

## <研究課題> タンパク分解酵素の活性化のプロセスに着目した変形性関節症における軟骨変性機序の解明

代表研究者 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員 津野 宏隆  
共同研究者 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 流動研究員 田中 信帆  
東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 教授 福井 尚志

### 【抄録】

変形性関節症（OA）において軟骨の変性消失が生じる機序を探るために、ヒト OA 膝関節の脛骨近位関節面の肉眼的な軟骨変性部と非変性部からペアにして軟骨組織を採取し、タンパクを抽出して解析を行った。その結果、OA 軟骨変性部では非変性部に比して組織プラスミノゲンアクチベーター（tPA）とウロキナーゼ（uPA）の発現がともに増加しており、それらの作用によって実際にプラスミン活性が誘導されていることが明らかになった。本研究ではさらに一次培養ヒト関節軟骨細胞を用いた実験を行い、軟骨変性部における tPA、uPA の発現亢進は、軟骨細胞周囲のマトリクスの変化によって引き起こされている可能性を明らかにした。本研究の結果から、OA 軟骨変性部では軟骨基質の変化によって二種類のプラスミノゲン・アクチベーターの発現が誘導され、プラスミン活性が局所的に誘導されて軟骨の変性に関与している可能性が示された。

### 1. 研究の目的

変形性関節症（osteoarthritis、OA）は主に高齢者が罹患する関節疾患で、社会の高齢化とともにその患者数は増加の一途を辿っている。OA は全身のどの滑膜関節にも生じるが、膝関節に生じる OA（膝 OA）は高齢者の QOL を低下させ、自立喪失の原因となることからとくに重要な疾患である。しかし OA の病態には不明な点が多く、疾患の進行を阻止できる治療法は見つかっていない。OA の本態は関節軟骨の緩徐な変性・消失である。このため軟骨の変性が生じる機序については従来様々な方向から検討が行われてきたが、いまだに明確な答えは得られていない。

代表研究者らは、cDNA マイクロアレイによる OA 軟骨の遺伝子発現データと OA 軟骨からのタンパク抽出液の解析によって、OA 軟骨の軟骨変性部では非変性部に比して二種類のプラスミノゲン・アクチベーターの発現がともに亢進しており、それによってプラスミン活性も亢進している可能性を見出した。プラスミンは線維素溶解の主役をなす酵素であるが、軟骨の主要な構成要素であるアグリカンを分解し 1)、さらに種々の MMP を活性型に変換することによって軟骨基質の変性を強力に引き起こしうる 2)。本研究は申請者が今までに得た知見を元に、OA 軟骨変性部においてプラスミン活性が誘導される機序の詳細を解明することを目的として行われた。

### 2. 研究方法と経過

#### 2-1.OA 軟骨変性部軟骨と非変性部軟骨からの抽出タンパクの解析

本研究は施設の倫理委員会の承認のもと、参加者の了解を文書で得たうえで行われた。本研究では初めに人工膝関節置換術が行われた内側型の膝 OA の症例から、変性部と非変性部の軟骨組織を採取した。具体的には手術の際に採取された脛骨近位関節面において、軟骨の肉眼的な変性部（degenerated area、以下 D）と非変性部（preserved area、以下 P）から軟骨組織をペアにして採取した（図 1）。軟骨組織の採取は軟骨下骨の直上から全層にわたって行った。

採取した軟骨組織は湿重量を計測したのちメスで細切し、三種類のバッファーを用いて三段階でタンパク抽出を行った。まずはじめに PBS 中のホモジナイズによってタンパクを抽出し、次に同じ軟骨組織から 0.1% Triton X-100 添加 PBS（PBS-T）を用いてタンパクを抽出し、最後に同じ軟骨組織から 6M グアニジン塩酸塩溶液（GuHCl）を用いてタンパクを抽出した。種々のタンパクについて軟骨組織からの抽出量はこれら三種のバッファー中に抽出された量の総和として求めた。本実験では uPA、uPAR、PAI-1、およびフィブロンネクチン、D-dimer とフィブリン分解産物（FDP）の合計量（以下、D-dimer+FDP）の 5 つのタンパクについて計測を行ったが、これらのタンパクの定量は、tPA

は ELISA (Human t-Plasminogen Activator/tPA ELISA Kit, R&D Systems) を用いて、他の 4 つのタンパクについては Human Luminex Discovery Assay (R&D Systems) を用いて Luminex により行い、その計測値から湿重量 1 g の軟骨組織からの抽出量を求めた。

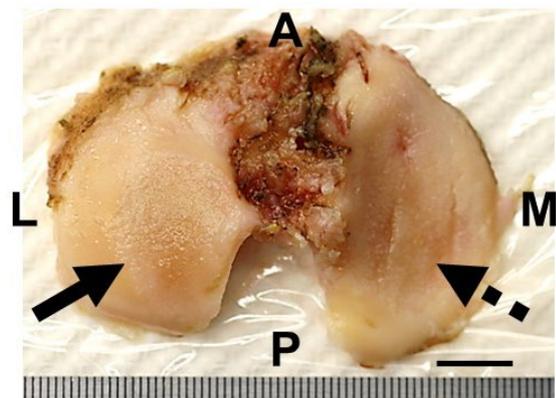


図1. 軟骨組織を採取した脛骨近位関節面を含む検体の1例を頭側から撮影した写真を示す。本研究では検体を内側型の変形性関節症の症例から採取しており、この検体は右膝関節から採取されたため、検体の外側では軟骨に目立った変性が認められないのに対し(矢印)、内側では軟骨の菲薄化が明らかである(破線矢印)。A、P、L、Mはそれぞれ前方、後方、外側、内側を示す。スケールバーは10 mm。

## 2-2. OA 軟骨変性部、非変性部における tPA、uPA および plasmin の酵素活性の計測

上記 2-1 と同様に、人工関節置換術の際に採取された内側型膝 OA の脛骨近位関節面において肉眼的な変性部と非変性部から対にして軟骨組織を採取し、湿重量を計測後にメスで細切し、PBS-T 中のホモジナイズによりタンパクを抽出した。この実験では酵素活性を温存するためにタンパクの抽出は PBS-T のみを用いて行った。抽出されたタンパク中の tPA、uPA および plasmin の酵素活性を市販の活性アッセイキット (Sensolyte AMC Tissue-type (tPA) Activity Assay Kit Fluorimetric、Sensolyte AFC Urokinase (uPA) Activity Assay Kit Fluorimetric、Sensolyte AFC Plasmin Activity Assay Kit Fluorimetric、いずれも AnaSpec) によりそれぞれ計測し、湿重量 1 g の軟骨組織から抽出された酵素活性を求めた。

## 2-3. 一次培養軟骨細胞を用いた培養実験

上記 (1)、(2) と同様にヒト OA 軟骨組織を採取し、先行論文に従ってははじめに Pronase (0.1%、Sigma-Aldrich) つぎに Collagenase P (0.025%、Calbiochem) を用いた二段階の酵素消化によって軟骨組織から軟骨細胞を単離した 3)。単離した軟骨細胞を単層培養およびア

ルジネート・ビーズを用いた三次元培養の二通りの方法で培養し、両者の間で tPA、uPA の発現レベルを比較した。培地は ITS を添加した DMEM/F-12 を用い、無血清で培養を行った。アルジネートビーズによる三次元培養を行った細胞では、この培地にさらにウシ血漿由来フィブロネクチン (Sigma-Aldrich、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、あるいはリコンビナント・ヒト・ビトロネクチン (Sigma-Aldrich、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加したのも用いて培養を行った。培養開始から 24 時間で細胞を回収して RNA を抽出し、プラスミン活性の発現を引き起こす tPA、uPA の発現レベルを *GAPDH* を housekeeping gene として LightCycler (Roche 社) を用いた qPCR による解析により調べた。

## 3. 研究の成果

### 3-1. OA 軟骨変性部、非変性部からの抽出タンパクの解析

軟骨変性部、非変性部からのタンパク抽出量を調べた結果、本検討で計測を行った tPA、uPA、uPAR、PAI-1、D-dimer+FDP のすべてについて、軟骨非変性部からの抽出量は変性部からの抽出量に比して有意に多かった (図 2)。この結果から OA 軟骨変性部では二種類のプラスミノゲン・アクチベーターの産生がいずれも亢進している一方、それらの活性を抑制する PAI-1 の産生も亢進していることが示され、これらの結果だけでは軟骨変性部においてプラスミノゲン・アクチベーターの活性が実際に亢進しているとは言えないことが明らかになった。

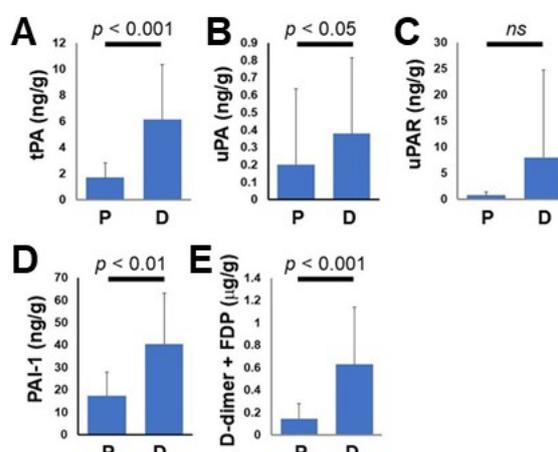


図2. 人工関節置換術の際に採取された内側型OA膝関節の脛骨近位関節面において、軟骨の肉眼的な変性部(P)と非変性部(D)からペアとして軟骨組織を採取し、組織からタンパクを抽出してtPA(A)、uPA(B)、uPAR(C)、PAI-1(D)、D-dimerとFDPの合計(E)の抽出量を計測した。グラフに湿重量1gの軟骨組織から抽出されたタンパク量の平均値と標準偏差を示す。

このため軟骨変性部で実際に線溶活性の亢進が起きているかを知る目的で抽出タンパク中の D-dimer と FDP の合計量を計測したところ、その抽出量は軟骨変性部において非変性部よりも明らかに多く、OA 軟骨変性部において実際に tPA、uPA の作用によってプラスミンが産生され、さらにその作用によってフィブリンの分解が生じているものと考えられた。

この結果の解釈であるが、tPA はフィブリンと結合することで PAI-1 による活性抑制を受けにくくなり酵素活性を発揮するようになることが知られている 4)。また uPA については uPAR と結合することで PAI-1 による抑制を受けにくくなってプラスミノゲン・アクチベーターとして活性を示すようになることが知られているが 5)、軟骨変性部では uPA とともに uPAR の発現も亢進していることから、同部で uPAR と結合することによって酵素活性を発揮している可能性が考えられた。ちなみに膝 OA の関節内ではフィブリンの形成が誘導されていることについては以前から報告があり 6)、本研究における D-dimer の計測や上記の推論はこの知見に基づくものであった。

### 3-2. OA 軟骨組織中の酵素活性の推定

上記 3-1 の結果に基づき OA 軟骨の変性部、非変性部から抽出されたタンパク中の tPA、uPA の酵素活性を調べたところ、これらの活性はいずれも予想通り、軟骨非変性部に比して軟骨変性部において有意に高いという結果が得られた (図 3A, B)。また研究代表者らが以前計測を行ったプラスミン活性についても今回用意された抽出タンパクを用いて再度計測を行い、以前の計測結果と同様、その活性がやはり軟骨変性部において非変性部に比して有意に高いことが確認された (図 3C)。これらの結果から、軟骨変性部におけるプラスミン活性の発現には、tPA、uPA という二種類のプラスミノゲン・アクチベーターがともに関与するものと考えられた。

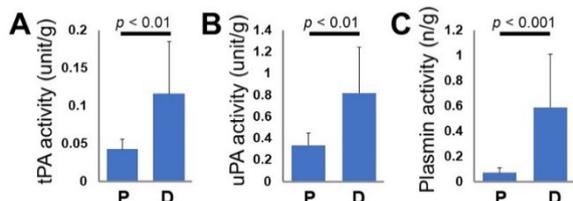


図3. 人工関節置換術の際に採取された内側型OA膝関節の脛骨近位関節面において、軟骨の肉眼的な変性部(P)と非変性部(D)からペアとして軟骨組織を採取し、組織からタンパクを抽出してtPA(A)、uPA(B)およびプラスミンの酵素活性(C)を計測した。グラフは湿重量1gの軟骨組織から抽出された酵素活性の平均値および標準偏差を示す。

### 3-3 軟骨細胞を用いた培養実験

アルジネート・ビーズにより三次元培養された軟骨細胞では、単層培養で維持された軟骨細胞に比して tPA、uPA の遺伝子発現レベルはいずれも明らかに低かった (図 4)。正常の関節軟骨において軟骨細胞は特定のマトリクスに結合しない状態に保たれていると考えられており、細胞を単離して単層培養で維持すると、軟骨細胞に発現する複数のインテグリンがリガンドと結合する結果、細胞内のシグナリングが変わり、軟骨細胞の表現型が変化することが知られている 7,8)。したがって本研究の結果も、単層培養された軟骨細胞では表現型の変化に伴って二種類のプラスミノゲン・アクチベーターの発現が誘導されたものと解釈された。

この解釈が正しいかを検証するために、アルジネート・ビーズを用いて三次元培養された軟骨細胞に対してフィブロネクチン、ビトロネクチンを添加したところ、いずれのタンパクの添加によっても tPA の発現が亢進 (図 4A)、またビトロネクチンの添加によって uPA の発現が亢進するという結果が得られた (図 4B)。以上の結果から、ヒト関節軟骨細胞は、細胞外マトリクスの変化に応じ、おそらく細胞に発現しているインテグリンを介して細胞内シグナルの変化が生じることによって二種類のプラスミノゲン・アクチベーターを発現する性質があるものと考えられた。

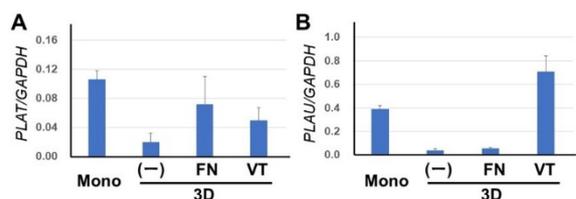


図4. 人工関節置換術の際に採取した軟骨組織から酵素消化により軟骨細胞を採取し、これを単層培養(Mono)およびアルジネート・ビーズを用いた三次元培養(3D)によって無血清培地で維持した。三次元培養された細胞では無添加の培地のほか、培地にフィブロネクチン(FN)、ビトロネクチン(VT)を添加した条件でも培養し、培養開始から24時間後に細胞からRNAを採取、qPCRによってtPA(A)およびuPA(B)の遺伝子発現を培養条件間で比較した。グラフに平均値と標準偏差を示す。

### 4. 今後の課題

本研究ではヒト OA 軟骨からの抽出タンパクの解析を行い、OA 軟骨変性部ではプラスミン活性が亢進しているという我々自身の以前の知見を確認し、さらにその活性発現には、軟骨変性部において発現が亢進している tPA、uPA という二種のプラスミノゲン・アクチベーターがともに関与していることを明らかにした。

前述のように、プラスミンは軟骨の主要な構成要素であるアグリカンを直接分解するほか、種々の MMP を活性型に変換することによっても軟骨基質の変性を強力に引き起こしうる。軟骨変性部におけるプラスミン活性の亢進は、OA における軟骨変性にこの酵素が関与していることを強く示唆するものと考えられる。

本研究ではさらに軟骨細胞の培養実験を行い、上記の二種類のプラスミノゲン・アクチベーターの発現には変性部における軟骨細胞周囲のマトリクスの変化が関与している可能性を示した。我々はこの知見が OA の発症機序を考える上で大変重要な意味を持っている可能性があると考えている。関節軟骨のマトリクスは主に II 型コラーゲンとアグリカンで構成されているが、これらの構成要素はいずれも軟骨内の代謝回転が極めて遅いことが知られており、体内に長期間存在する間に修飾を受けて分子の性状が変化することが知られている。このため高齢者では軟骨基質の物性が変化し、OA の発症に先だって軟骨基質の変化が生じている可能性があり、MRI を用いた疫学研究でもそれを支持する結果が得られている (Guermazi A, *BMJ* 2012)。本研究の結果から、軟骨基質に変性が生じると、それによって二種類のプラスミノゲン・アクチベーターの発現が誘導され、さらにそれ等の作用でプラスミン活性が誘導される結果、さらに軟骨基質の変性が進み、それによってさらにプラスミン活性が誘導されるという一種のポジティブ・フィードバックが形成される可能性が考えられる。我々はこのようなポジティブ・フィードバックが OA における軟骨変性に深く関係しているのではないかと考えている。

本研究ではこのように OA の軟骨変性について新たな知見を得ることができたが、本研究で得られた知見が実際のヒト OA の軟骨変性にどの程度関与しているかは現時点では不明である。さらに、軟骨細胞が周囲のマトリクスの変化によって tPA、uPA を発現するようになる可能性は示せたものの、それに関与する細胞接着分子やシグナル伝達系は特定できていない。今後さらに検討を進め、これらの点を明らかにできればと考えている。

## 5. 研究成果の公表方法

この報告書に示したデータについては既に国

内学会での発表を終えており、今後さらにデータを追加したうえで国際学会での発表および英文誌への投稿を行う予定である。

## 参考文献

1. Poe M, Stein RL, Wu JK. High pressure gel-permeation assay for the proteolysis of human aggrecan by human stromelysin-1: kinetic constants for aggrecan hydrolysis. *Arch Biochem Biophys* **298**: 757-759, 1992.
2. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* **1824**: 133-145, 2012.
3. Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J Cell Biol* **93**: 743-750, 1982.
4. Ranby M. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta* **704**: 461-469, 1982.
5. Blasi F, Sidenius N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett* **584**: 1923-1930, 2010.
6. So AK, Varisco PA, Kemkes-Matthes B, Herkenne-Morard C, Chobaz-Peclat V, Gerster JC, Busso N. Arthritis is linked to local and systemic activation of coagulation and fibrinolysis pathways. *J Thromb Haemost* **1**: 2510-2515, 2003.
7. Fukui N, Ikeda Y, Tanaka N, Wake M, Yamaguchi T, Mitomi H, Ishida S, Furukawa H, Hamada Y, Miyamoto Y, Sawabe M, Tashiro T, Katsuragawa Y, Tohma S.  $\alpha 5\beta 5$  integrin promotes dedifferentiation of monolayer-cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **63**: 1938-1949, 2011.
8. Tanaka N, Ikeda Y, Yamaguchi T, Furukawa H, Mitomi H, Nakagawa T, Tohma S, Fukui N.  $\alpha 5\beta 1$  integrin induces the expression of noncartilaginous procollagen gene expression in articular chondrocytes cultured in monolayers. *Arthritis Res Ther* **15**: R127, 2013.

以上

# **Elucidation of the Mechanism of Cartilage Degeneration in Osteoarthritis Focusing on the Process of Activation of Proteolytic Enzymes**

**Primary Researcher:** Hirotaka Tsuno, MD, PhD,  
Researcher, National Sagamihara Hospital Sagamihara Hospital

**Co-researchers:** Nobuho Tanaka, PhD,  
Researcher, National Sagamihara Hospital Sagamihara Hospital  
Naoshi Fukui, MD, PhD,  
Professor, Graduate School of Arts and Sciences, The University  
of Tokyo

To elucidate the mechanism of cartilage degeneration in osteoarthritis, cartilage tissues were obtained from osteoarthritic knee joints at macroscopically degenerated areas and preserved areas in pairs, and proteins were extracted. Analysis of the extracted proteins revealed that the expression of two types of plasminogen activators was increased in degenerated areas compared to preserved areas, and plasmin activity was also increased in degenerated areas, by the activities of both types of plasminogen activators. We further performed experiments using primary cultured human articular chondrocytes and found that the change in the surrounding matrix may be involved in the increased expression of the two plasminogen activators in degenerated areas. Thus, the results of this study suggest the possibility that increased plasmin activity may be induced in degenerated areas of osteoarthritic cartilage, likely due to changes in cartilage matrix there.