

表1 MMP の分類と主な基質

MMP	酵素名	主な基質
1. コラゲナーゼ群 MMP-1 MMP-8 MMP-13	組織コラゲナーゼ 好中球コラゲナーゼ コラゲナーゼ-3	I, II, III, VII, VIII, X 型コラーゲン, セラチン, アグリカン, リンクタンパク I, II, III, V, VII, VIII, X 型コラーゲン, セラチン, アグリカン I, II, III, VI, IX, X, X IV 型コラーゲン, セラチン, アグリカン, パールカン
2. セラチナーゼ群 MMP-2 MMP-9	セラチナーゼ A セラチナーゼ B	I, II, III, IV, V, VII, X, XI, X IV 型コラーゲン, セラチン, エラスチン アグリカン, リンクタンパク, pro-IL-1 β , pro-MMP-9, 13 IV, V, VII, X, X IV 型コラーゲン, セラチン, エラスチン, アグリカン pro-IL-1 β , pro-TGF β
3. ストロムライシン群 MMP-3 MMP-10	ストロムライシン-1 ストロムライシン-2	アグリカン, リンクタンパク, テコリン, III, IV, V, IX, X 型コラーゲン セラチン, パールカン, フィブロネクチン, オステオネクチン pro-IL-1 β , pro-MMP-1, 7, 8, 9, 13 アグリカン, リンクタンパク, III, IV, V 型コラーゲン, pro-MMP-1, 8, 13
4. マトリライシン群 MMP-7 MMP-26	マトリライシン-1 マトリライシン-2	アグリカン, リンクタンパク, テコリン, IV 型コラーゲン, セラチン エラスチン, フィブロネクチン, pro-TNF α , RANKL, pro-MMP-2, 9 IV 型コラーゲン, セラチン, フィブロネクチン, pro-MMP-9
5. 膜型 MMP 群 1) I 型膜貫通型 MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-24 2) GPI アンカー型 MMP-17 MMP-25 3) II 型膜貫通型 MMP-23	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP MT4-MMP MT6-MMP 	I, II, III 型コラーゲン, セラチン, アグリカン, フィブロネクチン pro-MMP-2, 13 セラチン, アグリカン, フィブロネクチン, pro-MMP-2 III 型コラーゲン, セラチン, フィブロネクチン, pro-MMP-2 セラチン, プロテオグリカン, pro-MMP-2 セラチン IV 型コラーゲン, セラチン, フィブロネクチン, pro-MMP-2 セラチン
6. フューリン活性化型群 MMP-11 MMP-21 MMP-28	ストロムライシン-3 エビリシン	カゼイン, フィブロネクチン 詳細不明 カゼイン
7. その他 MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-27	メタロエラスターゼ RASI-1 エナメライシン	エラスチン, IV 型コラーゲン, セラチン, フィブロネクチン IV 型コラーゲン, セラチン, アグリカン, COMP アメロジェニン セラチン, カゼイン

COMP : cartilage oligomeric matrix protein, GPI : glycosyl phosphatidyl inositol, IL-1 : インターロイキン, MMP : マトリックスメタロプロテアーゼ, MT : membrane type, RANKL : receptor activator of NF- κ B ligand, RASI : rheumatoid arthritis synovial inflammation, TGF : transforming growth factor, TNF : tumor necrosis factor

(筆者ら作成)

Ⅲ型コラーゲンの分解能を有しており、MMP-9 やMMP-13の活性化にも関与し得る。pro-MMP-2は、TIMP-2,-3,-4と、pro-MMP-9はTIMP-1とそれぞれ結合し、他のMMPの阻害活性を有している。Itohら⁹⁾は、MMP-2およびMMP-9の遺伝子欠損マウスを用いた抗体誘発性関節炎モデルの検討から、MMP-2は関節炎を抑制し、MMP-9は関節炎の発生に関与していると報告しており、これら酵素の役割には尚不明な点が残されている。

3. ストロムライシン群 (MMP-3, 10)

ストロムライシン群 (MMP-3, 10) は、アグリカン、リンクタンパクなど、幅広いECM成分を分解する酵素群である。特にMMP-3は、軟骨コラーゲンネットワークの構築上重要なⅡ型コラーゲン分子間架橋やⅨ型コラーゲンの分解能を有し、種々のMMP (MMP-1, 7, 8, 9, 13)の活性化能を有することから、軟骨破壊のkey enzymeと考えられてきた。アグリカナゼの同定以来¹⁰⁾、軟骨アグリカン分解の主要酵素の座を奪われつつあるが、RAの軟骨破壊においては、MMP-3は重要な役割を担っていると考えられる(後述)。近年、MMP-10にもMMP-3に類似した機能があることが示唆されている¹¹⁾。

4. マトリライシン群 (MMP-7, 26)

マトリライシン群 (MMP-7, 26) は、ヘモペキシンドメインを欠く短いMMP群である。MMP-7はストロムライシン群と同様の幅広い基質特異性を有し、OAにおける軟骨破壊への関与が示唆されているが、未だ不明な点が多い。

5. 膜型 MMP 群

膜型 MMP 群 (Ⅰ型膜貫通型: MMP-14, 15,

16, 24, GPI アンカー型: 17, 25, Ⅱ型膜貫通型: MMP-23) は、細胞膜貫通構造または glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーを有する酵素群であり、細胞膜に結合して細胞周囲のタンパク分解を行うため、細胞増殖、アポトーシス、分化、浸潤などにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。フューリンにより細胞内で活性化され細胞膜上に局在する。MMP-14はMMP-2, 13の活性化にも関与し、さらにⅡ型コラーゲンの分解能を有することから、軟骨破壊における役割は大きいと考えられている。MMP-23は、膜貫通構造をプロペプチドに有する特殊な膜型MMPであり、他の膜型MMPと異なり細胞膜から切り離された後、酵素活性を発揮する。

6. フューリン活性化型群 (MMP-11, 21, 28)

フューリン活性化型群 (MMP-11, 21, 28) は、膜型MMPと同様、フューリンにより細胞内で活性化される酵素群である。MMP-11は、ストロムライシン3と呼ばれるが、酵素活性、基質特異性ともに他のストロムライシンとは異なる。MMP-28は、OAやRAの軟骨中で発現が亢進していると報告されている¹²⁾。

7. その他 (MMP-12, 19, 20, 27)

MMP-12, 19, 20, 27は、上記分類に当てはまらない酵素群であり、詳細が明らかにされていないMMPも含まれる。MMP-12は主にマクロファージから産生される酵素であり、近年、他のMMPの活性化能を有することが報告され、RAの病態形成における役割も示唆されている¹³⁾。

RAにおける軟骨破壊とMMP (図2)

軟骨破壊はあらゆる関節疾患に随伴する共通の病態であるが、破壊の様式はさまざまである。大

GPI: glycosylphosphatidylinositol

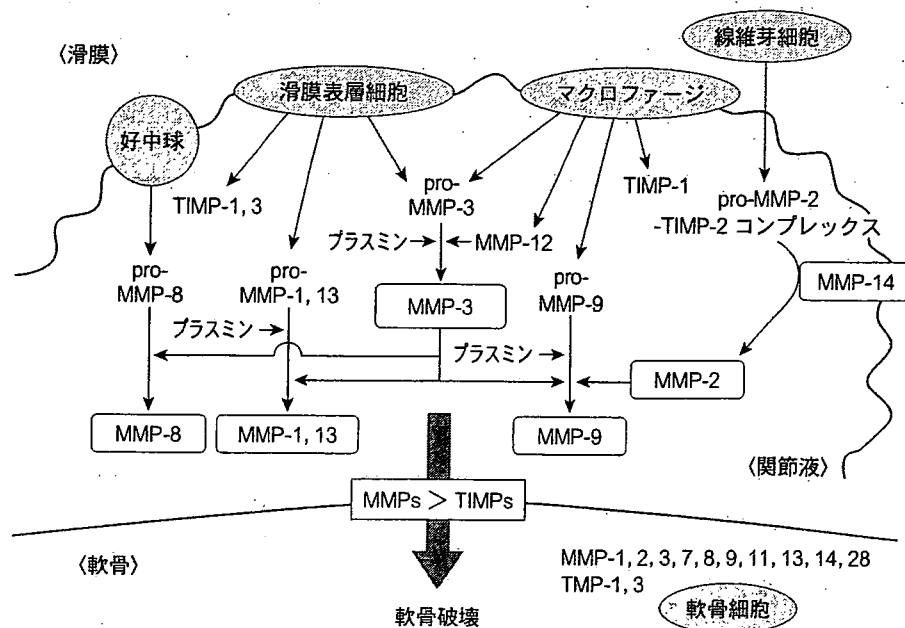


図2 RA 軟骨破壊とMMP

滑膜表層細胞およびマクロファージから産生された MMP-3 は、他の MMP (MMP-1, 7, 8, 9, 13) の活性化能を有し、軟骨破壊を進行させる。一方、pro-MMP-2 は TIMP-2 と結合しており、MMP-14 により活性化され、MMP-9 および MMP-13 の活性化に関与する。RA の関節内には過剰な MMP が産生されており、TIMP とのアンバランスが生じている。

MMP : マトリックスメタロプロテアーゼ, RA : 関節リウマチ, TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase (筆者ら作成)

別して内因性破壊と外因性破壊に分類され、前者は、軟骨細胞の代謝変動など軟骨自体が破壊の主因となるもので、変形性関節症が代表的疾患である。後者は、軟骨以外の病因、多くは滑膜炎などの病態により軟骨破壊が生じるもので、RA を代表とする炎症性関節疾患の破壊様式と考えられる。

関節内の主な MMP の産生は、滑膜表層細胞から MMP-1, 3, 13, 14 などが、滑膜深層の線維芽細胞からは MMP-2 が産生される。また、マクロファージからは MMP-3, 9, 12 が、好中球からは MMP-8, 9 が産生される。さらに、RA 滑膜組織中の遺伝子発現の検討では、そのほかにも MMP-10, 11 などの産生が確認されている。

外因性軟骨破壊を主とする RA では、滑膜組織

から産生された MMP は、関節液を介して軟骨 ECM 破壊に関与する。筆者ら¹⁾は、関節液中の種々の MMP およびそのインヒビターである TIMP 濃度を検討した結果、RA 患者の関節液中では、MMP-1, 2, 3, 8, 9 が OA 患者に比較して極めて高濃度であり(表2)、また、MMP の総濃度は TIMP の総濃度に比較して、RA では約 45 倍、OA でも約 8 倍のアンバランスが存在することを報告した。これら酵素とインヒビターのアンバランスが RA 軟骨破壊の一病態と考えられる。

種々の MMP が軟骨破壊に関与し得ることは明らかであるが、破壊に寄与する程度は明らかな見解が得られていない。しかしながら、関節液中の MMP-3 は他の MMP に比較して、RA では数十倍以上、OA でも 10 倍以上の高濃度で存在し(表

表2 RA, OA 患者の関節液中 MMP, TIMP 濃度 (平均 ± 標準偏差 [nmol/L])

RA 患者の関節液中の MMP-1, 2, 3, 8, 9 濃度は, OA 患者に比較して有意に高値を示した。また, MMP-3 は, 他の MMP に比較して RA では数十倍以上, OA でも 10 倍以上の高濃度で存在しており, 軟骨破壊における MMP-3 の役割は大きい。

	RA	OA	p 値*
MMP-1	35.1±24.8	5.74±5.17	p < 0.001
MMP-2	28.7±8.3	20.3±7.7	p < 0.001
MMP-3	1,980±1,360	282±53	p < 0.001
MMP-7	1.95±3.61	0.77±1.52	NS
MMP-8	13.2±18.6	ND	p < 0.001
MMP-9	10.6±14.8	ND	p < 0.001
MMP-13	0.05±0.04	0.02±0.07	NS
TIMP-1	47.4±24.9	28.9±15.4	p < 0.001
TIMP-2	7.22±1.76	6.93±1.75	NS

* RA, OA 間の差の有意性

MMP: マトリックスメタロプロテアーゼ, ND: 検出限界以下, NS: 有意性なし,
OA: 変形性関節症, RA: 関節リウマチ, TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase
(文献1より改変)

2), 抗原誘発性関節炎モデルでは, 関節内における MMP-3 遺伝子は他の MMP に比較して過剰に発現されることが報告されている¹⁴⁾。さらに, MMP-3 は炎症性サイトカインにより誘導され, 滑膜表層細胞のほかマクロファージからも産生が認められること, 幅広い基質特異性を持ち, 他の MMP の活性化能を有することなどを考え合わせると, RA の軟骨破壊における MMP-3 の役割は極めて大きいと推察される。しかしながら, MMP-3 の遺伝子欠損マウスを用いたコラーゲン誘導性関節炎の検討では, 軟骨破壊の進行に差が無かったと報告されており¹⁵⁾。関節炎による軟骨破壊は単一酵素のみで説明し得るものではなく, 各 MMP は互いに機能を補完していることが示唆されている。

ECM 分解以外の MMP の機能

MMP の主たる機能は ECM の分解であるが, 近

年, MMP にはそれ以外の生物学的機能を有することが明らかにされている。

まず第一は, 種々のタンパクの貯蔵庫としての ECM を破壊することにより, 結合している成長因子等を放出させる機能である。デコリンには transforming growth factor β (TGF β) が, パールカンには塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が結合しており, MMP はこれらの放出を促進すると報告されている^{16) 17)}。さらに, フィブロネクチンのように分解産物自体が生物学的活性を有している ECM も知られている。第二の機能は, 細胞周囲環境としての ECM を破壊することにより, 細胞-ECM 間や細胞間の相互作用に変化をきたし, 細胞活性が変化するということである。骨芽細胞を介した破骨細胞活性化の初期段階では, コラゲナーゼが重要な役割を担っていることが示唆されている。第3の機能として, MMP は ECM 以外の基質特異性を有し, 細胞表面タンパクやサイ

ADAMTS: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif, bFGF: 塩基性線維芽細胞増殖因子, CRP: C 反応タンパク, IL: インターロイキン, RANKL: receptor activator of NF- κ B ligand, TGF β : transforming growth factor β

トカイン、レセプターなどを分解して生物学的活性を調節している。MMP-2, 3, 9はインターロイキン (IL)-1 β のプロセッシングに関与し¹⁸⁾, MMP-7はreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)の可溶化を介して破骨細胞を活性化し得ることが報告されている¹⁹⁾。

以上のように、MMPは、ECM分解以外の機能を介しても、関節炎およびそれに引き続く軟骨破壊に関与し得ると考えられており、さらなる解明が必要である。

関節マーカーとしてのMMPの展望

筆者ら²¹⁾は、RAの軟骨破壊で重要な役割を担っていると考えられているMMP-3が、RAの関節病態の指標になり得ると考え、関節液、および血清濃度の検討を行ってきた。膝関節炎を主症状とするRA患者の膝関節液中と血清中MMP-3濃度を検討した結果、両者は有意な正の相関を示し、さらに血清中MMP-3濃度はLansbury関節点数や赤血球沈降速度(赤沈)、C反応タンパク(CRP)値など全身の炎症マーカーとも正の相関を認めた。さらに、MMP-3の関節液濃度は血清濃度の数百倍の高濃度であり、これらの結果は、血清中で検出されるMMP-3の多くが関節内のMMP-3に由来し、関節の炎症を反映していることを示唆している。

今日、血清中のMMP-3濃度はRAの検査項目の一つとして認可され、関節破壊の予後を予測できる可能性も示唆されている。しかしながら、関節炎の病態はさまざまであり、単一分子で十分に説明することは難しい。加えて、RA患者の関節病態は、同一患者であっても部位により異なるため、個々の関節病態を定量的に評価することがRAの診療上重要な課題と考えられる。MMPは、産生細胞や発現のメカニズムの異なる酵素群であり、さまざまな関節病態に呼応したプロファイルを呈する可能性が高い。血清中MMP-3のみなら

ず、新たな関節病態の指標として、今後益々の研究が期待される。

おわりに

近年、軟骨アグリカンを分解する新たな酵素として、ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif) 遺伝子ファミリーに属する種々の酵素が同定された。MMPと同じメタロプロテアーゼドメインを有する酵素群であり、ADAMTS-4, -5がそれぞれアグリカナーゼ1, 2と呼称されている¹⁰⁾。ADAMTS-5の遺伝子欠損マウスでは、実験的OAにおける軟骨破壊が抑制されたと報告されており²⁰⁾, OAの軟骨破壊における役割はMMPに比較して、より大きいと考えられている。一方、RAにおけるADAMTS分子の関与については、滑膜での発現は知られているが、未だその詳細は明らかにされていない。MMPのさらなる機能解析とRAにおけるMMPとADAMTSの役割の解明は今後の重要な課題であり、それらに基づいた新たな検査法、治療法の開発が期待される。

文 献

- 1) Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, et al: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **59**: 455-461, 2000.
- 2) Yoshihara Y, Obata K, Fujimoto N, et al: Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **38**: 969-975, 1995.
- 3) Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, function and biochemistry. *Circ Res* **92**: 827-839, 2003.
- 4) 岡田保典, 橋本学爾: マトリックスメタロプロテ

- アーゼによる細胞外マトリックス代謝と関節破壊. 生化学 73 : 1309-1321, 2001.
- 5) Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, et al : TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5) . J Biol Chem 276 : 12501-12504, 2001.
 - 6) Neuhold LA, Killar L, Zhao W, et al : Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. J Clin Invest 107 : 3-44, 2001.
 - 7) Kennedy AM, Inada M, Krane SM, et al : MMP13 mutation causes spondyloepiphyseal dysplasia, Missouri type (SEMD) . J Clin Invest 115 : 2832-2842, 2005.
 - 8) Wernicke D, Seyfert C, Gromnica-Ihle E, et al : The expression of collagenase3 (MMP-13) mRNA in the synovial tissue is associated with histopathologic type II synovitis in rheumatoid arthritis. Autoimmunity 39 : 307-313, 2006.
 - 9) Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, et al : The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. J Immunol 169 : 2643-2647, 2002.
 - 10) Tortorella MD, Burn TC, Prratta MA, et al : Purification and cloning of aggrecanase-1 : a member of the ADAMTS family of proteins. Science 284 : 1664-1666, 1999.
 - 11) Barksby HE, Milner JM, Patterson AM, et al : Matrix metalloproteinase 10 promotion of collagenolysis via procollagenase activation. Arthritis Rheum 54 : 3244-3253, 2006.
 - 12) Momohara S, Okamoto H, Komiya K, et al : Matrix metalloproteinase 28/epilysin expression in cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis : comment on the article by Kevorkian, et al. Arthritis Rheum 50 : 4074-4075, 2004.
 - 13) Chen YE : MMP-12, an old enzyme plays a new role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis ? Am J Pathol 165 : 1069-1070, 2004.
 - 14) Schurigt U, Stopfel N, Huckel M, et al : Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 7 : R174-R188, 2005.
 - 15) Mudgett JS, Hutchinson NI, Chartrain NA, et al : Susceptibility of stromelysin 1 - deficient mice to collagen induced arthritis and cartilage destruction. Arthritis Rheum 41 : 110-121, 1998.
 - 16) Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, et al : Degradation of decorin by matrix metalloproteinases : identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta 1 release. Biochem J 322 : 809-814, 1997.
 - 17) Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, et al : The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. J Biol Chem 271 : 10079-10086, 1996.
 - 18) Schonbeck U, Mach F, Libby P, et al : Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases : a novel caspase-independent pathway of IL-1 beta processing. J Immunol 161 : 3340-3346, 1998.
 - 19) Lynch CC, Hirosaka A, Acuff HB, et al : MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. Cancer Res 7 : 485-496, 2005.
 - 20) Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al : Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. Nature 434 : 644-648, 2005.

アグリカンフラグメントによる 関節軟骨疾患の評価

山田治基^{*1} 金治有彦^{*1} 伊達秀樹^{*1} 加藤慎一^{*1}
市瀬彦聡^{*1} 吉原愛雄^{*2} 森田充浩^{*2}

アグリカンは衝撃吸収という関節軟骨の機能を支える最も重要なマトリックス成分であり、その喪失は関節機能の低下に直結するのでマーカーとしてのポテンシャルは高い。最小構成要素であるグリコサミノグリカンの形で測定する手法は測定漏れが少ない。コア蛋白部分を ELISA で測定する手法は簡便であるが特異性が低い。ケラタン硫酸側鎖とヒアルロン酸結合能の両者を有する分子は軟骨に由来した特異性が高い。ADAMTS や MMP の作用によって生じた新しい断端を認識する測定法は、特定のプロテアーゼによる低分子化の結果を反映している。アグリカンフラグメントとして測定される分子は軟骨以外の組織に由来するものも多いこと、その量は合成と分解の両者の影響を受ける代謝回転の指標であることを認識するべきである。

はじめに

プロテオグリカンは、生体内に普遍的に存在する複合糖質に属する基本的な細胞外マトリックスである。関節軟骨に存在するプロテオグリカンはアグリカンとよばれ、ヒアルロン酸 (HA) に多数結合し、分子量数百万の巨大凝集体を形成する¹⁾。アグリカンはその保水性から

粘弾性、衝撃吸収などの関節機能の維持に重要な役割を果たしている。その喪失は関節機能の低下に直結する。関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA)、変形性関節症 (osteoarthritis : OA) などの関節疾患では、II 型コラーゲンの分解よりもアグリカンの分解、低分子化が先に起こるとされており、アグリカンの分解産物は関節疾患の如何を問わず、疾患病態把握のための早期指標となりうる。関節液、血液などの体液中に存在するアグリカン分子やアグリカンから由来した各種のフラグメントは、軟骨や滑膜などの関節構成体から遊離してきた分子である。軟骨の物理的特性を維持しているアグリカンが分解、低分子化されたフラグメントは、軟骨マトリックスの異化傾向の結果であり、軟骨機能や病態を類推するうえで重要であるとともに関節機能、病態を反映するマーカーとしてのポテンシャルは高い²⁾³⁾。

Key Words

アグリカン
グリコサミノグリカン
関節液
軟骨
マーカー

^{*1} YAMADA Harumoto, KANAJI Arikiko, DATE Hideki, KATO Shinichi, ICHINOSE Hirofusa/藤田保健衛生大学医学部整形外科

^{*2} YOSHIHARA Yasuo, MORITA Mitsuhiro/防衛医科大学校整形外科

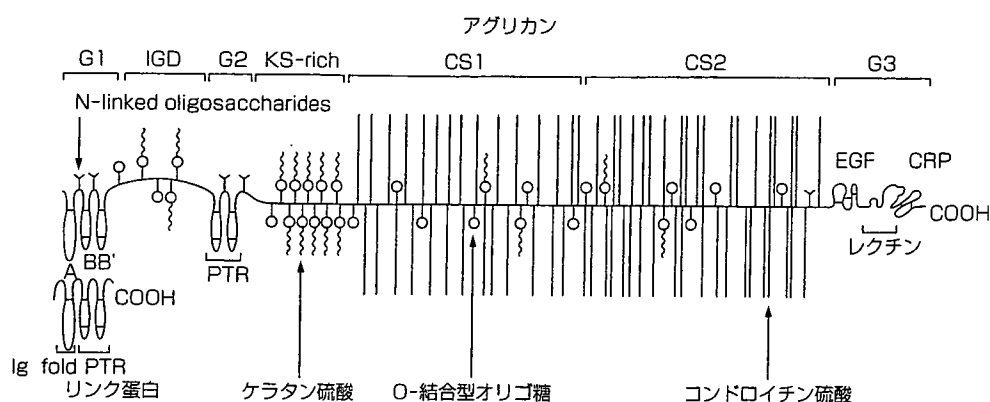


図1 アグリカンの構造

アグリカンのコア蛋白はN末端にG1, G2, C末端にG3の3つの球状ドメインを有する。アグリカンはG1ドメインを通じてHAに結合し、リンク蛋白がこれを補強している。アグリカンを構成する側鎖にはKSやCSがある。

(Hardingham TE, 2000¹⁾より引用)

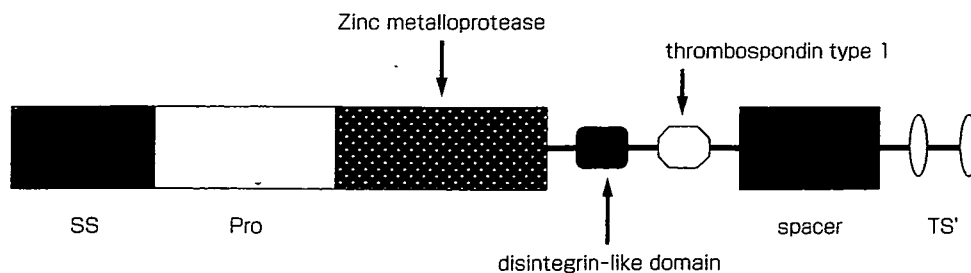
1. 関節軟骨に存在するアグリカンの構造と役割

マーカーとしてのアグリカンフラグメントの役割を理解するには、アグリカンの構造を知ることが必要である。関節軟骨のプロテオグリカンは約250 kDa コア蛋白に多数のケラタン硫酸 (KS)、コンドロイチン硫酸 (CS) などのグリコサミノグリカン (GAG) が結合し、大きいものでは2,000 kDa以上の分子量をもつアグリカンとよばれる巨大分子となる(図1)。アグリカンは関節軟骨に特異的に存在するものではなく、関節腔内では靱帯、滑膜などにも存在している。コア蛋白はN末端にG1, G2, C末端にG3の3つの球状ドメインを有する。アグリカンはG1ドメインを介してHAに結合し、リンク蛋白がこの結合を補強している。G2とG3間にはGAG結合部が存在する。側鎖であるGAGは、グルコサミンまたはガラクトサミンの糖単位がくり返してできた長鎖構造の多糖である。GAGは硫酸基とカルボキシル基をもち、強く負に帯電しているので多量の水分を保持する性質がある。ほとんどの関節疾患では、アグリカンの破壊がII型コラーゲンの変性に先行するとされている。アグリカンを喪失した軟骨組織ではII型コラーゲンが露出し、他のプロテアーゼなどの作用を受けやすい状態に置かれる。GAGにはHA, CS, デルマタン酸, ヘパラン硫

酸, KS などがあるが、HA 以外はコア蛋白に側鎖として結合することによってアグリカンを構成する。CS はアセチルガラクトースアミンとグルクロン酸のくり返し配列により構成される代表的なGAGであり、軟骨には唯一の細胞種である軟骨細胞から産生されたコンドロイチン6硫酸 (C6S) とコンドロイチン4硫酸 (C4S) の二種類が存在する。健康軟骨にはC6Sが多く、OA軟骨ではC4Sの比率が増加する。ただし、関節液中のC6Sは主として軟骨に由来するが、C4Sは軟骨のほかに滑膜および血清に由来するものも多い。KSはアセチルガラクトースアミンとガラクトースのくり返し配列により構成されるGAGである。KSは生体中では関節軟骨以外には角膜に存在するのみであり、関節軟骨特異性が高いGAGである。

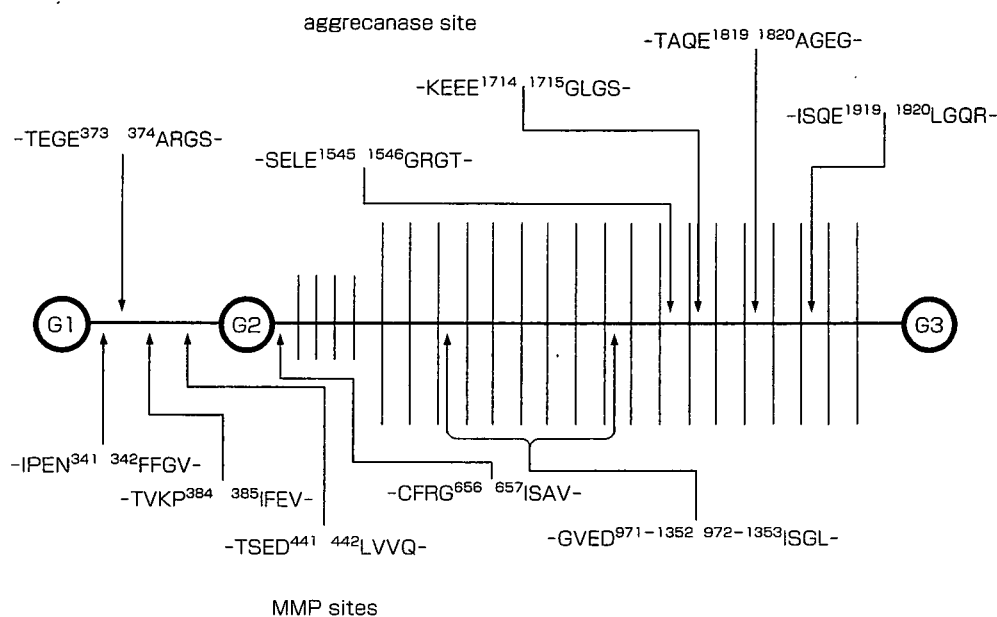
2. アグリカンのプロテアーゼによる分解、遊離機構

アグリカンは各種の機序によって分解、低分子化されるが、代表的な分解機構はプロテアーゼによるものである。コア蛋白はプロテアーゼによる分解を受けやすく、中性領域で作用するカテプシンG、プラスミンなどのセリン系プロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの金属系プロテアーゼ、カルパインなどのシステインプロテアーゼを含めて、複数のプロテアーゼ



図② ADAMTS の構造

ADAMTS は N 末端の Zinc metalloprotease ドメイン, disintegrin-like ドメイン, トロンボスポンジン 1, 2 に共通な構造を含む thrombospondin type 1 motif を有する基本構造をとる。



図③ コア蛋白におけるプロテアーゼによる切断部位

コア蛋白には MMP や ADAMTS などのプロテアーゼで特異的に切断されやすい部位が複数存在する。上段は aggrecanase によって切断される部位, 下段は MMP によって切断される部位である。

(Struglics A *et al*, 2006²²⁾より改変引用)

が *in vitro* でコア蛋白を分解する作用をもつ。ただし、これらのプロテアーゼの作用は非特異的なものも多い。以前は、関節軟骨を含めてアグリカンの生体内における分解、低分子化は MMP-3 をはじめとする複数の MMP によるものと考えられていたが、最近では a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS, いわゆる aggrecanase) と呼称される一群の金属系プロテアーゼが、OA や RA などの関節疾患におけるアグリカン分解に大きな役割を果たしていることが明らかとなっている⁴⁾。ADAMTS は N 末端の Zinc

metalloprotease ドメイン, disintegrin-like ドメイン, トロンボスポンジン 1, 2 に共通な構造を含む thrombospondin type 1 motif を有する (図②)。アグリカンのコア蛋白には MMP や ADAMTS で切断される部位が複数存在するが、最近の研究では ADAMTS による切断部位は 5 ヶ所存在することが明らかになっている⁵⁾(図③)。当初, aggrecanase とよばれた ADAMTS の存在は, OA 関節軟骨や関節液中に存在するアグリカン切断端が MMP による切断端と異なっていることから, その存在が予想され, 検索された。現時点では ADAMTS として

19種類が報告されているが, ADAMTS-1, -3, -5, -8, -15などがプロテアーゼとしてアグリカン分解能を有する⁶⁾. 軟骨からのアグリカンの遊離, 喪失, 引きつづく軟骨変性という観点からは, G1-G2間の interglobulardomain (IGD)における切断が最も重要である. ADAMTSはコア蛋白を主としてIGDに位置するGlu³⁷³-Ala³⁷⁴で切断する. 一方, MMPはIGDでコア蛋白を3か所で切断する. そのなかではAsn³⁴¹-Phe³⁴²での切断が最も顕著である.

3. 疾患におけるアグリカン破壊機序の違い

上記のプロテアーゼのうち, どれが関節疾患における最も主たる役割を演じているかについては現時点でも確定的ではない. 一つの疾患でも, その病期などによって作用するプロテアーゼに違いがあると予想されている. OA関節液中やOA軟骨中における切断端の検索ではIGDのGlu³⁷³-Ala³⁷⁴における切断端が多いことから, OA病態での関節軟骨におけるアグリカンの分解は主としてADAMTS, とくにADAMTS-4, -5によるものと推測されている⁷⁾⁸⁾. また, ウシ軟骨組織をインターロイキン (IL)-1で刺激するとGlu³⁷³-Ala³⁷⁴における切断端が増加することが*in vitro*で示され, 軟骨細胞自身によるマトリックス破壊が病態の中心であるOAでは, MMPよりもADAMTS-4, -5が重要であることが確定された. ヒトのOA軟骨組織には上記のGlu³⁷³-Ala³⁷⁴における切断端以外にも, Glu¹⁵⁴⁵-Gly¹⁵⁴⁶などのIGD領域以外の部位におけるADAMTSによる切断端の存在が報告されている. OA軟骨でのこれらの切断端の存在は年齢などに関連がなく, ランダムに切断が起こっていると考えられている⁹⁾. ADAMTS-4, -5のいずれがOAにおける主たる役割を演じているかは不明であった. 最近, Glassonら¹⁰⁾はADAMTS-4, -5の遺伝子欠損マウスに対して膝靱帯を切除したOAモデルを検討し, wildマウスおよびADAMTS-4欠損マウスの関節軟骨に破壊が認められたが, ADAMTS-5欠損マウスでは破壊は認められなかったことを報告した. さらに関節軟骨を培養し, IL-1 α で刺激すると, wildマウスではアグリカン喪失が示されたが, ADAMTS-5欠損マウスのうち, 遺伝子

型がヘテロ型のマウスでは部分的な喪失が観察され, ホモ型のマウスでは破壊はほとんど認められなかったとしている. ただし, ヒトOAでいずれのADAMTSが主役を演じているかについては更なる検討が必要である.

RAにおけるアグリカン喪失はOAよりも複雑である. これは, RAでは軟骨細胞以外に滑膜細胞, 好中球を含めた関節液中の炎症細胞, さらに骨髄に存在するマクロファージ系細胞など多数の細胞種から産生, 分泌されるプロテアーゼが複雑にマトリックス破壊にかかわっているためである. さらにRAにおいては病期により優勢な細胞からのプロテアーゼ種が変化することも予想され, MMPを含めた複数のプロテアーゼの関与が考えられている. よって, RAにおけるアグリカンフラグメントの存在形態はOAよりも多様性に富む. Stantonら¹¹⁾はADAMTS-5遺伝子欠損マウスの膝関節内へウシ血清アルブミンを注入する関節炎モデルでの検討をおこなった結果, 炎症による関節軟骨の破壊においてADAMTS-5が中心的な役割を果たしていることを明らかにした.

以上のようなMMPやADAMTSなどのプロテアーゼによるコア蛋白分解以外のアグリカン遊離メカニズムが生体内に存在する. 関節液中のアグリカンフラグメントを検討すると, 側鎖として関節軟骨に特有のKSを有し, かつHAとの結合領域であるG1ドメインを有しているアグリカン分子が存在することが報告されている. このような分子はADAMTSやMMPなどのプロテアーゼによっては産生されないもので, 機械的な遊離など他のメカニズムの関与が考えられている. このHA結合能を有するアグリカンフラグメントは, 関節軟骨から遊離された直後の可能性の大きいアグリカン分子であり, それだけ現存する軟骨アグリカン代謝を直接反映している可能性が高い¹²⁾.

4. アグリカンに由来するフラグメントの測定手法

上記の機序によって軟骨中のアグリカンから各種の切断されたフラグメントが遊離し, 関節液中に放出される. その濃度や存在形態を知ることによって疾患におけるア

グリカンの異化傾向が評価できる。アグリカンに由来するフラグメントの測定法の特徴を以下に述べる。

1) コア蛋白の定量法

アグリカンに対する色素、コア蛋白に対するポリクローナル抗体などを使用した酵素結合免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) などで関節液中のアグリカンフラグメント濃度を測定する手法が以前より知られている。これらの測定手法は、特異性が低く、関節疾患の病態との関係も明らかでないものが多い。

2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

アグリカンや GAG を酵素により二糖の構造単位にまで分解した後、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography : HPLC) で測定する手法が実用化されている。コンドロイチナーゼ ABC と同 AC-II で処理することによって、関節液中に存在する CS を不飽和二糖にまで分解する。得られた不飽和二糖を HPLC に添加し、溶出された不飽和二糖を定量する。本手法により C6S と C4S が良好に分離、定量される¹³⁾¹⁴⁾。同様にケラタナーゼ II で処理し、存在する KS を飽和二糖にまで分解した後、HPLC に添加し、溶出された飽和二糖を定量することによって KS が測定できる¹⁵⁾。KS については硫酸化の程度が疾患や年齢で異なることが報告されているが、HPLC による測定法は硫酸化の異なる KS 分子を別個に測定できる利点を有する。本手法は、関節液のように酵素を含む多くの夾雑物が混在している体液中の微量な GAG やアグリカン由来フラグメントを定量するのに適した測定法である¹⁶⁾。

3) コンドロイチン硫酸エпитープ

CS 部分に存在する各種のエピトープに対する特異的な抗体が開発されている。エピトープ 3-B-3 (一) と 846 は胎児軟骨に豊富に存在することから、産生直後のアグリカンであり、アグリカン合成を反映する数少ないマーカーと考えられている。とくに 846 エピトープを有するアグリカンは、HA との凝集能を有する完全なアグリカンであることが知られている¹⁷⁾。846 エピトープについ

ては関節液、血液に対する ELISA が確立されている。イヌを使用した靱帯切離による膝 OA モデルでは、術後 3 週の早期に血中の 846 エピトープが他のマーカーに先がけて上昇することが明らかとなっている¹⁸⁾。

4) ADAMTS や MMP による切断端

ADAMTS や MMP の作用によって、IGD を含むコア蛋白から新しい切断端 (ネオエピトープ) が生じる。この切断端は関節液や培養液を塩化セシウム溶液中で超遠心し、ネオエピトープに特異的な抗体を使用して SDS-PAGE した後に western blotting をおこなうことにより検出されている。ADAMTS-4 による切断部位 (Glu³⁷³-Ala³⁷⁴) に露出するネオエピトープに対しては、IGD 領域における N 末端シークエンス³⁷⁴ARGS-を認識する抗体を使用する。MMP による IGD 領域での切断ネオエピトープについては、³⁴²FFGV-を認識する抗体が使用される。ただし、この手法では測定できるネオエピトープ量は半定量にとどまる。最近、Pratta および Lohmander らのグループ¹⁹⁾は、KS を有するアグリカンであり同時に ADAMTS による切断端を有する分子を、ARGSVIL シークエンスに対するモノクローナル抗体で認識する ELISA を開発している。

5) HA 結合能を有するアグリカンフラグメント

プラスチックプレートに固定された抗 KS 抗体によって補足されたアグリカン分子に抗 G1 ドメイン抗体を反応させることによって、KS と G1 ドメインの両者を有するアグリカン分子を選択的に測定する手法が開発されている²⁰⁾。前述したように、この測定法は KS と HA 結合部分をあわせもつという関節軟骨に直接由来した可能性がきわめて高いアグリカン分子を選択的に測定しており、生体内に残存する関節軟骨量や代謝回転をよく反映している。

5. 測定対象となる体液

マトリックスに由来するマーカー分子を測定する体液として、関節液、血液、尿などが対象となる。関節液は軟骨や滑膜などの関節構成体に密接に接触しているの

で、個々の関節の病態を最も密接に反映する。アグリカンフラグメントもほとんどが関節液中で測定されている。OAのように単一関節での疾患においては、該当関節のマトリックスからフラグメントが関節液中に放出されてから血中に移行する際に希釈を受けるので、現在の測定手法では有意な変動をとらえることが困難である。また、アグリカンのように関節軟骨を含めて生体内に豊富に存在するマトリックスのフラグメントは、かなりの代謝変動が発生しないと、血中濃度には反映されにくいという欠点がある。RAではマトリックスの破壊がOAより高度なことで、複数の関節で破壊が存在することなどから、血液中の測定でも病態をある程度反映するが、あくまで全身の破壊活性ととらえるべきである。

6. アグリカン由来マーカーの反映するもの

関節液中のアグリカンフラグメントは軟骨や滑膜などの関節構成体で合成された後、上述した破壊機序によって低分子化され、関節腔に遊離され、血中に移行する。以前からアグリカンフラグメントは軟骨破壊の指標とされてきたが、軟骨に由来するC6SやKSなどのGAGやアグリカンフラグメントは軟骨細胞によって合成され、基質に組み込まれた後に分解、遊離されたものであり、合成と分解の両者の影響を受けるので、厳密には代謝回転のマーカーである。すなわち、アグリカンの合成が亢進しても、破壊が増加しても同じようにその濃度は高くなる。関節液中のC4Sは軟骨よりも滑膜や血清に由来する割合が大きく、軟骨代謝よりは滑膜炎の指標と考えられる。

前述したようにADAMTSやMMPの作用によってIGDから生じた新しい断端(ネオエピトープ)はアグリカンのプロテアーゼによる分解、破壊という病態を特異的に反映するマーカーといえる。ただ、ネオエピトープも万能ではなく、コア蛋白を有するアグリカンなら、それが軟骨以外に由来するアグリカンでも同様に測定してしまうという点は念頭に置いておかねばならない。すなわち関節軟骨特異性という点では疑問があることは否定できない。アグリカンは関節軟骨だけに特異的に存在するのでなく、関節包や滑膜にも存在している。よって関

節液中にはさまざまな組織から遊離されたアグリカンフラグメントが混在している。関節軟骨に存在するアグリカンの特徴は側鎖としてKSを有すること、かつHAに結合して巨大凝集体を形成することである。この点を考慮すると、HA結合能を有するアグリカンフラグメントの測定は関節軟骨の代謝を特異的に反映している可能性が高い。

関節軟骨を構成するマトリックスであるアグリカンに由来する分子は、荷重ストレスや運動によって軟骨組織からの遊離が増加するので、歩行や運動をおこなった後には関節液中や血中での濃度が増加する。また日内変動としては、ほとんどのマーカーは夜間にピークをもつ。よって早朝でかつ非運動時の検体採取を心がけるべきである。血中測定をおこなう際には、マーカー分子の最終的代謝過程を考慮すると、肝や腎疾患のある患者では高値を示す可能性があり注意を要する。

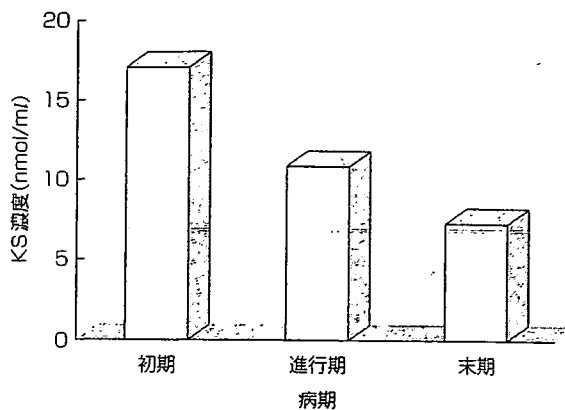
7. アグリカンフラグメント測定の臨床における有用性

1) OAにおける病期の評価

股関節OAにおける関節液の検討では、軟骨特異性が高いとされるC6Sの関節液中濃度は残存軟骨の総量を反映してX線病期の進行とともに減少傾向を示した。ただしOA関節液では貯留する関節液量による希釈の影響により、マーカーの濃度は大きく変動する。この関節液量の影響を小さくするためには、マーカー間の比率をとることが簡便な手法である。股関節OAにおけるC6S/C4Sは病期の進行とともに有意差をもって低下しており、関節液量の影響を受けにくい指標として有用である¹⁴⁾。これに対してKSは関節軟骨特異性が高く、関節液中KSについては単に濃度を測定しても、病期の進行による減少が有意に認められ、有用性がC6Sより高い(図4)。

2) OAにおける病態の評価

エピトープ3-B-3(-)と846はアグリカン合成のマーカーとされている。これらのエピトープは正常人ではほとんど検出されないが、OA軟骨で増加し、疾患重症度との相関も認められている。エピトープ846の関節液中濃



図④ 股関節 OA における関節液中 KS 濃度

股関節 OA の関節液中 KS を HPLC により測定した。X 線上でみた病期の進行に伴い、KS 濃度は低下する。

(Yamada H *et al*, 2000¹⁹⁾より改変引用)

度は、II型コラーゲンの合成マーカーであるコンドロカルシン濃度と相関を示し、アグリカンとコラーゲンの修復、合成がリンクしていることを示唆している²¹⁾。Struglics および Lohmander ら²²⁾による最近の報告は、ヒト OA 関節液中には ADAMTS と MMP の両者による切断端が存在するが、ADAMTS によるものが優位であるとしている。しかしながら、軟骨中には両者のプロテアーゼによる切断端がほぼ同等に存在することから、ヒト OA においては少なくとも二種類のアグリカン分解過程が存在することを明らかにしている。

3) 疾患進行の予知マーカーとして

RA 症例における初診時の関節液中アグリカン、cartilage oligomeric matrix protein (COMP), bone sialoprotein (BSP)などを測定し、その後の関節破壊進行との関係を検討した結果では、関節液中アグリカンのみが破壊進行の著しい症例で高いという結果が示されている。エントリー時における関節液中のアグリカン測定により RA における関節破壊予知が可能であるという有用性を示唆している (表①)²³⁾。

膝十字靱帯や半月などの損傷に際しては軟骨損傷の合併が多く、将来的に OA を発症する可能性がある。よって、これらの膝外傷後の軟骨病態を把握することは二次性 OA の発症を予知するうえでも臨床上、重要な課題である。これらの関節外傷後の関節液中 C6S, C4S を測

表① RA 患者における初診時関節液中マーカー濃度とその後関節破壊進行

アグリカンが高値な症例では関節破壊進行が著しい。エントリー時における関節液中のアグリカン測定により RA における関節破壊予知が可能である。

	高度破壊群	低破壊群	p 値
アグリカン (mg/ml)	68.6	31.4	0.0005
COMP (mg/ml)	56.4	52.2	0.95
アグリカン/COMP	1.12	0.58	0.00004
BSP (μg/l)	355.2	310.1	0.33

アグリカン：コア蛋白に対する ELISA で測定

BSP：bone sialoprotein

(Mansson B *et al*, 1997²³⁾より改変引用)

定した結果、受傷後早期にきわめて高値を示し、以後すみやかに漸減することが報告されている²⁴⁾。とくに受傷後の急性期における C6S の上昇は、損傷軟骨から直接遊離したもので、おもに合併する軟骨損傷、破壊の程度を反映するものであり、将来的な二次性 OA への進行が高い症例といえる。

4) 治療効果の評価、予測

HA の注入療法は OA に対する保存療法として代表的なものであるが、本法が OA の軟骨破壊そのものを抑制する disease modifying 効果を有するかどうかを X 線などの画像所見を用いて判定することは容易ではない。HA 注入前後での関節液中マーカーの変動を検討した結果では、C6S, C4S などの低下が報告されている²⁵⁾。関節液中のアグリカンフラグメントの低下が、ただちに HA の disease modifying 効果を実証したことにはならないが、本療法が OA 病態に影響をあたえていることを示唆している。

また、OA はきわめて有病率の高い疾患であるので、治療開始前に、その治療による有効性を予測できれば医療経済上も有用である。HA の注入療法開始前の関節液中に存在する HA 結合型アグリカン分子を測定した結果、注入前アグリカン濃度と注入後 4, 8 週後の膝 JOA スコア (Japanese Orthopedic Association score) 改善度との間には有意の正の相関が認められた。すなわちアグリカン濃度が高い症例ほど JOA スコア改善が良好であった²⁶⁾。関節液中の HA 結合型アグリカンレベルは残存軟骨量とその代謝活性に依存しているので、本結果は HA 注入

療法が有効であるためにはアグリカン代謝が維持されていること、すなわち軟骨が残存し、かつ活発に代謝をおこなっていることが前提になることを示唆している。以上の結果は、アグリカン由来マーカーが HA 注入療法の臨床的有効性予測に有用であることを示している。

おわりに

アグリカンの関節疾患における破壊機構とアグリカンフラグメントの測定法、マーカーとしての価値について概説した。アグリカンは関節軟骨の機能維持上、重要なマトリックスであり、マーカーとしての価値は高いことは疑う点はない。ただし、アグリカンは軟骨以外にも生体内に普遍的に存在するマトリックスであり、軟骨特異性という点については問題がある。アグリカンフラグメントをマーカーとして臨床的に使用していく際には、対象としている関節軟骨に由来するアグリカン分子を選択的に測定する手法を確立していくことが重要である。



文 献

- Hardingham TE : 軟骨, アグリカン-リンクプロテイン-ヒアルロン酸の凝集体として. ヒアルロン酸 最近の研究と進歩, 田中清介編, 文栄社, 東京, 2000, pp. 10-22
- Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD : Molecular basis and clinical use of biochemical markers on bone, cartilage, and synovium in joint diseases. *Arthritis Rheum* **43** : 953-968, 2000
- 山田治基 : 変形性関節症における関節マーカー. 日骨形態計測会誌 **11** : 21-29, 2001
- Nagase H, Kashiwagi M : Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* **5** : 94-103, 2003
- Little CB, Hughes CE, Curtis CL *et al* : Matrix metalloproteinases are involved in C-terminal and interglobular domain processing of cartilage aggrecan in late stage cartilage degradation. *Matrix Biol* **21** : 271-288, 2002
- Collins-Racie LA, Flannery CR, Zeng W *et al* : ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage. *Matrix Biol* **23** : 219-230, 2004
- Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ *et al* : The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* **89** : 1512-1516, 1992
- Sandy JD : A contentious issue finds some clarity : on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolysis. *Osteoarthritis Cartilage* **14** : 95-100, 2006
- Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K *et al* : Inhibition of ADAM-TS 4 and ADAM-TS 5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* **277** : 22201-22208, 2002
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B *et al* : Deletion of active ADAMTS 5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* **434** : 644-648, 2005
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ *et al* : ADAMTS 5 is the major aggrecanase in mouse cartilage *in vivo* and *in vitro*. *Nature* **434** : 648-652, 2005
- 宮崎聡 : プロテオグリカン, GAGs, ヒアルロン酸. 炎症と免疫 **2** : 186-193, 1994
- Shinmei M, Miyauchi S, Machida A *et al* : Quantitation of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in pathologic joint fluid. *Arthritis Rheum* **35** : 1304-1308, 1992
- Yamada H, Miyauchi S, Hotta H *et al* : Levels of chondroitin sulfate isomers in the synovial fluid of patients with hip osteoarthritis. *J Orthop Sci* **4** : 250-254, 1999
- Yamada H, Miyauchi S, Morita M *et al* : Content and sulfation pattern of keratan sulfate in hip osteoarthritis using high performance liquid chromatography. *J Rheumatol* **27** : 1721-1724, 2000
- 山田治基, 吉原愛雄, 宮崎匡輔 : 血液・尿化学検査 免疫学的検査 アグリカン, グリコサミノグリカン (GAG). 日本臨牀 **62**(増刊号 11) : 673-675, 2004
- Visco DM, Johnstone B, Hill MA *et al* : Immunohistochemical analysis of 3-B-3 (-) and 7-D-4 epitope expression in canine osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **36** : 1718-1725, 1993
- Matyas JR, Atley L, Ionescu M *et al* : Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **50** : 543-552, 2004
- Pratta MA, Su JL, Leesnitzer MA *et al* : Development and characterization of a highly specific and sensitive sandwich ELISA for detection of aggrecanase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage* **14** : 702-713, 2006
- Guerne PA, Desgeorges A, Jaspar JM *et al* : Effects of

- IL-6 and its soluble receptor on proteoglycan synthesis and NO release by human articular chondrocytes : comparison with IL-1. Modulation by dexamethasone. *Matrix Biol* **18** : 253-260, 1999
- 21) Lohmander LS, Ionescu M, Jugessur H *et al* : Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **42** : 534-544, 1999
- 22) Struglics A, Larsson S, Pratta MA *et al* : Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage* **14** : 101-113, 2006
- 23) Mansson B, Geborek P, Saxne T : Cartilage and bone macromolecules in knee joint synovial fluid in rheumatoid arthritis : relation to development of knee or hip joint destruction. *Ann Rheum Dis* **56** : 91-96, 1997
- 24) 吉原愛雄, 山田治基, 宮内聡ほか : 前十字靱帯損傷後の関節液中軟骨基質成分濃度の検討. *リウマチ* **36** : 734-740, 1996
- 25) Kobayashi K, Matsuzaka S, Yoshida Y *et al* : The effects of intraarticularly injected sodium hyaluronate on levels of intact aggrecan and nitric oxide in the joint fluid of patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12** : 536-542, 2004
- 26) Sugimoto H, Yamada H, Terada N *et al* : Intraarticular injection of high molecular weight hyaluronan for osteoarthritis of the knee-prediction of effectiveness with biological markers. *J Rheumatol* **33** : 2527, 2006

シンポジウム 「運動器の10年」変形性関節症の病態解明・診断・治療の新世紀

関節マーカーによる変形性関節症の病態評価とその臨床応用*

山田 治基 金 治 有 彦 伊 達 秀 樹

市 瀬 彦 聡 加 藤 慎 一 杉 本 春 夫†

諸 言

変形性関節症 (osteoarthritis, OA) をはじめとする関節疾患の病態評価には種々の手法がある。立位単純X線による関節裂隙測定はいまだに gold standard であるが, MRI (magnetic resonance imaging), 関節造影, 骨シンチなどの画像的手法のほかに, 関節鏡下での肉眼的評価や超音波など各種のプロープを併用した評価, 生検なども試みられている (図 1)。ただし, gold standard である X 線での関節裂隙測定は, 本症における裂隙狭小化が年間に 0.1-0.26 mm であることを考えるとときわめて鈍感な評価法と言わざるを得ない。病態評価だけでなく, 関節変性を抑制する真の抗 OA 薬が開発されている現在, OA 病態の客観的かつ再現性の高い評価法が望まれる。

また, わが国では人口動態の急速な高齢化によって OA の有病率が高いので, 医療経済上の重要性は大きい。OA の治療上, 最も医療コストのかかるのは関節の荒廃した症例に対する人工関節置換術であるので, このような末期に至る症例をいかに少なくするかが重要となってくる。たとえば OA では多数の患者のなかから早期に将来の関節破壊の進行を予知し, そのような症例には減量をはじめとする厳重な保存療法を行うとともに, 骨切り術などの関節温存手術を積極的にすすめるなどの集約的治療を行うことが必要となる。よって, 将来の OA 進行を予知することはきわめて重要な課題で

あるが, 画像のみによって, この予知を実現することは困難である。

以上の点を背景に, 近年, 関節液, 血液, 尿中などに存在する軟骨や滑膜などの関節構成体の代謝に関連する分子である関節マーカーによる OA の診断, 評価が行われている^{1), 2)}。本稿では数多い関節マーカーのうち, 軟骨基質に由来するマーカーについて概説し, その臨床応用について述べる。

関節マーカーの候補

OA は性, 加齢, 肥満, 遺伝などを要因とし, 種々の機械的ストレスが軟骨細胞に加わることによって発症する多因子疾患である。軟骨細胞を中心とした代謝異常は interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカイン発現を亢進させ, matrix metalloproteinase (MMP) やアグリカナーゼなどのプロテアーゼ, 活性酸素種の産生が高まる。OA 軟骨細胞にはアポトーシスが起きていることも明らかとされている。これらの OA プロセスに関与し, かつ体液中で測定可能な分子はすべて関節マーカーの候補となりうる (図 2)。OA の最終過程は軟骨マトリックスの変性, 破壊であり, 衝撃吸収など関節軟骨機能の維持上も軟骨マトリックスが重要な役割を果たしていることを考えると, 硝子軟骨に特異的に存在する基質である II 型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨マトリックスが分解されて放出される各種のフラグメントは有望な関節マーカーと言える。

1) アグリカンに由来するマーカー

硝子軟骨に存在するアグリカンから異化の過程で派生する各種のフラグメントは軟骨破壊マーカーの代表とされているが, 合成の影響も少なからず受けるので, 厳密には代謝回転のマーカーと呼ぶべきである (図 3)。

Key words: Osteoarthritis, Joint markers, Cartilage matrix

*Evaluation of Osteoarthritis Using Joint Markers and Its Clinical Application

†藤田保健衛生大学整形外科. Harumoto Yamada, Akihiko Kanaji, Hideki Date, Hirofusa Ichinose, Shinnichi Kato, Haruo Sugimoto: Department of Orthopaedic Surgery, Fujita Health University

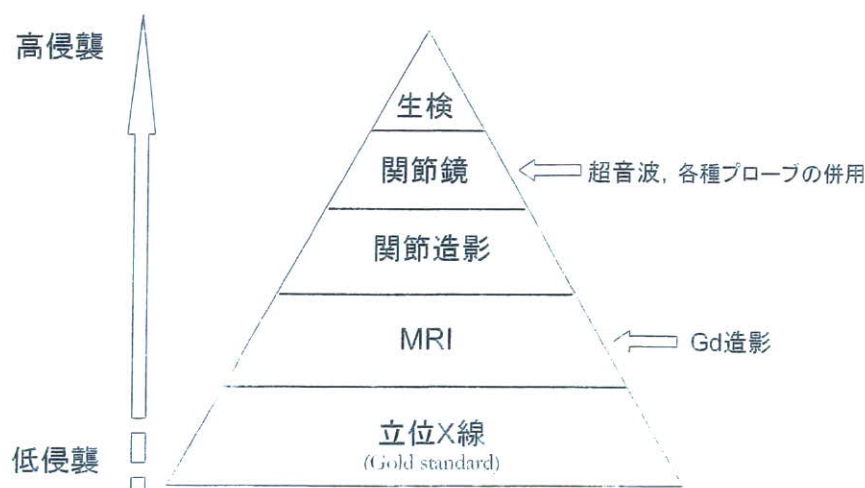


図1 OA病態の客観的な診断・評価法

軟骨破壊のマーカー

1) 破壊された軟骨マトリックスの断片(フラグメント)

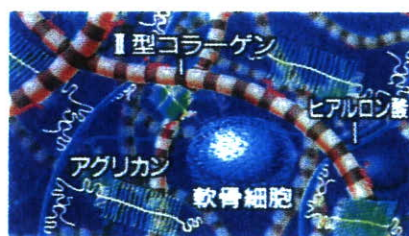
- ・アグリカン由来フラグメント
- ・II型コラーゲン由来フラグメント
- ・Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)

2) 破壊因子そのもの

- ・プロテアーゼ
- ・インヒビター
- ・サイトカイン
- ・成長因子

3) 滑膜由来分子

- ・ヒアルロン酸



軟骨修復のマーカー

1) 関節構成体の合成を反映する分子

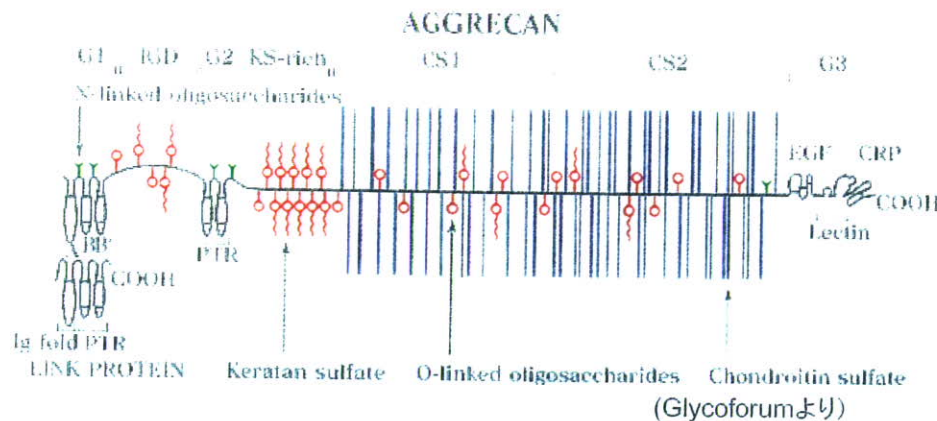
- ・II型コラーゲンの合成に関連する分子 (II型コラーゲン Cプロペプチド)

図2 関節マーカーの候補

アグリカンはコアタンパクにケラタン硫酸(keratan sulfate, KS)やコンドロイチン硫酸(chondroitin sulfate, CS)などの側鎖が結合したボトリブラス状を呈し、G1ドメインを介してヒアルロン酸に結合している。OAでは軟骨破壊の初期にはII型コラーゲンよりもアグリカンが先に分解、破壊されるのでアグリカンの分解は軟骨破壊の早期指標と言える。アグリカンがMMPやアグリカナーゼによってコアタンパクが切断された部位に生じる neoepitope (断片部分) を認識するモノクローナル抗体が開発されている。アグリカナーゼによる neoepitope はヒトOA軟骨組織中に早い病期から検出されており、MMPによる切断よりも病態との関連が高い³⁾。この neoepitope を関節液や血中で測定し、アグリカンの悪化マーカーとすることも有望視されているが、現在のところ、western blotting の手法で半定量的に測定するにとどまっている。

アグリカン分子には種々のグリコサミノグリカン(glycosaminoglycan, GAG)が側鎖として存在するが特にKSは、生体中では関節軟骨のほかには角膜に少量存在するのみであり、軟骨特異性が極めて高い。5D4などのKSを特異的に認識するモノクローナル抗体が開発されており、これらの抗体を使用したELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) により、膝OA患者の関節液中におけるKS濃度の低下が報告され

アグリカンの構造と由来するマーカー



関節軟骨アグリカンの特徴

- Keratan sulfate を有する
- ヒアルロン酸に結合する

アグリカン

に由来するマーカー

- Core-protein
- Neo-epitope from IGD (G1-G2)
- Keratan sulfate (KS) —軟骨特異的
- Chondroitin sulfate (C6S, C4S)
- HA-binding protein

図3 アグリカンの構造と由来するマーカー。アグリカンはG1-G2間で、MMPやアグリカナーゼなどのタンパク分解酵素によって特異的に切断される。アグリカンを構成する側鎖にはKSやCSがある。アグリカンに由来する種々の分子がマーカーとして測定されているがKSは最も軟骨特異性が高いものの一つである。

ているが、OA患者関節液中のKS濃度は高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) を使用して測定する手法も実用化されている⁶⁾。HPLCは、ほとんどすべてのKS分子を硫酸化の程度に分別して測定でき、生体中の夾雑物の影響を受けにくいなどの利点がある。股関節OA患者の関節液中KSを本法により測定した結果、硫酸化の少ないKSは病期の進行に伴い濃度が低下する(図4)。これは病期進行に伴う残存軟骨量の減少および軟骨の代謝活性の低下を反映している。

2) II型コラーゲンに由来するマーカー

II型コラーゲン分子はMMP-1, -8, -13などのタンパク分解酵素によってヘリックス中の3/4, 1/4の部分で特異的に切断される。この過程で生じるエピトープをモノクローナル抗体によって定量する手法が開発されており、OA患者における尿中濃度の上昇が報告されている。コラーゲン分解産物は生体内でさらに低分子化されていくが、この過程で生じるコラーゲン分子のC末端に存在するII型コラーゲン架橋テロペプチド (crosslinked telopeptide of type II collagen, CTX-II) を尿

中で測定する手法が実用化されている。骨吸収マーカーとして、すでにI型コラーゲン架橋テロペプチド (CTX-I) の有用性が確立されているが、CTX-IIも軟骨のコラーゲン代謝を反映するマーカーとして有望である。股関節OAでは関節裂隙の狭小化進行が早い症例(1年間に1mm以上の狭小化進行)で尿中のCTX-IIレベルが高く、OA進行の予知マーカーとしても有用なことが報告されている⁶⁾。

3) COMP, 軟骨中のマイナープロテイン

軟骨中にはアグリカンやII型コラーゲンのほかに機能がよく判明していないマイナープロテインが多数存在する。Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) はトロンボスポンジン-5 (thrombospondin-5, TSP-5) に分類される細胞外基質糖タンパク質であり、軟骨以外にも靱帯、腱、滑膜などでの存在が確認されている。COMP遺伝子の異常により偽性軟骨形成不全症が発症することは有名である。関節軟骨におけるCOMPの生物学的機能ははっきりとしていないが、II型コラーゲン線維に緩く結合することによって線維の安定化に寄与していると推測されている。COMPは特

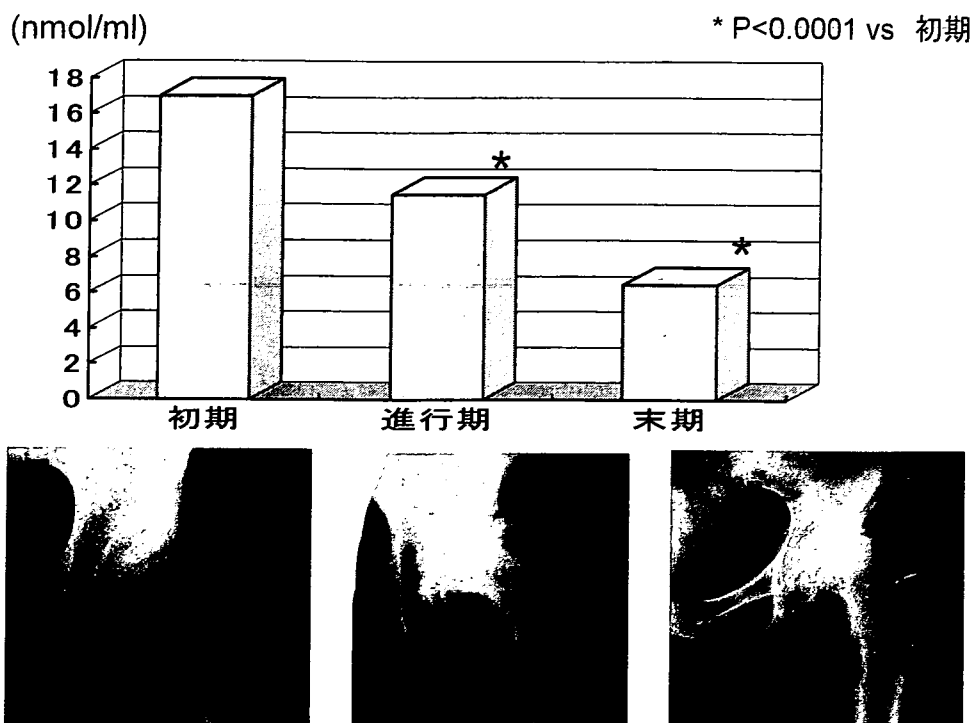


図4 股OA関節液中におけるケラタン硫酸(KS)濃度. 変形性股関節症の関節液中 KSを高速液体クロマトグラフィーにより測定した. X線上の病期の進行に伴い, KS濃度は低下する(文献5より改変, 引用).

異抗体を使用したELISA法が数種類, 市販されている. OA関節液中においてはCOMPは全体的に高値を示してくるが, 早期OAで最も高く, 病期が進行するに従い低下していく⁷⁾. われわれの膝OAを対象とした検討でも, 血清COMPはKellgren & Lawrence分類でgrade 3の病期で一番高く, grade 4になるとかえって低下していた(図5)⁸⁾. これは末期における残存軟骨量および代謝活性の低下を反映していると考えられる. またCOMPは軟骨中では, 完全体で存在する以外に, 分解された断片での存在が確認されている. OAなどの慢性関節破壊疾患においては, 断片の比率が多く, この低分子化の機序にはMMP-13などの関与が考えられており, COMPは軟骨破壊マーカーの1つとされている. 股OAでは血清COMPレベルが初診時に高いものほど, 年間の関節裂隙狭小化が大きいことが報告されており, 血清COMPはOAの関節破壊進行予知に有用とされている⁹⁾.

ただし, COMPは滑膜や靱帯にも存在し, 関節軟骨に特異的に存在するマトリックスではないため, その測定意義には疑問も残る. 変形性股関節症と大腿骨頭壊死症では共に軟骨破壊が起こるが, その機序は異なる. すなわち大腿骨頭壊死では骨壊死による骨頭圧壊

により急激に軟骨破壊が生じる. 両疾患の関節液中KSとCOMPを比較した結果, 両マーカー濃度は有意の正の相関を示していた(図6)¹⁰⁾. この結果は機械的な軟骨破壊である大腿骨頭壊死でも緩徐な破壊を特徴とする変形性股関節症でも, 関節液中のCOMPは軟骨の機能上, 重要なマトリックスであるKSと相関しており, 破壊の機序にかかわらずCOMPは軟骨破壊の指標となりうることを示唆している.

4) 関節マーカーの臨床的応用

関節マーカーの臨床応用の1つに, 治療に対するresponderの事前判定がある. OAはきわめて有病率の高い疾患であるので, ある治療を開始する前にその有効性を予測できれば不必要な医療を行わずに済み, 医療経済上も有用である. 関節マーカーの臨床応用としてOAに対する治療効果判定がある. グルコサミンにOA進行抑制効果があるか否かについては議論の多いところであるが, Christgauらは膝OA患者212名にグルコサミンを3年間, 経口投与した研究でエントリー時の尿中CTX-IIが正常値+1SD以上を示す, いわゆる高代謝回転群では, グルコサミンによる関節裂隙狭小化の抑制効果が高いことを報告している. すなわち破壊

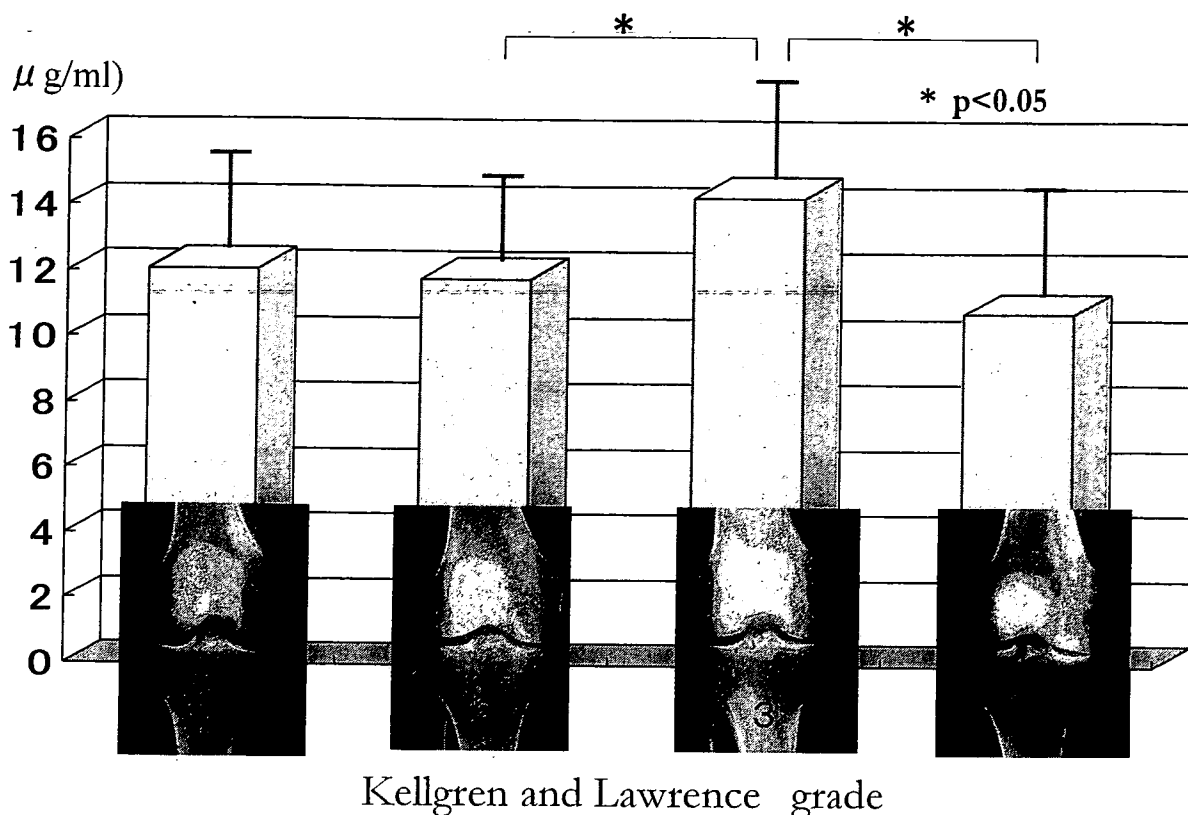


図5 膝 OA の病期と血清 COMP 濃度. 膝 OA 患者の血清 COMP を ELISA 法で測定した. 血清 COMP は Kellgren & Lawrence の grade 3 で有意に高値を示していた.

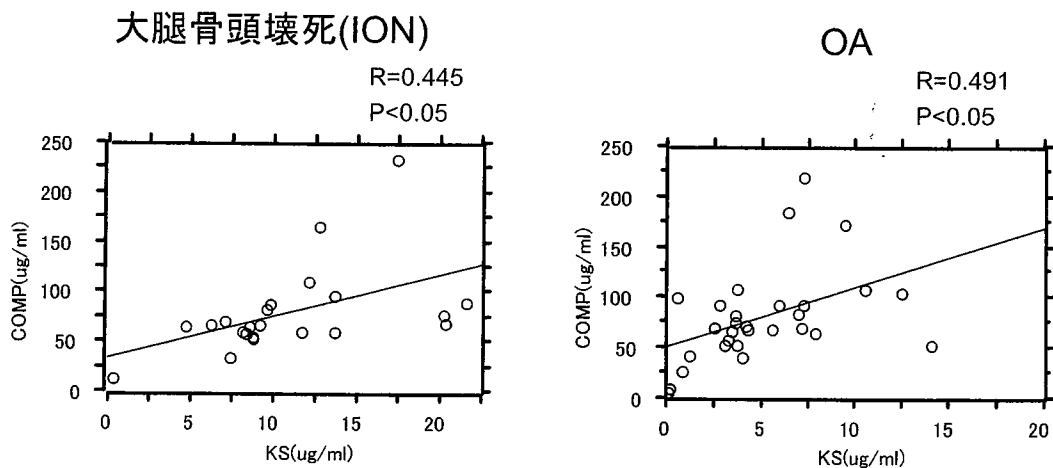


図6 大腿骨頭壊死症と変形性股関節症における関節液中 COMP と KS の関係. 両疾患ともに関節液中の COMP と KS の濃度は有意の正の相関を示し, 軟骨破壊の機序にかかわらず, COMP は軟骨の機能維持上, 重要な KS と連動していることが示された(文献 10 から引用).

も合成も高度な軟骨の代謝回転が高度な症例に対して, グルコサミンは有効であり, CTX-II は抗 OA 効果の予知に有用であるとしている¹¹⁾.

ヒアルロン酸(hyaluronic acid, HA)の注入療法は膝 OA に対する代表的な保存療法である. HA の注入療法開始前の関節液中アグリカンを測定した結果, アグリ

カン濃度と注入後 4 週後の膝 JOA スコア改善度との間には有意の正の相関が認められ, アグリカン濃度が高い症例ほど JOA スコア改善が良好であった(図 7)¹²⁾. 関節液中のアグリカンレベルは残存軟骨量とその代謝活性に依存しているので, 本結果は HA 注入療法が有効であるためにはアグリカン代謝が維持されていること,