

extracellular matrix. Thus, the mechanism for healing and self-repair, including cell mobilization and infiltration, is unlikely to occur, even when articular cartilage is impaired or degenerated. To repair articular cartilage injuries, various treatment methods have been attempted, such as a drilling method (Mitchell et al. 1976), which is a bone marrow stimulation method, a microfracture method (Stedman et al. 2001), periosteal/perichondrial transplantation (O'Driscoll et al. 1986), and mosaic plasty (Matsusue et al. 1993), but no method has been established. Regenerative medicine for cartilage tissue repair utilizing cell culture techniques has recently been investigated worldwide: transplantation of cultured autologous chondrocytes (Brittberg et al. 1994; Wakitani et al. 1994; Ochi et al. 2002), and chondrocytes differentiated from tissues other than cartilage, such as bone marrow, synovial cells, and adipocytes; however, problems remain to be resolved: it requires two separate surgeries for cell sampling and transplantation, and long-term maintenance of the characteristics of differentiated chondrocytes is difficult. For these reasons, repair with complete hyaline cartilage has not yet been confirmed (Benya et al. 1982; Sohn et al. 2002).

As a basic study on regenerative medicine of cartilage tissue aiming at future clinical applications, we focused on tissue stem cells (mesenchymal stem cells) present in adipose tissue as cell supply sources other than chondrocytes because they have high proliferative ability and the potential to differentiate into various cell types, such as adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, myofibroblasts, and nerve cells (Caplan 1991; Pittenger et al. 1999; Yamamoto et al. 2007). In this study, we isolated adipose-derived stromal vascular fraction culture cells (ADSVFs) using mesenchymal stem cell markers, and investigated the differentiation of highly pure adipose-derived stem cells (ASCs) with no contaminating vascular endothelial cells or fibroblasts into chondrocytes (Halvorsen et al. 2001; Kino-oka et al. 2005; Xu et al. 2007).

MATERIAL AND METHODS

Cell isolation and culture of adipose tissue

Cells were isolated from lymph node-excised ingui-

nal subcutaneous adipose tissue of ICR mice (4 weeks of age, male, 18–20 g). Briefly, after collagenase treatment, hemolysis, and filtration of adipose tissue, the sample was washed with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma, St. Louis, MO) by centrifugation. The cell pellet was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12, Sigma) containing 10% fetal bovine serum (FBS, JRH Biosciences, Adelaide, Australia), 2 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF, Sigma), and 1% penicillin-streptomycin (Sigma) at 37°C in 5% CO₂. After culture for 24 hours, cells adhered to the culture dish were further cultured as ADSVFs for 6 days. All procedures were approved by the Education and Research Center for Animal Models of Human Diseases of Fujita Health University.

Immunohistological staining of adipose tissue

ICR mouse subcutaneous adipose tissue, including inguinal skin tissue, was excised and rapidly fixed with a rapid tissue fixative (Super Fix KY-500; KURABO, Osaka Japan), which rapidly fixes even adipose and eyeball tissues, and paraffin-embedded sections were prepared using the standard method (Yamamoto et al. 2008). Sections were reacted with the following primary antibodies of mesenchymal stem cell markers: rat monoclonal CD90 and CD105 (Thy-1 and Endoglin, respectively; eBioscience, Inc., San Diego, CA) antibodies and rabbit polyclonal p75 neurotrophin receptor (p75NTR, CD271; Chemicon International, Inc., Temecula, CA) antibody. After washing with PBS, the sections were reacted with Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) as the secondary antibody. DAPI (Vectashield H-1200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used for nuclear staining. The sections were then observed under a microscope (Power BX-51; Olympus, Tokyo, Japan).

Flow cytometric analysis

Cells immediately isolated from adipose tissue or after 7 days culture (ADSVFs) were subjected to cell surface marker analysis using a cell analyzer (fluorescence-activated cell sorting: FACS, FACScan, BD Biosciences San Jose, CA). The cells were reacted with primary antibodies of CD11b (Integrin- α M), CD29 (Integrin- β 1, Chemicon), CD31 (PECAM-1), CD34, CD45 (leukocyte common antigen), CD90, CD105, CD106 (VCAM, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), CD117 (c-Kit), CD133 (Prominin-1) (all were purchased from eBioscience, excluding CD29,

CD106), p75NTR (CD271, Chemicon), and Sca-1 (Stem cell antigen-1 /Ly6, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN). After reacting with antibodies at 4°C for 30 minutes, the cells were washed with PBS, followed by a reaction with the secondary antibody, Alexa Fluor® 488, at 4°C for 30 minutes. After washing with PBS, the cells were analyzed by FACS. These experiments were repeated 3 times.

Cell density in differentiation culture

The initial cell density for differentiation into chondrocytes in culture was investigated. After ADSVFs were cultured for 7 days, cell density was adjusted to 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , and 10×10^5 cells/ml. Differentiation into chondrocytes was induced by cell centrifugation and pellet culture (pellet method) in chondrocyte differentiation medium (CA411D250, TOYOBO, Osaka, Japan) for 20 days, and the influence of cell density on differentiation was investigated.

Magnetic cell separation

ADSVFs were labeled with rat anti-CD105 monoclonal antibody, and reacted with microbead-labeled anti-rat IgG antibody (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). The cells were then separated into CD105-positive or -negative cells by a magnetic-activated cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec GmbH) method using a magnetic column.

Cell differentiation into chondrocytes

CD105-positive and -negative cells separated by MACS were adjusted to the cell density of 5×10^5 cells/ml, and subjected to pre-differentiation culture in DMEM/F12 medium containing 10% FBS and 2 ng/ml bFGF for 5 days. Cell density was then adjusted to 2×10^5 cells/ml, and the cells were cultured in the presence of 8% FBS and 2 ng/ml bFGF for 2 days, followed by medium change to chondrocyte differentiation medium (CA411D250), and the cells were cultured for 20 days. Control cells were cultured in DMEM/F12 medium containing FBS and bFGF for the same period.

In addition to the typical chondrocyte differentiation method, the pellet culture method, involving culture by seeding cells on atelocollagen gel (KOKEN, Tokyo Japan) (gel-coating method), in which chondrocytes proliferate while maintaining their characteristics, and embedding cells in a gel sheet (gel-embedding sheet method) were also performed as alternative culture conditions for differentiation, and total RNA was extract-

ed from cells cultured for 20 days (High Pure RNA Isolation Kit, Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Total RNA was subjected to quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) (PRISM-7900 HT, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) to measure the expressions of chondrocyte differentiation markers, the runt-related gene 2 (Runx2, Mm03003491_m1, ABI) and mature chondrocyte differentiation markers, aggrecan (Mm00545794_m1, ABI), and housekeeping gene-encoded glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH: Mm99999915_g1), for comparison. ADSVFs not separated based on CD105 were cultured in serum-supplemented medium without medium change to differentiation medium for the same period, and the mRNA expression level was regarded as the baseline.

Immunostaining of differentiation cells

After 20-day differentiation into chondrocytes, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C for 30 minutes. Frozen sections were prepared from cells cultured by the pellet and gel-coating methods using a cryostat (CM3050S Leica Microsystems, Nussloch, Germany), and stained. Cells cultured by the gel-embedded method were stained in the gel. After reacting with anti-aggrecan antibody (Abcam Limited, Cambridgeshire, UK) at 37°C for 1 hour, the preparations were washed 3 times with PBS, reacted with the secondary antibody of Alexa Fluor® 488 at 37°C for 1 hour, and washed 3 times with PBS followed by nuclear staining with DAPI (Vectashield H-1200).

Statistical Analysis

Data are presented as the means \pm s.d. The significance of differences between two groups was evaluated using ANOVA. The *p* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Immunostaining of subcutaneous adipose tissue

Mouse adipose tissue from the subcutaneous inguinal region was used. Many CD90 (Fig. 1A), CD105 (Fig. 1B), and p75NTR (Fig. 1C) -positive cells were found to be distributed around micro-blood vessels in the deeper layers of adipose tissue. Positive cells were comparatively small, within a narrow range.



Fig. 1. Immunohistological staining of mouse subcutaneous adipose tissue. Staining of CD90 (A), CD105 (B), p75NTR (C). Cells positive for each marker (arrowheads) were present around the micro-blood vessels (*) in deep adipose tissue. Bar = 50 μ m.

Characterization of ADSVFs

Since lymph nodes present in adipose tissue can be easily distinguished, they were dissected in advance. CD90-positive cells accounted for 49.3%, CD105-positive cells for 47.0%, and p75NTR-positive cells for 23.6% after immediately isolation from adipose tissue, but the rates increased to 93.8%, 68.5%, and 36.1% after 7-day culture (ADSVFs), respectively. In contrast, CD34, known as a hematopoietic stem cell and vascular endothelial precursor cell marker, CD45 as a hematopoietic cell marker, and CD31 as a vascular endothelial cell marker decreased (Table 1). We increased the positive cell rate of the mesenchymal stem cell marker by adding appropriate serum concentration and growth factor to the culture. From these results, we proved that positive cells of the mesenchymal stem cell marker could be increased even from a small cell count or little tissue.

Cell density at culture differentiation into chondrocyte

The influence of cell density on ADSVF differentiation into chondrocytes was evaluated from the chondrocyte marker of aggrecan by qRT-PCR. The aggrecan mRNA level was less than the detection limit when the initial cell density was 1×10^5 cells/ml, but it was detected when the differentiation density was 2×10^5 cells/ml or higher. This result proved that cell density was very important for differentiation into chondrocytes.

Separation of CD105-expressing cells

ADSVFs after 7-day culture were analyzed

TABLE 1 Flow cytometric analysis of ADSVF cells.

	Mean pnnitiae cell marker (\pm s.d.)	
	<i>in vivo</i> cells	primary culture cells
CD11	9.2 \pm 0.5	0.3 \pm 0.1
CD29	70.4 \pm 4.5	94.5 \pm 4.3
CD31	2.2 \pm 0.4	0.5 \pm 0.1
CD34	23.6 \pm 1.2	4.6 \pm 2.4
CD45	0.97 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2
CD90	49.3 \pm 0.3	93.8 \pm 3.3
CD105	47.0 \pm 1.5	68.5 \pm 2.9
CD106	7.2 \pm 2.3	0.9 \pm 0.7
CD117	1.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.3
CD133	2.0 \pm 0.3	0.4 \pm 0.2
p75NTR	23.6 \pm 6.8	36.1 \pm 5.9
Sca-1	5.8 \pm 1.7	94.7 \pm 0.5

with regard to a mesenchymal stem cell marker, CD105 (Fig. 2A). CD105-positive and -negative cells showed an apparent bimodal distribution (Fig. 2B), and could be separated by MACS using CD105 (Fig. 2C, D). This result proved that the intended or expected cells were separated using the MACS method the same as with a cell sorter. Comparing MACS with a cell sorter, all steps of the MACS method could be performed on a clean bench, and did not require expensive research equipment or extensive technology.

Compared with cell differentiation into chondrocytes

CD105-positive or -negative cells separated by MACS were subjected to 20-day differentiation under three culture conditions, in all of which, aggrecan and Runx2 mRNA expression

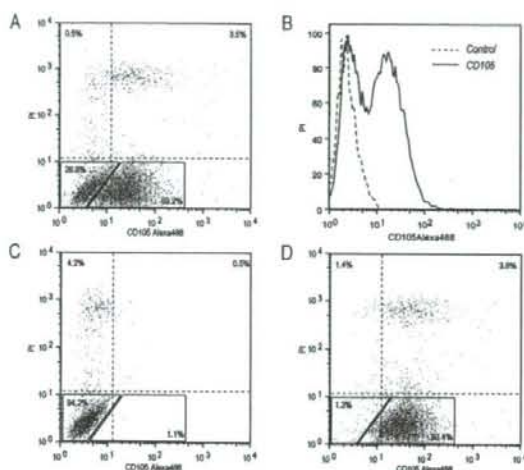


Fig. 2. Separation of ADSVFs by CD105. Cells were separated into CD105-positive or -negative cells by MACS. Before MACS separation of ADSVFs (A), histogram of the same sample (B), after MACS separation of CD105-negative cells (C) and CD105-positive cells (D) achieved over 90% purity.

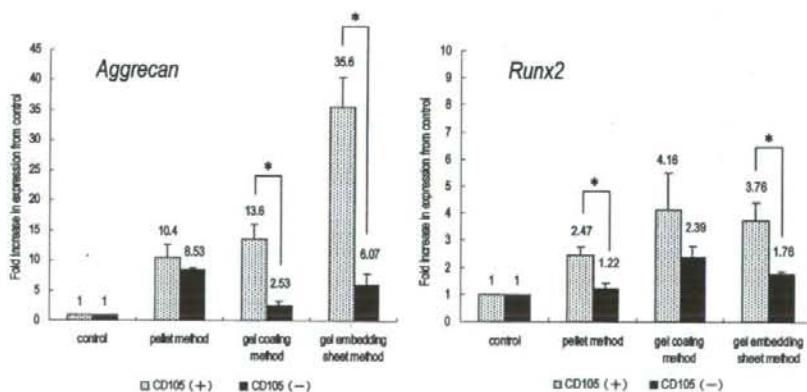


Fig. 3. Investigation of culture conditions using CD105-positive and -negative cells. The highest aggrecan mRNA expression level was detected in the gel-embedding method using CD105-positive cells, in comparison with the control. The Runx2 mRNA expression level showed the higher detection of differentiation cells from CD105-positive cells than CD105-negative cells (*: $p < 0.05$, ANOVA).

levels were higher the differentiation cells from CD105-positive cells than CD105-negative cells. Regarding the culture conditions, aggrecan mRNA of mature chondrocyte differentiation markers was significantly different between CD105-positive and -negative cells cultured by

the gel-embedding sheet method (ANOVA). Runx2 mRNA therefore showed higher detection of differentiation cells from CD105-positive cells than CD105-negative cells (ANOVA) (Fig. 3). We supposed that the gel-embedding sheet method could culture chondrocytes with high cell den-



Fig. 4. Immunostaining of aggrecan in differentiated cells.

The region of defective cells (arrowheads) was observed in cell aggregation as pellets by the pellet method (A). Cultured cells of the gel-coating method formed multiple layers, and a different expression of aggrecan was observed by region (B). The cultured cells of the gel-embedding method showed a spherical form (C). Bar = 100 μm .

sity from three dimensions, and increased the expression level of aggrecan mRNA. We therefore considered that the gel-embedding sheet method was the most suitable geometrically to regenerative cartilage tissue.

Aggrecan immunostaining of differentiation cells

When cells were differentiated from chondrocytes by pellet (Fig. 4A), gel-coating (Fig. 4B), and gel-embedding sheet (Fig. 4C) methods, aggrecan-positive cells were present in all cultures. The pellet method was used in a defective region, and the gel-coating method showed a different expression level of aggrecan by region. On the other hand, the cells of the gel-embedding sheet method were observed to be spherical, the same as *in vivo* cartilage tissue.

DISCUSSION

We consider that minimizing invasiveness and increasing the induction efficiency of a small number of cells into chondrocytes are most important in the regeneration of cartilage tissue. For this purpose, ADSVFs isolated and cultured from adipose tissue were sorted using mesenchymal stem cell markers to remove vascular endothelial cells and fibroblasts in ADSVFs (mesenchymal stem cell marker-negative cells). This unique procedure increased the efficiency of inducing differentiation into chondrocytes. To our knowledge, this is the first paper in which mesenchymal stem cell markers were utilized for cell sorting to increase the induction of differenti-

ation into highly pure chondrocytes.

The induction of chondrocyte differentiation from ADSVFs was investigated using various cell densities at culture initiation by the pellet method. The mRNA of a chondrocyte marker, aggrecan, was detected when the initial cell density was 2×10^5 cells/ml or higher, but the mRNA level was less than the detection limit when the initial density was 1×10^5 cells/ml or lower, showing that cell density at the initiation of induction was important for differentiation into chondrocytes, and 2×10^5 cells/ml or higher cell density was necessary for the differentiation of mouse ADSVFs into chondrocytes.

When CD105-positive cells were cultured by the gel-embedding sheet method, the aggrecan mRNA level in differentiated cells was higher than that in cells differentiated by the pellet culture method, suggesting that the isolation of cells from ADSVFs using a mesenchymal stem cell marker, CD105, increased the purity of adipose stem cells (ASCs), which realized the objective of this study: 'increasing differentiation into chondrocytes using a minimum number of cells'. Since CD105 expression was maintained after culture passages (Yoshimura et al. 2006), it is an attractive marker in this field.

In cultures by the pellet method, small tear drop-like aggregates are formed. Considering the low metabolic activity of cells in the center of aggregates and the difficulty of harvesting aggregates of the size of the cartilage defect in patients, clinical application of the pellet method may be difficult. In this point, the gel-embedding sheet

method has many advantages. The present data suggest that this culture method may be more useful for articular cartilage injury in the combination with a cell-supporting system.

There have been many discussions about the selection of donor tissue for regenerative medicine. The reasons for selecting adipose tissue in the present study aiming at clinical application are as follows: firstly, ASCs have very high proliferative ability, with potential to differentiate into mesenchymal cells, such as adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, and myofibroblasts (Zuk et al. 2001), similarly to bone marrow-derived mesenchymal stem cells: multipotent adult progenitor cells (MAPCs) (Jiang et al. 2002), and multipotency transcending the developmental framework, such as differentiation into nerve, vascular endothelial, and liver cells (Strem et al. 2005; Yamamoto et al. 2007). Another reason is that patients may easily accept the cell-sampling procedure for ASCs. Generally, adipose tissue accounts for about 20% of the body weight on average, and is considered merely as an energy store. Since patients can easily imagine adipose tissue sampling (adipocytes), compared to sampling bone marrow and synovial cells, and consider the tissue unnecessary, we expect that patients will readily understand and accept the cell-sampling procedure for regenerative medicine of cartilage tissue.

On the other hand, various problems still exist regarding the use of ASCs for the regeneration of cartilage tissue. The previous article reported that ASCs showed poorer osteogenic and chondrogenic potential than MAPCs (Im et al. 2005). It has also been reported that synovial tissue has greater potential to differentiate into chondrocytes than adipose tissue, suggesting a problem in selecting sampling regions (Sakaguchi et al. 2005; Wickham et al. 2003). Furthermore, possible carcinogenesis in ASCs in long-term culture (4-5 months) has been reported (Rubio et al. 2005) showing the necessity of reconfirming the safety of these cells.

However, as yet there has been no report in which mesenchymal stem cell markers were sorted, or the induction of differentiation into highly

pure chondrocytes was investigated. We are now performing comparative studies with MAPCs to verify these problems. The present data indicated that ADSVFs could be highly differentiated into chondrocytes through cell sorting using mesenchymal stem cell markers and have advantages in regenerative medicine for the treatment of cartilage defects or cartilage degenerative disease.

References

- Benay, P.D. & Shaffer, J.D. (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, **30**, 15-24.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O. & Peterson, L. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.*, **331**, 889-895.
- Caplan, A.I. (1991) Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, **9**, 641-650.
- Halvorsen, Y.D., Bond, A., Sen, A., Franklin, D.M., Lea-Currie, Y.R., Sujkowski, D., Ellis, P.N., Wilkinson, W.O. & Gimble, J.M. (2001) Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism*, **50**, 407-413.
- Im, G.I., Shin, Y.W. & Lee, K.B. (2005) Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and Cartilage*, **13**, 845-853.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A. & Verfaillie, C.M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, **418**, 41-49.
- Kino-Oka, M., Maeda, Y., Yamamoto, T., Sugawara, K. & Taya, M. (2005) A kinetic modeling of chondrocyte culture for manufacture of tissue-engineered cartilage. *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 197-207.
- Matsusue, Y., Yamamoto, T. & Hama, H. (1993) Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*, **9**, 318-321.
- Mitchell, N. & Shepard, N. (1976) The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J. Bone Joint Surg. Am.*, **58**, 230-233.
- Ochi, M., Uchio, Y., Kawasaki, K., Wakitani, S. & Iwasa, J. (2002) Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J. Bone Joint Sur. Br.*, **84**, 571-578.
- O'Driscoll, S.W. & Salter, R.B. (1986) The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **208**, 131-140.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. & Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*,

- 284, 143-147.
- Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martín, M.C., de la Fuente, R., Cigudosa, J.C., Lloyd, A.C. & Bernad, A. (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.*, **65**, 3035-3039.
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K. & Muneta, T. (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.*, **52**, 2521-2529.
- Sohn, D.H., Lottman, L.M., Lum, L.Y., Kim, S.G., Pedowitz, R.A., Coutts, R.D. & Sah, R.L. (2002) Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **394**, 254-262.
- Steadman, J.R., Rodkey, W.G. & Rodrigo, J.J. (2001) Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **391**, Suppl. 362-369.
- Strem, B.M., Hicok, K.C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R.E., Fraser, J.K. & Hedrick, M.H. (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.*, **54**, 132-141.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I. & Goldberg, V.M. (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.*, **76**, 579-592.
- Wickham, M.Q., Erickson, G.R., Gimble, J.M., Vail, T.P. & Guilak, F. (2003) Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **412**, 196-212.
- Xu, Y., Balooch, G., Chiou, M., Bekerman, E., Ritchie, R.O. & Longaker, M.T. (2007) Analysis of the material properties of early chondrogenic differentiated adipose-derived stromal cells (ASC) using an in vitro three-dimensional micromass culture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **359**, 311-316.
- Yamamoto, N., Akamatsu, H., Hasegawa, S., Yamada, T., Nakata, S., Ohkuma, M., Miyachi, E., Marunouchi, T. & Matsunaga, K. (2007) Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J. Dermatol. Sci.*, **48**, 43-52.
- Yamamoto, N., Majima, K. & Marunouchi, T. (2008) A study of the proliferating activity in lens epithelium and the identification of tissue-type stem cells. *Med. Mol. Morphol.*, **41**, 83-91.
- Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I. & Gonda, K. (2006) Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.*, **208**, 64-76.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. & Hedrick, M.H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, **7**, 211-228.

1

2008.Jan

月刊

〈巻頭〉

原薬等登録原簿（マスターファイル）の 登録申請の状況について

〈特集〉

成功する国際共同治験

〔連載〕

ER/ES 米国発 製薬企業 動き（第1回） 強化策（第1回）

変形性関節症 医療現場での 最新治療と新薬開発

Drug therapy for osteoarthritis

山田 治基 森田 充浩 金治 有彦 小崎 直人 伊達 秀樹 石村 大輔 前原 一之 早川 和恵

藤田保健衛生大学整形外科

1 はじめに

変形性関節症 (osteoarthritis, OA) は人口の高齢化が進む我が国における運動器の疾患のなかでは変形性脊椎症に次いで有病率の高い疾患である。厚生労働省の行った平成 16 年度介護票による国民生活基礎調査では要支援となる原因として本症は老衰に次いで 2 位 (17.5%) を占めている。本邦で臨床的に使用されている OA に対する薬剤は疼痛などの臨床症状を改善させる対症療法的な治療薬 (symptom modifying drug) である。厳密な評価法により軟骨構造そのものに変化をもたらす、OA の進行を遅らせる、いわゆる軟骨保護作用が確認された真の抗 OA 薬 (structure modifying drug) はまだ存在しない (表 1)。本稿では OA に対する最新の薬物治療について述べることを目的としているので、まだ臨床的評価の確定していない薬剤、物質、OA に対する保健適応のない薬剤についての記述がある点をお許しいただきたい。

表 1 抗 OA 薬の分類

1) structure modifying drug (disease modifying anti-OA drug) OA の進行そのものを遅らせる (開発途上にある)
2) symptom modifying drug 疼痛を主とした臨床症状を改善する <ul style="list-style-type: none"> ・ NSAIDs ・ 副腎皮質ステロイド薬 (関節内注入) ・ ヒアルロン酸 (関節内注入)

2 OA の病態

OA は関節軟骨に初発するとされる疾患であるが、その病態には二次性滑膜炎や骨・軟骨の修復反応が加わる。OA におこる最初の病変は軟骨表面の粗造化であり、生化学的には軟骨マトリックスの変性、すなわち低分子化である。OA 軟骨における病変を演出するのは軟骨に存在する唯一の細胞腫である軟骨細胞である。軟骨細胞からのアグリカンや II 型コラーゲンなどの軟骨マトリックスは病初期には合成および破壊ともに亢進して代謝回転が高くなるが、最終的には破壊が合成を上回る結果となり、衝撃吸収などの軟骨機能は低下し、臨床的な OA の発症へとつながる。軟骨マトリックスの変性、低分子化は軟骨細胞自らが産生する活性酸素種、プロテアーゼなどである。プロテアーゼのなかでも以前は matrix metalloproteinase (MMP) が重視されていたが、現在では aggrecanase (ADAM-TS) の役割が大きいことが明かにされている。これらのプロテアーゼの軟骨細胞による産生を調節しているのは、同じく軟骨細胞から産生される各種のサイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α など) や成長因子 (TGF- β , bFGF など) である。

OA の初発病変部位として軟骨下骨の役割を重視する説もある。軟骨マトリックス変性の結果、軟骨の衝撃吸収能が低下し軟骨下骨には過大なストレスが伝達される。その結果、軟骨下骨のリモデリングは亢進し、骨硬化も進行する。OA では軟骨下骨に骨髄のマイクロフラクチャーがおこるが、その治癒過程により骨硬化はさら

に進行する。これらの骨硬化が表層に位置する関節軟骨の力学的脆弱性を高める。一方、OAを自然発症する動物モデルでは、軟骨変性より骨硬化などの軟骨下骨の変化が先に、かつ高度に認められる。

2.1 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs)

・NSAIDsはプロスタグランジン (PG) の合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX) を阻害することによって抗炎症作用を発揮する。COXには2種類のアイソザイムがあるが、炎症場で発現の高いCOX-2に対する選択性の強いNSAIDsが注目されている。COX-2に選択性の強いNSAIDsとして我が国ではエトドラク、メロキシカムなどが使用されてきたが、最近ではセレコキシブが上梓された。本邦における膝OAを含めた第III相試験の結果でも、重篤な消化管出血に関してはセレコキシブのほうが非選択型NSAIDsより少ないことが報告されている¹⁾。ただし、これらのコキシブ系NSAIDsは心筋梗塞を含む心血管系の副作用が高まる可能性が示唆されており、心疾患のある患者さんへの投与には注意を要する²⁾。ただし、NIHの報告では心血管系の副作用はCOX-2選択型NSAIDsだけでなく従来型NSAIDsにも起こりうるとされており、十分に留意すべきである。

・OA患者へのNSAIDs投与で注意すべき点

高齢者に多いOAでのNSAIDs使用上のポイントは、1) 半減期の短いものを使用する、2) 長期投与を避ける、3) 常用量の半量など少量から投与する、などである。高齢者では肝臓における代謝が遅延し、かつ腎機能障害が潜在するため薬物代謝動態が健常人とは異なり、NSAIDsの半減期は延長する。よって、半減期の短いNSAIDsを選択すべきである。徐放型NSAIDsは高齢者のOA症例での使用には注意を要する。ほとんどのNSAIDsは腎機能を抑制する作用を有する。腎機能についてはCOX-1だけでなくCOX-2も腎血流維持に大きな影響を及ぼしており、COX-2選択的阻害薬が腎機能上、安全というわけではない。明らかに腎機能の低下している症例では、腎血流量への負担の少ないスリダクを選択する。消化管障害の予防が必要な症例では、プロドラッグ製剤およ

びCOX-2選択性の高いNSAIDsなどが有用である。

2.2 副腎皮質ステロイド薬 (関節内注入)

・OAは非炎症性の疾患であるが、軽度の二次性滑膜炎をおこしている。滑膜炎は関節水腫をおこし、疼痛、可動域制限などのOAの臨床症状が増悪する。滑膜炎が高度な病期のOAには副腎皮質ステロイド薬の関節内注入が効果的である。ステロイドは、好中球・単球の遊走阻止、炎症細胞からのサイトカイン産生阻害、炎症性プロスタグランジンの生合成の阻害などの強力な抗炎症作用を有する。注入されたステロイドは主として滑膜組織に作用し急速な臨床症状の改善が期待できる。アメリカリウマチ学会 (ARA) のOA治療ガイドラインでは副腎皮質ステロイド薬の関節内注入は関節液貯留や局所炎症が存在する症例、NSAIDsや選択的COX-2阻害薬が使用できない症例に有用であるが、数ヶ月に一回にとどめるべきとされている。副腎皮質ステロイド薬の関節内注入によるOA治療効果に関するメタ解析では注入後、早期に有意な症状改善が消失することが明らかとなっている (表2)^{3,4)}。ただし本剤による臨床症状の改善はあくまで対症療法的であることを念頭におくべきである。

表2 OAに対する副腎皮質ステロイド薬の関節内注入療法に関する報告 (メタ解析)

報告者	検討した試験数	結果
Godwin M ³⁾	RCT 5 試験	注入後1週で疼痛およびVASは有意に改善するが、3~4週でVASの改善は消失する。6~8週では改善は全く消失する。
Bellamy N ⁴⁾	RCT 28 試験	Weighted mean differencesで評価。注入後2~3週での改善効果は疼痛については明かだが機能についてはなし。注入後4~24週での改善効果は疼痛、機能ともになし。

2.3 ヒアルロン酸

・ヒアルロン酸 (hyaluronan, 以下HA) は直鎖状の多糖類であり、関節液の主成分である。HAは軟骨間の低摩擦性などの関節機能維持に関与している。正常人の

関節液中 HA の分子量は約 400 ~ 500 万 Da であるが、OA などの関節疾患では、分子量が低分子化するとともに、その濃度も低下している。新規の質のよい HA を関節腔内に補充する治療法 (visco-supplementation) は我が国でも 20 年以上前より行われている。物理的な軟骨間の潤滑作用のほかに、HA は軟骨や滑膜に対して種々の作用を有することが *In vitro* の研究で明らかとなっている。たとえば HA は軟骨細胞からの II 型コラーゲンやアグリカンなどのマトリックス産生を促進し、マトリックス破壊に働く MMP などのプロテアーゼ、活性酸素種や NO などのガスメディエーター、炎症性サイトカインなどの産生抑制作用、軟骨細胞のアポトーシス抑制などを通じて軟骨保護的に作用する⁹⁾。

HA の関節内注入療法に対する臨床成績は報告によって大きくことなるが、これは対象とする OA の病期、使用する HA 製剤の分子量、注入頻度、コントロールの有無、評価法などの違いが原因である。膝 OA に対する HA の臨床効果については、最近、複数のメタ解析の結果が報告されている (表 3)。それらのメタ解析によれば HA 注入療法は OA の疼痛、機能、患者による総体的評価における改善がプラセボに対して有意に優れている

表 3 OA に対するヒアルロン酸関節内注入療法の臨床効果についての報告 (メタ解析)

報告者	検討した試験数	結果
Wang CT ⁶⁾	RCT 20 試験	運動時疼痛、安静時疼痛、機能で評価した結果、HA 注入は副作用も少なく、臨床症状改善効果が明らかであった。ただし、試験間のバラツキが大きい。
Arrich J ⁷⁾	RCT 22 試験	歩行時疼痛 VAS は 2 ~ 6 週で -3.8mm, 10 ~ 14 週で -4.3mm, 22 ~ 30 週で -7.1mm で有意の改善に達していない。
Lo GH ⁸⁾	RCT 23 試験	effect size で検討。分子量 600 万の HA 製剤の 2 試験で大きな効果があったが、同様の製剤を使用した 1 試験では全く効果なく、試験間のバラツキが大きい。これらの 3 試験を除くと effect size は 0.19 で効果は小さい。
Bellamy N ⁹⁾	RCT 63 試験	Weighted mean differences で評価。注入後 5-13 週での改善効果は疼痛がベースラインから 11.54%, 機能が 9.15% と明らかである。副作用は少ない。

ことが明かであるが、効果のばらつきも大きいとの指摘もある^{6,9)}。臨床効果の強さについては週に 1 回、3 回の注入を行うと 3 ないし 6 ヶ月での評価で副腎皮質ステロイド薬とほぼ同等の効果があるとされており、短期的な効果よりも長期的な臨床効果が期待できる。

・HA は OA の進行を遅らせる効果があるか

HA に OA の進行を遅らせる、真の抗 OA 効果 (structure modifying effect) があるか否かについては種々の議論がある。Listrat らによる関節鏡を併用した評価、Frizzero らの軟骨生検による評価などでは HA に軟骨変性の進行を抑制する効果を認めたとしているが、いずれも症例数の少ないパイロットデータの域を脱しない^{10,11)}。Jubb らは 319 例の RCT 研究で Hyalgan (分子量 500 ~ 730 万) を週 1 回で 3 回、3 セット注入し、1 年間の関節隙狭窄小化をイメージデジタルアナライザーで計測した結果、HA 注入群で狭窄小化進行防止効果があったとしている¹²⁾。

2.4 ビスフォスフォネート製剤

・骨粗鬆症に対する薬剤であり OA に対する保健適応はないが、海外では OA に対する臨床治験が行われている。前述したように OA においては関節軟骨だけでなく、軟骨下骨がその発症および進行に関与している。たとえば、OA では軟骨下骨の代謝亢進、骨密度と骨強度の低下、骨稜の減少が存在する。ビスフォスフォネート製剤は破骨細胞に親和性が高く、軟骨細胞に直接、作用する可能性は少ないが、OA における軟骨下骨の脆弱性を改善し、2 次的に進行を抑制する作用は期待できる。ラットの前十字靭帯切離による OA モデルではアレンドロネート投与により軟骨変性、破壊が有意に抑制されることも示されている¹³⁾。

英国で行われたリセドロネートの膝 OA に対する治験 (British study of risedronate in structure and symptoms of knee OA, BRISK, 総 284 症例) では、15mg のリセドロネート投与群で WOMAC インデックスでは患者による総体的評価、杖の使用などでプラセボ群との間に有意差が認められ、臨床症状の改善効果が確認された。15mg のリセドロネート投与群では II 型コラーゲンの分

解マーカーである CTX-II の減少が認められた。ただし、関節裂隙狭小化に対する抑制効果は傾向 ($P = 0.067$) にとどまっていた¹⁴⁾。プラセボ群との間に有意性の出なかった背景には 1 年間の観察で裂隙狭小化の進行が検知できたものがプラセボ群でも 8% にすぎなかったことが影響している。一方、北米と欧州の 2 カ所で同時に行われた研究 (Knee OA Structural Arthritis, KOSTAR, 総 2483 名) では、2 年間にわたる観察でリセドネートは疼痛などの臨床症状改善効果、関節裂隙狭小化に対する抑制効果ともに認められなかった。BRISK 研究と異なり、疼痛に対する効果が認められなかったのはプラセボ群でも疼痛が大きく改善してしまったため、OA 治療の困難性を示している¹⁵⁾。

2.5 グルコサミン

グルコサミンは厚生労働省の定める栄養補助食品などとは異なり健康食品に属し薬品ではない。グルコサミンは約 30 年前より欧州を中心に OA に対して使用されており、ヨーロッパリウマチ学会 (EURLA) のガイドラインでは推奨度 A とされている。グルコサミンは経口投与された後は数% が関節軟骨に到達することが明かされている。*In vitro* では軟骨細胞のマトリックス産生を促進し、軟骨および滑膜細胞の MMP、NO などの破壊メディエーターを抑制する薬理作用を有することも報告されている。グルコサミンについては、OA の臨床症状を改善する symptom modifying drug の作用があるか否かについては幾多の議論がある。最近、NIH がスポンサーとなって大規模な研究が行われた。有痛性の膝 OA 患者 (1583 名) を 24 週観察した結果、グルコサミン (1500mg)、コンドロイチン硫酸 (1200mg)、その両者の併用の 3 群ともに疼痛の改善効果は有意でないと報告された¹⁶⁾。グルコサミンの structure modifying drug としての効果を明示した論文はまだ少ない。2001 年に Reginster らが Lancet に発表した、一次性膝 OA の 212 名に対する RCT が有名である¹⁷⁾。彼らは関節裂隙はプラセボ群で 0.31mm 狭小化したのに対して、グルコサミン硫酸 1500mg を毎日、3 年間服用した群では 0.07mm 増加していたと報告し、軟骨保護効果が認められたとしている。

2.6 プロテアーゼ・インヒビター

OA の軟骨マトリックス破壊には複数の key molecule が存在し、これをターゲットとした薬剤が考案されてきた。最も注目されてきたのは、軟骨の特性を維持している軟骨型プロテオグリカン (アグリカン) や II 型コラーゲンなどのマトリックスの分解、低分子化作用を有するプロテアーゼである。アグリカンの破壊は当初、活性発現に 2 価の金属イオンを必要とするマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) のうち、MMP-3 が主役と考えられていたが、最近の研究では ADAM-TS という別のプロテアーゼ種に属する、いわゆるアグリカナゼの方が大きな作用を有していることが知られている。II 型コラーゲンの破壊は以前はもっぱら古典的なコラーゲナーゼである MMP-1 によるとされていたが、最近の研究で OA では MMP-13 (コラーゲナーゼ 3) の作用が主体とされている。以上のプロテアーゼは軟骨細胞自身から産生されて、軟骨に作用している。これらの MMP をはじめとするプロテアーゼに対する低分子量の合成インヒビターが競って製薬会社で開発されてきた。MMP インヒビターは関節疾患のほかに、MMP が癌の浸潤や転移に大きな役割を果たしているとの研究結果から、抗腫瘍薬としての治療も並行して行われてきた。しかしながら、現在までに開発された MMP インヒビターについては、ヒトに対する短期的な投与でも主として骨・関節痛 (関節周囲組織の線維化) を誘発するなどの副作用の問題点が多く出現し、軟骨破壊の抑制を目指した長期投与治療まで進展していない。

2.7 抗サイトカイン療法剤

前述した軟骨細胞からのプロテアーゼ産生は、同じく軟骨細胞から産生されるインターロイキン-1 (IL-1) などの炎症性サイトカインによって促進される。よって、抗サイトカイン療法も OA 治療の戦略の一つである。Diacerein は *In vitro* において軟骨細胞からの IL-1 産生を抑制することによって MMP-1、-3 の産生を低下させる薬剤であり、イヌ ACL 切離による OA モデルにおいても軟骨破壊を抑制することが報告されている。

Diacerein は欧州では、以前より関節痛を軽減させる symptom modifying drug として臨床的に使用されてきたが、総計 507 名の股 OA 患者に対する 3 年間にわたる投与の結果、X 線上の関節裂隙狭小化進行を有意に抑制し得たと報告されている¹⁸⁾。臨床的に使用されている薬剤のなかで、structure modifying drug としての可能性をもつ数少ない候補の一つである。なお、抗 TNF- α モノクローナル抗体を OA モデルに使用すると軟骨破壊が有意に抑制されるという報告があるが、有病率の高く生命予後の良好な OA に抗 TNF- α モノクローナル抗体などのクリティカルな合併症を有する薬剤を使用することには様々な議論がある。

3 おわりに

OA は高齢者における運動器の most common disease であるが、薬物療法に効果的なものが少ない。その進行を遅らせる真の抗 OA 薬である structure modifying drug と言えるものは厳密にはまだない。骨粗鬆症の領域ではビスフォスフォネート製剤という薬剤の開発によって、その研究が飛躍的に発展した。OA においても break through となる薬剤の開発が待たれる。

参考文献

- 1) 宗園聡: COX-2 選択的阻害薬セレコキシブの登場とその臨床意義. *Progress in Medicine* 27 : 1655-1664, 2007
- 2) Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. : Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* ; 286 : 954-9, 2001
- 3) Godwin M, Dawes M. : Intra-articular steroid injections for painful knees: systematic review with meta-analysis. *Can Fam Physician*, 50 : 213-215, 2004
- 4) Bellamy N, Campbell J, Robinson V, et al. : Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane database of systematic reviews* (2): CD005328, 2006
- 5) 山田治基, 杉本春夫, 金治有彦: ヒアルロン酸製剤の関節内注入療法の効果について. *リウマチ科* 34 : 317-326, 2005
- 6) Wang CT, Lin J, Chang CJ, et al. : Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg* 86-A : 538-545, 2004
- 7) Arrich J, Piribauer F, Mad P, et al. : Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee : systematic review and meta-analysis. *CMAJ*, 172 : 1039-1043, 2005
- 8) Lo GH, LaValley M, McAlindon T, et al. : Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis. *JAMA*, 290 : 3115-3121, 2003
- 9) Bellamy N, Campbell J, Robinson V, et al. : Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane database of systematic reviews* (2) : CD005321, 2005
- 10) Llistrat V, Ayrat A, Patarnello F, et al. : Arthroscopic evaluation of potential structure modifying activity of hyaluronan in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 5 : 153-160, 1997
- 11) Frizziero L, Govoni E, Bacchini PL. Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee : clinical and morphological study. *Clin Exp Rheumatol*, 16 : 441-449, 1998
- 12) Jubb RW, Piva S, Beinat L, et al. : A one-year, randomized, placebo (saline)-controlled clinical trial of the structure modifying effect of 500-730 kDa sodium hyaluronate (Hyalgan) in osteoarthritis of the knee. *Int J Clin Pract* , 57 : 467-474, 2003
- 13) Hayami T, Pickarski M, Wesoooski GA, et al. : The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis. Reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the art anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*, 50:1193-1206, 2004.
- 14) Spector TD, Conaghan PG, Buckland-Wright JC, et al. : Effect of risedronate on joint symptoms of knee osteoarthritis: results of the BRISK randomized, controlled trial. *Arthritis Res Therapy*, 7 : R625-R633, 2005
- 15) Blingham CO 3rd, Buckland-Wright JC, Garner P, Cohen SB, Dougados M, Adami S, Clauw DJ, Spector TD, Pelletier JP, Raynauld JP, Strand V, Simon LS, Meyer JM, Cline GA, Beary JF. : Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degradation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee : results of the two-year multinational knee osteoarthritis structural arthritis study. *Arthritis Rheum*. 54 : 3494-507, 2006

- 16) Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham CO 3rd, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher HR Jr, Oddis CV, Wolfe F, Moltis JA, Yocum DE, Schnitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt KD, Moskowitz RW, Williams HJ. : Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med.* 354 : 795-808, 2006
- 17) Rejnster JY, Deroisy R, Rovati LC. Et al. : Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression : a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet.* 357 : 251-6, 2001
- 18) Dougados M, Nguyen M, Berdah L, Mazières B, Vignon E, Lequesne M; ECHODIAH Investigators Study Group. : Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. Evaluation of the Chondromodulating Effect of Diacerein in OA of the Hip. *Arthritis Rheum.* 44 : 2539-47, 2001

●別冊整形外科 No.53

〈変形性関節症 — 最近の知識〉

血清マーカーによる変形性関節症の 病態評価，進行予知

伊達秀樹	山田治基	森田充浩
金治有彦	市瀬彦聡	早川和恵
田島香里	宮崎匡輔	増田広之

南 江 堂

2008 年

III. 変形性関節症の臨床

血清マーカーによる変形性関節症の病態評価，進行予知*

伊達秀樹 山田治基 森田充浩 金治有彦 市瀬彦聡
早川和恵 田島香里 宮崎匡輔 増田広之**

[別冊整形外科 53:60~66, 2008]

はじめに

変形性関節症 (osteoarthritis : OA) の病態は関節軟骨の摩耗・変性と修復を基盤とするが，加えて骨・軟骨の反応性および増殖性変化である骨棘形成，骨・軟骨挫滅組織片による二次的滑膜炎も惹起される。OA の発症過程にはメカニカルストレス，遺伝，性，外傷などの多要因が関与するとされるが，軟骨マトリクスをはじめとする関節構成体においては病期に応じて，合成と破壊を中心とした代謝が行われていると考えられる。OA の診断，評価は主として単純 X 線像や MRI などの画像で行われることが多いが，画像は関節破壊や修復の結果をとらえているにすぎないために，将来の進行予知や臨床症状に大きく影響を与える滑膜炎，関節炎の評価は困難である。関節構成体の代謝を反映するバイオロジカルマーカーは病態評価の指標として有用であり，OA の病態評価について各種関節マーカーを応用することにより，画像以上の情報を得られる可能性がある。関節マーカーの測定には関節液，血清，尿が用いられるがそれぞれ利点と欠点をもつ。関節構成体の代謝を正確に反映するには関節液の採取が望ましいが，関節穿刺を必要とするため継続的に採取することは高侵襲と考えられ，また関節部位によっては採取困難な場合もある。血清，尿を用いた測定は他関節の影響や代謝による修飾を受けるといった欠点をもつが，採取が容易であるという大きな利点がある。

われわれは血清マーカー測定による膝 OA の病態評価，関節破壊進行予知の可能性について検討を行ってきた。本

稿では関節マーカーの概要とともに，その有用性および応用について述べる。

I. 関節マーカーの分類

関節構成体で産生され，特異的に存在し，関節機能上重要な役割を担っている分子が望ましい関節マーカーである。現在，使用されているマーカーとしては表 1 に示したような分子があげられる。軟骨の主要マトリクスである II 型コラーゲンやアグリカンの代謝産物は代表的な軟骨マーカーである。また cartilage oligomeric matrix protein (COMP) などの軟骨マトリクスに存在する微量蛋白もマーカー候補となる。一方，ヒアルロン酸などの滑膜産物質や matrix metalloproteinase (MMP) などのプロテアーゼ，炎症性サイトカインなどは主として関節炎を反映するマーカーと考えられている。

II. 血清・尿中マーカーの意義

関節マーカーには早期診断，進行予知，治療効果判定などにおける有用性が期待されている。関節液，血清，尿など検体の中では関節液が関節構成体の代謝をより直接的に反映しているが，採取に関しては制限がある。膝関節は比較的穿刺しやすいが，股関節などはイメージ下でないで穿刺が困難である。また穿刺しても関節液が採取できない場合もある。一方，血清・尿中のマーカーは関節中から移行した後に代謝過程で修飾を受けること，脊椎関節症など他部位の関節症を合併する症例ではこの影響を受けることを

Key words

biological marker, cartilage oligomeric matrix protein, hyaluronan

* Serum markers for estimation of articular metabolism and prognosing disease progression in osteoarthritis

要旨は第 80 回日本整形外科学会学術総会において発表した。

** H. Date, H. Yamada (教授), M. Morita, A. Kanaji, H. Ichinose, K. Hayakawa (講師), K. Tajima : 藤田保健衛生大学整形外科 (Dept. of Orthop. Surg., Fujita Health University, School of Medicine, Toyoake) ; K. Miyazaki, H. Masuda : 生化学工業。

表 1. 関節マーカー

	分解・破壊マーカー	合成マーカー
軟骨マーカー	<ul style="list-style-type: none"> Ⅱ型コラーゲン成分 <ul style="list-style-type: none"> CTX-Ⅱ Ⅱ型コラーゲンコラゲナーゼネオエピトープ (C2C, C12C) Ⅱ型コラーゲンヘリカルフラグメント (Helix-Ⅱ) アグリカン成分 <ul style="list-style-type: none"> ケラタン硫酸 (エピトープ 5D4, ANP9) コンドロイチン 6 硫酸 (C6S) 非コラーゲン性蛋白 <ul style="list-style-type: none"> COMP 	<ul style="list-style-type: none"> Ⅱ型コラーゲン成分 <ul style="list-style-type: none"> N 末端, C 末端プロペプチド (PⅡCP, PⅡANP, PⅡBNP) アグリカン成分 <ul style="list-style-type: none"> コンドロイチン硫酸 (エピトープ 846, 3B3, 7D4) 非コラーゲン性蛋白 <ul style="list-style-type: none"> ヒト軟骨グリコプロテイン (YKL-40) cartilage-derived retinoic acid sensitive protein (CD-RAP)
滑膜炎マーカー	<ul style="list-style-type: none"> Ⅲ型コラーゲン成分 <ul style="list-style-type: none"> Ⅲ型コラーゲンプロペプチド (PⅢNP) Glc-Gal-PYD 非コラーゲン性蛋白 <ul style="list-style-type: none"> ヒアルロン酸 YKL-40 プロテアーゼ, 炎症性サイトカイン <ul style="list-style-type: none"> MMP-1, 2, 3, 9 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) IL-1, IL-6 TNF-α 	

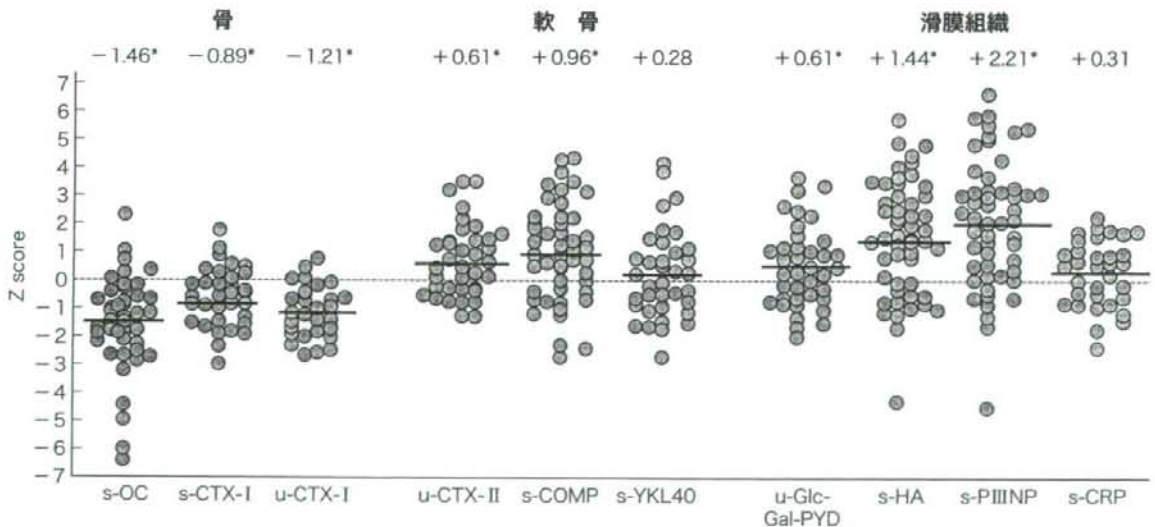


図 1. 健常群と膝 OA 群における骨・軟骨・滑膜組織代謝マーカーの比較. 膝 OA 患者を対照群と比較すると, 骨代謝マーカーの低下と軟骨・滑膜組織代謝マーカーの上昇を認める (文献 1 より引用). s-OC: 血清オステオカルシン, s-CTX-I: 血清Ⅱ型コラーゲン C 末端架橋テロペプチド, u-CTX-I: 尿中Ⅱ型コラーゲン C 末端架橋テロペプチド, u-CTX-II: 尿中Ⅱ型コラーゲン C 末端架橋テロペプチド, s-COMP: 血清 cartilage oligomeric matrix protein, s-YKL40: 血清ヒト軟骨グリコプロテイン, u-Glc-Gal-PYD: 尿中 glucosyl-galactosyl-pyridinoline, s-HA: 血清ヒアルロン酸, s-PⅢNP: 血清Ⅲ型コラーゲン N 末端プロペプチド, s-CRP: 血清 C-reactive protein

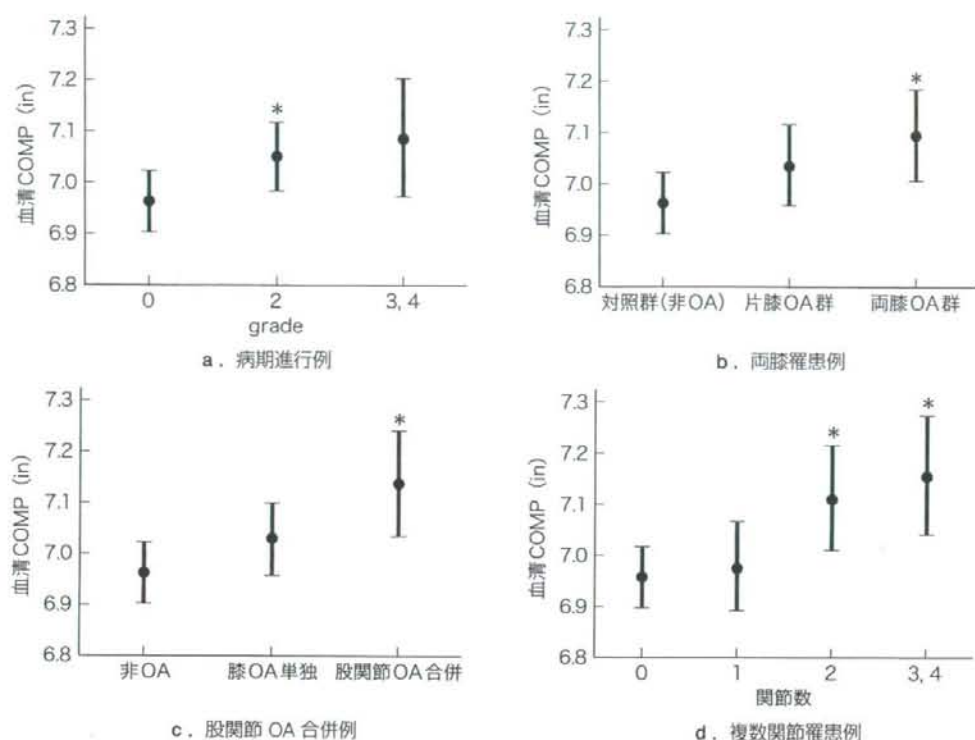


図2. 血清COMP値と膝OA病期・合併関節症との関係. The Johnston County Osteoarthritis Project の中の291例を無作為に選び、血清COMP値の分析をしたところ、膝OAの病期進行例(a)、両膝罹患例(b)、股関節OA合併例(c)、複数関節罹患例(d)で血清COMP値の上昇を認める(文献7より引用)。

否めないため、必ずしも当該する単関節の病態を特異的に反映しているとはいえないという欠点があるが、採取が容易なことは大きな利点である。

2001年Garneroら¹⁾は骨、軟骨、滑膜組織の代謝を反映するとされる種々の血清・尿中マーカーを用いて、OAには骨、軟骨、滑膜組織の代謝異常が存在することを示した(図1)。その中で彼らは膝OAにおいてWestern Ontario and McMaster Universities (WOMAC) indexによる臨床評価には尿中glucosyl-galactosyl-pyridinoline (Glc-Gal-PYD)濃度をもっとも相関し、X線像上の関節裂隙狭小化には尿中II型コラーゲンC末端架橋テロペプチド(CTX-II)濃度をもっとも相関を示したという結果を提示し、血清・尿中マーカーがOAの関節症状や進行度の指標として有用であることを述べている。また股OAを対象としたevaluation of the chondromodulating effect of diacerein in osteoarthritis of the hip (ECHODIAH) cohort²⁾についての報告でも、尿中CTX-II濃度とX線像上の関節破壊の間に強い相関を示したという結果を述べ、関節マーカーは膝のみならず

股OAに対しても有用な評価法であることを明らかにした。

ただし、単独の血清・尿中マーカーで関節病態の評価を行うには能力の限界があるとされ、現在では複数のマーカーを組み合わせて評価を行うことが多い。Jordanら³⁾は軟骨分解マーカーと滑膜炎マーカーである尿中CTX-IIと尿中Glc-Gal-PYDの組み合わせが膝OAの進行度に強い相関を示したと述べている。Mazieresら⁴⁾は尿中CTX-IIと血清ヒアルロン酸の組み合わせが股OAの関節破壊進行の予知に有用であったと述べている。Sharifら⁵⁾は血清IIA型コラーゲンN末端プロペプチド(P-II-ANP)と尿中CTX-IIというII型コラーゲンの合成と分解を示すマーカーの組み合わせが膝OAの関節破壊進行の予知に有用であったと述べている。

そのほか血清中で測定可能な軟骨マーカーとしてはCOMPの有用性が報告されている⁶⁻⁸⁾。以下に血清COMPおよびヒアルロン酸についてわれわれの検討も含め述べる。

Ⅲ. COMP

COMP は 524Kd の分子量をもつ非コラーゲン性糖蛋白であり, 主に軟骨マトリクスに存在するが靭帯, 腱, 半月板などにも微量ながら存在する⁹⁾. COMP はポリペプチドがジスルフィド結合したホモ 5 量体で, ポリペプチドの一次構造は epidermal-growth-factor (EGF)-like domain と calmodulin-like domain からなる領域の両端に C 末端と N 末端をもち, 構造上の類似から thrombospondin family に属する. COMP の機能の詳細は不明であるが偽性軟骨無形成症や多発性骨端異形成症の原因遺伝子であることが報告されている. これらの遺伝的疾患では OA を含めた軟骨異常を合併するので, COMP は軟骨の機能維持に関与していると推測されている. 具体的に COMP は II 型コラーゲンをはじめとする線維性コラーゲンに 5 量体として結合し, その安定化に寄与しているとされている. 血清 COMP については 1992 年に Saxne と Heinegard⁶⁾によって, inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による血清, 関節液中の測定が報告された. 以後, 膝・股関節疾患患者に対して, 横断的, 縦断的研究が報告され, 関節リウマチ (RA) や OA などの関節疾患において病期や将来的な関節破壊進行を予測するマーカーとしてとらえられるようになった. Clark ら⁷⁾は膝 OA 患者において病期が進行するにつれて血清 COMP 値が上昇することを報告した (図 2). Sharif ら⁸⁾は膝 OA 患者の 5 年間の追跡調査で, 血清 COMP は単独で将来的な OA 進行の予測因子になりうる

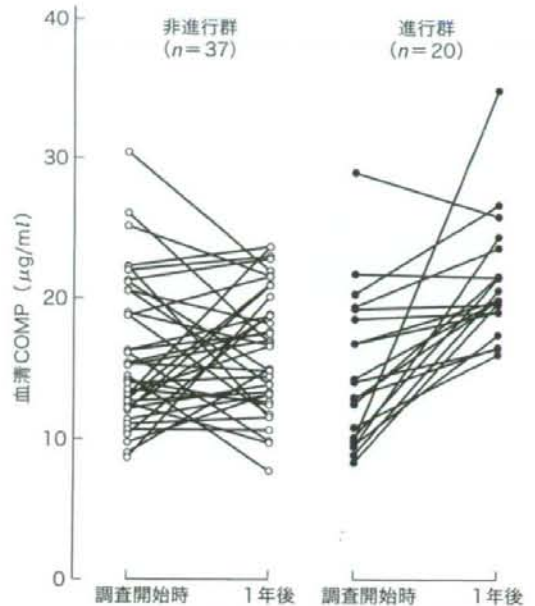


図 3. 血清 COMP 値と膝 OA の進行群・非進行群との関係. 膝 OA 57 例の 5 年間の経過で, 関節裂隙狭小化の進行した 20 例と進行しなかった 37 例を比較した結果, ベースライン時の有意差は認めなかったが, 進行群は 1 年後での血清 COMP 値の上昇を有意に認める (文献 8 より引用).

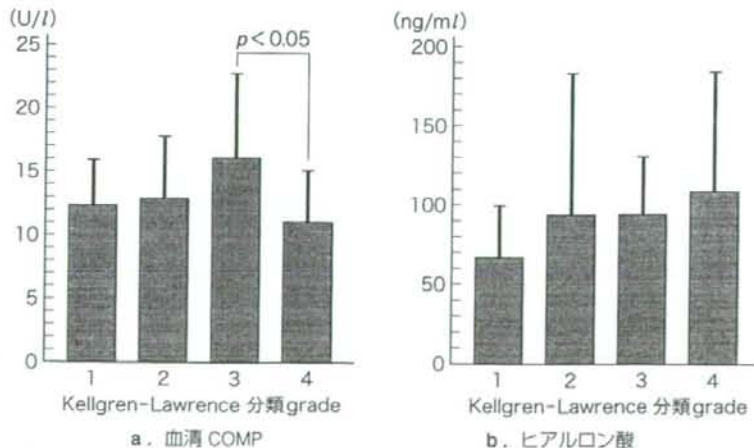


図 4. 血清 COMP/ヒアルロン酸値と X 線病期との関係. 膝 OA における血清 COMP 値は grade 3 でもっとも高値を示し, grade 4 で低値を示している.