kg/m}^2$ であった。

従来から、変形性脊椎症の病変の主要部位は椎間板であるのにも関わらず、重症度評価にはKellgrenやNathanなど椎間板変化を間接的にしか解析できないエックス線学的分類が用いられてきた。そこで、本研究では直接椎間板自身の変化を定量的に評価できるMRIを用いて検討した。椎間板変性が進めば、椎間板面積は縮小する、あるいは椎間板突出率は増加するものと考えられる。そこでこれらの指標をMRIによって計測した。MRIは東芝製1.5テスラの機器を用いて、腰椎を5mmスライスでT1強調とT2強調の2種類の撮像法で撮影し、第1腰椎(L1)から第5腰椎(L5)までのT1強調正中矢状断像をスキャナーにてパーソナルコンピュータに取り込み、面積計算ソフトにより、第1腰椎・第2腰椎間椎間板(L1/2)から第4腰椎・第5腰椎間椎間板(L4/5)までの4つの平均椎間板面積を計測し、さらに

前後方へ突出する4つの平均突出椎間板面積と平均椎間板突出率を算定した。さらに椎体面積も計測して椎間板椎体比を求めた。これら4椎間板の平均計測値のほかに、各高位の椎間板計測値も検討した。

骨量は、DEXA(Lunar社, DPX)により第2腰椎から第4腰椎までの腰椎前後像骨密度(BMD)、全身骨BMDおよび各年齢補正值(%)を計測した。さらに全身骨測定時に得られるBody Compositionから総軟部組織量、脂肪量、Lean mass, Bone mass content(BMC)を求めて、椎間板計測値との関連を検討した。

さらに骨代謝マーカーとして血中骨型アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、尿中デオキシピリジノリン、肥満関連物質として血中レプチンを41例で測定し、椎間板計測値との関係を検討した。

各変量間の統計学的検討は、単回帰分析で行い、2群間はt-test、多群間比較は分散分析およびScheffe testを使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立療養所中部病院の倫理規定に従って、倫理委員会の承諾を得ている。患者に試験参加を求めるとき、インフォームドコンセントに基づき、理解と同意を得た場合のみ行い、試験参加者のいかなる情報も外部に漏れないよう細心の配慮をする。また、研究等によって生じる当該個人の不利益及び危険性に対する十分な配慮を行い、参加拒否の場合でもいかなる不利益も被らないことを明白にしておく。

C. 研究結果：

1. 椎間板計測値

①椎間板面積は初回 $247.6 \pm 64.1\text{mm}^2$ 、追跡時は $234.8 \pm 61.2\text{mm}^2$ と減少していた($P=0.0286$)。②椎体面積は初回 $631.3 \pm 71.4\text{mm}^2$ 、追跡時 $601.1 \pm 74.2\text{mm}^2$ とやはり減少していた($p=0.0004$)。③突出椎間板面積は初回 $30.3 \pm 15.5\text{mm}^2$ 、追跡時 $31.6 \pm 15.5\text{mm}^2$ と有意な変化はみられなかったが、④椎間板突出率は初回 0.127 ± 0.072 、追跡時 0.147 ± 0.084 突出椎間板面積と増加していた($p=0.0032$)。⑤椎間板椎体比は初回 0.400 ± 0.129 、追跡時 0.403 ± 0.151 と

差はなかった。⑥L4/5椎間板面積は初回は270.3±86.5mm²、追跡時は251.9±91.9mm²と減少していた(p=0.0381)。⑦L4/5突出椎間板面積は初回42.0±20.6mm²、追跡時42.1±21.0mm²と差がなかったが、⑧L4/5椎間板突出率は初回0.168±0.101、追跡時0.197±0.137と増加していた(p=0.0100)。同じく、⑨L1/2椎間板面積は初回は210.9±63.9mm²、追跡時は196.5±49.0mm²と減少していた(p=0.0281)。⑩L1/2突出椎間板面積は初回17.9±14.3mm²、追跡時20.1±16.1mm²と差がなかったが、⑪L1/2椎間板突出率は初回0.086±0.069、追跡時0.108±0.087と増加していた(p=0.0180)。他の高位の椎間板計測値には追跡期間中有意な変化を認めなかった。

2. 骨量および軟部組織量

①腰椎BMDは初回0.830±0.182g/cm²、追跡時は0.833±0.222g/cm²と差がなかったが、②腰椎BMD年齢補正值は初回91.7±17.8%、追跡時96.9±23.1%と増加していた(p=0.0337)。③全身骨BMDは初回0.918±0.098g/cm²、追跡時0.906±0.116g/cm²と差がなく、④全身骨BMD年齢補正值も同じく初回99.0±8.5%、追跡時100.3±10.3%と差がなかった。Body compositionの値は、⑤総軟部組織量は初回46183±7256g、追跡時46128±7775g、⑥脂肪量は初回10662±4382g、追跡時11243±5205g、⑦Lean massは初回35521±4275g、追跡時34885±4135gと軟部組織量には差がみられなかったが、⑧BMCは初回1638±332g、追跡時1567±341gと減少していた(p=0.0012)。

3. 椎間板計測値と骨量および軟部組織量との関連

椎間板面積および椎間板突出率に関して、調査期間中に有意の変化を示したのは、L1/2椎間板とL4/5椎間板の2高位のみであった。そこで、この2つの高位の椎間板に対して骨量データとの関連を解析した。L4/5椎間板計測値から椎間板面積と椎間板突出率がともに減少した群(D-D)8例、ともに増加した群(I-I)4例、椎間板面積が減少し、椎間板突出率が増加した群(D-I)15例、椎間板面積が増加し、椎間板突出率が減少した群(I-D)4例に分けて比較検討したところ、腰椎BMD変化には各群間に差を認めなかったが、全身骨BMD変化はD-I群が-0.001±0.023g/cm²に対してI-D群は-0.080±0.107g/cm²であり、D-I群の方がI-D群より全身骨BMDの減少は少なかった(p=0.0317)。これは全身骨BMD年齢補正值でも同じ結果であった(p=0.0198)。

一方、昨年度横断的に検討した際には、椎間板変性と関連した軟部組織量は、今回の縦断的検討では、軟部組織量の変化と椎間板計測値の変化の間には有意の関連は認められなかった。L1/2椎間板では、4群間に全ての骨量と軟部組織量の変化に椎間板計測値の変化

の間には有意な差を認めなかった。

4. 骨代謝マーカーおよびレプチンと椎間板計測値

骨型アルカリフォスファターゼは28.3±9.9U/l、オステオカルシンは6.5±3.4ng/ml、デオキシピリジノリンは8.5±4.9、レプチンは7.6±3.5ng/mlであった。椎間板計測値との間に骨型アルカリフォスファターゼが椎間板面積と有意の正の相関(r=0.333, p=0.033)を示したが、椎間板突出率とは関連をみなかった。他の二つの骨代謝マーカーは全ての椎間板計測値と関連がなかった。レプチンは体重補正した椎間板面積と負の相関(r=0.536, p=0.012)を示したが、椎間板突出率とは関連をみなかった。

D. 考察

変形性脊椎症の進行に伴い、椎間板は線維輪の断裂と亀裂形成、髄核の亀裂侵入と脱水などが生じて、圧縮されて面積が減少する、あるいは前後方への突出率が増加するという形態的变化が生じると考えられる。今回分析した症例における4つの椎間板も計測値の変化から、平均4年10ヶ月の間に椎間板変性が全体に進行したと思われる。ただ、各椎間板高位別に検討すると有意な椎間板変性の進行があったのは、L1/2とL4/5の2つの椎間板だけであった。L4/5に関しては、仙骨骨盤に連結して最も力学的負荷がかかる部位であり、椎間板変性由来の疾患のおこる頻度が最も高い高位であるという臨床的事実と一致する結果である。L1/2に関しても、胸郭に連結して力学的負荷がかかる部位であり、そのため椎間板変性進行が生じやすいのであろう。

これに対して、骨量関連データで減少していたのは全身BMCだけで、腰椎BMD年齢補正值はむしろ増加しており、他の骨量値は有意な変化をみなかった。閉経後女性のみを対象とした検討であるのにもかかわらず、明らかな骨量減少がなかったのは、閉経直後の急速な骨量減少をきたす60才未満が8例と少なかったことが影響しての結果と思われる。さらに腰椎骨量年齢補正值増加はL1/2とL4/5にみられた椎間板変性進行に伴う骨増殖性変化による骨量データ修飾がその原因と考えて矛盾はないと思われる。

今回の分析では、最も臨床的に問題となるL4/5椎間板において椎間板変性進行の最も少ないI-D群は椎間板変性進行が最も大きいD-I群より、全身骨BMD減少量が多かった。つまり、腰椎の変形性骨増殖に直接修飾を受けることの少ない全身骨BMDが下位腰椎椎間板変性の進行に何らかの影響を与えている可能性を示唆する結果と考えられる。このように椎間板変性には多くの全身因子が関連しているかもしれない。今回検討した骨形成マーカーである骨型アルカリフォスファターゼや肥満コントロールのホルモンであるレプチンが椎

間板面積と相関していたことなどもそのような例の可能性はある。ただし、両者とも椎間板への直接作用というよりは間接的な関連とみる方が妥当であろう。前者は骨量減少に伴う椎体面積縮小が、一方で骨型アルカリフォスファターゼ値を上げ、椎間板面積保持・拡大することに結びついたのであろうし、後者は最近報告されたレプチンの、脳視床下部に作用して骨形成速度を下げるという骨形成阻害作用など、椎間板に間接的に影響している可能性は考慮される。

D. 結論

閉経後女性40名を平均4年10カ月追跡し、骨量、軟部組織量とMRIから計測した椎間板変性の変動を検討した結果、椎間板変性の進行は全身骨BMDなどの全身的因子と関連を持ち、別に行った横断調査でもレプチンなど全身液性因子との関連がみられた。変形性脊椎症は、その発症機序や進行機序に関して全身的因子が関連するものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

・ Tokuda H, Kozawa O, Harada A, Uematsu T. Extracellular sphingomyelinase induces interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *J Cell Biochem* 72: 262-268, 1999.

・ Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: Increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 14:518-527, 1999.

・ Tokuda H, Kozawa O, Harada A, Uematsu T. Prostaglandin D2 induces interleukin-6 synthesis via Ca²⁺ mobilization in osteoblasts: regulation by protein kinase C. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 61:189-194, 1999.

・ Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A. Association of transforming growth factor β 1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. *Arthritis Rheum* 43:452-460, 2000.

・ 原田敦. 高齢者の転倒・骨折予防. *日本医師会雑誌* 122: 1955-1959, 1999.

2. 学会発表

・ 原田敦, 水野雅士, 竹村真理枝, 奥泉宏康, 徳田治彦, 山田芳司. 脊椎椎間板変性と骨量及び軟部組織量との関係の検討. 第17回日本骨代謝学会. 1999.7.31.

・ 原田敦, 水野雅士, 竹村真理枝, 奥泉宏康, 山田芳司. 椎間板変性とTGF- β 1遺伝子多型性の関連についての検討. 第51回東海脊椎外科研究会. 1999.5.16.

変形性関節症の発症進展におけるTGF- β 作用と細胞外マトリックスについての基礎的検討

分担研究者 渡辺 研

国立療養所中部病院長寿医療研究センター
老年病研究部 運動・感覚機能研究室 室長

研究要旨 変形性関節症の発症や進展において、その病態と深く関わりのあるTGF- β スーパーファミリーに属するTGF- β がその細胞内シグナル伝達分子Smadにより、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現を調節している可能性を見いだした。また、軟骨細胞cDNAライブラリーより、Smadと相互作用してTGF- β シグナルを調節する細胞骨格因子filaminを同定した。

A. 研究目的

Transforming growth factor- β (TGF- β) 群は、activinやBMPとともに、その一次構造の類似から分類されるスーパーファミリーを形成するサイトカインの一群である。このサイトカイン群は、初期発生の体軸決定から、各組織の形態形成に至るまで重要な働きを行っている。とりわけ、骨格組織においては、形態形成のみならず、組織形態の維持、再生機構において中心的役割を担っていると考えられている。その中でもTGF- β は、フィブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックス分子の発現を調節しており、また、前年度からの本研究課題においてヒアルロン酸合成酵素Has2の遺伝子発現を誘導することを示してきた。そこで、更に詳細な分子レベルでの検討を行うことによって、関節形態形成、維持、再生機構に関する知見を得るために、マウスヒアルロン酸合成酵素Has2遺伝子のクローニング、プロモータ領域の解析、Smad作用の解析をおこなった。

B. 研究方法

①マウスHas2遺伝子のクローニング

マウスES細胞由来BAC遺伝子ライブラリーより、マウスHas2 cDNAをプローブとしてスクリーニングを行い、陽性クローンを得た。陽性クローンのうち、マウスHas2 cDNAの5'端に相当する部分をプローブとして検索を行い、exon 1に相当する部分のDNA断片を、制限酵素分析、サザンブロッティング法により単離した。単離したDNA断片は、pBluescriptベクターにサブクローニングし、遺伝子配列の決定を行った。

②マウスHas2遺伝子プロモータ領域の解析

マウスHas2遺伝子プロモータの解析は、ホタルルシフェラーゼをレポーター遺伝子とするレポーター発現実験により行った。exon 1の5'非翻訳領域120bpを含む5'上流2.3kbpをpGL3-basicに組み込んだ。また、上流からのdeletion mutants (1.0 kbp, 0.7 kbp, 0.3 kbp) を作製し、同様にベクターに組み込んだ。このレポ-

ーターを、P19胚性癌腫細胞、293腎臓由来線維芽細胞、KUSA骨芽細胞等にトランスフェクションし、24時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。また、TGF- β シグナルについては、TGF- β 1による処理、もしくは、活性型TGF- β 受容体、不活性型TGF- β 受容体、SmadのcDNAをレポーターと同時にトランスフェクションすることにより検討をおこなった。

③Smad結合タンパクの検索

マウスSmad5 cDNAをpベクター (pAS2-1) に組み込み、ヒト軟骨細胞cDNAライブラリーとともに酵母を形質転換して、相互作用陽性のマーカーとするHis非依存性増殖をもとにスクリーニングを行った。得られた陽性クローンは、空のベクターおよび陰性コントロールとの実験において偽陽性でないことを確認し、さらに、異なる陽性マーカーであるベータガラクトシダーゼ活性についても検討を行った。得られた陽性クローンからDNAを調製し、大腸菌での選択から、相互作用を示したクローンのプラスミドDNAを単離した。単離したプラスミドについては、内部の塩基配列を決定し、NIH BLAST SEARCHにより、遺伝子の同定を行った。

C. 研究結果

前年度の結果より、Has2遺伝子の発現がTGF- β により誘導されることが示されていたが、その誘導のメカニズムについて更なる検討を行った。まず、TGF- β によるHas2 mRNAの蓄積が、転写阻害剤により有意に阻害を受けるため、この誘導は、Has2 mRNAの安定性の促進というよりはむしろ、積極的な転写活性の誘導と考えられた。そこで、マウスHas2遺伝子をクローニングし、exon 1上流領域にプロモータ活性があることをホタルルシフェラーゼ活性によるレポーター発現実験により同定した。プロモータ活性は0.3 kbpのコンストラクトにおいても検出された。また、その0.3 kbpの塩基配列中には、予想転写開始点の2-30 bp上流にTATA-box様の配列があることが判明し、プロモ-

タ活性の一端を担っていると考えられた。しかしながら、この0.3 kbpコンストラクトではTGF- β 応答性は検出されなかったことから、TGF- β 応答は0.3 kbpには存在しない可能性が示された。そこで、2.3 kbp及び1.0kbpコンストラクトをTGF- β 応答性実験に用いたところ、そのレポーター活性がSmad7共存下で抑制されたことから、Has2遺伝子発現誘導にSmad経路が関与していること、及び、上流1.0 kbp以内にTGF- β 応答エレメントが存在する可能性が示された。

Has2遺伝子発現誘導にSmad経路が関与していることから、軟骨細胞でSmad経路の制御に関わる因子の同定をyeast two hybrid screeningにより行った。ヒト軟骨細胞cDNAライブラリーより、Smad5に結合する分子として、Smad4の他、細胞骨格因子、filaminとfilamin-gを同定した。filaminは、280kDaのactin結合タンパクで細胞形態、とりわけ細胞膜の裏打ち構造と深い関係があり、細胞接着・遊走などでの機能が報告されている。そこで、filamin欠損細胞を用いて、Smad依存的なTGF- β 応答性のレポーター発現実験を行ったところ、その応答性は大きく減少し、filamin発現ベクターを共存させることによって、用量依存的に回復した。このことから、filaminは、Smad経路に対して正の制御を行っているものと考えられた。

D. 考察

今年度の研究により、TGF- β によるHas2遺伝子の誘導がSmad依存的である可能性が示された。Smadは、TGF- β 受容体キナーゼにより、直接C末端がリン酸化されることにより、受容体と離れ、Smad4との会合を経て、核内へと移動し、転写調節を行うことが知られている。このSmadはまた、MAP kinase経路により、中心部のリンカー領域がリン酸化され、核内移行が制御されている。Has2も同様にTGF- β による誘導が、他の関節維持・再生因子であるIGFやFGF、HGFなどにより、更に調節されている可能性を示している。また、同様にHas2遺伝子発現がBMPにより誘導されることから、共通のSmad経路による遺伝子転写活性化の可能性が考えられた。また、軟骨細胞でのSmad結合タンパクの検索により、細胞骨格因子filaminを同定したが、filaminはMEK1やSEK1などのMAPK経路のキナーゼも結合することが知られており、前述のSmad経路とMAPK経路のクロストークの場を提供している可能性がある。しかも、filaminは、インテグリン β 鎖との結合も見いだされており、細胞骨格と細胞接着のconjunctionに機能していることが示唆されている。これは、細胞遊走や細胞形態と密接な関係があることを意味しており、関節軟骨において、軟骨細胞がある種（例えば、メカニカルストレス等）による刺激により細胞形態に変化を与えた場合、TGF- β 応答性に変

化をもたらし、Has2発現調節を通したヒアルロン酸合成、ならびに細胞外マトリックス誘導に変化をもたらす可能性が考えられる。TGF- β が通常、細胞外マトリックスに蓄積されていることから、TGF- β -細胞外マトリックス-細胞接着という3つの因子がそれぞれ相互作用を直接的、間接的に及ぼし、関節形態維持・再生に関わっているのが考えられた。

E. 結論

1. ヒアルロン酸合成酵素Has2遺伝子はSmad経路を介してTGF- β により誘導される。
2. Smadは細胞骨格因子filaminと結合し、正の制御を受けている。ことが示された。

F. 引用文献

岩田久 新名正由編「関節マーカー」
メディカルレビュー社 1997年

J.L. Wrana

Regulation of Smad activity.
Cell 100:189-92 (2000)

S. Zhou, K.W. Kinzler, B. Vogelstein
Going mad with Smads.
N. Engl. J. Med 341:1144-46 (1999)

G. 研究発表

1. 論文発表

R. Kosaki, K. Watanabe et al.

Overexpression of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth. Cancer Res. 59:1141-5 (1999)

2. 学会発表

佐々木文、池田恭治、渡辺研

Smadのアクチン結合蛋白Filaminとの結合を介する機能制御

日本癌学会総会（広島）平成11年10月

変形性膝関節症の発症進展におけるTGF- β 1およびOCIFの役割

分担研究者 山田芳司 国立長寿医療研究センター老年病研究部室長

研究要旨 治療目的で採取した膝関節液を用いて、変形性膝関節症の病態におけるOCIFおよびTGF- β 1の役割について検討した。変形性膝関節症例では慢性関節リウマチ例に比べ滑液中OCIF濃度が高く、さらに膝関節症の重症度に依存してその濃度が上昇した。一方滑液TGF- β 1濃度は膝関節症では血中の約1/50と低値であり、重症度との関連は認められなかった。関節内でのOCIF産生源は軟骨細胞と滑膜細胞であると推定されており、膝関節症において重症度依存的にOCIF濃度が増加した理由は、関節軟骨障害に対する代償機構と考えられる。

A. 研究目的

変形性膝関節症は罹患者数が多く、疼痛のための運動機能障害やQOLの低下を生じるため、その有効な治療法の開発は高齢者医療において重要な課題である。近年、破骨細胞の分化を抑制するタンパクであるOsteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/Osteoprotegerinが発見され、これが破骨細胞の分化を抑制することにより骨吸収を低下させ、骨量増加作用を有することが明らかになったが、変形性膝関節症における関節局所でのOCIFの役割は不明である。一方、変形性膝関節症の病態におけるTGF- β の役割ならびに病態におけるOCIFとの関連についても明確な知見は得られていない。これらの点を解明し変形性膝関節症の病態を明らかにすることは、より有効な治療法の開発を進める上で重要である。本研究の目的は、関節液中のOCIFとTGF- β 1濃度を測定することにより、変形性膝関節症の発症進展におけるこれらのサイトカインの関節局所での役割を明らかにすることにある。

B. 研究方法

変形性膝関節症160例および慢性関節リウマチ40例から治療目的で採取した滑液中のOCIFおよびTGF- β 1濃度を別々のELISA法で測定した。また変形性膝関節症60例および健常者60例から得られた血清OCIF濃度を測定した。

C. 研究結果

変形性膝関節症では慢性関節リウマチに比べ滑液中OCIF濃度が約2倍高く、さらにX線診断による膝関節症の重症度に依存してその濃度が上昇した。また滑液中のOCIF濃度は変形性膝関節症では血中濃度の約8倍、慢性関節リウマチでは約4倍といずれも血中濃度に比較し高値であった。一方、滑液TGF- β 1濃度は膝関節症では血中の約1/50と低値であり、重症度との関連は認められなかった。OCIFとは逆に慢性関節リウマチの滑液TGF- β 1濃度は膝関節症に比べ2-3倍高値であった。

D. 考察

関節内でのOCIF産生細胞は軟骨細胞と滑膜細胞であると推定されており、変形性膝関節症において重症度依存的にOCIF濃度が増加した理由は、関節軟骨障害に対する代償機構と考えられる(Takemura M, Harada A, Mizuno M, Yano K, Yamada Y. 論文投稿中)。今後、変形性膝関節症と慢性関節リウマチにおける滑液OCIFおよびTGF- β 1濃度のバランスの相違について、傍関節骨破壊などの臨床所見との関連を含め検討する予定である。さらに我々は雪印乳業生物科学研究所との共同研究により破骨細胞分化促進因子(Osteoclast differentiation factor, ODF)のsoluble formについてもその滑液および血清中の濃度を測定中である。破骨細胞の形成においてはその抑制因子であるOCIFと促進因子であるODFのバランスが重要であり、変形性膝関節症および慢性関節リウマチの滑液中のそれぞれの濃度を測定することにより、病態の違いが一層明らかになり、新しい治療法の開発に貢献できることが期待される。

E. 結論

OCIFは関節軟骨障害に対する防御因子としての役割を有する可能性が示唆された。この分子メカニズムを解明することにより変形性膝関節症の新しい治療法の開発が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada Y, Harada A, Hosoi T, Miyauchi A, Ikeda K, Ohta H, Shiraki M. Association of transforming growth factor β 1 genotype with therapeutic response to active vitamin D for postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res 2000;15:415-420.
- 2) Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A. Association of transforming growth factor β 1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. Arthritis

Rheum 2000;43:452-460.

3) Yano Y, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999;14:518-527.

4) Yamada Y, Hosoi T, Makimoto F, Tanaka H, Seino Y, Ikeda K. Transforming growth factor beta-1 gene polymorphism and bone mineral density in Japanese adolescents. *Am J Med* 1999;106:477-479.

2. 学会発表

1) 原田 敦、奥泉宏康、徳田治彦、山田芳司：脊椎椎間板変性と骨量および軟部組織量との関係の検討 第17回日本骨代謝学会、大阪、平成11年7月

2) 山田芳司、原田 敦、宮内章光、細井孝之、池田恭治、太田博明、白木正孝：TGF- β 1遺伝子多型による閉経後骨粗鬆症の治療効果の予測 第17回日本骨代謝学会、大阪、平成11年7月

3) Yamada Y. Prediction of the outcome of therapy with active vitamin D for postmenopausal osteoporosis by transforming growth factor- β 1 genotype. The 4th NLS Workshop, Obu, Japan, December 1999.

別添4

研究成果の刊行に関する一覧表

- Y. Hasegawa, T. Iwase, S. Iwasada, S. Kitamura, H. Iwata
Osteonecrosis of the femoral head associated with pregnancy
Arch Orthop Trauma Surg 119 : 112-114, 1999
- S. Iwasada, Y. Hasegawa, T. Iwase, S. Kitamura, H. Iwata
Bone scintigraphy and magnetic resonance imaging after transtrochanteric rotational osteotomy
Skeletal Radiol 28 : 251-259, 1999
- S. Ota, H. Muramatsu, T. Senda, Kun Zou, H. Iwata, T. Muramatsu
Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis
J Bone Mineral Res 14 : 1132-1144, 1999
- H. Nagaya, T. Yamagata, K. Iyoda, H. Ito, Y. Hasegawa, H. Iwata
Examination of synovial fluid and serum hyaluronidase activity as a joint marker in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients : by zymography
Ann Rheum Dis 58 : 186-188, 1999
- N. Ishiguro, T. Ito, K. Miyazaki, H. Iwata
Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, and Glycosaminoglycans in Synovial Fluid from Patients with Rheumatoid Arthritis
J Rheumatol 26 : 34-40, 1999
- N. Ishiguro, T. Ito, H. Ito, H. Iwata, Hitenishi Jugessur, Mirela Ionescu and A. Robin Poole
Relationships of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors to Cartilage Proteoglycan and Collagen Turnover revealed by Analyses of Synovial Fluids from Patients with Osteoarthritis
Arthritis Rheum 42 : 129-136, 1999
- D. Kida, M. Yoneda, S. Miyaura, T. Ishimaru, Y. Yoshida, T. Ito, N. Ishiguro, H. Iwata, K. Kimata
The ShAP-HA Complex in Sera from Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis
J Rheumatol 26 : 1230-1238, 1999
- Fei Han, N. Ishiguro, T. Ito, T. Sakai, H. Iwata
Effects of sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis in rabbit knee joints
Nagoya J Med Sci 62 : 115-126, 1999
- 酒井忠博、石黒直樹、岩田久、滝川正春
TNF刺激下の培養細胞におけるヒアルロン酸分子量の違いによる影響
臨床リウマチ 11 : 203-206, 1999
- H. Tokuda, O. Kozawa, A. Harada, T. Uematsu
Prostaglandin D2 induces interleukin-6 synthesis via Ca²⁺ mobilization in osteoblasts: regulation by protein kinase C
Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 61 : 189-194, 1999

K. Yano, E. Tsuda, N. Washida, F. Kobayashi, M. Goto, A. Harada, K. Ikeda, K. Higashio,
Y. Yamada

Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor:
Increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis
J Bone Miner Res 14 : 518-527, 1999

H. Tokuda, O. Kozawa, A. Harada, T. Uematsu

Extracellular sphingomyelinase induces interleukin-6 synthesis in osteoblasts
J Cell Biochem 72 : 262-268, 1999

原田敦

高齢者の転倒・骨折予防

日本医師会雑誌 122 : 1955-1959, 1999

R. Kosaki, K. Watanabe et al.

Overexpression of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances
anchorage-independent growth and tumorigenicity
Cancer Res 59 : 1141-1145, 1999

Y. Yamada, A. Harada, T. Hosoi, A. Miyauchi, K. Ikeda, H. Ohta, M. Shiraki

Association of transforming growth factor b1 genotype with therapeutic response to active
vitamin D for postmenopausal osteoporosis
J Bone Miner Res 15 : 415-420, 2000

Y. Yamada, H. Okuizumi, A. Miyauchi, Y. Takagi, K. Ikeda, A. Harada

Association of transforming growth factor b1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese
women
Arthritis Rheum 43 : 452-460, 2000

Y. Yamada, T. Hosoi, F. Makimoto, H. Tanaka, Y. Seino, K. Ikeda

Transforming growth factor beta-1 gene polymorphism and bone mineral density in Japanese
adolescents
Am J Med 106 : 477-479, 1999