

平成 29 年 8 月 4 日

## マウス関節軟骨における Hyaluronidase-2 の発現抑制は 変形性関節症を進行させる

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長：門松 健治）整形外科学（担当教授 石黒直樹）の樋口 善俊（ひぐち よしとし）医員、西田 佳弘（にしだ よしひろ）准教授らの研究グループは、マウス関節軟骨における Hyaluronidase-2 の発現抑制がヒアルロン酸を異常に蓄積させ、変形性関節症を進行させることを明らかにしました。

ヒアルロン酸は、関節軟骨を含む結合組織に特に豊富に存在しています。関節軟骨では Hyaluronidase (Hyal; ヒアルロン酸分解酵素) のうち Hyal1 と Hyal2 がヒアルロン酸分解の中心的役割を担っていると考えられていますが、詳細についてはわかっていません。また、Hyal1 の発現を抑制すると変形性関節症をさせると報告されていますが、Hyal2 に関しては不明のままです。そのため、研究グループは、関節軟骨特異的に Hyal2 の発現を抑制することで、変形性関節症の発症に関連するかを調査しました。

研究では、Hyal2 発現を抑制した自然老化モデル、関節不安定化 (DMM) モデルマウス、炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha$ （炎症を惹起させる物質）を使用した explant culture モデルを使用して解析しました。また、変形性関節症の評価は組織学的評価（modified Mankin score）と免疫染色（MMP-13, ADAMTS-5；軟骨を構成するコラーゲン、アグリカンの分解酵素の発現を評価）を行いました。さらに、ヒアルロン酸の蓄積を評価するために biotinylated- hyaluronan binding protein (B-HABP) 染色を行いました。その結果、Hyal2 発現抑制マウスの関節軟骨には、高分子ヒアルロン酸が異常に多く蓄積していました。また、3 種類のモデルにおいて、Hyal2 発現抑制マウスは野生型マウスより変形性膝関節症が進行し、基質分解酵素が多く出現していることがわかりました。以上から、Hyal2 の発現抑制により、ヒアルロン酸が異常に蓄積し、変形性関節症の進行に関連することを発見しました。

本研究成果は、国際科学誌「Scientific Reports」（英国時間 2017 年 8 月 1 日付けの電子版）に掲載されました。

# マウス関節軟骨における Hyaluronidase-2 の発現抑制は 変形性関節症を進行させる

## ポイント

- マウス関節軟骨における Hyaluronidase-2 (Hyal2) の発現抑制は、高分子ヒアルロン酸を関節軟骨に異常蓄積させ、変形性関節症変化を進行させる。
- 変形性関節症変化の進行は、マウスの自然経過モデル、関節不安定化モデルの両方で認められ、軟骨の explant culture による OA モデルでも認められた。
- Hyaluronidase-2 (Hyal2) の発現抑制マウスでは、MMP-13、ADAMTS-5 の発現亢進が認められた。

## 1. 背景

ヒアルロン酸は様々な組織の細胞外基質の主要構成成分です。ヒアルロン酸は関節軟骨、関節の滑液および眼の硝子体液を含む結合組織において特に豊富で、ヒアルロン酸の代謝と異化のバランスは、結合組織の質の維持にとって大変重要です。しかし、ヒアルロン酸の特に関節軟骨における分解過程は、まだ明らかにされていません。

2つのヒアルロン酸分解酵素(Hyal1 および Hyal2)および細胞表面ヒアルロン酸受容体(CD44)は、ヒアルロン酸分解において重要な役割を果たすと推測されています(図1)。

Hyal1 の機能不全は、ムコ多糖症(MPS)IX を引き起こすことがわかっています。これは、ヒアルロン酸の蓄積および変形性関節症(osteoarthritis: OA)の発症を特徴とする病気です。一方、Hyal2 機能不全マウスは頭蓋顔面および頸椎の異常を示しましたが、関節軟骨および変形性関節症の発症に関する報告はされていません。

本研究グループは、Hyal2 発現を関節軟骨特異的に抑制した自然老化マウスおよび関節不安定化モデルマウス、炎症性サイトカインを用いた explant culture モデルを使用して、Hyal2 発現抑制が OA の発達および進行に関連するかを明らかにすることを目的として実験を行いました。

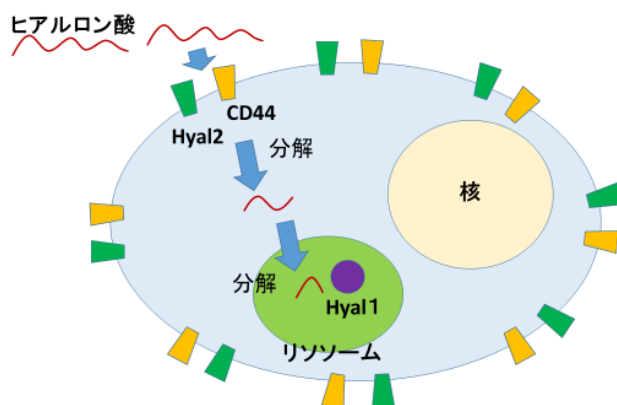


図 1:ヒアルロン酸分解機序

## 2. 研究成果

### ①自然老化マウスの検討

9 ヶ月齢の野生型マウスと比較して、Hyal2 発現抑制マウスはサフラニン O 染色が顕著に低

下し、軟骨損傷が強いことを証明しました(図 2A,E,I)。ヒアルロン酸染色(B-HABP 染色)の結果、Hyal2 発現抑制マウスは野生型マウスより関節軟骨における染色性が強く、HA 蓄積が多く蓄積していることを示しました(図 2B,F)。関節軟骨におけるヒアルロン酸の量および分子量は、野生型マウスと比較して Hyal2 発現抑制マウスの方がより高値でした(図 3)。また、Hyal2 発現抑制マウスの関節軟骨では、野生型マウスに比べて ADAMTS-5 および MMP-13 陽性の軟骨細胞を多く観察できました(図 2C,D,G,H,J)。

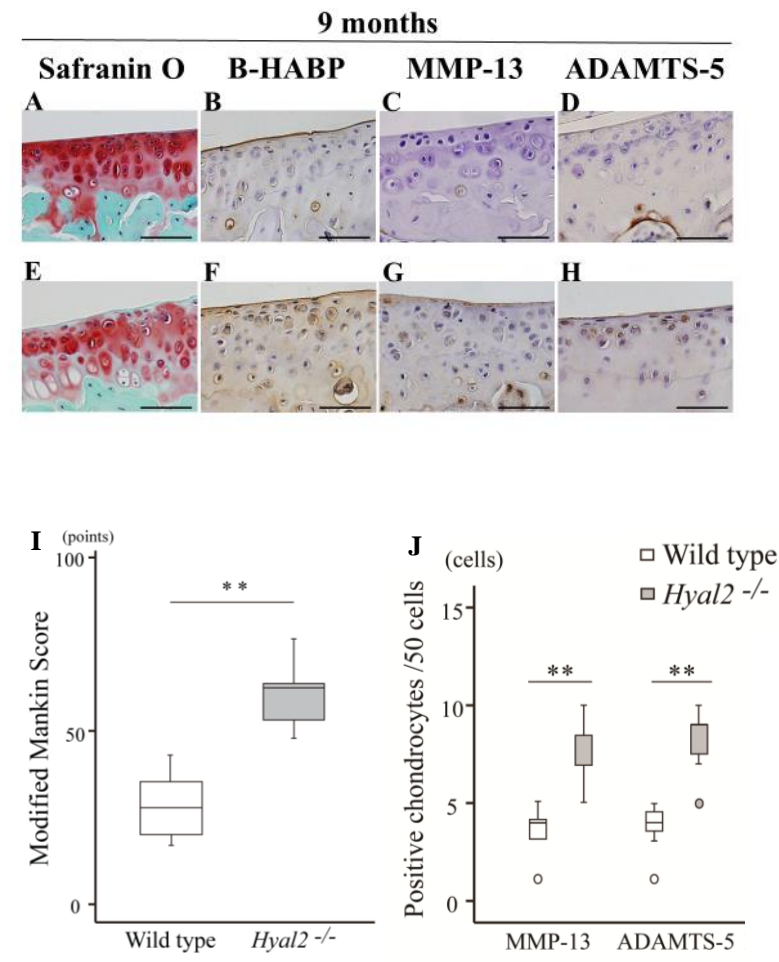


図 2.

9ヶ月齢の野生型マウス(A-D)および Hyal2 発現抑制マウス(E-H)の自然老化における関節軟骨の組織学的評価、B-HABP 染色および免疫染色の結果

関節軟骨の modified Mankin score(I)    \*\* P < 0.01

MMP-13、ADAMTS-5 の陽性軟骨細胞数(J)    \*\* P < 0.01

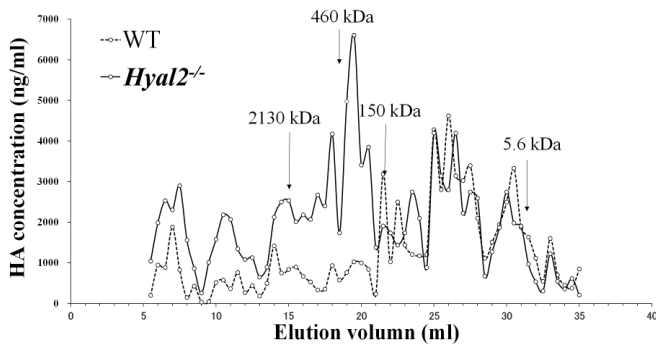


図 3

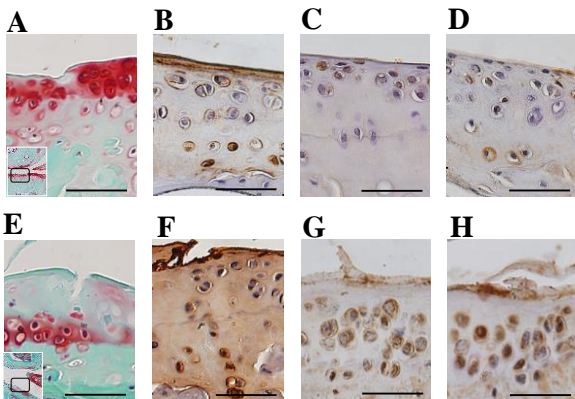
9 ヶ月齢の Hyal2 発現抑制マウスの膝関節および大腿骨頭から抽出したヒアルロン酸および既知の分子サイズを有するヒアルロン酸に対するセファクリル S-1000 ゲル濾過クロマトグラフィーの結果。この方法を用いて、ヒアルロン酸の分子量を測定しました。各画分のヒアルロン酸含量は、競合 ELISA 法を用いて測定しました。

## ②関節不安定化(DMM)手術をした変形性関節症モデルの検討

術後 10 週間のサフラン O 染色の結果、野生型マウスと比較して、Hyal2 発現抑制マウスはプロテオグリカンの染色性が低下し、軟骨損傷が強かったことを証明しました(図 4A,E,I)。ヒアルロン酸染色(B-HABP 染色)の結果、野生型マウスと比較して、Hyal2 機能不全マウスの関節軟骨における染色性が強く、ヒアルロン酸が多く蓄積していることを示しました(図 4B,F)。Hyal2 発現抑制マウスの関節軟骨では、野生型マウスに比べて ADAMTS-5 および MMP-13 陽性の軟骨細胞を多く観察できました(図 4C,D,G,H,J,K)。

10 weeks

Safranin O B-HABP MMP-13 ADAMTS-5



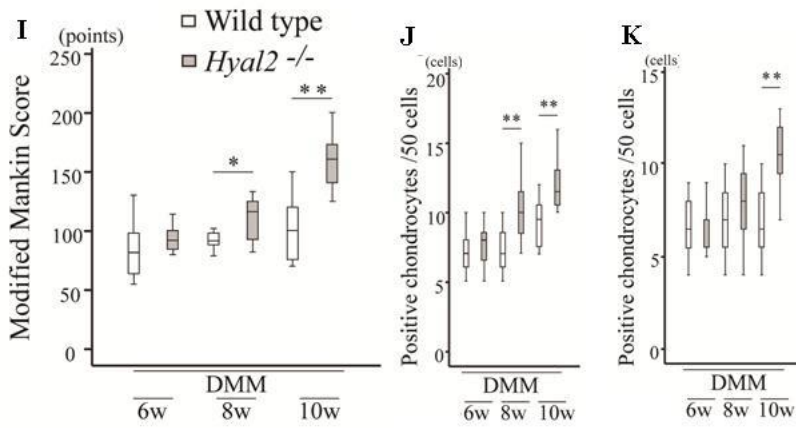


図 4

DMM 術後 10 カ月の野生型マウス(A-D)および Hyal2 発現抑制マウス(E-H)における関節軟骨の組織学的評価、B-HABP 染色および免疫染色の結果

マウス関節軟骨の modified Mankin score (I) \* P < 0.05、\*\* P < 0.01

MMP-13(J)、ADAMTS-5(K)の陽性軟骨細胞数(\*\* P < 0.01)

### ③炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha$ による変形性関節症モデルの検討

大腿骨頭を IL-1 $\alpha$ を添加して培養した後のサフラン O 染色の結果において、野生型マウスと比較して、Hyal2 発現抑制マウスはプロテオグリカンの染色性が低下していました(図 5A,E)。また、ヒアルロン酸染色(B-HABP 染色)の結果、野生型マウスと比較して、Hyal2 発現抑制マウスの関節軟骨における染色性が強く、ヒアルロン酸が多く蓄積していることを示しました(図 5B,F)。Hyal2 発現抑制マウスの関節軟骨では、野生型マウスに比べて ADAMTS-5 および MMP-13 陽性の軟骨細胞を多く観察できました(図 5C,D,G,H,I)。

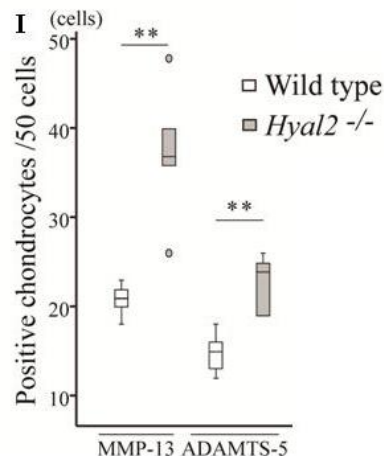
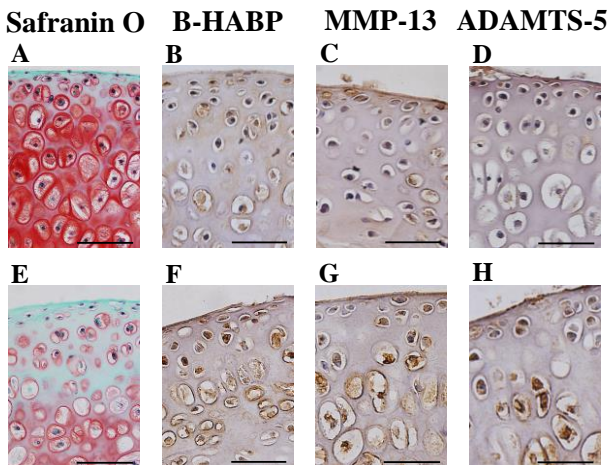


図 5

IL-1 $\alpha$ による培養後の野生型マウス(A-D)および Hyal2 発現抑制マウス(E-H)における関節軟骨の組織学的評価、B-HABP 染色および免疫染色の結果

MMP-13、ADAMTS-5 の陽性軟骨細胞数 (I) \*\* P < 0.01

### 3. 今後の展開

変形性関節症軟骨においては、一般的にヒアルロン酸が減少して細胞外マトリックスが変性していくと考えられていました。しかし、変形性関節症を示す患者の中には、ヒアルロン酸の過剰蓄積が原因となっている症例が含まれていることが示唆されました。今後、過剰ヒアルロン酸が変形性関節症の原因となっている患者を明らかにし、その病態を解析していくことで、新たな変形性関節症患者コホートを明確にすることができ、進行予防などの方策へつなげることが期待されます。

### 4. 用語説明

- 関節軟骨: 関節軟骨は軟骨細胞と細胞外基質で構成されています。細胞外基質はコラーゲン、プロテオグリカン、ヒアルロン酸で主に構成されています。
- ヒアルロン酸: 関節、皮膚、脳、硝子体などの細胞外基質に存在し、軟骨の機能維持に極めて重要な役割をしている。
- ヒアルロン酸分解酵素(Hyal): ヒアルロン酸を分解する酵素で特に Hyal1 と Hyal2 が中心的な役割を担っていると考えられています。
- サフラニン O 染色: 細胞外基質を構成するプロテオグリカンを染色する方法
- MMP-13: コラーゲンを分解する酵素
- ADAMTS-5: アグリカンを分解する酵素(アグリカンはプロテオグリカンの主な構成要素)
- IL-1 $\alpha$ インターロイキン 1 $\alpha$ : サイトカインと呼ばれる生理活性物質の一種で炎症反応に深く関与している。

### 5. 発表雑誌

Yoshitoshi Higuchi<sup>1</sup>, Yoshihiro Nishida<sup>1\*</sup>, Eiji Kozawa<sup>1</sup>, Lisheng Zhuo<sup>2</sup>, Eisuke Arai<sup>1</sup>, Shunsuke Hamada<sup>1</sup>, Daigo Morita<sup>1</sup>, Kunihiro Ikuta<sup>1</sup>, Koji Kimata<sup>2</sup>, Takahiro Ushida<sup>2</sup>, Naoki Ishiguro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Orthopedic Surgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

<sup>2</sup> Multidisciplinary Pain Center, Aichi Medical University, Nagakute, Japan

“Conditional knockdown of hyaluronidase 2 in articular cartilage stimulates osteoarthritic progression in a mice model”

*Scientific Reports* (英国時間 2017 年 8 月 1 日付けの電子版に掲載)

DOI: 10.1038/s41598-017-07376-5

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Scientific\\_R\\_20170804en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Scientific_R_20170804en.pdf)