

細胞組織医療機器開発総論

土屋利江

Development of Cell/Tissue-Based Medical Products

Toshie TSUCHIYA

*Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

(Received January 17, 2007)

Biodegradable polymers are often used as scaffolds for tissue engineering and these polymers are in class IV under the revised Pharmaceutical Affairs Law. From the point of view of safety and efficacy, recent problems in the development of tissue-engineered products using biodegradable polymers are summarized in this report.

Key words—regenerative medicine; cell/tissue-engineered medical products; biodegradable materials; safety; efficacy; scaffolds

1. はじめに

細胞組織医療機器等において注意すべき概論は、平成11年12月26日 医薬発第1314号「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」等ではめられているので、本稿では、細胞組織医療機器の開発において特に問題となっている事項を中心に記載する。

再生医療品である細胞組織医療機器においては、まず、再生医療に使用される細胞の品質・安全性・有効性評価が必要となる。細胞の品質が安全性と有効性の観点から、確保されていることが第1のステップとして重要である。具体的には、今後、ヒト間葉系幹細胞の使用製品が多くなると考えられる。この場合特に、ヒト間葉系幹細胞の同一性及び品質評価指標が重要となる。これらの指標については、現在、再生医療事業の研究班で検討しており、複数個の遺伝子セットが候補となっている。ヒト間葉系幹細胞の老化や癌化に関する安全性については、澤田らが記載しており、本稿では、省略する。

ヒト骨芽細胞においては、採取される年齢に依存して、骨分化能のレベルが著しく異なることを、わ

れわれは、年齢の異なるヒト骨芽細胞を用いた比較実験で明らかにしてきた。したがって、老齢のヒト骨芽細胞からの骨再生には、細胞の増殖・分化能において限界があるため、最近では、ヒト間葉系幹細胞からの骨誘導による骨再生が試みられている。骨再生には、人工骨材料であるハイドロキシンアパタイトや β TCPの多孔体に細胞を播種したものを、移植する研究が、活発に行われている。しかし、その治療成績は、劇的に治療成績が向上しているとは、言い難い現実がある。また、骨再生医療においても、若年層と老年層では、治療効果は著しく異なることも容易に想定できる。骨再生分野においては、BMPなどのサイトカインと材料との組み合わせによる骨再生材料が、海外では、コンビネーション医療機器として販売されている。細胞なしで、薬とのコンビネーション材料による骨再生材料の方が、コスト面、輸送性、安定性などにおいて優れているため、コンビネーション医療機器が先行製品となる可能性もある。しかし、最近、既存のハイドロキシンアパタイトや β TCPに比べて、骨分化能や、組織侵入性の優れた新規セラミックスを、産官学連携で開発した。この開発には、安全性の観点から、また、作用機構を考慮した材料設計を行った結果、生み出された新規材料である。

軟骨細胞等を採取し、増殖させる過程において使用される個々の培地成分の安全性が重要であること

国立医薬品食品衛生研究所薬品部 (〒158-8501 世田谷区上用賀 1-18-1)

e-mail: tsuchiya@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウム S4 で発表したものを中心に記述したものである。

は、当然であるが、培地に添加される血清の安全性についても、特に重要な必須事項となる。特に牛胎児血清については、感染因子のリスクとともに、血清使用によって残留する異種タンパクの量に応じて、惹起されるアレルギー反応のリスク評価が重要なポイントとなる。

各種血清が各種細胞に及ぼす影響については、間葉系幹細胞の培養には、自己のヒト血清（患者自身の血清）で培養可能であるが、分化した軟骨細胞の培養には、患者由来の軟骨細胞を培養した成績と比べて、牛胎児血清の方が、培養成績が安定していると昨年の学会で報告があった。しかし、牛血清の代替品や、無血清培地の開発が特に最近進んでいる。われわれの再生医療事業の研究班では、ヒト間葉系幹細胞においては、既に無血清培地での培養に成功しており、製品化される計画が進んでいる。

細胞・材料とのハイブリッド製品については、細胞以外に、材料の品質・安全性・有効性評価が必要となる。既に、医療機器・医用材料として薬事承認された材料の場合、一般的に安全性試験は不要と考え易い。しかし、使用・製造方法や適用部位も異なることから、材料について、最新の科学的知見に基づいた安全性評価が必要である。特に、医用材料の中でも、生分解性・吸収性材料の評価は、重要となる。これらの材料は、細胞との培養過程で細胞に吸収されるので、安全性・有効性の両面において、材料が細胞・組織に与える影響が大きい。

われわれの経験では、生分解性材料において、同名のモノマーから合成された同名のポリマーにおいて、細胞の増殖や、分化に及ぼす影響が異なっていた。¹⁾細胞の増殖、分化には、生分解性材料の組成、分子量、重合時使用された触媒の種類、残留量、各種添加剤等が影響する。

最近、共重合型の生分解性材料とハイブリッド化された再生医療候補品において、動物実験を実施したところ、有効性が認められず、あらためて、生分解性材料の安全性を評価した結果、遺伝毒性が陽性となった例がある。3次元スキャホールドへの加工前の原料についても、安全性を評価した結果、遺伝毒性陽性であった（未発表データ）。製造メーカーの情報では、遺伝毒性陽性となるものは、加えていないと説明している。原料に既に遺伝毒性物質が混在していた可能性がある。使用する原材料について

は、自らが事前にチェックし、安全性を確認したのち、研究を開始することが特に重要である。この当たり前のことが、ほとんどなされていないため、高度な技術がありながら時間的ロスとコスト面で大きな損失をしている例が多い。

この生分解性材料は、*in vitro* 実験では、細胞分化を促進し、優れた材料であると、関係者の間では、期待されていたものであった。

上記した失敗をさけるためにも、早期の段階で、材料の安全性評価を実施しておく必要がある。

ここで、安全性評価を委託機関に任せて、試験を実施すれば、評価できると考えていると判断ミス招く。薬とは異なり、医療材料においては、試験に導入するためのサンプル調製をどのように行ったかによって、試験結果が左右される。

すなわち、安全性評価の実施においては、生分解性高分子材料の場合、ISO 10993 シリーズで記載されている水や、植物油による抽出液で評価しても、試験結果は、偽陰性となる。この点に特に注意すべきである。有機溶媒で抽出した抽出物について試験を実施する必要がある。信じがたいことに高分子を水洗した液について、試験した結果のみで安全だと宣言しているケースが多い。

また、生分解性高分子材料の場合、その種類によっては、埋植部位で炎症反応を起こすことが知られている。使用する部位、使用する量、分解速度、材料の崩壊・分解パターンなどにより、その影響は異なる。したがって、事前の綿密な材料設計が、再生医療品開発において重要なキーポイントとなる。

前述したように、*in vitro* での評価が *in vivo* での評価とかならずしも一致しない点は、製品化を進める上で留意すべき点である。また、動物種によっては、自然治癒効果が高く、ヒトでの治療効果のモデルとならない場合もあることも注意すべき重要な点である。



土屋利江

国立医薬品食品衛生研究所療品部長。九州大学薬学部卒業。1988年国立衛生試験所療品部室長。2000年国立医薬品食品衛生研究所療品部長。この間スイス・ベルン大学留学。生体適合性評価法開発研究、生体機能性材料開発研究、再生医療・医療機器の各種ガイドライン作成により、安全・安心・有効性の高い先端医療の製品化を心がけている。

これまでに、われわれは、ゲッシ類の胎児由来の細胞とヒト細胞では、軟骨細胞の増殖分化において、異なる結果を得ている。同じ生分解性材料と比較した結果、前者の細胞では、増殖・分化機能の亢進作用を、後者の細胞では、逆に阻害作用を検出している。²⁾

動物細胞でも、細胞株であるマウス由来の MC3T3 E1 細胞は、骨分化機能を有する細胞として、多くの研究者に使用されているが、この細胞は、細胞株であり、その結果の解釈は、慎重に行う必要がある。例えば、ヒト正常骨芽細胞と MC3T3E1 細胞では、ポリ乳酸のオリゴマーに対する反応性が前者は、阻害的、後者は、促進作用を認め、両細胞間で明らかに異なっていた。^{3,4)}

細胞組織医療機器に特徴的な 3 次元スキャホールドへの細胞の接着率についても、検討した結果、細胞播種の方法によって、スキャホールドへの細胞接着率が大きく異なっていた。

また、3 次元スキャホールドの物理化学的性質、porosity, pore size, pore の連通性などが、3 次元製品の動物埋植実験において、血管進入や組織再生の程度が異なり、製品の有効性に関わってくるものが明らかになっている。3 次元多孔体の形状のみでなく、その化学的組成の違いも組織侵入性が異なる因子となることを、最近われわれが開発した新規セラミックスで確認している。

さらに、培養前と培養後では、スキャホールドの強度は、変化する。その変化の程度は、製品の材質、多孔体の形状、細胞侵入性、培養期間等によって異なる。

品質評価項目であるエンドトキシンについては、スキャホールドの材質によって、エンドトキシンの汚染状況や材料への吸着力は異なっている。材料によっては、クスリで使用されているエンドトキシン試験法では、材料中のエンドトキシンは、回収されないため、実際の汚染状況よりも低い値を示し、過少評価となる点に注意すべきである。^{5,6)} エンドトキシンの材料からの回収率の確認は、時間とコストが掛かるため、現在、抽出操作なしで、測定できる方法を開発中である（厚生労働科学研究：再生医療事業）。

臨床評価においては、特に有効性評価において、定量的な臨床評価が必要となる。さらに、患者様へ

の侵襲性の低い試験方法で評価されることが、患者の QOL を考える上で重要である。

力学的適合性評価において、現在、ASTM 文書に採用されている軟骨の測定方法は、多量の試料が必要であったり、測定に時間が掛かるため、再生医療品を試験品とする場合には、適切な方法とは言い難い。

わが国では、微量の試料で測定可能な測定機器の開発や、非侵襲的に測定できる方法が開発されつつある。⁷⁾

米国の American Society for Testing and Materials International (ASTM International) において、バイオマテリアル及び tissue engineered medical products (TEMPS) の生体適合性評価として、コネキシン機能評価が選ばれ、筆者は、現在文書作成中である。コネキシンが心筋再生の機能評価にも使用され、学会等で発表されている。今後、心筋以外の領域でも、活用され、この分野の横断的な生体適合性指標として使用可能となるべく、研究を継続している。⁸⁻¹⁴⁾

2. おわりに

筆者は、平成 16 年度からヒューマンサイエンス財団の政策創薬総合研究事業において「幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化」を研究課題として、産官学連携プロジェクトの体制で、材料開発、*in vitro* 試験、動物試験、臨床評価方法の標準化をめざして、軟骨・骨・心筋等を中心に検討してきた。本特集のシンポジウムで、ご講演をお願いした澤 芳樹先生（心筋再生）及び誌上発表して頂いた脇谷滋之先生（軟骨再生）は、本プロジェクトの分担研究者として、心筋再生、軟骨再生の臨床評価を中心に、活躍して頂いた。特に、細胞シートによる心筋再生においては、シート工学というわが国発の優れた材料技術が基になっている。この材料技術開発が、再生医療分野の多くの動物実験や臨床例において、有効性の優れた成績を挙げている。このシート工学で開発された材料上で培養した皮膚上皮細胞では、ギャップ結合細胞間連絡機能が上昇していた。¹²⁾ 組織の恒常性機能維持に重要なギャップ結合細胞間連絡機能向上が様々な組織での再生成功要因となっていると考えている。⁹⁾

本事業で得られた軟骨再生・骨再生等の成果のガイドライン化は、再生医療の早期ガイドライン化研

究（土屋班）で、現在進めている。

平成17年度からスタートした厚生労働省の次世代医療機器評価指標検討会において、再生医療分野の対象品として心筋再生（細胞シート）が選ばれた。国立医薬品食品衛生研究所は、審査WGの事務局を担当している。審査WGは、シート工学の専門家、細胞の専門家、臨床評価の専門家、倫理の専門家等で構成された委員により、活発かつ迅速に評価指標を作成中である。平成18年度からは、医薬品医療機器総合機構の生物系審査部、品質管理部からも関係者が委員となって出席して頂く体制となっている。評価指標は、合同検討会を得たのち、学会等からのパブリックコメントを得たのち、審議会にかけて、室長通知となる予定である。再生医療・次世代医療機器のガイドライン化の道筋ができた。平成17年度の報告書は次世代医療機器評価指標作成ホームページに掲載中である。（次世代医療機器評価指標作成事業ホームページ：<http://dmd.nihs.go.jp/jisedai/>）。

厚生労働省の次世代医療機器評価指標検討会は、経済産業省の医療機器開発ガイドライン評価検討会との合同検討会を年に3回開催している。開発WGの事務局は、産業技術総合研究所で担当し、厚生労働省と経済産業省との合同検討会において、評価ガイドライン設定の対象候補等を決定している。開発WGは、開発の迅速化の観点から、開発ガイドラインを作成することとなっている。

このような状況下で、評価指標作成事業等も活用しつつ、安全で有効性の高い再生医療用細胞組織が製品化されることを進めるための努力を、厚生労働省医療機器審査管理室、総合機構を始め、所内外の専門家との連携を行い、関係者・関係機関一丸となって進めていきたいと考えている。

謝辞 最後に、日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会長の長尾 拓 前国立医薬品食品衛生研

究所長に、本シンポジウムを企画し、講演する機会を与えて頂いたことを感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Banu N., Banu Y., Sakai M., Mashino T., Tsuchiya T., *J. Artif. Organs*, **8**(3), 184-191 (2005).
- 2) Tsuchiya T., *Bioindustry*, **7**, 30-37 (2002).
- 3) Isama K., Tsuchiya T., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **13**, 153-166 (2002).
- 4) Isama K., Ikarashi Y., Tsuchiya T., *Bioindustry*, **7**, 21-29 (2002).
- 5) Nakagawa Y., Murai T., Hasegawa C., Hirata M., Tsuchiya T., Yagami T., Haishima Y., *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.*, **66B**, 347-355 (2003).
- 6) Haishima Y., Hasegawa C., Yagami T., Tsuchiya T., Matsuda R., Hayashi Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**(3), 495-503 (2003).
- 7) Jung D.-Y., Kang Y.-B., Tsuchiya T., Tsutsumi S., *Key Eng.*, **342-343**, 853-856 (2007).
- 8) Yang J., Ichikawa A., Tsuchiya T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, 80-85 (2003).
- 9) Tsuchiya T., *ASTM STP*, **1452**, 254-261 (2004).
- 10) Nagahata M., Tsuchiya T., Ishiguro T., Matsuda N., Nakatsuchi Y., Teramoto A., Hachimori A., Abe K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**(3), 603-611 (2004).
- 11) Nakaoka R., Ahmed S., Tsuchiya T., *J. Biomed. Mater. Res. A*, **74**(2), 181-186 (2005).
- 12) Nagira T., Matthew S. B., Yamakoshi Y., Tsuchiya T., *Tissue Eng.*, **11**(9-10), 1393-1397 (2005).
- 13) Li Y., Nagira T., Tsuchiya T., *Biomaterials*, **27**, 1437-1443 (2006).
- 14) Nagira T., Nagahata-Ishiguro M., Tsuchiya T., *Biomaterials*, **28**, 844-850 (2007).

細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価

山口照英,^{*a} 土屋利江^b

Safety and Efficacy of Cell/Tissue Medical Products

Teruhide YAMAGUCHI^{*a} and Toshie TSUCHIYA^b^aDivision of Biological Chemistry and Biologicals, and ^bDivision of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学・幹細胞研究の飛躍的な進展により、ヒト又は動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞治療の開発が急速に進んでいる。このように細胞そのものを治療薬として用いることができれば、ガン、再生不良性貧血、心筋梗塞など致死的な疾患ばかりでなく、糖尿病やパーキンソン病等の重篤な慢性疾患に対して極めて有効な治療法になる可能性が高い。

厚生労働省では、この細胞治療・再生医療に用いられる細胞組織利用医薬品・医療機器（細胞・組織利用医薬品等）の安全性及び品質の確保のために必要な基本的要件を明らかにするため、平成12年、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」、及び「ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」（以下「指針」と略す）を策定した。前者は、細胞組織利用医薬品等の品質及び安全性確保、並びに細胞・組織の採取からその取り扱いに関する科学的妥当性及び倫理的妥当性を確保するために遵守すべき基本的原則をまとめたものである。後者の指針は、前者の通知に基づき、ヒト由来の細胞・組織を加工した製品について、治験前の品質・安全性確認を含めた細胞・組織利用医薬品等の製造者が厚生労働省に提出しなければならない資料の内容について明らかにしたものである。細胞を用いた製品を医薬品や医療機器として開発しようとする企業は、その品質・安全性・有効性を担保するためにこれらの指針に従っ

てデータを作成し、確認申請や承認申請時に提出する必要がある。

一方、大学や医療機関等で細胞を用いて医師が直接治療を行う医療行為やその臨床研究は、薬事法上の規制を受けることはなかった。しかし、細胞治療・再生医療のような未知・未経験の要素の多い革新的医療にあつては、その品質や安全性を担保するために新たなガイドラインが必要とされ、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が、平成18年7月に出された。この中で、用いる細胞については、その品質・安全性確保のための方策については上述した細胞・組織利用医薬品等に関する指針を準用するように求めており、薬事法上の規制を受けない臨床研究においても、治療に用いる細胞について同等の品質・安全性を担保することが大きな特徴である。

細胞組織利用医薬品・医療機器の開発は日米欧の先進国のみならず、ASEAN諸国や他の地域でも活発に行われており、世界レベルで開発競争が繰り広げられている。残念ながら日本で承認された細胞組織利用医薬品・医療機器はまだないが、欧米では既に培養皮膚や培養軟骨など、いくつかの製品が販売されている。一方、わが国においても、複数の製品が確認申請を受け治験に入っており、臨床研究を含めると200を超える細胞治療・再生医療の開発が行われている。このような細胞治療・再生医療の適切な開発を促進するためには、ウイルス等の安全性の確保や細胞組織利用医薬品がどのような機構で臨床効果を発揮しているのか明確にすることなど、いくつかの課題がある。

今回の誌上シンポジウムでは、細胞治療・再生医療に用いられる細胞組織利用医薬品・医療機器の安

国立医薬品食品衛生研究所、^a生物薬品部、^b療品部
(〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

*e-mail: yamaguch@nihs.go.jp

日本薬学会第126年会シンポジウム S4 序文

全性や有用性確保にはどのような視点が必要かについて、4人の専門家に紙上発表をして頂くことにした。具体的事例として、「血管内皮前駆細胞を用いた治療」について浅原孝之先生に、「軟骨再生の現状と将来」として脇谷滋之先生に、また、「細胞組織医療機器に利用される幹細胞の品質及び安全性評価」として、間葉系幹細胞について品質・安全面から澤田留美先生にお願いし、最後にレギュラトリーな観点から「細胞組織医療機器開発総論」を土屋利江が担当した。

血管再生治療に関しては、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) を用いた再生医療を取り上げて頂いた。成人末梢血中に EPC が発見されて以来、胎生期にのみ認められるとされていた血管発生 (vasculogenesis) という現象が成人期においても同様に認められ、局所で EPC が増殖・分化し血管新生に係わっていることが明らかになった。さらに、冠動脈疾患や下肢虚血疾患 (パーチャー病や閉塞性動脈硬化症など) を含む重症虚血性疾患患者に対して、自己 EPC を虚血部位に移植するという血管再生療法の臨床試験が実施されており、良好な成績が報告されつつある。一方、老化や糖尿病に代表される基礎疾患により患者の EPC 量及び質が低下し、移植後に十分な治療効果が期待できないという問題点も抱えている。そこで、成体での血管形成のメカニズム及び EPC の特性を生かした現行の EPC 移植治療について将来的展望を含めて概説して頂いた。

軟骨再生に関しては、世界中で企業開発品として1万例以上の再生医療が実施されているにも関わらず、いまだにその有効性については論争中であり、広く認められる結論が得られていない。その要因として、1) 関節軟骨欠損による臨床症状あるいは自然経過が明らかにされていないため手術適応基準があいまいであり、どのような患者に再生医療を実施すべきかコンセンサスが得られていないこと、及び2) 再生医療による軟骨修復の評価方法が確立されていない、さらに3) 企業開発品は、細胞浮遊液を骨膜で覆った欠損部へ移植したのみで細胞の固定性

が不十分、培養で細胞を増殖する過程で脱分化を生じることなどが挙げられる。本誌上シンポジウム原稿では、関節軟骨再生の現状と、将来、軟骨修復が再生医療として標準的な治療となるために必要な要素について解説して頂いた。

多分化能を持つ幹細胞であり近年再生医療へのソースとして注目を集めている間葉系幹細胞について、その増殖能と形質変化について取り上げて頂いた。間葉系幹細胞は長期に渡る培養で、老化を起こした細胞からがん化した細胞が出現すると報告され、大きな議論を巻き起こしている。これに対して否定的な論文もあり、結論は得られていないが、間葉系幹細胞を治療に用いる際には、このような点にも注意を払う必要がある。この間葉系幹細胞の培養中に起こる遺伝子発現レベルの変化についての解析結果を含め概説して頂いた。

従来の治療法では、なし得ない先端治療として、安全で有効性が高くかつ非侵襲的な治療法が望まれている。細胞・組織利用医療機器は、材料を有効活用して、目的とする部位への適切な固定・機能・適切な強度維持などが可能となる。また、わが国発の再生医療材料技術として、最近、シート工学 (開発者: 東京女子医科大学 岡野光夫教授) が注目されている。シート工学技術により、得られた細胞シートの機能が優れており、心筋再生、角膜再生、歯根膜再生など、様々な組織での動物実験や臨床研究が開始され、成功例が報道されている。しかし、一方では、材料の安全性評価や、試験系が不十分なため、研究が活発に行われ、学会発表や紙上発表が行われているにも関わらず、有効性が期待されるほど高くなく、その結果、リスク・ベネフィットやコスト面等から、産業化されておらず、途中で開発を断念された再生医療品もある。これまでの研究から、開発の阻害要因となった具体例について、概説し、開発への近道となるためのポイントについて概説した。最後に再生医療品の開発と審査の迅速化のために平成17年度からスタートした次世代医療機器評価指標作成事業 (再生医療分野) を紹介した。

再生医療・繊維工学・人工臓器に使用される医療用材料の 安全性・有効性に関する基本的考え方

*Standpoints and Principles for the Evaluation of Safety and Efficacy of Biomaterials
Applied for Tissue Engineered Products*

土屋利江

1. はじめに

国内外共に開発競争が盛んな医療材料の一つとして生分解性材料があげられる。限られた紙面の都合上、ここでは、注目されている生分解性材料において、現在、安全性・有効性において問題になっている点を中心に述べる。生分解性材料は、やがては生体内で消失し、残存しないという長所があるものの、吸収性材料であるが故に、クラスIVに分類されるハイリスク医療材料である。最近の不具合報告や前臨床試験研究からも、解決すべきいくつかのポイントがあるので、現在考えられる基本的考え方について述べる。

2. 安全性

各種モノマーから合成される高分子系では、使用される触媒の選択が安全性・有効性を考える上で第1のキーポイントとなる。環境および生体ハザードとして有名な触媒を使用している例がある。生分解性材料を医療材料として使用した場合、生体内で吸収される。使用される材料のトータル量は医療材料の使用目的によって数mgから数g程度まで異なっている。量が多くなると安全性上のリスクも高くなる。安全性上問題はないのか最新の知見を十分検討して合成のスキームを描いていただきたい。また、医療材料として使用する場合、使用する部位、使用する量、分解速度によって安全性に関するリスクレベルは異なる。慎重な検討を御願いたい。

3. 経済性と安全性

医療材料も、エコマテリアルであることが、理想的であるが、通常、工業製品用のエコマテリアルとなると数百から数千トン単位で合成され、地球環境系へ放出される。また、使用量も多く、できるだけ低コストで生産されること

になる。工業界では、安価な触媒で効率よく重合できる製法が望まれる。安全性に対する検討事項もあるが、医療材料として使用される場合とは試験選択項目が異なる。分解性という点でエコマテリアルの候補と考えられるポリグリコール酸には、環境ハザードで有名な有機錫で合成された製品が販売されている例がある。有機錫は、ppbあるいはそれ以下のオーダーで神経毒性を示す触媒である。作用域が低濃度であるため、残留物の分析では、一般化学分析では、同定・定量することは容易ではない。製造工程が示してあれば、容易に知ることが可能であるが、カタログ掲載の製品では、使用されている触媒が、明示されていないし、たづねても回答がかえってこないケースが多い。世の中に登場しているエコマテリアルと称される材料が、安全性上、危惧される点が解決できた製造工程で合成されているか確認する必要がある。環境中に放出されれば、触媒は、土壌中に残留することになり、海にも流れ、やがては、魚貝類に蓄積し、食物連鎖によりやがてはヒトの健康への悪影響が懸念される。これらの点は、逆の発想をすれば、有効性の高い材料開発のアイデアともなりうる。すなわち、毒性のある触媒の代わりに、有効性の高い触媒を使用すれば、安全で有効性の高い材料開発の創製となるかもしれない。

海外では、すでに無触媒条件下で分子量100万のレベルまで重合した生分解製材料を高価な価格で販売しているという。この分野の国際情報の流通がわるい。

4. 生体適合性

第2のポイントは、生体内に埋植すると炎症反応を惹起しやすい性質を示す材料がある。炎症反応が起これば、例えば、バイオ軟骨において、動物に細胞組み込み型生分解性スキャホールドを埋植し、炎症がおきれば、スキャホールドに播種した軟骨細胞等の分化発現や機能維持の目的を達成できない。従って、このような材料に起因した炎症反応を回避あるいは消失させるための創意工夫をしていただきたい。炎症反応惹起の有無はin vivoで確認する必要がある。ある生分解性高分子からなる材料に軟骨細胞を播種してin vitro培養すると分化を非常によく促進する。次に、動物の軟骨欠損部分に移植したところ、組織再生がうまくいかない、材料や細胞組み込み型材料を埋植すると組織再生は遅延し、それらをまったく埋植しない軟骨欠損のまま



TOSHIE TSUCHIYA
国立医薬品食品衛生研究所 療品部長
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1
Tel: 03-3700-9196 Fax: 03-3700-9196
E-mail: tsuchiya@nihs.go.jp
<専門> 繊維工学、医療材料の安全性と生体適合性

の群の自然治癒率をもっとも優れていたということも実際ありうる。Tissue Engineering 関連の論文で掲載されたデータで、in vitro でどんなに成績が良くても、生体内で、同じように作用するか否かは、別の問題となる。in vitro で優れた成績を示している必要性はあるが、必ずしも in vivo で成功するとは限らない。生体内は、複数の細胞・組織のネットワークで営まれております。in vitro 系は、特定の細胞の反応をみていること、さらに、検出している指標のみを解析しているにすぎないことを、いつも考慮しておく必要がある。

5. 更なる生体適合性

第3のポイントは、合成高分子には、ゲッシ類で比較的高い腫瘍発生率を示す材料があることに留意して、新たな材料開発を行うべきである。たとえば、京都大学の研究成果では、ポリグリコール酸は、フィルムをラット皮下に長期間埋植しても、腫瘍の発生を認めなかったが、ポリ乳酸フィルムを、ラット皮下に埋植した結果、埋植ラットの40%に腫瘍発生を認めている。ポリプロラクトンとの共重

合体では、50%の腫瘍発生頻度であった。一方、材料発癌では、20年以上昔の現象から、フィルム状のものをゲッシ類の皮下に埋植すると、腫瘍を発生する。との古典的な説がある。フィルムがすべて同程度腫瘍化するわけではない。シリコンフィルムでは、手術群に近く、低発生率である。フィルムで腫瘍発生する生分解性材料を、粒子状にして埋植した結果、やはり腫瘍を発生し、発生率は、埋植量に比例した。私は、埋植材料の化学組成、物理学的性質、残留性(分解速度)、血管系の有無などがサイトカイン産生、コネクション機能変化、炎症反応による活性酸素産生、修復能などに影響を与え、腫瘍発生率に関係すると考えている。

医療材料の安全性評価においては、ガイドラインにある一通りの試験項目について受託機関等により試験し、すべて陰性結果を得ると、安全であると考えやすいが、その試験が適切な抽出やサンプル適用方法でおこなわれていない限り、意味のない試験結果となることを強調しておく。生分解性材料の場合に、そのオリゴマーの安全性についても評価することが、長期予測をおこなう上で重要である。

第10回高分子分析討論会(高分子の分析及びキャラクタリゼーション)－研究発表募集－

主催：日本分析化学会高分子分析研究懇談会 協賛：(社)繊維学会 日時：平成17年10月27日(木)・28日(金)
会場：工学院大学新宿校舎〔東京都新宿区西新宿1-24-2、交通：JR(山手線・中央線・埼京線)、京王線、小田急線、地下鉄(丸の内線・都営新宿線)「新宿」駅下車西口より徒歩5分。大江戸線「都庁前」駅直結〕
http://www.kogakuin.ac.jp/mnp/shinjuku/map_shinjuku.pdf
発表申込締切：7月1日(金) 発表要旨締切：10月7日(金)
研究発表申込先・問合せ：〒305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 つくば中央5
(独)産業技術総合研究所 計測標準研究部門 有機分析科 高分子標準研究室 松山重倫
TEL: 029-861-4617、FAX: 029-861-4618、E-mail: polymer@m.aist.go.jp

第41回X線分析討論会－講演募集－

主催：日本分析化学会X線分析研究懇談会 協賛：(社)繊維学会ほか
日時：平成17年10月21日(金)・22日(土)
会場：京都大学福井謙一記念研究センター(京都市左京区高野西開町34-4)
講演申込締切日：8月10日(木) 講演要旨締切日：9月16日(金)
詳細については下記にお問い合わせください。
〒141-0031 品川区西五反田1-26-2 五反田サンハイツ304号 日本分析化学会X線分析研究懇談会
TEL: 03-3490-3351 FAX: 03-3490-3572 E-mail: ktanaka@jsac.or.jp

「高分子材料の耐久性評価」に関する講習会

主催：日本材料学会 協賛：(社)繊維学会ほか 日時：平成17年7月22日(金) 9:30～14:40
会場：工学院大学新宿校舎28階第1会議室 〒163-8677 東京都新宿区西新宿1-24-2(TEL: 03-3342-1211)
プログラム、参加申込の詳細については、下記にお問い合わせください。
〒606-8301 京都市左京区吉田泉殿町1-101 日本材料学会「高分子材料の耐久性評価」講習会係
TEL: 075-761-5321 FAX: 075-761-5325 E-mail: jimuj@jsms.jp



Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression

Tsutomu Nagira^{a,b}, Misao Nagahata-Ishiguro^a, Toshie Tsuchiya^{a,*}

^a*Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

^b*Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, 3-42-6 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan*

Received 3 July 2006; accepted 24 September 2006



Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression

Tsutomu Nagira^{a,b}, Misao Nagahata-Ishiguro^a, Toshie Tsuchiya^{a,*}

^a*Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

^b*Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, 3-42-6 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan*

Received 3 July 2006; accepted 24 September 2006

Abstract

Sulfated hyaluronan (SHya), which is composed of a sulfated group and hyaluronan (Hya), has high activity on and biocompatibility with cells. When normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) were incubated in dishes coated with SHya, cell proliferation was suppressed in a dose-dependent manner. The expression levels of keratin 1 and loricrin mRNAs, as detected by real-time RT-PCR, were increased significantly. The expressions of Wnt mRNAs, which play important roles in cell proliferation and differentiation, were modulated. Wnt4 and Wnt6 mRNA expressions were increased compared to controls, while expression of Wnt5a was similar to the control and that of Wnt7a mRNA was decreased. In addition, the expression of Notch mRNAs, which play a critical role in keratinocyte differentiation, were affected. Notch3 mRNA was increased significantly, while Notch1 mRNA was decreased compared to controls, and expression of Notch2 was similar to that of control. These results suggested that a SHya-coated scaffold might be useful for regulating cell activity in tissue engineering.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Sulfated hyaluronan; Normal human epidermal keratinocyte; Differentiation; Wnt; Notch

1. Introduction

Normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) are usually cultured on 3T3 mouse feeder-layer cells [1]. Several biomaterials have been developed from other animals or humans, but they carry the risk of infection from prions and viruses [2,3]. In contrast, biomaterials from microorganisms carry lower risks of infection, and the development of a semi-synthetic material promoting cell activity will enable safer cell culture.

Several types of polysaccharides for culturing NHEKs have been studied [4,5]. Hyaluronan (Hya) is a negatively charged glycosaminoglycan that is a major component of the extracellular matrix (ECM) [6,7]. Hya plays important roles in cell adhesion, migration, proliferation, and differentiation [7–9]. Park and Tsuchiya reported that a Hya-coated surface is capable of enhancing gap junctional

intercellular communication (GJIC) and differentiation or cell growth [10,11]. Sulfated polysaccharides, such as heparin or heparin sulfate, stabilize some growth factors, resulting in enhancement of their effects [12], and promote their mitogenic activity [13]. Sulfated hyaluronan (SHya), a semi-synthetic material composed of Hya and a sulfate group [14] can be synthesized using Hya extracted from microorganisms; therefore, it has a lower infectivity and a lower risk of containing virus-induced carcinogens.

It has been reported that Hya and chondroitin sulfate A enhanced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells [15,16]. We hypothesized that SHya has the potential to function as a biomaterial promoting keratinocyte differentiation because it has been reported that SHya stimulates cell activities [14,17]. Analysis of the effects of SHya on cell differentiation and intercellular signaling will provide the information allowing construction of biomaterials of greater usefulness for tissue engineering.

Wnts are secreted glycoproteins that bind Frizzled receptors and play a critical role in the process of cell differentiation in the canonical pathway. In the canonical

*Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9196; fax: +81 3 3700 91968.

E-mail addresses: nagira@nihs.go.jp (T. Nagira), tsuchiya@nihs.go.jp (T. Tsuchiya).

pathway, beta-catenin stabilized by the binding of Wnt proteins to Frizzled receptors stimulates TCF/LEF transcription. A mouse keratinocyte cell line with decreased Wnt4 expression showed a more malignant morphology and was less differentiated [18], Wnt6 was required for epithelialization of the segmental plate mesoderm [19], and Wnt7a promoted cell proliferation by activation of Rac-GTPase and beta-catenin [20].

Notch receptors play a crucial role in determination of cell fate. Notch1 signaling plays an essential role in regulation of mouse keratinocyte differentiation [21]. In mouse keratinocytes, Notch1 activation suppressed Wnt4 activity mediated by the cyclin/CDK inhibitor p21 (WAF1/Cip1) [22]. Notch3 was required for the differentiation of vascular smooth muscle cells and T-cells [23,24].

In a previous study, we demonstrated that a Hya coating promoted several cell functions better than a Hya-supplemented one [25]. Therefore, in this study, we investigated the effects of a SHya coating on keratinocyte differentiation.

2. Materials and methods

2.1. Sulfated hyaluronan

SHya was prepared by the method reported previously [4]. A solution of 2% Hya120 (molecular weight, 1.2×10^6) solution in *N,N*-dimethylformamide (DMF) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)

was mixed with trimethylamine (TMA)– SO_3 complex (Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI, USA) and stirred for 24 h at 60 °C. The reaction mixture was then diluted, neutralized, and precipitated by adding a large quantity of acetone (Wako Pure Chemical Industries). The precipitate was dissolved in distilled water and dialyzed against distilled water. The molecular weight of SHya was 2.0×10^5 , and the degree of substitution (D.S.) of SHya was 1.0, as determined by the chelate titration method [26] (Fig. 1). Moreover, the effectiveness of sulfation was also demonstrated by FT-IR analysis. The IR spectrum of SHya exhibited two absorption bands at 1240 and 820 cm^{-1} due to $\text{S}=\text{O}$ and SO_3^- stretching, respectively.

2.2. Cell culture

NHEKs isolated from neonatal human foreskins (Cambrex Bioscience, Walkersville, MD, USA) were cultured with K-110 Type II medium (Kyokuto, Tokyo, Japan) supplemented with 2% whole bovine pituitary extract, 50 IU penicillin G, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and 0.03 mM CaCl_2 (low-calcium condition) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air. Keratinocyte differentiation was induced in 0.20 mM CaCl_2 medium (high-calcium condition). The medium was exchanged for a fresh one every 2 days.

2.3. Preparation of SHya-coated culture dishes and well plates

Both 35 and 100 mm polystyrene dishes (Iwaki, Funabashi, Japan) and 24-well plates (Corning, Corning, NY, USA) were coated with SHya dissolved in distilled water at a final density of 0.4 or 0.8 mg/cm^2 . The SHya-coated dishes and plates were dried under a sterile airflow at room temperature for 8 h.

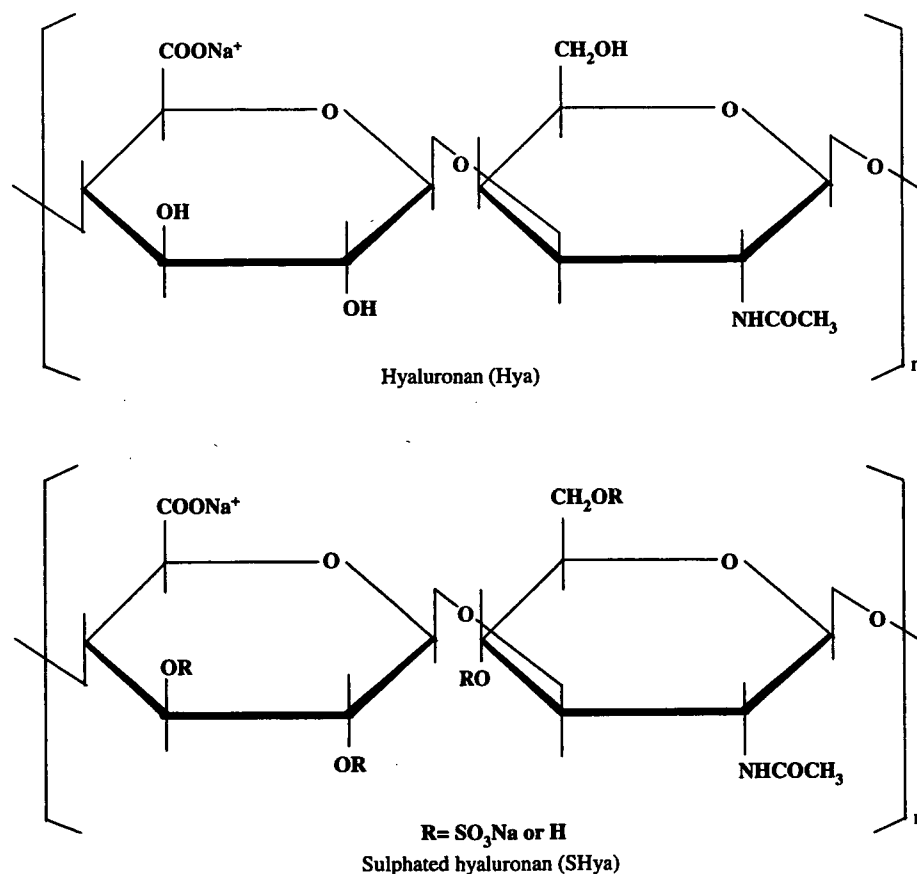


Fig. 1. The structures of hyaluronan and sulfated hyaluronan. Sulfated hyaluronan (SHya) is composed of Hya and a sulfate group. The molecular weight of SHya is 2.0×10^5 , and the degree of substitution of SHya was 1.0.

2.4. Determination of cell numbers by crystal violet assay

NHEKs were seeded at 1.0×10^4 cells/cm² in wells of 24-well plates coated with various concentrations of SHya (0, 0.4, and 0.8 mg/cm²) and incubated in the high-calcium condition (0.20 mM) for 5 days. After washing with Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate-buffered saline [PBS(-)], cells were exposed to 0.4% crystal violet (Wako) in methanol for 15 min. NHEKs were washed with PBS(-) three times and destained with 500 μ l of methanol for 20 min. Then, absorbance was read at 590 nm using a plate reader.

2.5. Quantitative real time RT-PCR

NHEKs were seeded at 1.0×10^4 cells/cm² in various concentrations on SHya-coated 60 mm dishes (0, 0.4, and 0.8 mg/cm²) and incubated in the high-calcium condition (0.20 mM) for 5 days. Cells were washed with PBS(-) three times, and total RNA was extracted from NHEKs using an RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed into 10 μ l DNA using an ExScript RT reagent kit (Takara Co., Ltd., Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Aliquots of the cDNA were used as templates for PCR analysis using a Lightcycler system (Roche, Mannheim, Germany). PCR amplification was performed in a total volume of 20 μ l including 1 μ l of RT reaction, 10 μ l of SYBR Premix Ex Taq (Takara), and 0.4 μ M/l of each primer. The PCR reaction was performed as follows: 40 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 20 s, and 65 °C for 15 s. The PCR primers were purchased from Takara Co., Ltd. The PCR primer sequences for amplification of keratin 1 were forward primer 5'-AGATCACTGCTGGCAGACATGG-3', and reverse primer 5'-TGATGGACTGCTGCAAGTTGG-3'. The PCR primer sequences for amplification of loricrin were forward primer 5'-TCATGATGCTACCCGAGGTTTG-3', and reverse primer 5'-CAGAACTAGATG CAGCCGGAGA-3'. The PCR primer sequences for amplification of Wnt4 were forward primer 5'-CCAGCAGAGCCCTCATGAAC-3', and reverse primer 5'-TCCACCTCAGTGGCACCATC-3'. The PCR primer sequences for amplification of Wnt6 were forward primer 5'-CTG GAATTGCTCCAGCCACA-3', and reverse primer 5'-GCAGTGAT GGCGAACACGA-3'. The PCR primer sequences for amplification of Wnt7a were forward primer 5'-GCCCCGACTCTCATGAACTTG-3',

and reverse primer 5'-CCTCGTTGACTTGTCTTGTAGCA-3'. The PCR primer sequences for amplification of Notch1 were forward primer 5'-TGCGAGGTCAACACAGACGAG-3', and reverse primer 5'-GTG TAAGTGTGGGTCCGTCAG-3'. The PCR primer sequences for amplification of Notch2 were forward primer 5'-TGAACACTGGGTC GATGATGAAG-3', and reverse primer 5'-AGCGATGGTGTCC TACGGATG-3'. The PCR primer sequences for amplification of Notch3 were forward primer 5'-TGATGGCATGGATGTCAATGTG-3', and reverse primer 5'-CAGTTGGCATTGGCTCCAGA-3'. The PCR primer sequences for amplification of GAPDH were forward primer 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', and reverse primer 5'-ATGG TGGTGAAGACGCCAGT-3'. Each sample was tested in triplicate.

2.6. Statistical analysis

Significant differences between groups were evaluated with Student's *t*-test. Mean differences were considered significant when $p < 0.01$. Three samples were run for each case. All experiments were repeated at least twice, and similar results were obtained.

3. Results

3.1. Adhesiveness of NHEKs to SHya

Normal human dermal fibroblasts showed low adhesion to Hya-coated surfaces [9,10]. In order to assess the adhesion of NHEKs to SHya-coated surfaces, NHEKs were seeded on SHya- and Hya-coated surfaces (0, 0.4, and 0.8 mg/cm²). Fig. 2 shows that NHEKs adhered to SHya-coated surfaces as well as to an uncoated dish, but they did not adhere to the Hya-coated dishes.

3.2. Effect of SHya coating on keratinocyte proliferation

NHEKs were seeded on SHya-coated dishes (0.4 or 0.8 mg/cm²) and incubated in a high-calcium condition

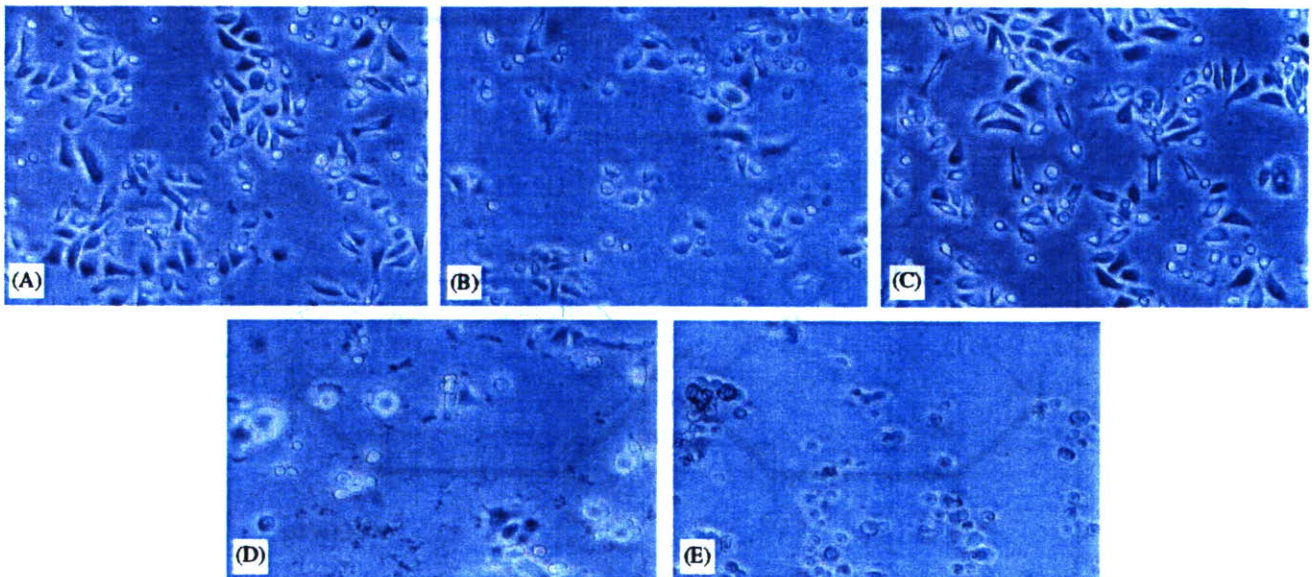


Fig. 2. The adhesion of NHEKs to SHya-coated surfaces. NHEKs were seeded at 1.0×10^4 cells/cm² onto SHya- and Hya-coated 24-well plates. Then NHEKs were incubated with non-coated (A), 0.4 mg/cm² SHya-coated (B), 0.8 mg/cm² SHya-coated (C), 0.4 mg/cm² Hya-coated (D), and 0.8 mg/cm² Hya-coated (E) wells for 16 h.

(0.20 mm) for 5 days. The cell proliferation assay showed that the SHya coating suppressed keratinocyte proliferation remarkably in a dose-dependent manner (Fig. 3).

3.3. Effect of SHya coating on keratin1 and lorricrin expression

To ensure that the SHya coating promoted keratinocyte differentiation, we detected the relative expression levels of differential marker mRNA by real-time RT-PCR. After NHEKs were incubated with SHya coating in a high-calcium condition (0.20 mm) for 5 days, the expression level of keratin1 mRNA on NHEKs was increased more than eight-fold compared to the control (Fig. 4A) and that of lorricrin mRNA was increased in a dose-dependent manner (Fig. 4B).

3.4. Effect of SHya coating on Wnts expressions

The expression levels of Wnt4 and Wnt6 mRNA on NHEKs incubated with SHya coating in the low-calcium

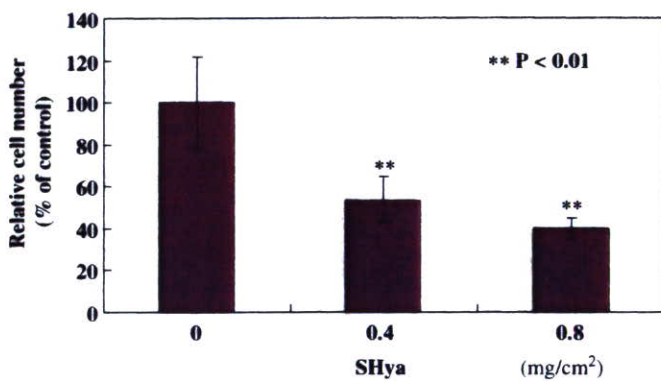


Fig. 3. Suppressive effect of SHya on keratinocyte proliferation. NHEKs were seeded at 1.0×10^4 cells/cm² densities onto non-coated (A), 0.4 mg/cm² SHya-coated (B), and 0.8 mg/cm² SHya-coated (C) 24-well plates and cultured for 5 days. Then numbers of NHEKs were determined by crystal violet assay. Each value is expressed as the mean \pm SD. ** $P < 0.01$ compared to control.

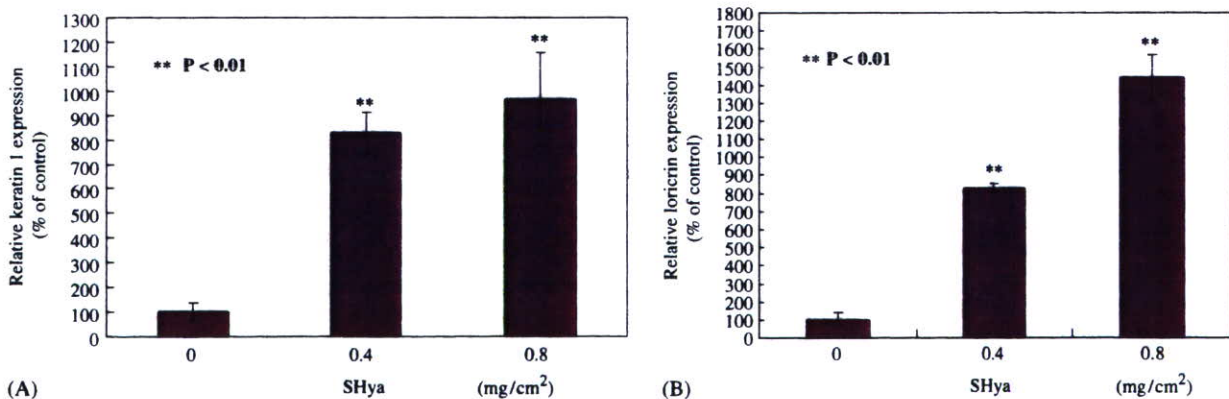


Fig. 4. The expression levels of keratin1 and lorricrin mRNA of NHEKs incubated with SHya coating. NHEKs were seeded at 1.0×10^4 cells/cm² onto SHya-coated 60 mm dishes (0, 0.4, and 0.8 mg/cm²) and cultured in medium with 0.20 mm calcium for 5 days. Then RNA was extracted, and real-time RT-PCR was performed to determine the expression levels of keratin1 and lorricrin mRNA. Effect of SHya on the expression level of (A) keratin1 mRNA, and (B) lorricrin mRNA. Each value is expressed as the mean \pm SD. ** $P < 0.01$ compared to control.

condition were measured (Fig. 5A and B); the expression level of Wnt5a of NHEKs incubated with SHya coating was decreased to 95% of the control (Fig. 5C) and that of Wnt7a mRNA to about 40% of the control (Fig. 5D).

3.5. Effect of SHya coating on Notch expressions

The expression level of Notch1 mRNA on NHEKs incubated with SHya coating was decreased about 75% compared to the control, and that of Notch2 mRNA was similar to the control (Fig. 6A and B). However, the expression level of Notch3 mRNA was increased about eight-fold compared to the control (Fig. 6C).

4. Discussion

Several studies have suggested that SHya interacts with cells [4], but the effect of SHya on cell differentiation and intercellular signaling was not clear. We demonstrated that a SHya coating promoted keratinocyte differentiation and modulated the expression levels of Notch and Wnt mRNAs.

In this study, the expression levels of Wnt4 and Wnt6 on NHEKs incubated with SHya were increased. A mouse keratinocyte cell line with a deficit of Wnt4 expression showed less differentiation [18]. Wnt6 regulated epithelization [19], suggesting that the SHya-induced upregulation of Wnt4 and Wnt6 is associated with the regulation of keratinocyte differentiation. Wnt7a promoted cell proliferation in corneal epithelial cells during wound healing [20], suggesting that SHya down-regulated Wnt7a expression, resulting in the enhancement of keratinocyte differentiation. The activation of beta-catenin, a downstream factor of Wnt signaling, contributes to keratinocyte differentiation [27]. A sulfated proteoglycan-induced Wnt-11 expression in mouse kidney cells, and sulfated polysaccharides were required in Wnt signaling in mouse kidney cells [28,29]. Therefore, it was suggested

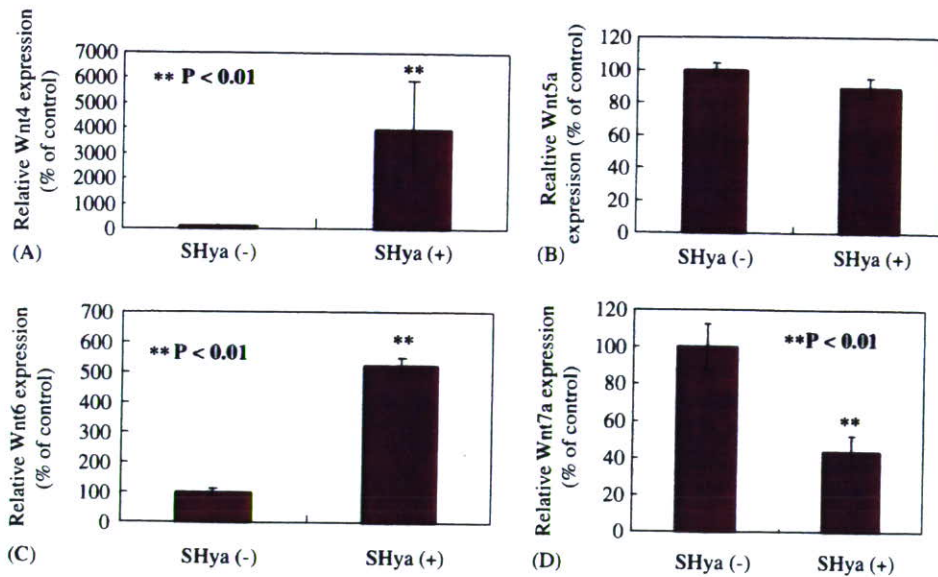


Fig. 5. The expression level of Wnt mRNA in NHEKs incubated with SHya coating. NHEKs were seeded at 1.0×10^4 cells/cm² onto SHya-coated 60 mm dishes (0 and 0.8 mg/cm²) and cultured in medium with 0.20 mM calcium for 20 h. Then RNA was extracted, and real-time RT-PCR was performed to determine the expression level of Wnt mRNA. Effect of SHya on the expression level of (A) Wnt4 mRNA, (B) Wnt5a mRNA, (C) Wnt6 mRNA, and (D) Wnt7a mRNA. Each value is expressed as the mean \pm SD. ** $P < 0.01$ compared to control.

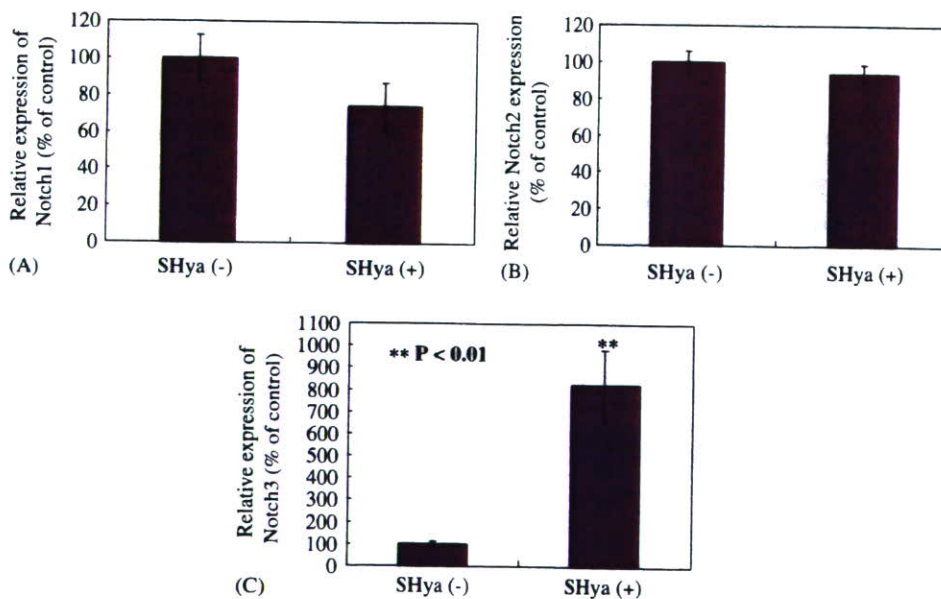


Fig. 6. The expression level of Notch mRNA in NHEKs incubated with SHya coating. NHEKs were seeded at 1.0×10^4 cells/cm² onto SHya-coated 60 mm dishes (0, 0.4, and 0.8 mg/cm²) and cultured in medium with 0.20 mM calcium for 5 days. Then RNA was extracted, and real-time RT-PCR was performed to measure the expression level of notch mRNA. The effect of SHya on the expression level of (A) Notch1 mRNA, (B) Notch2 mRNA, and (C) Notch3 mRNA. Each value is expressed as the mean \pm SD. ** $P < 0.01$ compared to control.

that SHya modulated Wnt signaling leading to beta-catenin activation.

In mouse keratinocytes, Notch1 is associated with the regulation of cell differentiation via p21, and Notch1 activation down-regulates Wnt4 expression [21]. Notch1 is required in keratinocyte differentiation and in the regulation of Wnt expression [24]. Activation of Notch receptors induces an increase in its own expression level by a positive feedback mechanism [24]. The expression of Notch1 in NHEKs incubated in SHya-coated dishes was decreased

compared to that of the control. It was suggested that the decrease in Notch1 expression triggered by SHya induced the increase of Wnt4. The expression level of Notch3 mRNA in NHEKs incubated with SHya coating was increased, suggesting that SHya interacted with Notch3, particularly resulting in the modulation of Wnt expression (Fig. 7). Notch3 is required for the differentiation of vascular smooth muscle cells or T cells [23,24]. The role of Notch3 in keratinocyte differentiation triggered by elevation of the extracellular calcium-ion concentration may not

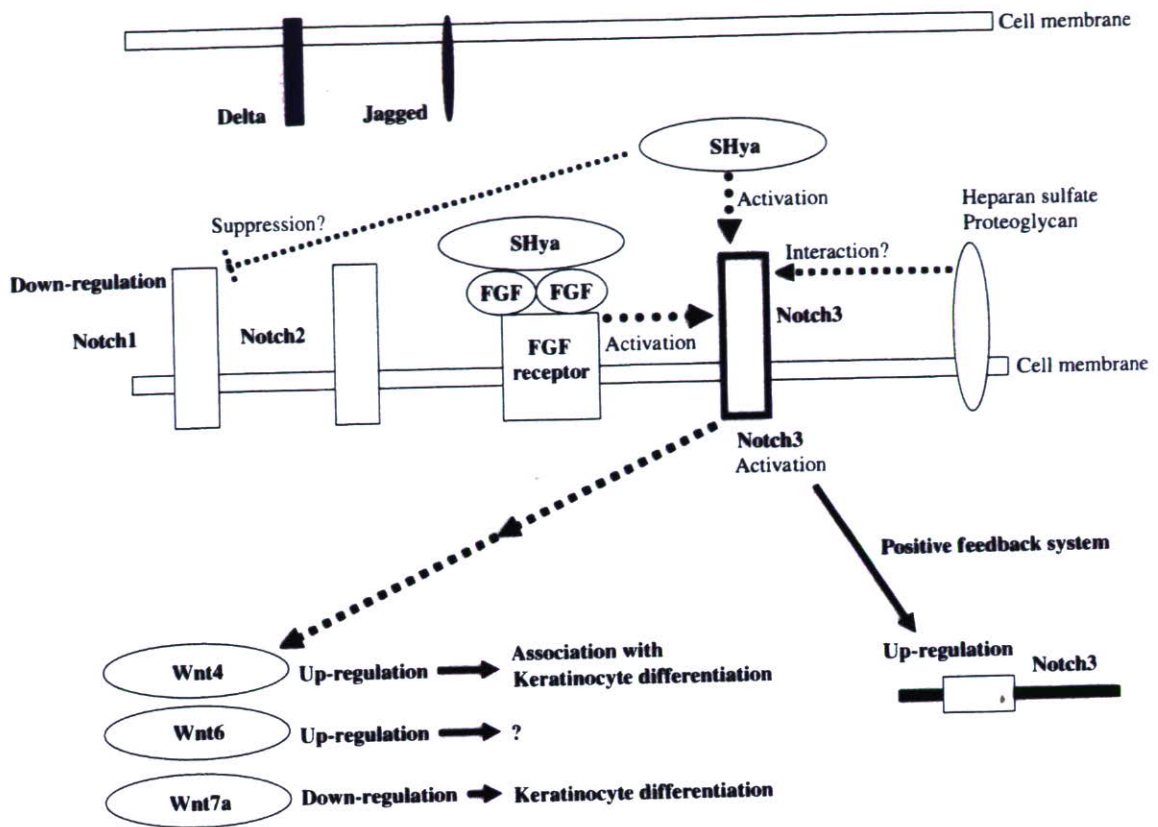


Fig. 7. Diagram of the effect of SHya on Wnt expression via Notch3.

be important, but Notch3 may be activated by SHya, leading to a modulation of intracellular signaling and enhancement of keratinocyte differentiation. Notch3 may be required for interaction with the sulfate groups of sulfated polysaccharides.

Notch1 activation stimulates p21 via the RBP-J kappa transcription factor, resulting in growth arrest, keratinocyte differentiation, or a decrease of Wnt4 expression [25]. Therefore, SHya might activate p21 via Notch3 activation, leading to the modulation of Wnt expression.

The differentiation of NHEKs incubated in SHya was better than that in Hya (data not shown). This suggests that the introduction of sulfate groups into Hya may be a key factor in the enhancement of keratinocyte differentiation.

Normal human dermal fibroblasts showed very low adhesiveness to Hya-coated surfaces because of the anionic surface of Hya [10,11]. However, NHEKs showed very high adhesiveness to SHya-coated surfaces. This suggested that the introduction of sulfate groups into Hya may change the property of its surface, resulting in a high adhesiveness. Sulfated polysaccharides such as heparin and heparan sulfate enhance the stabilities of some growth factors or adsorption of them by the cell membrane, resulting in the enhancement of cell differentiation [13]. The sulfate groups of SHya may bind to and stabilize cationic growth factors, and stabilized growth factors may neutralize the negative charge of the SHya surface, resulting in high cell attachment. Further, it was reported

that fibroblast growth factors (FGF) receptors interact with the Notch signaling pathway [30,31]. Therefore, it was suggested that SHya binds and stabilizes FGF to activate FGF receptors leading to stimulation of Notch3 and intercellular signaling.

5. Conclusion

This study demonstrated that a SHya coating promoted keratinocyte differentiation triggered by an elevated extracellular calcium ion concentration. Furthermore, SHya modulated Wnt expressions and increased the expression level of Notch3 mRNA. These results suggest that Notch3 may be an important target for the regulation of cell differentiation. SHya may be a useful biomaterial to regulate Wnt signaling in tissue engineering. This study provides new information that clarifies the interaction between sulfate groups and Notch families. Studies are in progress to clarify the roles of these modulations of *Notch* and *Wnt* genes in keratinocyte differentiation.

Acknowledgments

Special thanks to Dr. Misao Nagahata-Ishiguro for providing sulfated hyaluronan. This work was supported by Health and Labour Sciences Research Grants on Advanced Medical Technology (H14-001) and the Health Sciences focusing on Drug Innovation (KH61059) and on

Human Genome, Tissue Engineering (H17-022), from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.

References

- [1] Blacker KL, William ML, Goldyne M. Mitomycin C-treated 3T3 fibroblasts used as feeder layers for human keratinocyte culture retain the capacity to generate eicosanoids. *J Invest Dermatol* 1987;89: 536–9.
- [2] Lam PK, Chan ES, Yen RS, Lau HC, King WW. A new system for the cultivation of keratinocytes on acellular human dermis with the use of fibrin glue and 3T3 feeder cells. *J Burn Care Rehabil* 2000;21:1–4.
- [3] Meana A, Iglesias J, Del RM, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, et al. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* 1996;24:621–30.
- [4] Hollander D, Stein M, Bernd A, Windolf J, Wagner R, Pannike A. Autologous keratinocyte culture on hyaluronic acid ester membrane: an alternative in complicated wound management? *Unfallchirurgie* 1996;22:268–72.
- [5] Boyce S, Michel S, Reichert U, Shroot B, Schmidt R. Reconstructed skin from cultured human keratinocytes and fibroblasts on a collagen–glycosaminoglycan biopolymer substrate. *Skin Pharmacol* 1990;3:136–43.
- [6] Lapcik L Jr and L, Lapcik L, De Smedt S, Demeester J, Chabreck P. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chem Rev* 1998;98:2663–84.
- [7] Laurent TC, Fraser JE. Hyaluronan. *FASEB J* 1992;6:2397–404.
- [8] Kimata K, Honma Y, Okayama M, Oguri K, Hozumi M, Suzuki S. Increased synthesis of hyaluronic acid by mouse mammary carcinoma cell variants with high metastatic potential. *Cancer Res* 1983;43: 1347–54.
- [9] Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J* 1983;7:1233–41.
- [10] Park JU, Tsuchiya T. Increase in gap junctional intercellular communication by high molecular weight hyaluronic acid associated with fibroblast growth factor 2 and keratinocyte growth factor production in normal human dermal fibroblasts. *Tissue Eng* 2002;8: 419–27.
- [11] Park JU, Tsuchiya T. Increase in gap-junctional intercellular communications (GJIC) of normal human dermal fibroblasts (NHDF) on surfaces coated with high-molecular-weight hyaluronic acid (HMW HA). *J Biomed Mater Res* 2002;60:541–7.
- [12] Takada T, Katagiri T, Ifuku M, Morimura N, Kobayashi M, Hasegawa K, et al. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 2003;278: 43229–35.
- [13] Chamow SM, Schwall RH, Stack RJ. Sulphated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its activity. *J Biol Chem* 1995;14:16871–8.
- [14] Nagahata M, Tsuchiya T, Ishiguro T, Matsuda N, Nakatsuchi Y, Teramoto A, et al. A novel function of N-cadherin and connexin43: marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed to sulfated hyaluronan. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:603–11.
- [15] Kavalkovich KW, Boynton RE, Murphy JM, Barry F. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002;38:457–66.
- [16] Yang R, Yan Z, Chen F, Hansson GK, Kiessling R. Hyaluronic acid and chondroitin sulphate A rapidly promote differentiation of immature DC with upregulation of costimulatory and antigen-presenting molecules, and enhancement of NF- κ B and protein kinase activity. *Scand J Immunol* 2002;55:2–13.
- [17] Matsuda M, Shikata K, Shimizu F, Suzuki Y, Miyasaka M, Kawachi H, et al. Therapeutic effect of sulphated hyaluronic acid, a potential selectin-blocking agent, on experimental progressive mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Pathol* 2002;198:407–14.
- [18] Saitoh A, Laura A, Vogel HJC, Udey MC. Characterization of *Wnt* gene expression in murine skin: possible involvement of epidermis-derived Wnt-4 in cutaneous epithelial–mesenchymal interactions. *Exp Cell Res* 1998;243:150–60.
- [19] Schmidt C, Stoeckelhuber M, Mckinnell I, Putz R, Christ B, Patel K. Wnt6 regulates the epithelialisation process of the segmental plate mesoderm leading somite formation. *Dev Biol* 2004;271: 198–209.
- [20] Jungmook L, Choun-Ki J. Wnt-7a up-regulates matrix metalloproteinase-12 expression and promotes cell proliferation in corneal epithelial cells during wound healing. *J Biol Chem* 2005;280: 21653–60.
- [21] Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 2001;20: 3427–36.
- [22] Devgan V, Mammucari C, Millar SE, Brisken C, Dotto GP. p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes Dev* 2005;19: 1485–95.
- [23] Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, et al. *Notch3* is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev* 2004;18:2730–5.
- [24] Vacca A, Felli MP, Palermo R, Di Mario G, Calce A, Di Giovine M, et al. Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia. *EMBO J* 2006;25: 1000–8.
- [25] Li Y, Nagira T, Tsuchiya T. The effect of hyaluronic acid on insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap-junctional intercellular communications. *Biomaterials* 2006;27: 1437–43.
- [26] Anderegg G, Flaschka H, Sallmann R, Schwarzenbach G. Metallindikatoren VII. Ein auf Erdalkaliionen ansprechendes Phatalein und sein analytische Verwendung. *Helv Chim Acta* 1954;37: 113–20.
- [27] Yang L, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Tokumaru S, Yahata Y, et al. Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2006;42:111–9.
- [28] Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 1998;125:4225–34.
- [29] Kispert A, Vainio S, Shen L, Rowitch DH, McMahon AP. Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. *Development* 1996;122:3627–37.
- [30] Nery KYS, Rutlin ML, Radtke F, Fishell G, Gaiano N. Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors. *J Neurosci* 2004;24:9497–506.
- [31] Akai J, Halley PA, Storey KG. FGF-dependent Notch signaling maintains the spinal cord stem zone. *Genes Dev* 2005;19:2877–87.

Serum keratan sulfate is a promising marker of early articular cartilage breakdown

S. Wakitani¹, M. Nawata², A. Kawaguchi¹, T. Okabe³, K. Takaoka¹, T. Tsuchiya⁴, R. Nakaoka⁴, H. Masuda⁵ and K. Miyazaki⁵

Objectives. To find serum markers that may serve as indices for an early diagnosis of degeneration or damage of the articular cartilage. **Methods.** Twenty-four healthy volunteers, 19 individuals with knee trauma (KT) and 31 with knee osteoarthritis (OA) were evaluated. KT patients were divided into a group ($n=5$) with an injury <2 months old (recent KT) and a group ($n=14$) with that >2 months old (old KT). Articular cartilage damage was assessed using either arthroscopy or direct observation. Serum concentrations of hyaluronic acid (HA), cartilage proteoglycan aggrecan turnover epitope (CS846) and cartilage oligomeric protein (COMP) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits and those of keratan sulfate (KS) and chondroitin-6-sulfate (C6S) using high-performance liquid chromatography. **Results.** Serum KS in the recent KT group (2095 ± 594 ng/ml) was significantly higher than that in the old KT group (1373 ± 418 ng/ml; $P=0.021$), and serum COMP in the recent KT group (1572 ± 182 ng/ml) showed a tendency that was higher than that in the old KT group (1350 ± 250 ng/ml; $P=0.079$).

Serum KS in OA patients with Kellgren and Lawrence (KL) grades 0 and I (1456 ± 334 ng/ml) showed a tendency that was higher than that in OA patients with KL grades II, III and IV (1248 ± 220 ng/ml; $P=0.084$).

Conclusions. The serum concentration of KS correlated with the damage of the articular cartilage and it was significantly increased even at an early stage after the injury.

KEY WORDS: Keratan sulfate, Glycosaminoglycan, Cartilage oligomeric protein, Cartilage injury, Osteoarthritis, Serum marker.

Introduction

The prevalence of patients with articular cartilage defects among patients with symptomatic knees requiring arthroscopy has been reported as 5–20% [1–3]; when left untreated, osteoarthritic changes are observed on X-rays taken after 10–20 yrs [4, 5]. Thus, articular cartilage injury is considered a cause of osteoarthritis (OA). Even if there is no articular cartilage injury, degeneration of the articular cartilage is considered to begin in humans at a young age, and articular cartilage changes, such as changes in colour and fibrillation, can occur. Injury or early-stage alterations of the articular cartilage in OA cannot be detected using X-ray examination. Magnetic resonance imaging (MRI) can detect articular cartilage defects and cartilaginous quality changes to some extent, but this technique is not sensitive enough to detect early OA changes and is expensive to be used as a routine examination. Serum markers, on the other hand, are suitable as screening tests, and only patients with high values of serum markers should be subjected to MRI or arthroscopy to detect articular cartilage degeneration. If it were possible to detect OA or articular cartilage damage at an early stage, patients could be educated to prevent the progression of OA. Moreover, it would be useful to monitor the natural course of articular cartilage damage or repair after, for instance, autologous chondrocytes implantation, whose effectiveness is still controversial because there is no method to effectively evaluate cartilage repair.

In 1985, Thonar *et al.* [6] measured serum keratan sulfate (KS) using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by anti-KS antibody (1/20/5-D-4), and suggested its usefulness as a marker of OA. However, the correlation was weak and it did

not correlate with X-ray grading [7]. Many researchers have tried to detect the metabolic products of articular cartilage components (proteoglycan, type II collagen and non-collagenous proteins) in joint fluid or blood and thereby a marker of OA [8–11]. As reported by Okumura *et al.* [12], early OA articular cartilage destruction begins with a loss of glycosaminoglycans (GAGs) from articular cartilage surfaces, followed by collagenolysis. Thus, the first event in OA or articular cartilage damage is the release of GAGs, which play an important role in maintaining articular cartilage function. Consequently, early markers of articular cartilage damage or OA change might be among GAG metabolic products. We selected KS, chondroitin 6 sulfate (C6S), cartilage proteoglycan aggrecan turnover epitope (CS846) and hyaluronan (HA) as candidate markers, and cartilage oligomeric protein (COMP), which is not a component of GAGs but has been reported to be a marker of OA [9]. These components have been reported to correlate with OA, to some extent, but not with cartilage damage caused by degradation and/or injury. These metabolic products can be measured in joint fluid, serum and urine, but we measured them in serum because it is easy to collect.

We measured KS using high-performance liquid chromatography (HPLC), which has been reported to be more accurate than ELISA [13]; C6S using HPLC, and CS846, HA and COMP using ELISA. We measured these markers in healthy volunteers and in patients with knee trauma (KT) or OA, who were subjected to knee surgery and whose articular cartilage was optically assessed (by arthroscopy or direct observation). We examined the correlation of these markers with the articular cartilage assessment to evaluate their usefulness as markers of early articular cartilage breakdown caused by degeneration and/or injury but that showed no change by X-ray examination.

Patients and methods

This study was approved by the institutional Review Board of Marunouchi Hospital and was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, revised in 1983. Written informed consent was obtained from the healthy volunteers and patients prior to their participation in the study.

¹Department of Orthopaedic Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine, ²Department of Orthopaedic Surgery, Marunouchi Hospital, ³Department of Orthopaedic Surgery, Shinshu University School of Medicine, ⁴Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences and ⁵Department of Pharmaceuticals Information, Selkagaku Corporation.

Submitted 11 April 2007; revised version accepted 19 July 2007.

Correspondence to: Shigeyuki Wakitani, MD, Department of Orthopaedic Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan. E-mail: wakitani@med.osaka-cu.ac.jp

Blood collection from healthy volunteers

Ten men and 14 women (23–52 yrs old) volunteered to participate in the study. The volunteers were healthy with no gross obesity, inferior limb malalignment, history of knee injury or knee disorders. Sera were collected and stored at -80°C .

Patients with KT or knee OA

Nineteen KT patients (11 men and 8 women; 20–54 yrs old) and 31 patients with knee OA (11 men and 20 women; 40–80 yrs old) who were diagnosed to undergo knee surgery participated in the study. X-rays of knee and lumbar spine were available for all the patients. Sera samples were collected before surgery and stored at -80°C . The condition of the knee articular cartilage was observed at the time of surgery either arthroscopically or by direct observation. Among the 19 KT patients, two had meniscal injuries, 12 had ligament injuries and five had both meniscal and ligament injuries. KT patients were divided into a group of 5 patients with injuries <2 months old (recent KT) and a group of 14 patients with injuries >2 months old (old KT). Among the 31 OA patients, eight underwent total knee replacement, one underwent a high tibial osteotomy and 22 underwent arthroscopic debridement.

Assessment of articular cartilage surfaces by X-ray and visual inspection

X-ray images were assessed using the Kellgren and Lawrence (KL) grading scale [14]. All the KT patients were KL grade 0. Seven of the OA patients were KL grade 0, seven were KL grade I, four were KL grade II, six were KL grade III and seven were KL grade IV. Articular cartilage damage was assessed using the Société Française d'Arthroscopie (SFA) scaling system [15]. In brief, the degree of articular cartilage damage was estimated from 0 to IV according to the SFA grading scale. The width of the damaged area was evaluated as a percentage of the damaged area in the medial and medial femoro-tibial and patello-femoral areas, separately. The SFA score was then calculated using a coefficient. The SFA score represents not only the degree of articular cartilage surface damage, but also the width of the damaged area.

Determination of the serum markers

Keratan sulfate was determined by HPLC after digestion with keratanase II (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) according to the method of Tomatsu *et al.* [13]. Each serum sample (0.2 ml) was treated with a protease (actinase E: Kaken Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo) and the negatively charged

substance containing KS was fractionated by Q sepharose and digested by keratanase II. The KS-derived β -galactosyl-(1-4)-6-*O*-sulfo-*N*-acetylglucosamine (m-ks) and β -6-*O*-sulfo-galactosyl-(1-4)-6-*O*-sulfo-*N*-acetylglucosamine (d-ks) were contained in the solution that was digested by the enzyme and were measured using HPLC. Standard KS derived from bovine cornea (Seikagaku) was used to measure KS under identical conditions; and the quantity of KS in each serum sample was calculated as the sum of m-ks and d-ks. To determine C6S concentration, 0.2 ml of each serum sample was first treated with chondroitinase ABC (Seikagaku). The quantity of unsaturated disaccharide contained in the digested fluid was determined and C6S was detected by HPLC [16]. For the determination of CS846, COMP and HA, the Aggrecan Chondroitin Sulfate 846 Epitope ELISA Kit (IBEX Technologies, Inc., Montreal, Quebec, Canada), Human COMP ELISA Kit (Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, USA) and Hyaluronan Assay Kit (Seikagaku Corporation) were used respectively.

Statistical analysis

To determine the statistical significance of inter-group differences, Steel's multiple comparison test for patient group vs control and Wilcoxon rank-sum test for inter-patient group were conducted, and the *P*-level was set at <0.05.

Results

Arthroscopic findings in KT patients and serum concentrations of KS, C6S, CS846, HA and COMP

All KT patients had articular cartilage damage. Their cartilaginous damage scores (SFA) for the recent KT group and the old KT group were 1.2 ± 0.7 and 3.8 ± 3.9 , respectively. On X-ray examination, no changes were noted in the knee or intervertebral joints (Fig. 1).

The serum concentrations of KS, C6S, CS846, HA and COMP in KT patients are shown in Table 1. KS, C6S, CS846 and COMP were significantly higher in the recent KT group ($P=0.001$, $P=0.047$, $P=0.022$ and $P=0.001$, respectively), and KS and COMP higher in the old KT group (both $P < 0.001$) than in controls.

X-ray and arthroscopic examination of OA patients and serum concentrations of KS, C6S, CS846, HA and COMP

The SFA scores of OA patients distributed by their KL grade are presented in Table 2. The SFA score increased in relation with

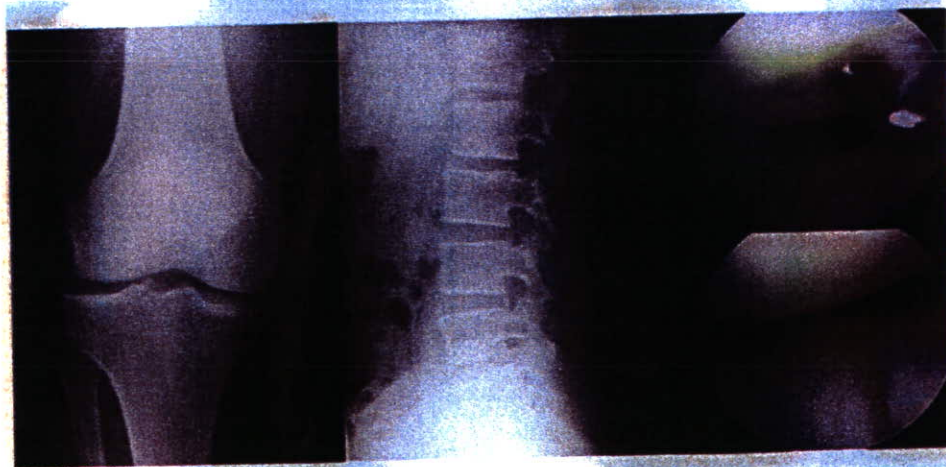


FIG. 1. Representative radiographs of the knee and lumbar spine and photograph of the articular cartilage in the knee of a 36-yr-old man with traumatic arthropathy. The X-ray grade, SFA score and serum KS concentration were normal, 0.7 and 2537 ng/ml, respectively. The serum KS concentration was high, although damage of the cartilage was minimal.

increased KL grade. Even in patients with KL grade 0 OA, degeneration or damage of the articular cartilage surface was observed by direct optical methods. In such patients, no X-ray findings were detected in the knee nor in the intervertebral discs (Fig. 2).

Serum concentrations of KS were significantly higher in most OA stages (KL grade 0: $P=0.004$, I: $P<0.001$, III: $P=0.004$ and IV: $P=0.008$) and serum COMP were significantly higher in all OA stages (KL grade 0: $P=0.004$, I: $P=0.002$, II: $P=0.008$, III: $P=0.002$ and IV: $P<0.001$) than in controls. C6S and HA

TABLE 1. Serum concentration of markers of cartilage degeneration or damage in patients with knee trauma

	Healthy subjects	KT patients	
		Recent trauma ^a	Old trauma ^b
<i>n</i>	24	5	14
SFA		1.2 ± 0.7	3.8 ± 3.9
KS (ng/ml)	910 ± 145	2095 ± 594*	1373 ± 418*
C6S (ng/ml)	97 ± 28	122 ± 10*	104 ± 22
CS846 (ng/ml)	137 ± 24	214 ± 77*	142 ± 46
COMP (ng/ml)	1030 ± 150	1572 ± 182*	1350 ± 250*
HA (ng/ml)	41 ± 15	44 ± 19	39 ± 12

The values are the mean ± s.d.

^aPatients evaluated within 2 months after the injury.

^bPatients evaluated >2 months after the injury.

* $P<0.05$ vs Healthy subjects (Steel's multiple comparison test).

SFA, Société Française d'Arthroscopie score; KS, keratan sulfate; C6S, Chondroitin-6-sulfate; CS846, cartilage proteoglycan aggrecan turnover epitope; COMP, cartilage oligomeric protein and HA, hyaluronic acid.

TABLE 2. Serum concentration of markers of cartilage degeneration or damage in OA patients

X-ray grade	Healthy subjects	OA patients				
		0	I	II	III	IV
<i>n</i>	24	7	7	4	6	7
SFA		2.4 ± 2.1	5.1 ± 3.5	28.8 ± 47.5	>100	>200
KS (ng/ml)	910 ± 145	1501 ± 360*	1411 ± 326*	1253 ± 241	1352 ± 242*	1155 ± 176*
C6S (ng/ml)	97 ± 28	116 ± 18	115 ± 15	102 ± 22	131 ± 22	157 ± 53*
CS846 (ng/ml)	137 ± 24	147 ± 67	151 ± 108	140 ± 70	112 ± 16	211 ± 184
COMP (ng/ml)	1030 ± 150	1710 ± 550*	1570 ± 310*	1580 ± 200*	1630 ± 470*	1907 ± 268*
HA (ng/ml)	41 ± 15	80 ± 65	72 ± 21*	76 ± 68	116 ± 76	258 ± 230*

The patients were grouped by their X-ray grade.

The values are the mean ± s.d.

* $P<0.05$ vs healthy subjects (Steel's multiple comparison test).

SFA, Société Française d'Arthroscopie score; KS, keratan sulfate; C6S, chondroitin-6-sulfate; CS846, cartilage proteoglycan aggrecan turnover epitope; COMP, cartilage oligomeric protein and HA, hyaluronic acid.

in patients with KL grade IV were significantly higher than in controls (both $P<0.001$).

Comparison of the serum markers between patient groups

Since the serum concentrations of KS and COMP were higher in most stages of KT and OA than in controls, those differences between stages were compared in Fig. 3. The serum KS in the recent KT group (2095 ± 594 ng/ml) was significantly higher than that in the old KT group (1373 ± 418 ng/ml; $P=0.021$) and those in OA patients with KL grades 0 and I (1456 ± 334 ng/ml) showed a tendency that was higher than that in patients with KL grades II, III and IV (1248 ± 220 ng/ml; $P=0.084$). The serum concentrations of COMP in the recent KT group (1572 ± 182 ng/ml) showed a tendency that was higher than that in the old KT group (1350 ± 250 ng/ml; $P=0.079$), but those in OA patients showed no difference between the patient group with KL grades 0 and I (1639 ± 434 ng/ml) and the patient group with KL grades II, III and IV (1731 ± 355 ng/ml).

Discussion

This study showed that the serum concentration of KS was high in patients with early-stage damage of the articular cartilage undetectable by X-ray imaging. Serum KS may be suitable as a screening test for articular cartilage damage and to monitor the natural course of articular damage or repair.

In the KT patients with recent injuries, KS was significantly higher than in those with old injuries, suggesting that serum

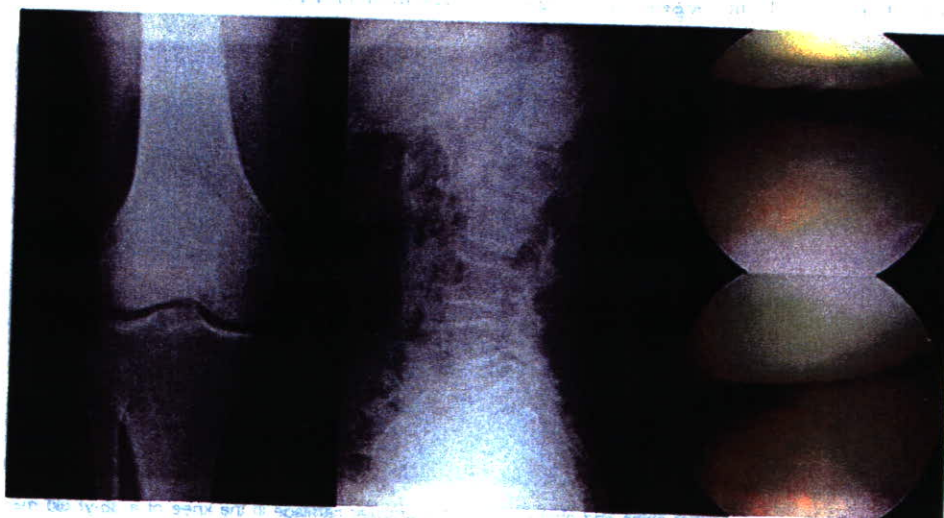


Fig. 2. Representative radiographs of the knee and lumbar spine and photograph of the articular cartilage in the knee of a 66-year-old woman with KL grade 0 OA. The SFA score and serum KS concentration were 1.7 and 2145 ng/ml, respectively. The serum KS concentration was high, although the patient had early-stage OA.

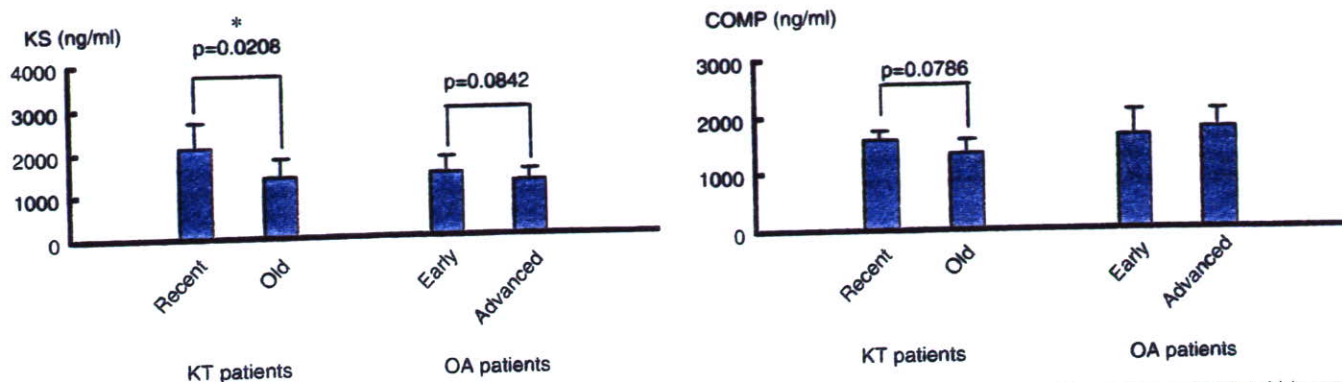


Fig. 3. Comparison of the serum markers between stage groups in KT or OA patients. KT patients were divided into a group with an injury <2 months old (recent) and a group with an injury >2 months old (old). OA patients were divided into a group with KL grades 0 and I (early) and a group with KL grades II, III and IV (advanced). Data are the mean \pm s.d. * $P < 0.05$ (Wilcoxon rank-sum test).

KS might indicate the release of cartilaginous GAG in the early stage after injury in spite of moderate cartilaginous damage.

In OA patients, the serum concentrations of KS, C6S, HA and COMP were significantly higher than in healthy controls as reported previously [6, 17–19]. Among these parameters, KS was high in patients with KL grades 0 and I, indicating that KS might serve as a marker of early-stage OA. The KS concentrations in OA patients tended to decrease as the KL grade increased from 0 to IV, which reflects disappearance of the joint space. It may mean that in OA, a greater quantity of the cartilage matrix is released when the joint space has not yet narrowed. On the contrary, COMP was high in KL grade IV. This can be explained by the fact that COMP is a non-collagen protein that exists in the synovial membrane, meniscus and tendon, as well as in the cartilage and its increase is most likely related to the inflammation of various intra-articular tissues. The changes in C6S and HA were marked in KL grade IV, indicating that these are not markers of early-stage cartilage destruction.

KS is a component of proteoglycans found in the articular cartilage, intervertebral discs and corneas. Because corneas are relatively small tissues, serum KS mainly originates from articular cartilage and intervertebral discs. Thus, the serum concentration of KS is not only a marker of knee articular cartilage, but also of other joints and intervertebral discs. Therefore, before concluding that the elevated serum concentration of KS originated from damage to the knee joint articular cartilage, the possibility of spondyloarthropathy and OA in other joints must be examined. We verified that there were no X-ray changes in the lumbar spine nor symptoms caused by lumbar spinal abnormalities in KT patients (Fig. 1), although spondyloarthrotic changes existed in OA patients because most of these patients were of advanced age (Fig. 2). We verified that no OA symptoms were observed in joints other than the knee in these patients. We are planning to investigate serum KS in patients with spondyloarthropathy or intervertebral disk herniation in the future.

Serum KS is considered to reflect the normal metabolism of cartilage, and KS increases in case of mechanical injuries within a few months after injury. Budberg *et al.* [20] found that serum KS increased 1–3 months after resection of the anterior cruciate ligaments of dog knees. In our report, KT patients who were evaluated within 2 months after the injury exhibited an acute release of KS. Although the SFA score of KT patients was very small, indicating that damage was confined, serum KS was high (Table 1). After the rapid release of KS ends, release from the injured surfaces continues at a relatively high rate. This phase is considered to continue for a few years to a couple of decades as in KT evaluated >2 months after the injury and in early-stage OA patients (KL grades 0 and I). The persistence of this condition leads to OA in a few decades. This phase corresponds to advanced OA (KL grades II, III, IV).

This report is the first study to show that serum KS increases early after an injury causing small articular damage and in patients with early-stage OA undetectable by X-ray imaging. As only a small volume of blood is required for the measurement of serum KS, this parameter may serve as a screening test to detect articular cartilage injury and it is expected to contribute greatly to the decision on a therapeutic strategy for the management of OA or cartilage injury.

Rheumatology key messages

- Serum keratan sulfate correlates with damage of the articular cartilage.
- It may serve as a screening and monitoring test of the natural course of articular cartilage damage or repair.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

References

- 1 Aroen A, Loken S, Heir S *et al.* Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med* 2004;32:211–5.
- 2 Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997;13:456–60.
- 3 Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 2002;18:730–4.
- 4 Messner K, Maletius W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand* 1996;67:165–8.
- 5 Shelbourne KD, Jari S, Gray T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: a natural history study. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A (Suppl 2):8–16.
- 6 Thonar EJ, Lenz ME, Klintworth GK *et al.* Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis Rheum* 1985;28:1367–76.
- 7 Campion GV, McCrae F, Schnitzer T, Lenz ME, Dieppe PA, Thonar EJ. Levels of keratan sulfate in the serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1991;34:1254–9.
- 8 Belcher C, Yaqub R, Fawthrop F, Bayliss M, Doherty M. Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Ann Rheum Dis* 1997;56:299–307.
- 9 Mundemann A, Dyrby CO, Andriacchi TP, King KB. Serum concentration of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is sensitive to physiological cyclic loading in healthy adults. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:34–8.
- 10 Bruyere O, Collette J, Kothari M *et al.* Osteoarthritis, magnetic resonance imaging, and biochemical markers: a one year prospective study. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1050–4.
- 11 Mazzuca SA, Poole AR, Brandt KD *et al.* Associations between joint space narrowing and molecular markers of collagen and proteoglycan turnover in patients with knee osteoarthritis. *J Rheumatol* 2006;33:1147–51.
- 12 Okumura M, Tagami M, Fujinaga T. Measurement of serum and synovial fluid keratan sulphate and antibody to collagen type II in equine osteoarthritis. *J Vet Med A* 1998;45:513–6.
- 13 Tomatsu S, Okamura K, Maeda H *et al.* Keratan sulphate levels in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *J Inher Metab Dis* 2005;28:187–202.