

学 位 論 文 題 名

A study on keratan sulphate as a molecular marker
to monitor cartilage metabolism in horses

（ウマにおける軟骨代謝を検索するための分子マーカーとしての
ケラタン硫酸に関する研究）

学位論文内容の要旨

関節障害の程度およびその病態を具体的に把握することは、通常非常に困難である。関節障害発症機序のいずれの場面において滑膜炎が最も重要な役割を演じているかについては明らかではないが、関節疾患の初期、すなわち、X線検査で明らかな病変が発見される前に関節内では軟骨の大きな傷害が発生する。初期の炎症性関節疾患における軟骨および骨病変の状態を評価するための感度の高い検査手法は、臨床獣医師が関節疾患のより正確な診断と適切な治療法を選択する上で有用である。

関節軟骨は、非常に多くの細胞外基質の中にその実質細胞である軟骨細胞が散在する特殊な組織である。通常の代謝過程において、基質中のプロテオグリカン分子は一定の速度で小断片に分解され、軟骨に隣接する体液中に拡散する。体液中に拡散したそれらプロテオグリカン断片は、コンドロイチン硫酸あるいはケラタン硫酸等のグリコサミノグリカンとして血液や尿中で確認される。ケラタン硫酸は、軟骨の細胞外基質に多く存在するグリコサミノグリカンであり、軟骨以外では角膜などの組織にわずかに存在するのみである。そのため、血中あるいは関節液中における代謝産物としてのケラタン硫酸を測定することは軟骨固有の基質代謝をほぼ反映しているものと考えられ、ケラタン硫酸は非侵襲的な軟骨代謝マーカーとして期待されるようになった。

本研究は、ウマにおいて関節軟骨代謝の変動から関節疾患の病態を把握することを目指し、1) ウマケラタン硫酸を特異的に認識するモノクローナル抗体を開発し、高感度のケラタン硫酸測定法を開発すること、2) ペレット培養法を応用し

た*in vitro*培養軟骨細胞を、インスリン様成長因子(IGF)-I α 、形質転換成長因子(TGF)- β 1およびインターロイキン(IL)-1 α で刺激し、関節軟骨代謝を変動させて培養液中およびペレット中のケラタン硫酸濃度を、本研究で新たに開発した抗ウマケラタン硫酸抗体および抗ヒトケラタン硫酸抗体の2種類を用いて測定し、ケラタン硫酸測定の意義を評価すること、および3)ウマの血清および関節液を用いて、成長、機械的刺激による短期の代謝変動、実験的および自然発症の関節炎におけるケラタン硫酸濃度の変動を評価し、軟骨代謝におけるケラタン硫酸濃度測定の意義を検討することを目的とした。

まず、ウマの血清および関節液中ケラタン硫酸濃度を測定する酵素免疫測定法を開発するために、ウマのケラタン硫酸を特異的に認識する高感度のモノクローナル抗体(1/14/16H9)を作成した。開発したモノクローナル抗体を用いて競合酵素免疫測定法を最適化し、臨床的に正常なウマおよび関節炎発症馬から得られた血清48材料および関節液18材料のケラタン硫酸濃度を測定した。最適化した測定法では、ケラタン硫酸濃度が10から160 ng/mlの範囲で測定でき、同一測定内誤差および時差測定間誤差がそれぞれ10.0%および12.7%であった。

次に、本研究で開発した抗ウマケラタン硫酸抗体1/14/16H9と市販の抗ヒトケラタン硫酸抗体1/20/5D4に反応するケラタン硫酸の軟骨代謝マーカーとしての有用性を、*in vitro*培養軟骨モデルを用いて評価した。6か月齢のサラブレッド種ウマ3頭から関節軟骨を採取し、軟骨細胞に分離後、遠心管内でペレットとして培養した。軟骨細胞をIGF-I α 、TGF- β 1あるいはIL-1 α を添加した培養液で2週間培養し、ペレット中あるいはその培養液中のポリ硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)およびケラタン硫酸(1/14/16H9および1/20/5D4)濃度を、それぞれ1,9-ジメチルメチレンブルー比色定量法および競合酵素免疫測定法によって定量した。培養液中のGAG濃度は、IGF-I α およびTGF- β 1添加によって有意に増加した。ペレット中のGAG濃度は、IGF-I α の添加によって有意に増加したが、TGF- β 1の添加では有意な変化はみられなかった。一方、GAG濃度と抗ウマケラタン硫酸抗体1/14/16H9および抗ヒトケラタン硫酸抗体1/20/5D4に反応するケラタン硫酸濃度を比較したところ、IL-1 α 添加時にGAG濃度とケラタン硫酸は高い相関性(GAGと1/14/16H9抗体:0.87; GAGと1/20/5D4抗体:0.84)を示したが、IGF-I α 添加時には、その相関性は低かった(GAGと1/14/16H9抗体:0.43; GAGと1/20/5D4抗体:0.59)。

以上の結果から、これら2つの抗体(1/14/16H9および1/20/5D4)によっ

て測定されるケラタン硫酸濃度は、主に軟骨異化を示すマーカーとして有用であると考えられ、場合によっては軟骨同化をも反映する可能性があると考えられた。

最後に、*in vivo* における軟骨代謝マーカーとしてのケラタン硫酸の臨床的な有用性を評価するため、今回作成した抗ウマケラタン硫酸抗体1/14/16H9および抗ヒトケラタン硫酸抗体1/20/5D4を用いて、ウマの成長過程、機械的刺激による短期の代謝変動、および実験的ならびに自然発症の関節炎における血清および関節液中ケラタン硫酸濃度を測定した。

出生直後から3か月齢までの血清ケラタン硫酸濃度（1/14/16H9および1/20/5D4）は4か月以降のそれと比較して有意に高値を示した。また、関節疾患を発症した3頭のウマの血清ケラタン硫酸濃度（1/14/16H9および1/20/5D4）は正常に発育した12頭のウマのそれに比較して著しく高値を示した。

トレーニング中のウマでは、3および4歳馬に比較して2歳馬で血清ケラタン硫酸濃度（1/14/16H9および1/20/5D4）が有意に高値を示した。常時運動を行っている2歳馬では6か月以上休養している2歳馬に比較して血清ケラタン硫酸濃度が有意に高値を示した。また、運動直後の血清ケラタン硫酸濃度（1/14/16H9および1/20/5D4）は、運動直前のそれに比較して有意に増加し、運動終了後1時間以内に運動直前のレベルに低下した。

キモパイン関節内投与によって実験的に変形性関節症を作出したウマにおける血清および関節液中のケラタン硫酸濃度を測定した。キモパイン投与3日目の1/14/16H9および1/20/5D4抗体で測定した血清ケラタン硫酸濃度は、投与前のそれぞれ1.9および1.4倍に増加した。同様に関節液中ケラタン硫酸濃度（1/14/16H9および1/20/5D4）はキモパイン投与3日目に、投与前の約4倍に増加した。また、変形性関節症を自然発症したウマにおける関節液中ケラタン硫酸濃度は、正常のウマのそれと比較して両抗体とも有意な変動はみられなかった。一方、血清中ケラタン硫酸濃度は、正常のウマのそれと比較して両抗体とも高い傾向が認められた。

本研究で作出した抗ウマケラタン硫酸抗体1/14/16H9、および抗ヒトケラタン硫酸抗体1/20/5D4によって測定されたケラタン硫酸濃度は、生体のウマの関節における関節異化を理解する上で有用な指標になり得ることが、*in vitro* 培養軟骨モデルを用いた試験で示された。また、馬の血清および関節液を用いた試験においても、1/14/16H9抗体と1/20/5D4抗体それぞれに反応するケラタン硫酸濃度の比較によって、軟骨基質が異化あるいは同化作用をうけている状況を把握する

のに有用であることが示された。ウマの関節疾患の病態を把握する上で、ケラタン硫酸の測定は特に軟骨の損傷を表現する、非侵襲的かつ直接的な情報を提供するマーカーであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 永 徹

副 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 教 授 梅 村 孝 司

副 査 教 授 岩 永 敏 彦

学 位 論 文 題 名

A study on keratan sulphate as a molecular marker to monitor cartilage metabolism in horses

(ウマにおける軟骨代謝を検索するための分子マーカーとしての
ケラタン硫酸に関する研究)

関節障害の程度およびその病態を客観的に把握することは通常困難である。関節疾患の初期には関節軟骨の代謝異常が生ずるため、その程度を評価する手法は関節疾患の病態解析のために非常に有用である。

申請者は、ウマにおいて関節軟骨代謝の変動から関節疾患の病態を把握することを目的に高感度のケラタン硫酸測定法を開発し、さらに軟骨代謝を検索するための分子マーカーとしての本法の意義を明らかにした。

まず、ウマのケラタン硫酸を特異的に認識する高感度のモノクローナル抗体1/14/16H9を作出し、この抗体と抗ヒトケラタン硫酸抗体1/20/5D4の両者を用いた競合酵素免疫測定法を最適化した。

次に、ケラタン硫酸の軟骨代謝マーカーとしての有用性を*in vitro*培養軟骨を用いて評価した。培養液にインスリン様成長因子- $I\alpha$ 、形質転換増殖因子- $\beta 1$ あるいはインターロイキン- 1α を添加して軟骨基質代謝を変動させ、軟骨中あるいは培養液中のグリコサミノグリカン およびケラタン硫酸濃度を定量・比較した。さらに、成長過程の馬、運動前後の馬、実験的および自然発症の関節炎馬における血清および関節液中ケラタン硫酸濃度の変化を評価した。これらの結果から、ケラタン硫酸濃度の測定は、軟骨基質が異化あるいは同化作用をうけている状況を把握する上で有用であり、両抗体の測定値の比較によって、より精度の高い軟骨代謝分析ができる可能性が示唆された。

以上のように申請者は、血清および関節液中ケラタン硫酸濃度が、特に軟骨の損傷を表現する非侵襲的かつ直接的な情報を提供するマーカーであることを明らかにした。本研究の成果は、獣医臨床における各種関節疾患の病態解析に大きく貢献するものと判断された。よって、審査員一同は奥村正裕氏が博士（獣医学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。