

岩手医科大学  
審査学位論文  
(博士)

## 高分子ヒアルロン酸 (HA) による軟骨保護作用の メカニズムの解明

Key words: cartilage,

osteoarthritis (OA),

animal model,

hyaluronic acid (HA),

therapeutic effect

岩手医科大学医学部病理学講座機能病態学分野

原 田 真 理

岩手医科大学医学部病理学講座機能病態学分野

東北文化学園大学医療福祉学部

宇 月 美 和

名古屋大学大学院医学系研究科整形外科科学講座

石 黒 直 樹

新薬リサーチセンター

岩 館 克 治

仙台市医療センター仙台オープン病院

東北大学大学院医学系研究科病理形態学分野

岩手医科大学医学部病理学講座機能病態学分野

澤 井 高 志

### 要 旨

目的：ヒト変形性膝関節症（OA）患者の軟骨組織に対するヒアルロン酸（HA）製剤の影響を検討するために、OA モデル動物に対して 2 種類の高分子 HA 製剤を投与し、病理組織学的に非投与群と比較検討した。

対象・方法：OA モデルはウサギで石黒らの方法に従って作製した。検討対象とした HA 製剤は平均分子量270万 Da の HA 製剤 SUVENYL<sup>®</sup> (SVE) と鶏冠由来の HA を架橋化して混合した分子量600万 Da の Synvisc<sup>®</sup> (SYN) である。対照として生食を用いた。これらの製剤を反復投与した後、関節部の組織を採取してホルマリン固定し、パラフィン切片を作製して種々の組織学的検討を行った。

組織の評価方法：軟骨に与える影響の評価項目は、① 軟骨のプロテオグリカン、HA、Type II collagen など保全状態を反映する基質成分、② aggrecan 分解産物や軟骨細胞のアポトーシスなど軟骨組織、細胞の変性、分解過程を反映する因子、③ Ki67, HAS2, HAS3など軟骨の再生、合成を反映する因子である。

結果：OA の傷害度を OA cartilage histopathology grade assessment-grading methodology に基づいて分類した Grade は、大腿骨では、対照群 $4.69 \pm 0.25$ , SVE 投与群 $4.35 \pm 0.43$ , SYN 投与群 $4.38 \pm 0.30$ であり、HA 投与群が対照群に対して有意に低値であった ( $p < 0.05$ )。脛骨では同順に4.81

---

Mechanism of the protective effect of high molecular weight hyaluronic acid against cartilage degeneration.

Mari Harada<sup>1)</sup>, Miwa Uzuki<sup>1) 2)</sup>, Naoki Ishiguro<sup>3)</sup>, Katsuji Iwadate<sup>4)</sup>, Takashi Sawai<sup>1) 5) 6)</sup>.

<sup>1)</sup>Department of Pathology, Iwate Medical University, School of Medicine, <sup>2)</sup>Faculty of Medical Science and Welfare, Tohoku Bunka Gakuen University, <sup>3)</sup>Department of Orthopedics, Nagoya University, Graduate School of Medicine, <sup>4)</sup>New Drug Research Center, Inc., <sup>5)</sup>Sendai Open Hospital, Sendai city Medical care Center, <sup>6)</sup>Department of Pathology, Tohoku University, Graduate School of Medicine.

DOI: 10.14961/cra.27.51

(2014. 10. 30 受付, 2014. 12. 8 受理)

$\pm 0.25$ ,  $4.69 \pm 0.25$ ,  $4.77 \pm 0.26$ であった。大腿骨では、対照群に比較して HA 投与群のプロテオグリカン, Type II collagen, HA の残量が多かった。アポトーシス細胞の陽性率, aggrecan の分解物は低下傾向を示した。また Ki67 陽性細胞数や HAS2 や 3 の mRNA 発現量は増加していた。脛骨についても大腿骨と同様の傾向を示したが、3 群間の差は小さかった。

結論：HA 製剤は、基質の保護作用を有し、軟骨の傷害を示すパラメータを抑える一方、再生を示すパラメータを上昇させており、OA 軟骨に対する有効な影響をもたらしている可能性が組織学的にも示唆された。

## はじめに

変形性膝関節症（以下 OA）は主に軟骨局所における機械的ストレス、代謝変化、加齢、遺伝的背景などの複合的な原因をもとに発生する変性疾患である。炎症に伴う関節液の貯留、滑膜におけるヒアルロン酸（以下 HA）合成の低下が軟骨面における潤滑を不良にし、更に軟骨細胞への過大な力学的ストレスによって生じた炎症性サイトカインが軟骨細胞自身を刺激してプロテアーゼを過剰産生させ<sup>1)</sup>、軟骨マトリックスを破壊して軟骨変性を加速する。

OA の関節注入治療に用いられる薬剤には、強い抗炎症効果を示す副腎皮質ステロイドと、関節の摩耗を防ぎ表面を潤滑する HA がある。前者は滑膜炎が高度で多量の関節液貯留がある場合などに効果があり<sup>2)</sup>、即効性がある反面、*in vitro* の研究では、aggrecan の合成抑制作用や滑膜細胞による HA の合成抑制作用があることが報告されており、頻回投与による軟骨変性の加速が懸念されている<sup>3,4)</sup>。一方 HA は、効果発現までにある

程度の時間を要するが、関節液の粘弾性を回復させる効果がある<sup>1)</sup>。3 ないし 6 ヶ月の長期投与後でステロイドと比較すると、HA の方が優れているとの報告<sup>5)</sup>もある。HA は関節液や軟骨組織などの重要な構成成分の一つであり、健康人の関節液中の HA 濃度は  $2.5 \sim 4 \text{ mg/mL}$ <sup>6)</sup> である。本来生体内に広く分布する高分子物質であることから、ステロイドや他の製剤投与に比べて、副作用が少ないことが期待されている。これまでも HA 製剤の効果を裏付ける報告<sup>5)</sup>があり、HA 製剤の効果の差も報告されているが、その機序は必ずしも明らかではない<sup>7)</sup>。

筆者らは、ウサギ OA モデルの膝関節腔に、平均分子量 270 万 Da の HA 製剤 SUVENYL<sup>®</sup>あるいは Synvisc<sup>®</sup>を反復投与し（表 1）、その関節組織を用いて、HA による軟骨基質の保護効果、軟骨変性の度合い、さらにリモデリングの可能性を組織学的に評価した。なお今回の検討は特に HA 治療群について対照群との比較を中心に行い、2 種類の HA 製剤の差については言及しない。

表 1 2 種類のヒアルロン酸（HA）製剤の比較

	スベニール <sup>®</sup>	サイビスクディスボ <sup>®</sup>
	SUVENYL <sup>®</sup>	Synvisc <sup>®</sup>
一般名	ヒアルロン酸ナトリウム	ヒアルロン酸ナトリウム 架橋処理ポリマー
由来	ヒアルロン酸産生乳酸菌	鶏冠
分子量	粘度平均分子量: 190 万 ~ 250 万 Da	Hylan A : ヒアルロン酸架橋処理ポリマー 分子量 約 600 万 Da
	重量平均分子量: 270 万 ~ 367 万 Da	Hylan B : ヒアルロン酸架橋処理ポリマー ビニルスルホン架橋体 分子量 600 万 Da 以上 A:B を 80:20 で混合したもの

## 材 料 と 方 法

1. ウサギ OA モデルの作製：石黒らの報告<sup>8)</sup>と同様に、14~15週齢の Kb1:JW (SPF) 系ウサギ(オス)の左膝関節の外側側副靱帯および半月板の部分切除を行って、OA モデルを作製した。
2. HA 投与の群分け：HA 投与の用量、回数はヒトに対する用法用量に従った。投与間隔については、3日、5日、7日の3通りを予備検討し、HA 投与効果を確認できる5日間隔とした。またそれに伴って剖検日は25日目を選択した。平均分子量270万 Da の HA 製剤スベニール・バイアル関節注25mg (中外製薬(株) 東京) (以下 SVE) を0.1mL/kg の用量で術後0日から20日まで5日間隔で5回関節内に投与した群、平均分子量約600万 Da の架橋型 HA (Hylan G-F 20) サイビスクディスポ・関節注2 mL (帝人ファーマ(株) 東京) を0.08mL/kg の用量で術後0日から10日まで5日間隔で3回関節内に投与した群、および陰性対照として生理食塩水を0.1mL/kg の用量で術後0日から20日まで5日間隔で5回関節内に投与した群の計3群に分け、それぞれ13羽を用いた(表2)。
3. 組織切片の作製：手術・投与開始を5日として25日後の左側膝関節を用いた。剖検後、左膝の大腿骨と脛骨を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、肉眼的な観察と計測を行い、10%EDTA 液(pH7.4)で脱灰後、パラフィン切片を2 $\mu$ mで薄切し、連続切片を作製した。
4. 組織切片の分析：大腿骨と脛骨の組織切片を評価対象とし、OA cartilage histopathology grade assessment・grading methodology<sup>9)</sup>と照

合して傷害度を分類した。軟骨基質成分を定量化するために、サフラニン-0染色の他に、type II collagen や aggrecan を免疫組織化学で、HA は HA 結合蛋白(HABP)による組織染色を行った。軟骨の変性度は、aggrecan の断片を免疫組織化学で、アポトーシス細胞は TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法で評価した。軟骨細胞のリモデリング効果は、細胞増殖性マーカーである Ki67(MIB-1)陽性細胞を計測し、ヒアルロン酸合成酵素である hyaluronic acid synthase(HAS)2 と 3 の mRNA の検出を試みた。HAS2 と HAS3 の mRNA の検出には各群13羽のうち5羽のウサギの関節を用いた。顕微鏡像の写真撮影にはオリンパス DP70を用いた。各方法の詳細は以下の通りである。

①軟骨基質成分の定量：免疫組織化学は脱パラフィン後、0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールで内因性ペルオキシダーゼ阻止を室温で30分、10%ウマ血清で非特異的蛋白吸着阻止を室温で30分行った後、一次抗体の反応を行った。二次抗体には biotinylated anti-mouse IgG affinity purified made in horse(VECTOR LABORATORY INC, CA, USA)を用いた。type II collagen の検出には一次抗体として anti collagen type II alpha 1 chain mouse IgG1 (Acris GmbH, Dreieich, Germany)を0.1%BSA を含む PBS で200倍希釈して用い、4℃, over night で反応させた。一次抗体反応の前に予め2% proteinase K を用いて室温で15分間の前処理をした。aggrecan の検出には、一次抗体として ACAN/aggrecan mouse anti-human monoclonal antibody (LSBio, Seattle, WA, USA)を PBS で25 倍希釈して用い、4℃,

表2 対象の群わけ

群	N	投与物質	用量(mL/kg)	膝関節腔内投与回数(投与日)	剖検日(術後)
対照	13	生理食塩水	0.1	5回 (術後0, 5, 10, 15, 20日)	25日
SVE	13	スベニール(SVE)	0.1	5回 (術後0, 5, 10, 15, 20日)	25日
SYN	13	サイビスク(SYN)	0.08	3回 (術後0, 5, 10日)	25日

over night で反応させた。一次抗体反応の前に5IU/mL の trypsin (和光純薬工業, 大阪) を用いて室温で20分間, さらに2IU/mL の chondroitinase (生化学工業, 東京) を用いて室温20分間の前処理を施した。HA の検出には, bovinenasal cartilage 由来のヒアルロン酸 binding protein (HABP)<sup>10)</sup> をビオチン標識した B-HABP (生化学工業, 東京) を用いた。HABP 反応の前に5IU/mL の trypsin を用いて室温で10分間の前処理を行った。上記全ての検出には ABC キット (VECTOR LABORATORY INC) を用いた ABC 法を, 発色には 3,3' Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB) (DOJINDO, 東京) を共通に使用した。

②軟骨の変性度: 一次抗体前の反応および二次抗体反応, その後の ABC 反応と発色については①と同様である。aggrecan 分解産物の検出には, aggrecan が aggrecanase (ADAMTS5) の作用を受けて分解した際に生じる aggrecan 断片の N 末端を特異的に認識する BC-3 抗体<sup>11)</sup> (ACAN/aggrecan BC-3 (in vitro research, San Rafael, CA, USA)) を用いた。1% BSA を含む PBS で 100 倍希釈して一次抗体とし, 4℃, over night で反応させた。一次抗体反応の前に5IU/mL の trypsin を用いて室温で20分間前処理を行った。アポトーシス細胞の検出には TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色法 (Apop Tag キット: Chemicon International Inc. Temecula, CA, USA) を用いた。

③リモデリング効果: 細胞増殖マーカーである Ki67 (MIB-1) の検出には一次抗体として, monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen clone MIB-1 (Dako, Glostrup, Denmark) を PBS で 50 倍希釈して用い, 4℃, over night で反応させた。一次抗体前の反応および二次抗体, その後の ABC 反応と発色については①と同様である。一次抗体反応前に 10mM クエン酸バッファー (pH6.0) に浸漬して microwave (出力500W) で 20 分間加熱する賦活化処理を施した。in situ hybridization に用いたウサギ HAS2 と HAS3 のオリゴ DNA プローブは, Ohno らの報告<sup>12)</sup> をもと

に一部改変して, 以下の50塩基をデザインし, 日本遺伝子研究所 (仙台) にて合成, HPLC で精製されたものに, DIG oligonucleotide 3'-end labeling kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) でジゴケシゲニンを標識したものを用いた。HAS2 の anti sense probe: 5' AAC TTG ACA TGT ACA GCA CTG AGT AGA GAG ACA TAA AGA CCA TGA CGA TA 3'; HAS2 の sense probe: 5' TAT CGT CAT GGT CTT TAT GTC TCT CTA CTC AGT GCT GTA CAT GTC AAG TT 3'; HAS3 の anti sense probe: 5' GAA CTG GTA GCC TGT CAC ATA GGC TGC CAG GAT GCC ACC CAG CAC CGC CA 3'; HAS3 の sense probe: 5' TGG CGG TGC TGG GTG GCA TCC TGG CAG CCT ATG TGA CAG GCT ACC AGT TC 3'.

in situ hybridization 法は, Micro Probe Staining System (Fisher Scientific, San Francisco, CA, USA) AP - Fast Red 法<sup>13)</sup> に準じ, ハイブリダイゼーションの時間を 45℃ 2 時間とした<sup>14)</sup>。

## 評価法

1. サフラニン-O 染色, type II collagen, aggrecan, HA および aggrecan 分解産物については, 大腿骨, 脛骨それぞれの同一関節面の外側の傷害部を傷害部位, 内側の非傷害部を非傷害部位とし, 組織標本を顕微鏡下でオリンパス DP70 を用いて 1253 万画素で写真撮影した後, 画像処理ソフト Photoshop CS6 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) の画像解析機能を用いて 5mm×5mm の一定面積の染色強度を 0~255 の 256 段階に数値化<sup>15-17)</sup> した。無作為に 5 視野を選択して測定し, 非傷害部と傷害部との差と非傷害部との比 ((傷害部位-非傷害部位)/非傷害部位) を求め, その平均値を用いて arbitrary unit (arb.unit) とし, 比定量化して評価した (図 1)。

2. アポトーシス細胞, Ki67 陽性細胞, HAS2 および HAS3 の mRNA 陽性細胞は, 400 倍 (High power field; HPF) で 1 視野当たりの陽性細胞と軟骨細胞総数を 3 視野カウントし, 平均して陽性

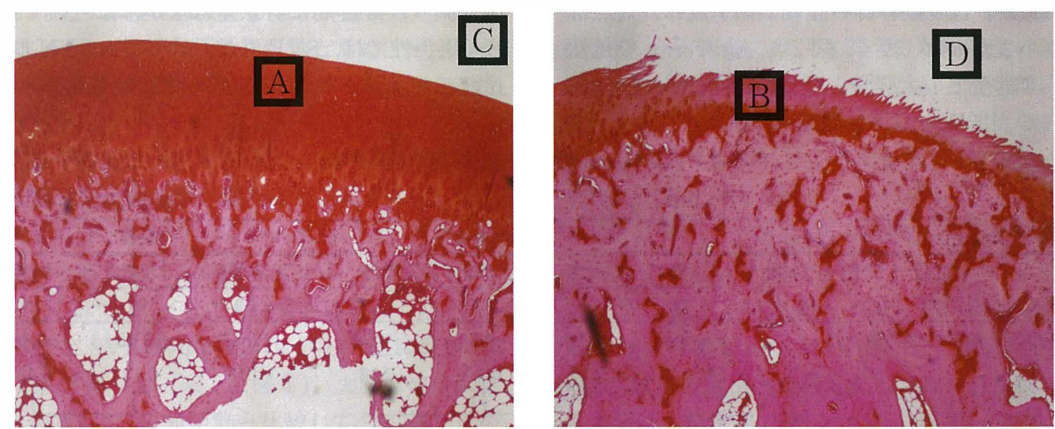


図 1 Arbtrary unit の求め方

サフラニン-O 染色を例に染色強度 arbitrary unit (arb. unit) の求め方を示した。左側：非傷害部と右側：傷害部である。図の□で囲った領域 A～D に相当する 5 mm×5 mm の一定面積を無作為に 5 ヶ所ずつ選択して染色強度を測定し、 $\text{arb. unit} = ((B-D)-(A-C))/(A-C)$  を算出しその平均値を用いた。

表 3 傷害の組織学的 Grade

		大腿骨			脛骨		
傷害のGrade	群	対照	SVE	SYN	対照	SVE	SYN
	N	13	13	13	13	13	13
	average	4.69	4.35	4.38	4.81	4.69	4.77
	SD	0.25	0.43	0.30	0.25	0.25	0.26
		p<0.05					
		p<0.05					

大腿骨の対照群と SVE 群、対照群と SYN 群の間に有意差 (p<0.05) が認められた。

率を算出した。アポトーシス細胞については傷害部位と非傷害部位の他に中間の軽度傷害部位もカウントした。

3. 有意差検定には Wilcoxon の符号付順位和検定を用いた。

結 果

1. Hematoxyline-eosin (HE) 染色およびサフラニン-O 染色による観察；3 群の大腿骨と脛骨は、全て外側の軟骨組織の傷害が著しく、びらんが関節軟骨の中ほどから軟骨下骨付近に達していた。OA cartilage histopathology grade assessment・grading methodology<sup>9)</sup>と照合して分類した Grade は、大腿骨で、両 HA 投与群が対

照群に対して有意に低かった (p<0.05) (表 3)。脛骨では有意差は見られなかったものの、大腿骨と同様な傾向であった (表 3)。また HA 投与群の大腿骨と脛骨では、対照群と比較し、軟骨細胞のクラスター形成が多く観察された。

2. 各軟骨基質成分；サフラニン-O の染色性は arb.unit が小さいほど低下度が大きく、傷害部のプロテオグリカンの残存量が少ないことを示す。大腿骨の arb.unit は、SVE 群が対照群および SYN 群と比較し有意に大きく (p<0.05, p<0.01) (表 4)、また脛骨においても、SVE 群が対照群および SYN 群と比較し大きい値を示した (表 4)。type II collagen では、大腿骨、脛骨ともに、値のバラつきが大きいために 3 群間で有意差がな

かったが、HA 投与群の脛骨の低下度は、対照群より小さかった（表 4、図 2）。Aggrecan 染色性は、3 群全ての大腿骨と脛骨の arb.unit が -0.8

を下回り、3 群間に有意差はなかった（表 4）。HA 染色性では、SVE 群が、対照群や SYN 群と比較して濃染され、SVE 群の関節軟骨部分が他

表 4 HA による軟骨組織の保護効果の評価

		単位:arb.unit					
		大腿骨			脛骨		
	群	対照	SVE	SYN	対照	SVE	SYN
	N	13	13	13	13	13	13
サフラニン-O 染色性の低下度	average	-0.55	-0.39	-0.58	-0.52	-0.43	-0.58
	SD	0.15	0.13	0.16	0.18	0.13	0.18
		p<0.05		p<0.01	p<0.01		
type II Collagen 染色性の低下度	average	-0.71	-0.65	-0.73	-0.81	-0.59	-0.64
	SD	0.15	0.19	0.12	0.72	0.17	0.15
Aggrecan 染色性の低下度	average	-0.86	-0.83	-0.85	-0.93	-0.92	-0.92
	SD	0.06	0.14	0.14	0.03	0.04	0.05
ヒアルロン酸(HA) 染色性の低下度	average	-0.79	-0.65	-0.65	-0.81	-0.64	-0.68
	SD	0.21	0.16	0.22	0.20	0.18	0.26

サフラニン-O 染色性の低下度において、大腿骨の対照群と SVE 群との間に  $p<0.05$ , SVE 群と SYN 群の間に  $p<0.01$  で有意差が認められた。脛骨の SVE 群と SYN 群の間にも  $p<0.01$  で有意差が認められた。

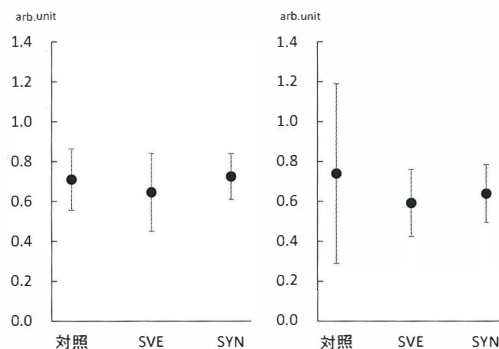


図 2 Type II collagen の染色性の低下度

左グラフ：大腿骨、右グラフ：脛骨 arb.unit を平均値 ±SD で示した。arb.unit が大きいほど非傷害部と傷害部の染色性が大きいため、Type II collagen が低下したことを示す。大腿骨では 3 群の差がないが、脛骨では HA 投与群で Type II collagen の減少が対照群に比べ抑えられていた。

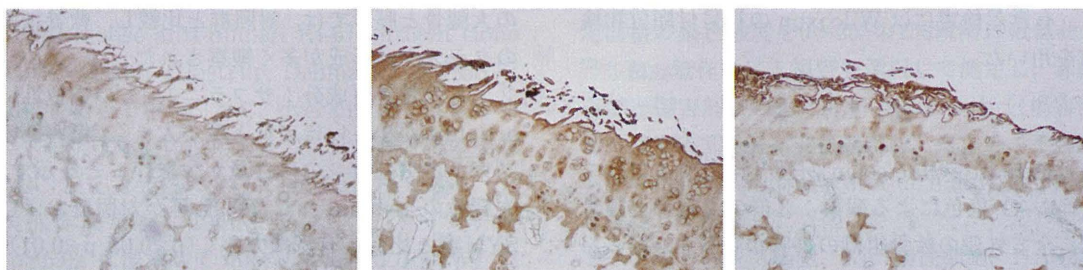


図 3 HABP を用いたヒアルロン酸 (HA) の組織染色像

左：対照群，中：SVE 群，右：SYN 群 大腿骨の傷害部位（400倍）を例として示した。SVE 群および SYN 群は対照群に比べ濃染された。

の2群より保護されている様子が観察された(図3). arb.unit は大腿骨, 脛骨ともに, 対照群が-0.8程度, HA 群が-0.6程度であったが, 3群間に有意差はなかった(表4).

3. 軟骨の変性度; Aggrecan 分解産物の染色性は分解産物が多いほど濃染されるので, arb.unit が大きいほど変性が大きいと判断した. 対照群の大腿骨と脛骨では同程度の値を示したが, SVE 群と SYN 群では, ともに大腿骨が脛骨より小さく, 大腿骨で SVE 群が対照群に対し有意に低値 ( $p < 0.01$ ) であった(表5, 図4). 大腿骨の中間部位と傷害部では, 対照群と比較して HA 投与群のアポトーシス細胞の陽性率が低く, HA 投与群で

はアポトーシスが抑制された結果であった(表5, 図5). 一方脛骨では, 3群全てが同程度の値を示した. また非傷害部位, 中間部位と傷害部位と比較すると, 大腿骨, 脛骨ともに中間部位のアポトーシス陽性率が高く, この傾向は3群に共通していた(表5, 図5).

4. リモデリング効果; Ki67の免疫組織染色をした結果(図6), 大腿骨と脛骨ともに, SVE 群が対照群や SYN 群と比較し有意に高い陽性率を示した ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )(図7). HAS2及びHAS3の mRNA の検出例を図8に示した. HA 投与群の大腿骨の傷害部では, HAS2, HAS3ともに, 対照群と比較して高い値を示し(図9,10), 特に

表5 軟骨の変性度の評価

		大腿骨			脛骨			
		対照	SVE	SYN	対照	SVE	SYN	
		N	13	13	13	13	13	
Aggrecan分解産物の染色性		average	-0.06	-0.45	-0.25	-0.07	-0.05	0.13
単位:arb.unit		SD	0.54	0.26	0.41	0.48	0.49	0.34
アポトーシス 陽性細胞数 単位:陽性率%	非傷害部位	Average	14.6	6.2	7.3	10.2	7.5	13.6
		SD	19.4	8.0	7.1	4.8	5.1	15.4
	中間部位	Average	34.8	16.1	15.2	19.5	18.5	20.5
		SD	27.9	11.7	8.4	13.9	13.0	20.1
	傷害部位	Average	26.1	9.8	12.8	16.6	13.8	10.8
		SD	15.3	6.2	7.7	9.2	10.8	7.3

軟骨の変性度を aggrecan 分解産物の染色性とアポトーシス陽性細胞の陽性率から評価した. arb.unit が大きいほど aggrecan の分解産物が多いことを示す. 脛骨では3群に差がないが, 大腿骨では対照群の arb.unit が大きい. アポトーシス陽性細胞の陽性率は, 大腿骨の中間損傷部位で対照群が有意に高値であった.

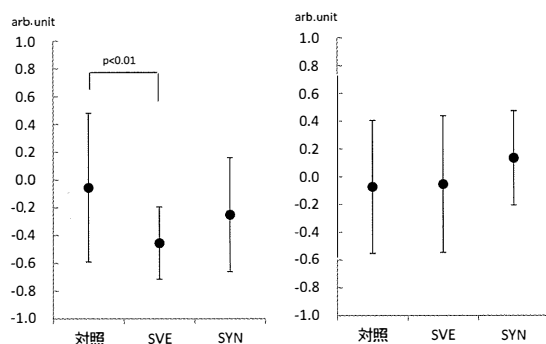


図4 Aggrecan 分解物の染色性の上昇

左グラフ: 大腿骨, 右グラフ: 脛骨, 平均値±SD で示した. 大腿骨の対照群と SVE 群の間に  $p < 0.01$  で有意差を認めた.



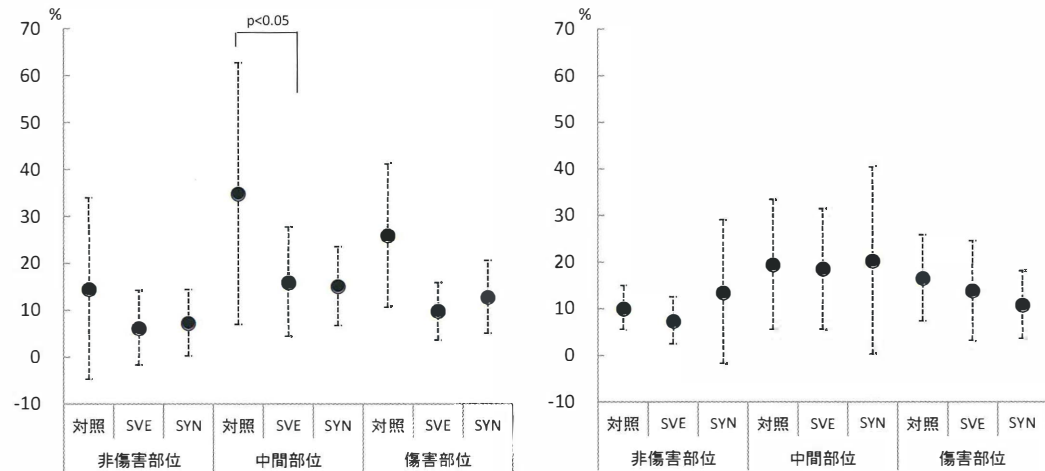


図5 アポトーシス細胞の陽性率

左グラフ：大腿骨，右グラフ：脛骨，平均値±SDで示した。  
大腿骨の中間部位で，対照群とSVE群の間に  $p < 0.05$  で有意差を認めた。

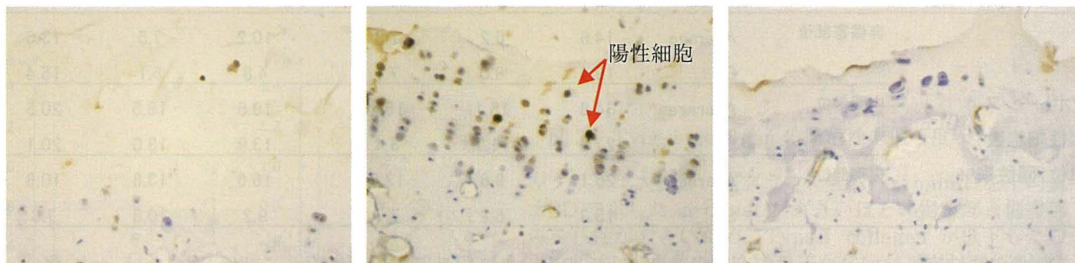


図6 Ki67の免疫組織染色像(400倍)

大腿骨を例に示した。左：対照群，中：SVE群，右：SYN群，陽性細胞を矢印で示した。

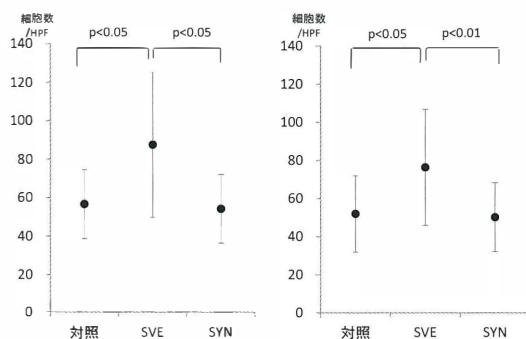


図7 Ki67陽性細胞数

左グラフ：大腿骨，右グラフ：脛骨，平均値±SDで示した。  
大腿骨の傷害部におけるki67陽性細胞数の平均は対照群56.6(個/HPF)，SVE群87.4(個/HPF)，SYN54.1(個/HPF)で，対照とSVE群の間に  $p < 0.05$ ，SVE群とSYN群の間に  $p < 0.05$  で有意差を認めた。脛骨では，対照群51.9(個/HPF)，SVE群76.3(個/HPF)，SYN50.2(個/HPF)で，対照群とSVE群の間に  $p < 0.05$ ，SVE群とSYN群の間に  $p < 0.01$  で有意差を認めた。

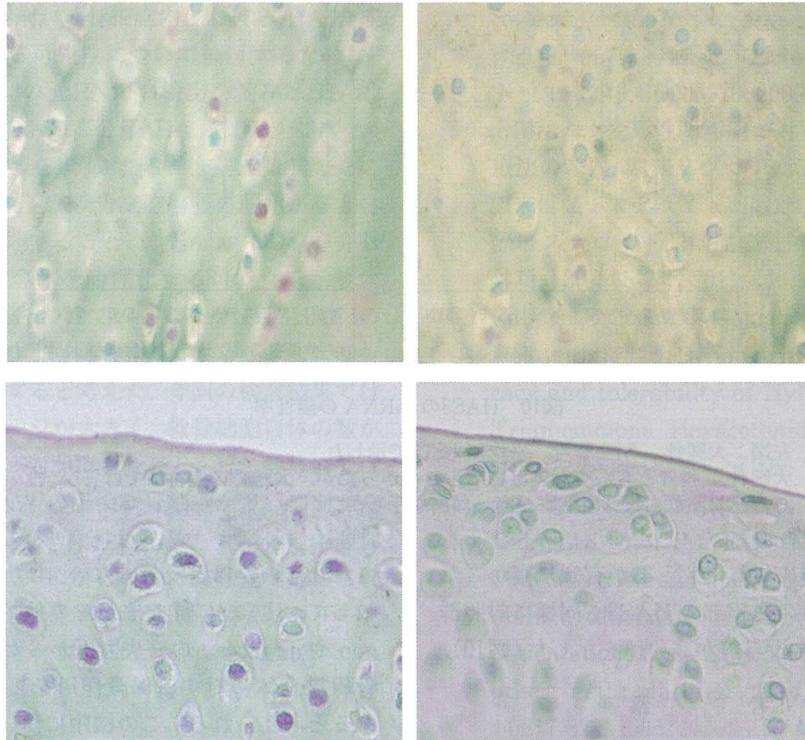


図8 *in situ* hybridization による HAS2 と HAS3 の mRNA の検出

左上: HAS2 anti sense probe を用いた陽性像, 右上: HAS2 sense probe を用いた陰性像  
 左下: HAS3 anti sense probe を用いた陽性像, 右下: HAS3 sense probe を用いた陰性像  
 sense probe を用いた場合には HAS2, HAS3 ともに染色されないことが確認された。

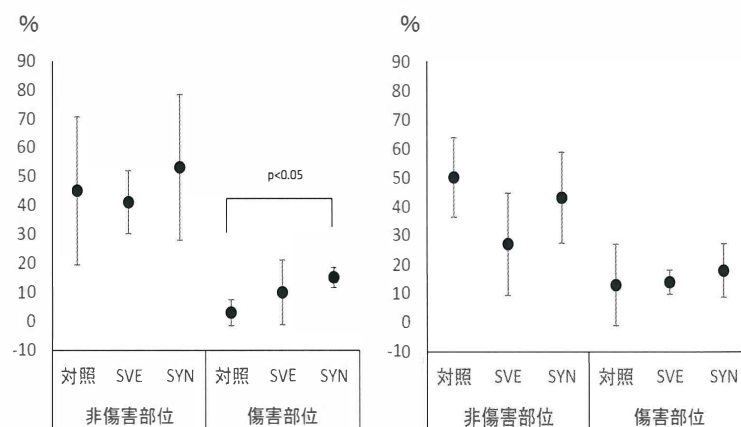


図9 HAS2 の mRNA の陽性率

左図: 大腿骨, 右図: 脛骨, 平均値 $\pm$ SD で示した。  
 大腿骨の傷害部位において, 対照群と SYN 群の間に  $p < 0.05$  で有意差を認めた。

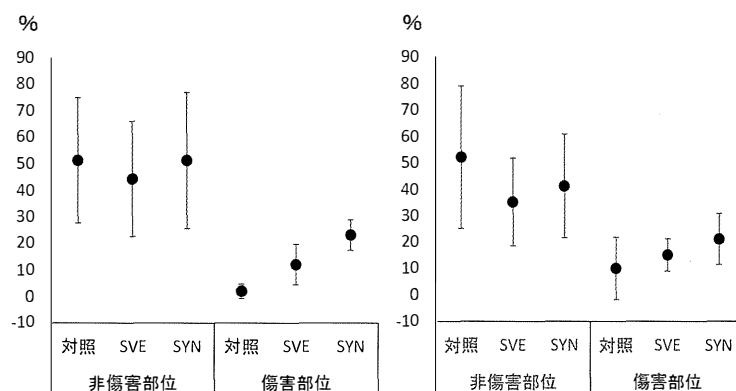


図10 HAS3の mRNA の陽性率

左図：大腿骨，右図：脛骨，平均値±SDで示した。

大腿骨，脛骨ともに有意差は認められなかったが，大腿骨の傷害部では HA 投与群が対照群に比べ陽性率が高い傾向を示した。

HAS2は対照群に対し SYN 群が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。脛骨の傷害部の HAS3も同様に対照群と比較して HA 投与群が高い値を示した(図10)。

## 考 察

OA に対する HA の関節内投与が関節液の粘弾性を回復させ，疼痛緩和に効果があることは多く報告されてきた<sup>46)</sup>。OA のみでなく，関節リウマチ患者への関節内投与が疼痛緩和や炎症の改善と，日常生活動作の改善にも効果があると報告されている<sup>18)</sup>。動物実験においては，投与された HA が関節軟骨の深層部まで浸透することや<sup>19)</sup>，プロテオグリカン遺伝子の発現に関与する可能性<sup>20)</sup>など細胞培養実験による HA 製剤の効果も個別に報告されてきた。一方で臨床的な効果判定は，投与患者からの聞き取り調査や X 線検査所見に頼らざるを得ない。本研究では OA モデルを用いて，ヒトでの病態を考慮した総合的な効果を解析した。大腿骨における傷害部位のプロテオグリカンの低下度は，SVE 群が他の 2 群より軽度であると判定された。Type II collagen, aggrecan と HA の低下度には 3 群間で有意差が認められなかったが，HA 投与群では対照群より HA が多く残存した。今回の検討で定量化された HA が保護作用によって軟骨内に残存したものか，投与によって浸透したものか，軟骨細胞によって新たに合成

されたものかは言及できない。しかし対照群と比較して，HA 投与群では HA の他，type II collagen や aggrecan の喪失も低かったことから，軟骨組織全体に対する保護作用を裏付ける結果であると考えられる。この機序については，HA が軟骨組織内で軟骨基質の他の成分と結合したり，網目状構造を示す重要な成分であることから裏付けられる。aggrecan 断片の定量値は，3 群の脛骨で差を認めなかったが，大腿骨では対照群と SVE 群の間に有意な差を認めたこと，アポトーシス細胞数においても対照群と SVE 群の間に有意差が認められたことから，HA 製剤の投与は大腿骨に対して変性を抑制する効果を発揮したと言える。靱帯切離による実験的 OA モデルやヒト relapsing polychondritis では，軟骨の変性と軟骨細胞のアポトーシス出現の間に正の相関があることが報告<sup>21)22)</sup>されており，軟骨細胞のアポトーシスに続いて軟骨変性が生じること<sup>23)</sup>から，大腿骨の中間部位で特に対照群のアポトーシス細胞が増加した結果は，時間の経過に伴って対照群の変性が進行する可能性を，また HA 投与群では軟骨変性が抑制される可能性を推測させた。Fas を対象とした研究では HA の存在がアポトーシスの出現率を低下させ<sup>24)</sup>，HA の共存や添加によって軟骨細胞における type II collagen や aggrecan の合成が誘導されることが培養細胞を

用いて確認されている<sup>25)</sup>。本研究では、関節内投与した HA 製剤が軟骨細胞内における HA 合成亢進に関与する可能性について検討するために、HAS2と HAS3の mRNA の検出を試みた。HAS2は平均  $2 \times 10^6$ Da の高分子 HA を、HAS3は  $1 \times 10^5$ Da の HA を合成する<sup>26)</sup>。HAS2,HAS3の mRNA の発現量が軟骨細胞培養の開始から 8 日後に最高値に達すること<sup>27)</sup>、HA が CD44を介して成長因子受容体を活性化する可能性を示唆すること<sup>28)</sup>が報告されていることから、HAS の mRNA の増加は軟骨細胞の再生及びリモデリング効果を反映すると考えた。今回の検討結果では、傷害部のダメージが大きく、軟骨細胞自体の数が少なかったが、対照群と比較し、HA 投与群では HAS の mRNA の陽性軟骨細胞が多い傾向がみられた。更に Ki67陽性細胞数も大腿骨の中間部位で対照群と SVE 群との間に有意差が認められたことから、HA 製剤が軟骨細胞の増殖やリモデリングに効果を有することが示唆された。

## 結 論

筆者らの研究ではウサギ OA モデルに 2 種類の HA 製剤を反復投与したのち、25日後の関節を用いて、軟骨の保護効果、傷害の程度、リモデリング効果の 3 項目について病理組織学的な検討を行った。大腿骨、脛骨ともに傷害部位のダメージが大きく、軟骨細胞が著しく減少した状態であったことから、各群の間の差は小さかった。しかし、大腿骨では有意差が得られる評価項目が多かったことから、HA 投与群では大腿骨側の傷害が軽減する可能性が示唆された。投与した HA 製剤は軟骨の保護、傷害の軽減にとどまらず HAS の産生に関与する可能性を否定できない。以上、HA 製剤投与群では、有意差を認める効果は少ないものの、軽微な効果を示すことが実験的に証明された。個体間差もあり、症例数も限られていることから更なる比較検討が必要である。

## 文 献

- 1) 山田治基, 伊達秀樹, 辻村俊造, 他: 変形性関節症における疼痛の保存的治療, THE BONE, 27:63-69, 2013.
- 2) Bellamy N, Campbell JRV: Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. Cochrane Database Syst Rev, 19:CD005328, 2006.
- 3) 山田治基: 変形性関節症に対する関節内注入療法の基礎. 臨床リウマチ, 15:63-69, 2003.
- 4) 加来信弘: ステロイド薬関節内注入療法の実際とステロイド関節症の危険性. 整形・関節外科, 30: 65-74, 2011.
- 5) Caborn D, Rush J, Lanzer W: A randomized, single-blind comparison of the efficacy and tolerability of Hylan G-F 20 and Triamcinolone Hexacetonide in patients with Osteoarthritis of the knee. J Rheumatol, 31:333-343, 2004.
- 6) Dahl LB, Dahl IM, Engstrom-Laurent A: Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. Ann Rheum Dis, 44:817-822, 1985.
- 7) Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G et al: OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis. Part II, OARSI evidenced-based.expert consensus guidelines. Osteoarthritis Cartilage, 16:137-162, 2008.
- 8) 石黒直樹, 岩館克治, 澤井高志: 実験的変形性膝関節症に対する高分子量ヒアルロン酸 (平均分子量270万 HA) スベニールと架橋型ヒアルロン酸 (Hylan G-F20) SYNVISCO の作用比較. 関節外科, 29:1440-1452, 2010.
- 9) Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, et al: Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging<sup>1,2</sup>. Osteoarthritis Cartilage, 14, 13-29, 2006.
- 10) 宇月美和, 澤井高志: ヒアルロン酸 binding protein (HABP) を用いたヒアルロン酸の新しい検出法 組織細胞化学1998, 日本組織細胞化学会編 学際企画, 東京:177-183, 1998.
- 11) Hughes CE, Caterson B, Fosang AJ: Mon-

- oclonal antibodies that specifically recognize neopeptide sequences generated by 'aggrecanase' and matrix metalloproteinase cleavage of aggrecan: application to atabolism *in situ* and *in vitro*. Biochem , 305:799-804, 1955.
- 12) Ohno S, Tanimoto K, Fujimoto K: Molecular cloning of rabbit hyaluronic acid synthases and their expression patterns in synovial membrane and articular cartilage, Biochimica et Biophysica Acta, 1520:71-78, 2001.
  - 13) 佐藤雄一, 土屋紅緒: ブリガディー標識オリゴプローブを用いた rapid *in situ* hybridization 法 組織細胞化学 1998, 日本組織細胞化学会編 学際企画, 東京: 128-134, 1998.
  - 14) 宇月美和, 平田万千代, 澤井高志: 関節疾患における免疫組織化学と *in situ* hybridization. Journal of Hard Tissue Biology, 10 : 135-142, 2002.
  - 15) 徳永勢二: 関節リウマチ患者の関節内でのヒアルロン酸分解酵素 (hyaluronidase) の発現と分布について. 岩手医学雑誌, 59: 89-98, 2007.
  - 16) 山部大輔, 村上秀樹, 宇月美和, 他: 腰椎椎間関節軟骨の変性の評価一病理組織像と T2 マッピング法の比較. 岩手医学雑誌, 65: 259-270, 2013.
  - 17) 村上賢也, 鎌滝章央, 嶋村 正, 他: 関節リウマチにおける CD14陽性細胞の役割一蛍光二重染色および電子顕微鏡学解析. 東日本整形・災害外科学会誌, 23 : 15-24, 2011.
  - 18) 金 強中, 金子健次, 伊藤達雄, 他: 高分子ヒアルロン酸の関節リウマチ膝に対する効果の臨床研究. 臨床リウマチ, 16: 38-43, 2004.
  - 19) 加藤幸夫, 西村正宏, 菊地寿幸, 他: 関節軟骨・滑膜組織に対する高分子量ヒアルロン酸の浸透性. Clin Rheumatol, 21: 20-31, 2009.
  - 20) 加藤幸夫, 本田清昌, 中島 歩, 他: ラット変形性膝関節症モデルにおける高分子ヒアルロン酸の作用: ヒアルロン酸応答遺伝子の網羅的解析. 臨床リウマチ, 25: 174-184, 2013.
  - 21) Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T: Effect of hyaluronan on chondrocyte apoptosis and nitric oxide production in experimentally induced osteoarthritis. J Rheumatol, 27: 1713-1720, 2000.
  - 22) Ouchi N, Uzuki M, Kamataki A et al: Cartilage destruction is partly induced by the internal proteolytic enzymes and apoptotic phenomenon of chondrocytes in relapsing polychondritis. J Rheumatol, 38: 730-737, 2011.
  - 23) Hashimoto S, Oche R, Komiya S et al: Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. Arthritis Rheum, 41: 1632-1638, 1998.
  - 24) Lisiginoli G, Grassi F, Zini N: Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan. Arthritis Rheum, 44: 1800-1807, 2001.
  - 25) 山田治基: 変形性関節症に対する関節内注入療法の基礎. 臨床リウマチ, 15: 63-69, 2003.
  - 26) Itano N, Sawai T, Yoshida M: Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. Biol Chem, 274: 25085-25092, 1999.
  - 27) Suzuki A, Tanimoto K, Ohno S: The metabolism of hyaluronan in cultured rabbit growth plate chondrocytes during differentiation. Biochimica et Biophysica Acta, 1743: 57-63, 2005.
  - 28) Meran S, Luo DD, Simpson R, et al: Hyaluronan facilitates transforming growth factor- $\beta$  1-dependent proliferation via CD44 and epidermal growth factor receptor interaction. J Biol Chem, 286: 17618-17630, 2012.

## ABSTRACT

Mechanism of the protective effect of high molecular weight hyaluronic acid against cartilage degeneration

Mari Harada<sup>1)</sup>, Miwa Uzuki<sup>1)2)</sup>, Naoki Ishiguro<sup>3)</sup>, Katsuji Iwadate<sup>4)</sup>, Takashi Sawai<sup>1)5)6)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pathology, Iwate Medical University, School of Medicine, <sup>2)</sup> Faculty of Medical Science and Welfare, Tohoku Bunka Gakuen University, <sup>3)</sup>Department of Orthopedics, Nagoya University, Graduate School of Medicine, <sup>4)</sup>New Drug Research Center. Inc, <sup>5)</sup>Sendai Open Hospital, Sendai city Medical care Center, <sup>6)</sup>Department of Pathology, Tohoku University, Graduate School of Medicine

**Purpose:** The therapeutic effect of hyaluronic acid (HA) on osteoarthritis (OA) was assessed in Kbl rabbits by histopathological examination.

**Materials:** An OA model was prepared in rabbits according to Ishiguro's method. Then an HA preparation (SUVENYL<sup>®</sup> HA [MW 2.7 million Da] or Synvisc<sup>®</sup> HA [mixture of cross-linked HA prepared from rooster's combs]) or saline was repeatedly injected into the left knee joint of the each rabbit. Knee joint tissues were fixed in 10% formalin and paraffin embedded specimens were routinely processed for histological examination.

**Methods:** The therapeutic effect of HA on joint cartilage was assessed from the following three sets of parameters: (1) maintenance of proteoglycan, HA, or type II collagen; (2) degeneration of the extra cellular matrix and cartilage, assessed by observing aggrecan degradation products or apoptotic cells; and (3) remodeling evaluated by staining with Ki67 or detection of hyaluronan synthase (HAS) 2 or 3 mRNA.

**Results:** The histological grade of OA for the tibial compartment was  $4.81 \pm 0.25$  in the saline group, and  $4.69 \pm 0.25$  in the SUVENYL<sup>®</sup> HA-treated group, and  $4.77 \pm 0.26$  in the Synvisc<sup>®</sup> HA-treated group, while the grade for femoral compartment were  $4.69 \pm 0.25$ ,  $4.35 \pm 0.43$  and  $4.38 \pm 0.30$ , respectively. The residual levels of proteoglycan, type II collagen, and HA were increased in the femurs of the two HA-treated groups compared with the saline group. In addition, the positive ratio of apoptosis and aggrecan degradation products were significantly decreased in the HA-treated groups compared with the saline group. Moreover, the number of Ki67 positive cells and the expression of HAS2 and HAS3 mRNAs were significantly greater in HA-treated groups than in the saline group. In the tibia, the trends of these parameters were similar to those for femur, but differences among the three groups were smaller.

**Conclusions:** Efficacy of HA was demonstrated by a reduction of parameters indicating cartilage damage, and an increase of parameters indicating a remodeling effect on cartilage.