

主論文の要旨

**Suppression of Murine Osteoarthritis by  
4-Methylumbelliferone**

〔 4-メチルウンベリフェロンによるマウス変形性関節症の抑制 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

土谷 早穂

## 【緒言】

ヒアルロン酸 (HA) は軟骨細胞外基質においてアグリカンと結合し軟骨の機能保持に極めて重要な役割を果たしており、HA の損失と変形性関節症 (OA) の関連が示唆されている。一方、我々は先行研究において HA の合成阻害剤である 4-methylumbelliferone (4-MU) がウシ及びヒト OA 軟骨細胞において MMP13, ADAMTS4, TSG6 の産生を抑制し、またインターロイキン 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) に刺激されたヒト OA 軟骨片から軟骨内グリコサミノグリカン及びサフラニン O 染色の損失を抑制することを *in vitro* にて報告した。さらにこの軟骨保護的な効果は 4-MU による HA 量減少にも関わらず確認された。興味深いことに我々の別の先行研究においてヒアルロン酸合成酵素 2 (HAS2) 遺伝子の過剰発現 (HAS2-OE) が軟骨細胞外の HA 増量とは独立した機序で 4-MU と同様に軟骨保護的な作用を有することも報告した。HA 合成に関しては相反する 4-MU と HAS2-OE に共通する作用機序は軟骨糖代謝の中で UDP-糖の代謝経路変化をもたらすことであり、これらの結果は OA の抑制に軟骨糖代謝の変化が関連していることを示唆するものであった。しかし我々の 4-MU 及び HAS2-OE を用いた先行実験はすべて *in vitro* であり *in vivo* での検討が必要であった。マウスを用いた Destabilization of the medial meniscus (DMM) 手術は *in vivo* OA モデルとして標準的な手法である。そこで *in vivo* において 4-MU が OA の進行を抑制する効果を持つかをこのモデルを用いて検討することを本研究の主目的とし、また 4-MU の軟骨保護的作用が軟骨糖代謝と関連があるかにも注目した。

## 【方法】

オス C57BL/6 マウス (12 週) の右膝に OA モデルとして DMM 手術を行った (DMM 群)。コントロール用のマウスには右膝 Sham 手術を行った (Sham 群)。経口飼料に 4-MU 5%を含有するものを作成し、チョコレート風味をつけた。対比として通常の経口飼料及びチョコレート風味のみ加えた経口飼料も用意した。DMM 群、Sham 群をさらに 4-MU 含有飼料群、コントロール飼料群に分け、術後からこれらの経口飼料を開始し、術後 2、4、8 週で右膝内側大腿脛骨関節面の OA 進行度をサフラニン O/fast green 染色の下 OARSI スコアを用い評価した。また右膝脛骨内側骨棘のサイズについても評価した。同部位の免疫組織染色で MMP13、MMP3 の発現割合も評価した。さらに 4-MU 含有飼料を手術 1 週間前から経口投与し、術後 2 週で評価する群及びチョコレート風味が影響を与えるかを対比する群も追加した。軟骨糖代謝変化の評価に対しては 6mm 径のウシ軟骨柱を IL1 $\beta$ 、4-MU 下 10 日間培養し、培養液内の蓄積した乳酸濃度を計測した。

## 【結果】

コントロール飼料群において DMM 群では Sham 群に比べ術後 2 週より有意に OA 変化が見られた。4-MU 含有の有無でみると、4-MU 含有飼料 DMM 群はコントロール飼料 DMM 群に比べ、術後 2 週から 8 週まで有意に OARSI スコアの低下を認めた。この

結果は 4-MU 含有飼料を術前から投与した群でも同様であった。チョコレート風味による影響は認められなかった (図 1、2)。また 4-MU 含有飼料により術後早期の 2 週において有意に MMP13、MMP3 の発現割合低下、術後 8 週にて有意に骨棘サイズの減少が認められた。IL1 $\beta$  を添加したウシ軟骨柱培養ではコントロールに比べ有意に培養液内の乳酸濃度の上昇を認めたが、4-MU を加えることで乳酸濃度はコントロールと同程度まで抑制された (図 3)。

### 【考察】

4-MU の有効性に関しては既にいくつかの *in vivo* の研究があるが、それらは主に炎症モデルに対するもので HA 合成阻害剤として HA 量に注目したものである。我々の目的は 4-MU が抗炎症効果を介してではなく軟骨変性変化を直接的に抑制する効果を持つかを解明することであり、我々の結果から滑膜炎が要因となる以前の早期すなわち 2-8 週においても 4-MU により OA の進行が抑制されることが示された。IL1 $\beta$  に刺激された滑膜を含まない軟骨柱においても 4-MU によりサフラニン O 染色の損失が抑制された結果も併せるとこれらは滑膜炎とは独立したものであり、*in vivo* においても 4-MU がその HA 合成阻害作用にも関わらず OA 進行抑制作用を持つことが示唆される。

4-MU に関する他研究において 4-MU を経口飼料に混ぜた場合最初の 1 週間は経口摂取を拒み体重減少が生じるとの報告があった。実際我々の結果においても初期に 10% 程度の一過性の体重減少が見られた。一方この程度の体重減少は DMM モデルによる OA 変化には影響を与えないという報告もあり、また我々の結果の OARSI スコアを体重で補正しても依然として 4-MU による OA 進行抑制効果に有意差が見られた。体重減少は我々の結果に影響を与えるものではないと考える。

4-MU の作用機序は HA の合成に必要な UDP-GlcUA と複合体を形成することで HA 合成を抑制することであり、これは軟骨細胞内の糖代謝経路変化が生じることを意味すると考える。HAS2-OE の研究においても HAS2-OE により UDP-GlcUA の消費量が増え糖代謝経路の変化が生じると我々は考えている。実際ヒト癌細胞において UDP-糖の代謝変化が細胞糖代謝経路変化を生じさせる報告があり、また OA では軟骨内代謝が正常軟骨に比べより嫌気性解糖に傾いていることも示唆されている。HA 合成に関しては相反する 4-MU 及び HAS-OE の軟骨保護的効果はこの糖代謝の経路変化にあるのではないかと我々は考えている。軟骨柱培養において IL1 $\beta$  添加により乳酸濃度の増加を認め、この変化が 4-MU 添加により抑制されたことは、OA 進行において嫌気性解糖に傾きつつある糖代謝経路を 4-MU が UDP-GlcUA を消費することで糖代謝の変化が生じ嫌気性解糖を抑え、結果 OA の進行抑制につながるのではないかと考える。

### 【結語】

DMM 手術後のマウス変形性関節症の進行が 4-MU により抑制され、軟骨内の糖代謝経路で嫌気性解糖を抑えることがその機序として示唆された。