

厚生科学研究研究費補助金  
長寿科学総合研究事業

# 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12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩 田 久

平成13 (2001) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告書

- 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 ..... 1  
岩田 久

### II. 分担研究報告

1. 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 ..... 5  
岩田 久
2. 軟骨細胞でのNF- $\kappa$ B活性化抑制－軟骨細胞代謝の特異性－ ..... 7  
石黒直樹
3. 変形性脊椎症に対するMRIによる検討 ..... 9  
－椎間板変性と骨量、筋肉量、脂肪量の関連について  
原田 敦
4. 変形性関節症の発症進展におけるTGF- $\beta$ 作用と細胞外 ..... 11  
マトリックスについての基礎検討  
渡辺 研
5. 変形性膝関節症の発症進展におけるTGF- $\beta$ 1およびOCIFの役割 ..... 13  
山田芳司

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 15

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 17

## 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。目的は、変形性関節症の成因・病態を解明し、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)関節液と病期の分析を行った。基質分解物とMMP・TIMPとの間に相関はなく、①他の物質による分解の可能性②阻害物質の関与③酵素活性化での制御の検討が必要と推察された。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においてTNF- $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの活性化はI $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ のリン酸化、分解により細胞質より一過性の消失を伴うこと、この活性化は抗酸化剤では抑制されず、Proteasome inhibitorによって抑制される事を示した。原田は変形性脊椎症の本態である椎間板圧縮をMRIで評価し、全身組織量との関係を検討した。横断検討で椎間板変性と骨量は正の相関を持ち、縦断検討で椎間板変性進行群は非進行群より全身骨量減少が少なく、骨量は変形性脊椎症進展に一定の影響を持つことが示されたが、軟部組織量は椎間板変性に関連しなかった。脊柱管狭窄と全身骨軟部組織量は関連を有しなかった。渡辺は変形性関節症の組織形態・機能維持と深く関わりのあるTGF- $\beta$ スーパーファミリーの分子群の作用について、軟骨細胞cDNAライブラリーからSmad結合タンパクとしてFilaminを単離し、TGF- $\beta$ 作用に重要な働きを行っていることを明らかにした。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た。

## 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（財団法人岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部）

## 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うる関節症マーカー（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。TGF- $\beta$ 、BMPなどのTGF- $\beta$ スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達においては、Smad分子と呼ばれる一群の伝達因子が主要な役割を担っている。Smadのレセプターとの会合、細胞内代謝はさまざま

Smad結合蛋白によって調節されている。渡辺はTGF- $\beta$ 、BMP依存性の遺伝子発現調節は変形性関節症治療に応用可能と考え、軟骨細胞におけるSmad分子の調節因子を明らかとすることを目的とした。山田は関節液中のOCIFとTGF- $\beta$ 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。

## 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。関節液中MMP-1、-2、-3、-8、-9、-13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2糖に分解後HPLCにて、ケラタン硫酸は5-D-4 epitope, Type II collagen C-propeptideをELISAにて測定した。Cleavage epitope of type II collagen, 846 epitopeはカナダ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- $\alpha$  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- $\kappa$  B の活性化を観察した。また、TNF- $\alpha$  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- $\kappa$  B の活性化及び I $\kappa$  B の分解、各遺伝子の発現に与える影響を調べた対照として骨芽細胞細胞株を用いて NF- $\kappa$  B の活性化の違いを検討した。原田は 3 年度にわたり腰椎 MRI と骨量測定を実施した閉経後女性を対象とした。計測項目は正中矢状断椎間板面積と椎間板突出率である。脊柱管狭窄は硬膜管面積で評価した。DEXA により全身骨 BMD を計測し、Body Composition から脂肪量、Lean mass, Bone mass content (BMC) を求めて椎間板および硬膜管計測値との関連を検討した。2 年度では 3 年以上経過観察例での検討を行った。(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実施された。渡辺は ① 結合実験: GST-Smad5 ならびに GST-ABP-C を大腸菌内で合成させ、GSH-Sepharose カラム精製し、in vitro 結合試験に用いた。[35S]Met および in vitro translation でラベルされたタンパクと GST 融合タンパクの結合を GST 特異的沈降法により調べた。in vivo 結合試験では、エピトープタグを付した Smad コンストラクト (Smad1, 2, 4, 5, 6, 7) と Filamin の各部位に対する断片を発現するベクターを細胞に導入し、共免疫沈降法により結合を調べた。② 転写活性化実験: TGF- $\beta$  応答性レポーター遺伝子 3TP-lux を Smad コンストラクトおよび Filamin コンストラクトとともに細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性をルミノメータにより測定した。③ 核内移行試験: TGF- $\beta$  (10 ng/ml) 処理 1 時間後に細胞を 4% パラフォルムアルデヒドにより固定し、抗 Smad2 抗体ならびに二次抗体として FITC 結合抗マウス IgG 抗体を用いて、細胞内の Smad2 の挙動を間接蛍光抗体法により観察した。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- $\beta$  1 濃度をそれぞれの 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。各症例の膝関節 X 線および他の臨床所見とこれらの測定値とを比較検討した。

### C. 研究結果

岩田の研究では MMP、TIMP 濃度の比較では RA 関節液は OA 関節液と比較して MMP-1、-3 に高値であった。MMP-13 は両疾患で測定限界以下を示すものが多かった。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 Aggrecanase 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。一方 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。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。一方、Collagen 分解の指標には明らかな変化を見いだすことが出来なかった。石黒の研究では HCS-2/8 細胞において、TNF- $\alpha$  によって活性化される NF- $\kappa$  B は、p50-p65 heterodimer を形成、TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  によって濃度依存性に増加した。NF- $\kappa$  B の活性化に伴い I $\kappa$  B  $\alpha$ 、I $\kappa$  B  $\beta$  のリン酸化、分解により細胞質からの一過性消失が見られた。細胞質内の I $\kappa$  B  $\alpha$ 、I $\kappa$  B  $\beta$  共にその後 1 2 時間にわたり増加する傾向が見られた。抗酸化剤による NF- $\kappa$  B 活性化阻害は見られなかった。Proteasome inhibitor は、TNF- $\alpha$  による I $\kappa$  B の分解を阻害し、NF- $\kappa$  B の核内移行を妨げ、DNA 結合能の上昇を抑制することを確認した。一方骨芽細胞様細胞 ROS では抗酸化剤による NF- $\kappa$  B 活性化の抑制が見られた。COX-2、MMP-1、3 の TNF- $\alpha$  による遺伝子発現の増加は、抗酸化剤によっては抑制されず、Proteasome inhibitor によって、著明に抑制された。原田の研究では横断的検討は初年度と 3 年度に実施したが、一貫していたのは全身骨 BMD や BMC と椎間板変性との正の相関で、骨量が増えると椎間板圧縮が進むという関係であった。軟部組織量の椎間板変性への影響について、初年度にステップワイズ回帰により脂肪量は骨量や筋肉量より低いと判断されたが、症例が増えた 3 年度ではロジスティック回帰により両軟部組織量の影響は否定された。2 年度の縦断的検討では平均 4 年 10 ヶ月の間に椎間板変性が進行した群は、全く進行しなかった群より全身骨 BMD の減少が少なかった。3 年度の検討では硬膜管面積は、全身骨 BMD、体組成組織量のいずれとも有意な相関を持たなかった。渡辺は in vitro と in vivo

における結合実験を行い、いずれにおいても Filamin と Smad5 の結合が認められた。他の Smad 分子についても Filamin と結合しうるかどうかを解析したところ、Smad5 とホモロジーの高い BMP シグナル特異的 Smad1、TGF- $\beta$  シグナル特異的 Smad2、共通型 Smad の Smad4、抑制型 Smad の Smad6 のいずれも *in vivo* で Filamin と結合した。以上のことから Filamin は Smad5 を介する BMP シグナリングのみならず、Smad2 を介する TGF- $\beta$  シグナルにも関わる可能性が示唆された。Filamin を自然に欠失したヒトメラノーマ細胞 M2 と、M2 に Filamin の遺伝子を導入して Filamin を安定発現させた A7 について、TGF- $\beta$  反応性のレポーター-p3TP-lux の転写活性を比較したところ、恒常活性型 TGF- $\beta$  I 型レセプター及び TGF- $\beta$  処理による活性上昇は M2 で低下していた。逆に M2 に一過性に Filamin を発現させると、恒常活性型レセプター刺激による p3TP-lux の活性上昇の回復がみられた。この活性の回復は、アクチン結合部位を欠いた Filamin の発現によっても起こり、少なくとも TGF- $\beta$  シグナルに関しては、Filamin がアクチン線維を架橋することは必要がないことが示唆された。TGF- $\beta$  処理による Smad2 の核内への移行を免疫蛍光染色で観察すると、TGF- $\beta$  処理 1 時間後の A7 には Smad2 の核内への蓄積が認められたが M2 には認められなかった。山田の研究では OA では RA に比べ滑液 OCIF 濃度が約 2 倍高く、さらに X 線診断による変形性膝関節症の重症度に依存してその濃度が増加した。また滑液 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- $\beta$  1 濃度は変形性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- $\beta$  1 濃度は膝関節症に比べ 2-3 倍高値であった。

#### D. 考察

1. 岩田の研究は 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。石黒の研究は NF- $\kappa$ B の活性化に注目し骨細胞との代謝の相違を検討した。現在活性化される NF- $\kappa$ B のサブユニットは細胞、組織により異なること、活性化に至る細胞内伝達経路が組織あるいは刺激の違いによって異なるなど報告が錯綜している。抗酸化剤が NF- $\kappa$ B 抑制効果を持つことは関節組織の細胞種では滑膜細胞・骨芽細胞で明らかとされている。今回軟骨細胞ではこれが見られず、軟骨細胞が血管を欠いた組織に存在する細胞であること、他方骨組織が血行が豊富な組織であることの対比を考えると興味深い所見と考えられた。I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$  の代謝では消失後 12 時間にわたり合成がみられた。この合成促進は NF- $\kappa$ B 活性化抑制による治療法の候補であると思われた。原田の研究では変形性脊椎症を椎間板圧縮度から評価して体組成組織量との関係を検討したところ、軟部組織は関連を持たず、骨量のみが椎間板変性と正の相関を有していた。この結果は、骨粗鬆症と変形性脊椎症が相反した位置にある疾患であるという説を支持する面を持つが、3 年度の検討で明らかになったように、全身骨量が主に影響するのは椎間板中央の容積に対してであり、椎間板周縁部は必ずしも連動しないため、臨床的により重大な脊柱管狭窄には関連しなかった。すなわち、高骨量が脊柱管狭窄を導くという危惧は少ないものと考えられた。渡辺の研究ではほとんどの組織に普遍的に存在し、N 末端側にアクチン結合部位を持ち、C 末端側のドメイン 24 で会合してホモ 2 量体を形成するタンパク質で、2ヶ所の可塑性に富む hinge 部分を含む Filamin に注目した。アクチン線維が網目状に重合する際の蝶番の様な働きをするタンパクとして同定されたものであるが、インテグリン $\beta$ 鎖、グライコプロテイン I $\beta$ 、TRAF2、MAP キナーゼキナーゼの SEK1、プロセッシング酵素のフェーリンなどと結合することが報告されており、多様な細胞内シグナルに関わるタンパクと考えられている。Filamin の欠失によるヒトの疾患 Periventricular Heterotopia において合指症、斜指症などの TGF- $\beta$  スーパーファミリーの異常でも起こる骨格異常が認められることから、Filamin が Smad を介するシグナリングに関与する可能性を考えた。Filamin は Smad2 のレセプターによるリン酸化の過程で働き、Smad を活性化されたレセプターの近傍に動員する役割を担う分子の一つと考えられた。最近、Filamin と TGF- $\beta$  レセプターの両者がそれぞれ caveolin-1 に結合してカベオラに存在することが報告され、実際に細胞内で Filamin が Smad のシグナルに関与して

いる可能性が強く示唆された。

山田の研究では関節内での 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た (Takemura M, Harada A, Mizuno M, Yano K, Yamada Y. Metabolism 2001)。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 濃度と傍関節骨吸収像などの臨床所見との関連を検討する予定である。さらに雪印乳業生物科学研究所との共同研究により可溶性破骨細胞分化促進因子 (osteoclast differentiation factor, ODF) についてもその滑液および血清濃度を測定中である。骨吸収においては、破骨細胞形成抑制因子である 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を一層明らかにし、新しい治療法の開発に貢献したいと考えている。

#### 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。コラーゲン、プロテオグリカンの分解は一定の傾向が見られなかった。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- $\alpha$  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、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。NF- $\kappa$ B 活性化を抑制することで、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。しかし、その抑制には骨・滑膜細胞と違う細胞代謝条件を考慮する必要があると思われた。

3, 閉経後女性の腰椎 MRI における椎間板変性および脊柱管狭窄と全身 BMD、脂肪量、Lean Mass、BMC の関係を検討した。軟部組織は関連を示さなかったが、骨量は椎間板変性に正の相関を有し、何らかの影響を与えていると考えられた。一方、脊柱管狭窄はいずれの因子とも関連していなかった。

4, 軟骨の形態形成・維持、ならびに変形性関節症の病態と深く関わる TGF- $\beta$  のシグナル機構において細胞骨格因子 Filamin が重要な役割を担っている

ことを明らかとした。

5, 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。

## 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)関節液中の分解酵素(MMPs)、阻害物質(TIMPs)、Collagen分解・合成指標物質、Proteoglycan合成・分解指標物質を各測定した。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測定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著明な濃度差が見られ、RA優位に高値を示した。両疾患でCollagen、Proteoglycan分解物とMMP・TIMPとの間に相関はなく、①他の物質による分解の可能性②阻害物質の関与③酵素活性化での制御の検討が必要と推察された。CollagenとProteoglycanの分解が平行しない可能性が示された。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、関節軟骨基質から由来すると考えられるグリコサミノグリカン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5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、-13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, Cleavage epitope of type II collagen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を検討した。

## C. 研究結果

MMP、TIMP濃度の比較ではRA関節液はOA関節液と比較してMMP-1、-3に高値であった。MMP-13は両疾患で測定限界以下を示すものが多かった。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Aggrecanase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。一方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。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。一方、Collagen分解の指標には明らかな変化を見いだすことが出来なかった。

## D. 考察

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役割が大きいと考えられる。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が考えられる。

- 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) 軟骨基質の再生に関わる物質 C-pro peptide of Type II collagen、846 epitope of chondroitin sulfate (Dr. Robin Poole)等がある。また分解産物には直接的な酵素による切断部位を測定する方法とそれ以外の方法に分かれる。従来直接的な Cleavage epitope の測定は酵素活性による基質破壊の直接的な証拠であるにも関わらず困難とされてきた。今回我々は Type II collagen についてこれを実施し、MMPs、TIMPs 濃度との関連が見られないことを報告した。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考えられる。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。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ゲナーゼ、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支持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。

## F. 健康危険情報

特に報告すべき危険情報なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yukiharu Hasegawa, Hisashi Iwata

Natural history of unreduced congenital dislocation of the hip in adults

Arch Orthop Trauma Surg 120:17-22, 2000

Seiki Iwasada, Yukiharu Hasegawa, Shinji

Kitamura, Kenichi Yamauchi, Hisashi Iwata

Osteophyte of the femoral head after transtrochanteric rotational osteotomy

J Orthop Sci 5:349-355, 2000

### 2. 学会発表

第15回日本整形外科学会 基礎学術集会 京都  
2000.9.28-29

西田佳弘, Warren Knudson, Cheryl Knudsin,  
岩田 久

関節軟骨細胞におけるCD44の発現とその役割

第15回日本整形外科学会 基礎学術集会 京都  
2000.9.28-29

坂野真士, Linda J. Sandell, 近藤精司, 岩田久

転写因子AP-2とSox9およびType II, X collagen  
とCD-RAPの関節軟骨、半月板軟骨、成長軟骨に  
おける発現



厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

軟骨細胞でのNF- $\kappa$ B活性化抑制  
—軟骨細胞代謝の特異性—

分担研究者 石黒直樹 名古屋大学医学部整形外科助教授

研究要旨 各種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細胞内の伝達機構に関しては未だ不明な点も多い。ヒト軟骨組織由来細胞株 HCS-2/8 においてTNF- $\alpha$ によるCOX-2、MMP-1、3の遺伝子発現の増加はNF- $\kappa$ Bの活性化を介していること、この活性化にはI $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ のリン酸化、分解により細胞質より一過性の消失を伴うこと、その後I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ 共に暫増する事を示した。この活性化は抗酸化剤では抑制されず、Proteasome inhibitorによって抑制された。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- $\kappa$ Bの活性化が関与していること、また軟骨細胞と骨芽細胞との比較でNF- $\kappa$ B活性化の機序が異なる可能性が示唆された。これは軟骨細胞特異的な治療法開発の糸口与えるものと期待している。

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、腫瘍壊死性因子TNF- $\alpha$ による転写調節因子NF- $\kappa$ Bの活性化の抑制及び、炎症や軟骨基質の破壊に関わるCOX-2、MMP-1、3の遺伝子発現に対する抑制効果を調べた。同時に骨芽細胞との比較を行った。

B. 研究方法

ヒト軟骨組織由来細胞株 HCS 2 / 8 を用いてTNF- $\alpha$ を用い転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化し、これに各種抗酸化剤及びProteasome inhibitorを作用させた。1時間後細胞を回収し、細胞核分画を利用してEMSA法にてを観察した。同様にTNF- $\alpha$ に抗酸化剤、Proteasome inhibitorを添加し細胞に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。対象としてラット由来骨芽細胞様細胞ROSを用いた。

C. 研究結果

HCS-2/8細胞において、TNF- $\alpha$ によって活性化されるNF- $\kappa$ Bは、p50-p65 heterodimerを形成しており、TNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ によって濃度依存性に増加した。NF- $\kappa$ Bの活性化に伴いI $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ のリン酸化、分解により細胞質からの一過性消失が見られた。細胞質内のI $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ 共にその後12時間にわたり増加する傾向が見られた。抗酸化剤によるNF- $\kappa$ B活性化阻害は見られなかった。Proteasome inhibitorは、TNF- $\alpha$ によるI $\kappa$ Bの分解を阻害し、NF- $\kappa$ 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。一方骨芽細胞様細胞ROSでは抗酸化剤によるNF- $\kappa$ B活性化の抑制が見られた。COX-2、MMP-1、3のTNF- $\alpha$ による遺伝子発現の増加は、抗酸化剤によっては抑制されず、Proteasome inhibitorによって、著明に抑制された。骨芽細胞では抗酸化剤によるこれら遺伝子の発現抑制が観察された。

D. 考察

NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ Bはその阻害因子であるI $\kappa$ Bと結合した形で細胞質中に存在し、TNF- $\alpha$ 等の刺激によりI $\kappa$ B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I $\kappa$ Bが分解され、NF- $\kappa$ Bが核内に移行する、これをNF- $\kappa$ Bの活性化と呼ぶ。核内に移行したNF- $\kappa$ 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、活性化されるNF- $\kappa$ Bのサブユニットは細胞、組織により異なること、活性化に至る細胞内伝達経路が組織あるいは刺激の違いによって異なるなど報告が錯綜している。抗酸化剤がNF- $\kappa$ B抑制効果を持つことは関節組織の細胞種では滑膜細胞・骨芽細胞で明らかとされている。今回軟骨細胞ではこれが見られず、軟骨細胞が血管を欠いた組織に存在する細胞であること、他方骨組織が血行が豊富な組織であることの対比を考えると興味深い所見と考えられた。Proteasome inhibitorはubiquitin-proteasome pathwayによる、NF- $\kappa$ B阻害因子であるI $\kappa$ Bの分解を阻害することによりNF- $\kappa$ 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- $\alpha$ によるI $\kappa$ Bの分解を阻害し、NF- $\kappa$ Bの核内移行を妨げ、DNA結合能の上昇を抑制した。また、COX-2、MMP-1、3のTNF- $\alpha$ 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。I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ の代謝では消失後12時間にわたり合成がみられた。この合成促進はNF- $\kappa$ B活性化抑制による治療法の候補であると思われる。

#### E. 結論

軟骨組織由来細胞においてTNF- $\alpha$ 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、いわゆるChondrocytic chondrolysisを示唆するものと考えられた。その細胞内伝達経路の一つとしてNF- $\kappa$ Bの活性化が関与する事、この抑制には、滑膜細胞・骨芽細胞とは違って抗酸化剤は無効であることを示した。このことは軟骨細胞は滑膜細胞・骨芽細胞とは異なるNF- $\kappa$ Bの活性化機序を持ち、これには酸化反応が関係していない可能性を示した。滑膜細胞・骨芽細胞と比較して軟骨細胞が比較的酸素供給の乏しいと考えられる環境の組織に生活する細胞であることを考えると興味深い所見と思われた。このことは軟骨細胞の特殊性に由来すると考えた。今

回得られた知見は軟骨細胞に特異的な治療法開発の糸口を提供しうられる。

#### F. 健康危険情報

特に報告するべき危険情報なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Naoki Ishiguro, Takuya Shimizu, Takayasu Ito, Toshiki Kojima, Yusuke Iwahori, Hisashi Iwata

The expression of matrix metalloproteinases and inhibitors in acute rupture of the anterior cruciate ligament

Mod Rheumatol 10:95-102, 2000

Kazutoshi Kurokuchi, Fukushi Kanbe, Toyone Kikumori, Tadahiro Sakai, Devanand Sarkar, Naoki Ishiguro, Hisashi Iwata, Hisao Seo

Effects of glucocorticoids on tumor necrosis factor  $\alpha$ -dependent activation of nuclear factor  $\kappa$ B and expression of the intercellular adhesion molecule 1 gene in osteoblast-like ROS17/2.8 cells

J Bone Miner Res 15:1707-1715, 2000

##### 2. 学会発表

16th Annual Meeting on Oncogenes (The Evolution of the Cancer Cells) La Jolla (USA) 2000.6.22-6.25

Yasuyoshi Sohara, Naoki Ishiguro, Kazuya Machida, Hisashi Kurata, Satoru Matsuda, Hisashi Iwata, Michinari Hamaguchi

Hyaluronan-dependent cell motility in v-Src transformed cells requires the Ras-MAPK pathway

第15回日本整形外科学会 基礎学術集会 京都 2000.9.28-29

高嶺由二、土屋廣起、栗田和洋、北小路隆彦、小野芳裕、大嶋義之、石黒直樹、岩田久

骨芽細胞注入によるラット脚延長の仮骨形成促進

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

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 変形性脊椎症の本態である椎間板圧縮を MRI で評価し、全身組織量との関係を検討した。横断検討で椎間板変性と骨量は正の相関を持ち、縦断検討で椎間板変性進行群は非進行群より全身骨量減少が少なく、骨量は変形性脊椎症進展に一定の影響を持つことが示されたが、軟部組織量は椎間板変性に関連しなかった。脊柱管狭窄と全身骨軟部組織量は関連を有しなかった。

#### A. 研究目的

変形性脊椎症は椎間板変性を本態とする疾患で合併症として脊柱管狭窄症がある。本疾患と全身要因との関連について、骨量、軟部組織量との関係を横断的、一部は縦断的に検討した。さらに脊柱管狭窄との関連も検討した。

#### B. 研究方法

3 年度にわたり腰椎 MRI と骨量測定を実施した閉経後女性を対象とした。計測項目は正中矢状断椎間板面積と椎間板突出率である。脊柱管狭窄は硬膜管面積で評価した。DEXA により全身骨 BMD を計測し、Body Composition から脂肪量、Lean mass、Bone mass content(BMC) を求めて椎間板および硬膜管計測値との関連を検討した。2 年度では 3 年以上経過観察例での検討を行った。

(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実施された。

#### C. 研究結果：

横断的検討は初年度と 3 年度に実施したが、一貫していたのは全身骨 BMD や BMC と椎間板変性との正の相関で、骨量が増えると椎間板圧縮が進むという関係であった。軟部組織量の椎間板変性への影響について、初年度にステップワイズ回帰により脂肪量は骨量や筋肉量より低いと判断されたが、症例が増えた 3 年度ではロジスティック回帰により両軟部組織量の影響は否定された。2 年度の縦断的検討では平均 4 年 10 ヶ月の間に椎間板変性が進行した群は、全く進行しなかった群より全身骨 BMD の減少が少なかった。3 年度の検討では硬膜管面積は、全身骨 BMD、体組成組織量のいずれとも有意な相関を持たなかった。

#### D. 考察

変形性脊椎症を椎間板圧縮度から評価して体組成組織量との関係を検討したところ、軟部組織は関連を持たず、骨量のみが椎間板変性と正の相関を有していた。この結果は、骨粗鬆症と変形性脊椎症が相反した位置にある疾患であるという設を支持する面を持つが、3 年度の検討で明らかになったように、全身骨量が主に影響するのは椎間板中央の容積に対してであり、椎間板周縁部は必ずしも連動しないため、臨床的により重大な脊柱管狭窄には関連しなかった。すなわち、高骨量が脊柱管狭窄を導くという危惧は少ないものと考えられた。

#### E. 結論

閉経後女性の腰椎 MRI における椎間板変性および脊柱管狭窄と全身 BMD、脂肪量、Lean Mass、BMC の関係を検討した。軟部組織は関連を示さなかったが、骨量は椎間板変性に正の相関を有し、何らかの影響を与えていると考えられた。一方、脊柱管狭窄はいずれの因子とも関連していなかった。

#### F. 健康危険情報

特に報告するべき危険情報なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1.M Takemura, A Harada, M Mizuno, Y Yamada. Relationship between osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor concentration in synovial fluid and disease severity in individuals with osteoarthritis of the knee. Metabolism 50: 1-2, 2001.

2.A Harada, M Mizuno, M Takemura, H Tokuda,

H Okuizumi, N Niino. Hip fracture prevention trial using hip protectors in Japanese nursing homes. Osteoporos Int (in print), 2001.

3.H Tokuda, O Kozawa, A Harada, T Uematsu. p42/p44 Mitogen-activated protein kinase activation is involved in prostaglandin F2 $\alpha$ -induced interleukin-6 synthesis in osteoblast. Cell Signal 11: 325-330, 1999.

## 2. 学会発表

1.原田敦、水野雅士、竹村真里枝、奥泉宏泰、田中英一. 大腿骨頸部骨折における転倒の病態. 第73回日本整形外科学会学術集会. 2000.4.6.

2.原田敦、水野雅士、竹村真里枝、奥泉宏泰、井上喜久男、猪田邦雄. ヒッププロテクターによる大腿骨頸部骨折予防試験. 第73回日本整形外科学会学術集会. 2000.4.9.

3.Harada A, Mizuno M, Takemura M. Hip Protector Trial in Japanese Nursing Homes. World Congress on Osteoporosis 2000. 2000.6.18.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

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

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進展において、その病態ならびに組織形態・機能維持と深く関わりのある TGF- $\beta$  スーパーファミリーの分子群の作用について、軟骨細胞 cDNA ライブラリーから Smad 結合タンパクとして Filamin を単離し、TGF- $\beta$  作用に重要な働きを行っていることを明らかにした。

A. 研究目的

TGF- $\beta$ 、BMP などの TGF- $\beta$  スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達においては、Smad 分子と呼ばれる一群の伝達因子が主要な役割を担っている。Smad は、TGF- $\beta$  スーパーファミリーリガンドが結合して活性化されたレセプターの細胞内領域に一過性に結合して、C 末端の 2ヶ所のセリン残基のリン酸化を受けると核内へ移行し、他の転写因子と協調して標的遺伝子の転写調節を行うと考えられている。Smad のレセプターとの会合や、細胞内での代謝はさまざまな Smad 結合蛋白によって調節されていることが報告されているが、まだ解明されていない点も多い。TGF- $\beta$ 、BMP 依存性の遺伝子発現調節を分子レベルで解析していく上で、軟骨細胞における Smad 分子の調節因子を研究することは意義があると考え、Smad に結合する分子を酵母を用いた遺伝子クローニングシステムにより探索した。

B. 研究方法

①結合実験：GST-Smad5 ならびに GST-ABP-C の融合タンパク質を大腸菌内で合成させ、GSH-Sepharose カラムにより精製し、in vitro 結合試験に用いた。結合試験では、 $[^{35}\text{S}]\text{Met}$  および in vitro translation でラベルされたタンパクと GST 融合タンパクの結合を GST 特異的沈降法により調べた。in vivo 結合試験では、エピトープタグを付した Smad コンストラクト (Smad1, 2, 4, 5, 6, 7) と Filamin の各部位に対する断片を発現するベクターを細胞に導入し、共免疫沈降法により結合を調べた。

②転写活性化実験：TGF- $\beta$  応答性レポーター遺伝子 3TP-lux を Smad コンストラクトおよび Filamin コンストラクトとともに細胞に導入し、ルシフェラー

ゼ活性をルミノメータにより測定した。細胞導入効率の検討は、細胞導入時にコントロールとして pRL-CMV を導入して、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を計測し、TGF- $\beta$  応答性遺伝子活性化を算出した。

③核内移行試験：TGF- $\beta$  (10 ng/ml) 処理 1 時間後に細胞を 4%パラフォルムアルデヒドにより固定し、抗 Smad2 抗体ならびに二次抗体として FITC 結合抗マウス IgG 抗体を用いて、細胞内の Smad2 の挙動を間接蛍光抗体法により観察した。

C. 研究結果および D. 考察

BMP シグナル特異的な Smad5 を bait としてヒト軟骨細胞 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、アクチン結合タンパク質の Filamin (ABP-280) の C 末端側の cDNA クローンが複数得られた。Filamin はほとんどの組織に普遍的に存在し、N 末端側にアクチン結合部位を持ち、C 末端側のドメイン 24 で会合してホモ 2 量体を形成するタンパク質で、2ヶ所の可塑性に富む hinge 部分を含む。アクチン線維が網目状に重合する際の蝶番の様な働きをするタンパクとして同定されたものであるが、近年、インテグリン  $\beta$  鎖、グライコプロテイン I  $\beta$ 、TRAF2、MAPキナーゼキナーゼの SEK1、プロセッシング酵素のフェーリンなどと結合することが報告されており、多様な細胞内シグナルに関わるタンパクと考えられている。また、Filamin の欠失によるヒトの疾患 Periventricular Heterotopia において合指症、斜指症などの TGF- $\beta$  スーパーファミリーの異常でも起こる骨格異常が認められることから、Filamin が Smad を介するシグナリングに関与する可能性が示唆される。このように Filamin は軟骨特異的な分子ではないが、TGF- $\beta$

/ BMPのシグナリングへの関わりは興味深く思われたので、以後の解析を行った。

最初に、*in vitro*と*in vivo*における結合実験を行い、いずれにおいても Filaminと Smad5の結合が認められた。また、他の Smad分子についても Filaminと結合しうるかどうかを解析したところ、Smad5とホモロジーの高い BMPシグナル特異的 Smad1、TGF- $\beta$ シグナル特異的 Smad2、共通型 Smadの Smad4、抑制型 Smadの Smad6のいずれも*in vivo*で Filaminと結合した。以上のことから Filaminは Smad5を介する BMPシグナリングのみならず、Smad2を介する TGF- $\beta$ シグナルにも関わる可能性が示唆された。そこで TGF- $\beta$ 反応性のレポーターを用いて Filaminの TGF- $\beta$ シグナルにおける役割について検討した。

Filaminを自然に欠失したヒトメラノーマ細胞 M2と、M2に Filaminの遺伝子を導入して Filaminを安定発現させた A7について、TGF- $\beta$ 反応性のレポーター-p3TP-luxの転写活性を比較したところ、恒常活性型 TGF- $\beta$  1型レセプター及び TGF- $\beta$ 処理による活性上昇は M2で低下していた。この反応性の差が M2と A7のクローン間の差ではないことを証明するために、M2に一過性に Filaminを発現させると、恒常活性型レセプター刺激による p3TP-luxの活性上昇の回復がみられた。この活性の回復は、アクチン結合部位を欠いた Filaminの発現によっても起こり、少なくとも TGF- $\beta$ シグナルに関しては、Filaminがアクチン線維を架橋することは必要がないことが示唆された。また TGF- $\beta$ 処理による Smad2の核内への移行を免疫蛍光染色で観察すると、TGF- $\beta$ 処理1時間後の A7には Smad2の核内への蓄積が認められたが M2には認められなかった。このことから、Filaminが Smad2を介する TGF- $\beta$ シグナルに必要であることが示唆された。

TGF- $\beta$ シグナルにおいて、レセプターの活性化後のどの段階で Filaminが機能するかを調べるために、M2と A7両細胞における TGF- $\beta$ シグナルによる Smad2のリン酸化状態を検討した。その結果、M2細胞において TGF- $\beta$ 処理による Smad2のリン酸化の低下が認められた。そして、p3TP-luxのレポーター活性の回復と同様に、全長のフィラミンおよびアクチン結合部位を欠いた Filaminの遺伝子導入によって、M2における恒常活性型レセプター刺激による Smad2のリン酸化が回復した。このことから、Filaminは Smad2のレセプターによるリン酸化の過程で働き、Smadを活性化されたレセプターの近

傍に動員する役割を担う分子の一つと考えられる。最近、Filaminと TGF- $\beta$ レセプターの両者がそれぞれ caveolin-1に結合してカベオラに存在することが報告され、実際に細胞内で Filaminが Smadのシグナルに関与している可能性が強く示唆される。

## E. 結論

軟骨の形態形成・維持、ならびに変形性関節症の病態と深く関わる TGF- $\beta$ のシグナル機構において細胞骨格因子 Filaminが重要な役割を担っていることがわかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

A. Sasaki, Y. Masuda, Y. Ohta, K. Ikeda, K. Watanabe.

Filamin associates to Smads and regulates the receptor mediated signaling.

J. Biol. Chem. 276:2001 in press

### 2. 学会発表

佐々木文、増田芳子、池田恭治、渡辺 研

アクチン結合蛋白 Filaminによる Smadシグナル経路の制御

第18回日本骨代謝学会 平成12年7月19日-22日 広島

Sasaki A, Ohta Y, Ikeda K and Watanabe K.

Filamin, a Cytoskeletal Actin-binding Protein is a Potential Regulator of Smad-mediated Signaling.

The 22nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research. September 22-26, 2000, Toronto, Canada.

変形性膝関節症の発症進展における TGF- $\beta$  1 および OCIF の役割

分担研究者 山田芳司 財団法人岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部

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 osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) および transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) の役割について検討した。変形性膝関節症では慢性関節リウマチに比べ滑液 OCIF 濃度が高く、さらに変形性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- $\beta$  1 濃度は変形性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、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た。

A. 研究目的

変形性膝関節症は罹患者数が多く、疼痛のため運動機能障害を生じ QOL を低下させるため、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、骨量を増加させ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。また、変形性膝関節症の病態における TGF- $\beta$  の役割ならびに OCIF との関連についても明らかにされていない。これらの点を解明し変形性膝関節症の病態をより明らかにすることは、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- $\beta$  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- $\beta$  1 濃度をそれぞれの 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。各症例の膝関節 X 線および他の臨床所見とこれらの測定値とを比較検討した。

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

OCIF 濃度が約 2 倍高く、さらに X 線診断による変形性膝関節症の重症度に依存してその濃度が増加した。また滑液 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- $\beta$  1 濃度は変形性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- $\beta$  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た (Takemura M, Harada A, Mizuno M, Yano K, Yamada Y. Metabolism 2001)。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 濃度と傍関節骨吸収像などの臨床所見との関連を検討する予定である。さらに雪印乳業生物科学研究所との共同研究により可溶性破骨細胞分化促進因子 (osteoclast differentiation factor, ODF) についてもその滑液および血清濃度を測定中である。骨吸収においては、破骨細胞形成抑制因子である 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を一層明らかにし、新しい治療法の開発に貢献したいと考えている。

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. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamada Y, Miyauchi A, Takagi Y, Tanaka M, Mizuno M, Harada A. Association of the C<sup>-509</sup>→T polymorphism, alone or in combination with the T<sup>869</sup>→C polymorphism, of the transforming growth factor-β1 gene with bone mineral density and genetic susceptibility to osteoporosis in Japanese women. *J Mol Med* (in press).

2) Kamiya M, Harada A, Mizuno M, Iwata H, Yamada Y. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-β1 gene with genetic susceptibility to ossification of posterior longitudinal ligament in Japanese. *Spine* (in press)

3) Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. Transforming growth factor-β1 polymorphism and bone mineral density. *JAMA* 285:167-168, 2001.

4) Kanematsu M, Sato T, Takai H, Watanabe K, Ikeda K, Yamada Y. Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor-β ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 15:1321-1329, 2000.

5) Yamada Y. Association of a Leu10→Pro polymorphism of the transforming growth factor-β1 with genetic susceptibility to osteoporosis and spinal osteoarthritis. *Mech Ageing Dev* 116:113-123, 2000.

6) Yamada Y, Miyauchi A, Takagi Y, Nakauchi K, Miki N, Mizuno M, Harada A. Association of a polymorphism of the transforming growth factor β-1 gene with prevalent vertebral fracture in Japanese women. *Am J Med* 109:244-247, 2000.

7) Shimokata H, Yamada Y, Nakagawa M, Okubo

R, Saido T, Funakoshi A, Miyasaka K, Ohta S, Tsujimoto G, Tanaka M, Ando F, Niino N. Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute for Longevity Sciences, longitudinal study of aging (NILS-LSA). *J Epidemiol* 10:S46-S55, 2000.

8) Yamada Y, Harada A, Hosoi T, Miyauchi A, Ikeda K, Ohta H, Shiraki M. Association of transforming growth factor β1 genotype with therapeutic response to active vitamin D for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15:415-420, 2000.

9) Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A. Association of transforming growth factor β1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. *Arthritis Rheum* 43:452-460, 2000

##### 2. 学会発表

1) 山田芳司：シンポジウム 骨粗鬆症のリスク診断、治療効果の予測 第74回日本整形外科学会、千葉、平成13年4月

2) 竹村真理枝、原田 敦、水野雅士、鈴木健司、矢野和樹、山田芳司：変形性膝関節症の重症度と滑液中の破骨細胞形成抑制因子(OPG/OCIF)濃度との関連 第15回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、平成12年9月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

1) 山田芳司：遺伝子多型の検出方法及びそのキット (特願2001-8983)



別添 6

研究成果の刊行に関する一覧表

Yukiharu Hasegawa, Hisashi Iwata

Natural history of unreduced congenital dislocation of the hip in adults

Arch Orthop Trauma Surg 120 : 17-22, 2000

Seiki Iwasada, Yukiharu Hasegawa, Shinji Kitamura, Kenichi Yamauchi, Hisashi Iwata

Osteophyte of the femoral head after transtrochanteric rotational osteotomy

J Orthop Sci 5 : 349-355, 2000

Naoki Ishiguro, Takuya Shimizu, Takayasu Ito, Toshiki Kojima, Yusuke Iwahori, Hisashi Iwata

The expression of matrix metalloproteinases and inhibitors in acute rupture of the anterior cruciate ligament

Mod Rheumatol 10 : 95-102, 2000

Hideki Takagi, Naoki Ishiguro, Hisashi Iwata, Toshihisa Kanamono

Genetic association between rheumatoid arthritis and estrogen receptor microsatellite polymorphism

J Rheum 27 : 1638-1642, 2000

M. Takemura, A. Harada, M. Mizuno, Y. Yamada

Relationship between osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor concentration in synovial fluid and disease severity in individuals with osteoarthritis of the knee

Metabolism 50 : 1-2, 2001

A. Harada, M. Mizuno, M. Takemura, H. Tokuda, H. Okuizumi, N. Niino

Hip fracture prevention trial using hip protectors in Japanese nursing homes

Osteoporos Int , 2001 (in press)

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

p42/p44 Mitogen-activated protein kinase activation is involved in prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced interleukin-6 synthesis in osteoblast

Cell Signal 11: 325-330, 1999

A. Sasaki, Y. Masuda, Y. Ohta, K. Ikeda, K. Watanabe

Filamin associates to Smads and regulates the receptor mediated signaling

J Biol Chem 276 : 2001 (in press)

Y. Yamada, A. Miyauchi, Y. Takagi, M. Tanaka, M. Mizuno, A. Harada

Association of the C<sup>-509</sup> → T polymorphism, alone or in combination with the T<sup>869</sup> → C polymorphism, of the transforming growth factor-β1 gene with bone mineral density and genetic susceptibility to osteoporosis in Japanese women

J Mol Med, (in press)

- M. Kamiya, A. Harada, M. Mizuno, H. Iwata, Y. Yamada  
Association of a polymorphism of the transforming growth factor- $\beta$  1 gene with genetic susceptibility to ossification of posterior longitudinal ligament in Japanese Spine, (in press)
- Y. Yamada, F. Ando, N. Niino, H. Shimokata  
Transforming growth factor- $\beta$  1 polymorphism and bone mineral density  
JAMA 285 : 167-168, 2001
- M. Kanematsu, T. Sato, H. Takai, K. Watanabe, K. Ikeda, Y. Yamada  
Prostaglandin E<sub>2</sub> induces expression of receptor activator of nuclear factor- $\beta$  ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency  
J Bone Miner Res 15 :1 321-1329, 2000
- Y. Yamada  
Association of a Leu<sup>10</sup>→Pro polymorphism of the transforming growth factor- $\beta$  1 with genetic susceptibility to osteoporosis and spinal osteoarthritis  
Mech Ageing Dev 116 : 113-123, 2000
- Y. Yamada, A. Miyauchi, Y. Takagi, K. Nakauchi, N. Miki, M. Mizuno, A. Harada  
Association of a polymorphism of the transforming growth factor  $\beta$  -1 gene with prevalent vertebral fracture in Japanese women  
Am J Med 109 : 244-247, 2000
- H. Shimokata, Y. Yamada, M. Nakagawa, R. Okubo, T. Saïdo, A. Funakoshi, K. Miyasaka, S. Ohta, G. Tsujimoto, M. Tanaka, F. Ando, N. Niino  
Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute for Longevity Sciences, longitudinal study of aging (NILS-LSA)  
J Epidemiol 10 : S46-S55, 2000
- Y. Yamada, A. Harada, T. Hosoi, A. Miyauchi, K. Ikeda, H. Ohta, M. Shiraki  
Association of transforming growth factor  $\beta$  1 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  $\beta$  1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women  
Arthritis Rheum 43 : 452-460, 2000

## ORIGINAL ARTICLE

Y. Hasegawa · H. Iwata

**Natural history of unreduced congenital dislocation of the hip in adults**

Received: 7 January 1998

**Abstract** The natural history of 33 patients with 43 unreduced congenital dislocations of the hip was reviewed. The average age at the first consultation was 50 years. Four were men and 29 were women. Ten patients had bilateral and 23 unilateral complete dislocation. Average follow-up lasted 9.2 years. At the final follow-up 23 hips and 18 knees were painful. Lumbago was observed in 6 of 15 patients under the age of 50 and in 14 of 18 patients over the age of 50 at the final follow-up. The average Harris hip scores at the first and final consultations were 69 and 70, respectively. The average dislocation index was increased in the standing more than in the lying position. In unilaterally dislocated hips the average femorotibial angles in the ipsilateral and contralateral knees to the dislocated hip were 172 and 179 deg, respectively. Lumbar degenerative scoliosis of more than 5 deg was observed in 16 patients.

**Introduction**

Few descriptions of the natural history of unreduced congenital dislocation of the hip in adults are available. Wedge and Wasylenko [17] reported the long-term results of congenital disease of the hip in 42 of 58 patients with untreated complete dislocation of the hip. They found that 59% of 42 dislocated hips had a fair or poor prognosis, while in some of the older patients dislocation was compatible with acceptable function and little discomfort. Unilateral dislocation not only led to valgus deformity and osteoarthritis of the lateral compartment in the ipsilateral knee, but also to lumbar spondylosis. However, recently we experienced that acceptable function in older patients is often not achieved and found that several pa-

tients with unreduced congenital dislocation of the hip suffered not only from severe lumbago with or without intermittent claudication due to degenerative spondylosis but also from contralateral knee pain.

Total hip arthroplasty for unreduced congenital dislocation of the hip is still controversial [13, 18]. Because of the technical difficulties and major complications of the operation, some authors have considered complete dislocation as a contraindication for total hip arthroplasty. On the other hand, some authors have reported good results in spite of a high complication rate [8, 12, 14, 15].

The purpose of this paper is to evaluate retrospectively the natural history of unreduced congenital dislocation of the hip lasting more than 5 years in adults by physical and radiological examinations of this hips, knees and lumbar spine.

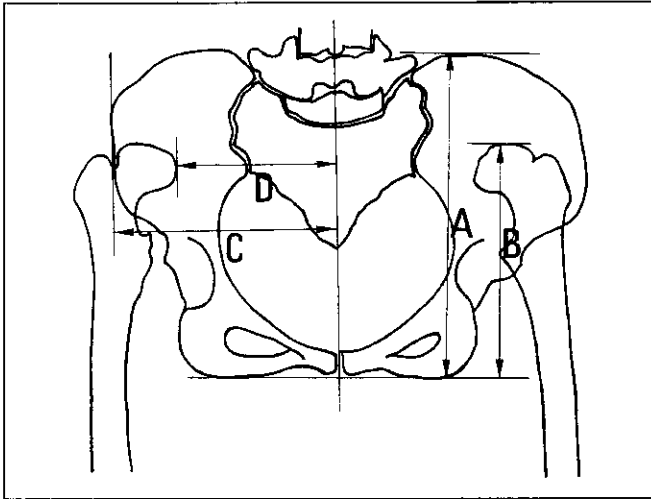
**Patients and methods**

From 1965 to 1998, 51 patients with 63 completely unreduced dislocations of the hip were treated in Nagoya University Hospital. Complete dislocation of the hip was defined as being present when the femoral head was located in the gluteal muscle and was not in contact with the pelvic wall, which is the same as group IV according to Crowe et al. [3], or more cranially dislocated. During this period 3481 patients with osteoarthritis of the hip due to acetabular dysplasia or dislocated hip were registered. Thirty-three patients with 43 completely dislocated hips who were followed-up for more than 5 years and examined clinically and radiographically were retrospectively evaluated (Table 1). All patients were Japanese. The average age at the first consultation was 50 years (range 21–70 years). The dominant age distribution of the 33 patients was found in the fifth and sixth decades. Four (6 hips) were men and 29 (37 hips) were women. Ten patients had bilateral and 23 unilateral complete dislocation; in the unilaterally dislocated patients; 4 hips were in an advanced stage, 9 a terminal stage, 2 with dysplasia without osteoarthritis and 8 with a normal contralateral hip at the time of first consultation. Average follow-up of the patients with complete dislocation of the hip was 9.2 years (range 5–32 years).

Harris hip score was used to assess the clinical hip function (pain, gait, range of motion and activities of daily life) at the first consultation and annual follow-ups. Clinical evaluation of the knee and lumbar spine was also performed.

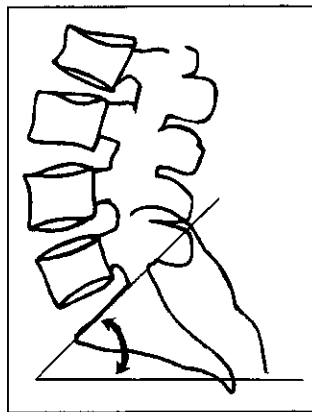
Radiographs of the hips, knees and spine, and whole extremities with weight-bearing stress were evaluated at the latest follow-

Y. Hasegawa (✉) · H. Iwata  
Department of Orthopaedic Surgery,  
Nagoya University School of Medicine,  
Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan  
e-mail: hassey@tsuru.med.nagoya-u.ac.jp,  
Tel.: +81-52-7412111, Fax: +81-52-7442260



**Fig. 1** The dislocation index [17] and lateral index: dislocation index =  $B/A \times 100$ , lateral index =  $D/C \times 100$

**Fig. 2** Lumbosacral angle in standing position



up. The dislocation index by Wedge and Wasylenko [17] and lateral index were measured (Fig. 1). The femorotibial angle (FTA) was measured in the standing position, and osteoarthritis of the knee was classified according to Ahlböck [1]. Spondylotic changes, degenerative scoliosis and lumbosacral angle were measured (Fig. 2).

During the follow-up period 6 completely dislocated hips in 5 patients were subjected to cementless total hip arthroplasty, and 5 contralateral hips with terminal osteoarthritis were treated with total hip arthroplasty. The data of the operated hips were used from just before total hip arthroplasty in this study.

Statistical analyses were performed with chi-square test and Student's *t*-test. Statistical significance was defined as a *P* value of less than 0.05.

## Results

### Hip joint

At the first consultation 17 of 43 completely dislocated hips were painless, while 26 were painful: severe pain in 10 hips and mild to moderate pain in 16 hips (Table 1). Hip pain and overall hip score had not improved significantly at the final follow-up. At the final follow-up 20 hips were not painful, while 23 were painful; severe pain in 10

and mild to moderate pain in 13 hips. The average Harris hip scores (mean  $\pm$  standard deviation) at the first and final consultation were  $69 \pm 13$  and  $70 \pm 14$  points, respectively. Overall hip score was good in 12 hips, fair in 12 hips, and poor in 19 hips at the first consultation. Overall hip score was good in 15, fair in 10, and poor in 18 at the final follow-up.

Trendelenburg sign was positive in all but 2 hips at the first and final follow-up. Leg length discrepancy was as follows: less than 2 cm in 9 patients, 2–4 cm in 10 patients, and 4 cm or more in 15 patients. Walking ability was more than 1 km at the first and final consultation in 18 patients and 12 patients, respectively. At the first consultation walking aids were employed by 18 of 33 patients; T cane or one crutch was used in 10 and two crutches in 8 patients. Walking aids were used in 21 of 33 patients; T cane or one crutch was used in 12 and two crutches in 9 patients at the final follow-up.

Formation of a false acetabulum was observed in 6 hips at the first consultation and in 11 at the final follow-up. The false acetabulum was not correlated with the final clinical outcome. Resorption of the femoral head was observed in 3 hips at the final follow-up. Osteophyte formation in the lesser trochanter and contralateral acetabulum was observed in 5 hips. The average dislocation index in the lying and standing positions at the final follow-up were  $65 \pm 6$  and  $69 \pm 6$ , respectively (Fig. 3). Dislocation index was increased significantly ( $P < 0.05$ ). However, the average lateral index in the lying and standing positions was  $66 \pm 7$  and  $67 \pm 8$ , respectively. The femoral head was shifted in the cranial direction and not in the horizontal direction in the standing position compared with the lying position.

Total hip arthroplasty was performed in 5 patients (6 dislocated hips) due to severe hip pain. All patients were women with an average age of 57 years (range 53–63 years). Omniflex cementless microstructured socket and arc deposited (AD) stem (Stryker Co., NJ, USA) were inserted. A transfemoral approach was used with a femoral head autograft, and subtrochanteric osteotomy was performed [15]. Five hips were monitored using spinal evoked potentials (SEP) to prevent sciatic nerve palsy. There were no serious complications except for transient pudendal nerve palsy in 1 hip and moderate haematoma in 1 hip. The average Harris hip score in 6 hips of 5 patients followed for more than 4 years improved from 54 to 76 (Fig. 4 A, B). All 5 patients were satisfied with the results of total hip arthroplasty.

### Knee joint

There were past and present histories of knee pain in 13 patients. Three of 10 patients with bilateral hip dislocation complained of pain in both knees. Ten of 23 patients with unilateral hip dislocation complained of pain (7 contralateral knees and 5 ipsilateral knees). Aspiration of the joint effusion was performed in 5 knees (4 contralateral and 1 ipsilateral). At the final follow-up tenderness was ob-