総説

関節軟骨と血管新生

村田三奈子¹⁾, 増子佳世²⁾

¹⁾ 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

²⁾ 聖マリアンナ医科大学大学生化学教室

要旨: 関節軟骨は無血管組織であるが、軟骨の分化や骨化において、あるいは関節疾患における組織変性において、vascular endothelial growth factor (VEGF) などの血管新生因子の関わりが最近示唆されている。これらの因子は、軟骨組織における低酸素環境によって発現が誘導されることが知られており、病変関節においては、炎症による酸素分圧の低下が、VEGF 発現誘導などを介して関節破壊を悪化させる可能性がある。今後、軟骨における低酸素の制御、および血管新生因子の発現抑制を介した、新たな関節疾患の治療戦略の確立も期待される。

キーワード: 関節軟骨、軟骨細胞、変形性関節症、VEGF

はじめに

変形性関節症 (osteoarthritis: OA) や、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) などの関節疾患は、痛みのみならず、関節の可動域 (運動) 制限をきたすと患者の日常生活動作が妨げられることから、“生活の質” の低下につながる疾患であり、根本治療の開発が望まれているものの、いまだその病因は明らかになっていない。

OA や RA の患者においては、病期が進むにつれ罹患関節に変形がみられることが多い。このような関節変形は、各疾患において病因、病態に若干の量的ないし質的違いはあるものの、いずれも、関節を構成する骨の関節面に存在する関節軟骨の変性 (摩耗や菲薄化など) が起こり、引き続いて関節構造が破壊されていくという過程をたどることが知られている。

関節の変性・破壊には炎症性・非炎症性の多くの要因が関与しているが、最近、血管新生を促進する因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) などの分子が、通常無血管組織である軟骨においても、その変性過程に関わっていることが明らかになってきた。本稿では、最近の軟骨破壊に関する血管新生因子の関与について、我々の成果もまじえな

がら報告し、軟骨変性抑制に向けた新たなアプローチの可能性について考察したい。

関節軟骨

関節軟骨は軟骨細胞と細胞外マトリックスにより構成されている。細胞外マトリックスは、軟骨細胞から合成されるプロテオグリカン、II 型コラーゲンなどのコンポーネントから成り立っている。軟骨細胞は、マトリックス成分を産生する同化作用と併せ、一方ではさまざまな刺激に応じて炎症性サイトカインであるインターロイキン (interleukin: IL) -1, 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) - α や、蛋白分解酵素であるマトリックス・メタロプロテナーゼ matrix metalloproteinase (MMP) ・アグリカナーゼなどを産生し、細胞外マトリックスを破壊する負の代謝機能も有している。正常状態ではこれらのバランスが保たれてマトリックスのターンオーバーが正常に機能することにより、関節軟骨組織の構造が維持されている。しかし、加齢や炎症性疾患などによって軟骨のマトリックス産生が低下するか変性作用が上昇すると、マトリックス構造は強度が低下し、次第に変性・破壊が進行することになる。

関節軟骨組織は、生理的には血管が存在しない無

血管組織である。従って、栄養や各種液性因子、および酸素の軟骨への主な供給源は、滑膜細胞から分泌され関節腔内に少量存在する関節液からの浸潤によるのみとなる。このことから、軟骨組織は平常状態においても、他の組織に比較して低酸素状態となっており、力学的負荷や炎症による消費の亢進によって、関節軟骨における酸素分圧はさらに低下することが知られている。1970年にLund-Olesenが、関節液中の平均酸素圧は正常状態で63mmHg、一方、炎症性関節疾患であるRAでは27mmHg、OAでは43mmHgと報告している(Lund-Olesen 1970)。

軟骨における低酸素と VEGF

VEGFはplatelet derived growth factor (PDGF)/VEGF成長因子ファミリーに属するホモダイマー蛋白である。VEGFはVEGF-AからVEGF-Fまで、さらにplacental growth factorを含めたVEGFファミリーを構成することが知られているが、*Vegf/Vegf-A*遺伝子にコードされるVEGF-Aが通常、単にVEGFとして解析されている主要な分子である(本稿でもVEGF-AをVEGFとする)。VEGFはさらにスプライシングにより数種類のアイソフォームを生じるが、それらアイソフォームは細胞マトリックスや受容体との結合性が若干異なっている。VEGFは血管内皮細胞を始めさまざまな細胞によって産生され、特異的チロシンキナーゼ受容体(VEGFR)を介したシグナルにより、血管新生のほか、細胞増殖やアポトーシス制御などの作用を示し、創傷治癒にも関わっていることなどが報告されている。

血管新生は低酸素刺激によって促進されることが多くの組織で証明されており、低酸素時に活性化する転写因子Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α)によって、VEGFの発現が誘導されることが明らかになっている(Lin et al. 2004)。具体的には、VEGF遺伝子に存在するhypoxia response element(HRE)にHIF-1 α が結合してVEGF発現を誘導する。

2003年にEnomotoらが、ヒト軟骨組織におけるVEGFおよびその受容体の発現を初めて報告した。彼らは、VEGFのアイソフォームVEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, and VEGF₁₈₉が、OA患者由来軟骨および正常軟骨に発現していることを見いだした。OA軟骨は、VEGF受容体VEGFR-1およびVEGFR-2も発現していた。興味深いことに、組織におけるVEGF発現の程度と、関節炎の進展度のスコアであるMankinスコアとに相関が見られた。さらに彼らは、VEGFで刺激した培養軟骨細胞においては、MMP-1およびMMP-3

産生が増加したと報告している。これらの結果は、VEGFが、軟骨組織および軟骨細胞において、マトリックス代謝(変性)に関わっていることを示唆する。一方、低酸素ストレスのみならず、軟骨組織においては、荷重により関節にかかる機械的(メカニカル)ストレスによってもVEGF発現が誘導されることが報告されている(Pufe et al. 2004)。

この点において、我々は最近、炎症性サイトカインであるIL-1で刺激することにより、ヒト軟骨細胞からのVEGF発現が誘導されることを見いだした(Murata et al. 2006)。このとき、IL-1刺激からVEGF発現に至るシグナルについて、HIF-1 α を介した経路と、必ずしも介さない経路の存在とが想定された。IL-1は病変関節においては正常よりも高濃度に存在する炎症性サイトカインであることから、関節局所での炎症反応(IL-1産生増加など)それ自体と低酸素環境とが、別個の経路によって軟骨局所のVEGF産生を制御し、病態形成に寄与している可能性が示唆される。

関節の炎症と血管新生

前述の通り、関節軟骨は無血管組織であり、基本的には低酸素環境に順応した組織であると考えられる。正常軟骨におけるVEGF発現は、病変部軟骨に比べてその程度は低い(Enomoto et al. 2003)。しかし、関節局所で炎症が生じた場合、軟骨における酸素分圧は平常時よりもさらに低下し、関節腔および軟骨細胞自体から、IL-1、IL-6、TNF- α 、ケモカイン、プロスタグランジンなどの各種炎症性因子の産生が促進されるとともに、VEGFなどの血管新生増加因子や各種成長因子の発現増加が認められる(Fenwick et al. 1999; Enomoto, Inoki et al. 2003; Bonnet and Walsh 2005)。このようなVEGFの発現増加により、軟骨下骨より血管の侵入が生ずるのではないかと考えられている(Jackson et al. 1997; Pufe, Lemke et al. 2004; Murata, Yudoh et al. 2006)。OAにおいては、軟骨辺縁からの血管新生と細胞増殖による修復反応が、骨棘の形成を導くことが示されている(Brown and Weiss 1988)。

軟骨における VEGF の作用

VEGFの軟骨における作用は、これまで主に軟骨の成熟や分化に関する分野において検討されてきた。例えばCarlevaroらは、新生児軟骨にはVEGFおよびVEGF受容体が発現していることを報告し、

autocrine/paracrine な作用によって軟骨における血管新生および軟骨細胞の分化に関与することを示唆している (Carlevaro et al. 2000)。軟骨の骨化様式の1つである内軟骨骨化においては、骨化過程における血管新生の重要性が報告されているが、このとき VEGF が重要な役割を果たすことが明らかとなっており、例えば VEGF を不活化またはノックアウトしたマウスにおいては血管新生が減少するほか、肥大軟骨細胞の骨化が減少し、胎生期骨形成不全を生じることが報告されている (Gerber et al. 1999; Haigh et al. 2000)。

一方、正常なヒト成人関節軟骨細胞は、もはや分化増殖能をもたない成熟軟骨細胞から構成され、若年者にみられる成長軟骨とは性質が異なっている。このような成熟軟骨における VEGF の作用の詳細、とくに骨軟骨病変の病態形成への関わりは未だ解明されていないのが現状である。しかし、OA の特徴的な病変である骨棘形成時に出現する肥大軟骨細胞様細胞において、VEGF が発現しているとの報告があり、OA の病態形成における VEGF の関与が示唆されている (Hashimoto et al. 2002)。また最近の報告において、VEGF が軟骨細胞からの MMP-1, MMP-3, MMP-13 の発現を増加させる可能性が示されている。これらの MMPs はいずれも、軟骨の細胞外マトリックスを破壊し軟骨変性を進展させることが知られている (Tetlow et al. 2001) ことから、VEGF が

関節破壊の進展にも関与しうることが想定される。一方、Kim らは、リウマチ滑膜細胞を用いた検討から、VEGF が受容体 neuropilin-1 との相互作用を介し、抗アポトーシス因子 Bcl-2 の発現を誘導することによって、滑膜細胞をアポトーシス細胞死から保護していると報告している (Kim et al. 2006)。軟骨細胞においては、Bcl-2 は転写因子 Sox9 を介して細胞外マトリックス産生制御に関わっていることが報告されていることから (Yagi et al. 2005)、正常もしくは病変部関節軟骨において、VEGF-Bcl2-Sox9 の連関によるマトリックス制御機構の存在が示唆され、今後の検討による臨床との関連の解明が期待される。

終わりに

新生児にみられる成長軟骨は、成人の関節軟骨とは性質が異なっている。同一起源の軟骨細胞であっても、このように各々のライフステージにおいて性質が変化することから、軟骨の分化成熟に関わる血管新生および血管新生因子の役割も、加齢とともに変化していく可能性がある (Murata et al. 2008a) (図 1)。

関節軟骨細胞は分化を続けるとともにマトリックス成分を生成するダイナミックな代謝を営んでおり、年齢段階や分化・脱分化により細胞のフェノタイプが変化していく。この点において、血管新生

図 1 成長軟骨における血管新生は骨形成に重要な役割をになう。成長が完了し成熟期を迎えると血管新生は抑制され、関節軟骨細胞は軟骨組織の維持に働く。細胞老化にともない、様々なストレスがトリガーとなり、血管新生を誘導し関節炎の一因になりうる可能性がある (Murata et al. 2008a)。

およびそれを制御する各種液性因子、およびその受容体がいかなる形で軟骨組織の形成に関与しているかを解明するのは未だ難しい仕事である。しかし、VEGFにより細胞のアポトーシスやMMP発現が制御される可能性があることなどから、関節軟骨における低酸素、および低酸素によって発現が誘導されるVEGFなどの因子、さらにそれにより惹起される血管新生といったプロセスの解明は、関節変性のメカニズムを検討する上で新たな視点を提供する課題であると考えられる。

血管新生因子は、血管新生の誘導以外にも多彩な作用を有することが判明してきている。VEGFによるアポトーシス制御などのほか、例えば最近注目されているアンギオポエチン関連因子Angiopoietin-like-4 (ANGPTL4)は、血管新生を促進させる一方、生体の脂質代謝および脂質異常症の病因病態に深く関与していることが明らかとなりつつある。我々は最近、ヒト関節軟骨細胞がANGPTL4を発現していることを見いだしており (Murata et al. 2008b)、今後、関節軟骨変性へのANGPTL4の作用についても興味を持たれる。

文献

- Bonnet CS and Walsh DA (2005) Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 44: 7-16
- Brown RA and Weiss JB (1988) Neovascularisation and its role in the osteoarthritic process. *Ann. Rheum. Dis.* 47: 881-885
- Carlevar M, Cermelli S, Cancedda R and Cancedda F (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J. Cell Sci.* 113: 59-60
- Enomoto H, Inoki I, Komiya K, Shiomi T, Ikeda E, Obata K, Matsumoto H, Toyama Y and Okada Y (2003) Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *Am. J. Pathol.* 162: 171-181
- Fenwick SA, Gregg PJ and Rooney P (1999) Osteoarthritic cartilage loses its ability to remain avascular. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 441-452
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z and Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* 5: 623-628
- Haigh JJ, Gerber HP, Ferrara N, and Wagner EF (2000) Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development* 127: 1445-1453
- Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Takahashi K, Amiel D, Coutts R and Lotz M (2002) Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cart.* 10: 180-187
- Jackson JR, Minton JA, Ho ML, Wei N and Winkler JD (1997) Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1beta. *J. Rheumatol.* 24: 1253-1259
- Kim WU, Kang SS, Yoo SA, Hong KH, Bae DG, Lee MS, Hong SW, Chae CB and Cho CS (2006) Interaction of vascular endothelial growth factor 165 with neuropilin-1 protects rheumatoid synoviocytes from apoptotic death by regulating Bcl-2 expression and Bax translocation. *J. Immunol.* 177: 5727-5735
- Lin C, McGough R, Aswad B, Block JA and Terek R (2004) Hypoxia induces HIF-1alpha and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 22: 1175-1181
- Lund-Olesen K (1970) Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum.* 13: 769-776
- Murata M, Yudoh K and Masuko K (2008a) The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 16: 279-286
- Murata M, Yudo K, Nakamura H, Chiba J, Okamoto K, Suematsu N, Nishioka K, Beppu M, Inoue K, Kato T and Masuko K (2008b) Hypoxia upregulates the expression of angiopoietin-like-4 in human articular chondrocytes: Role of angiopoietin-like-4 in the expression of matrix metalloproteinases and cartilage degradation. *J. Orthop. Res.* 27: 50-57, 2009
- Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T, Inoue K, Chiba J, Nishioka K and Masuko-Hongo K (2006) Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 24: 1544-154
- Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ and Mentlein R (2004) Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *Am. J. Pathol.* 164: 185-192
- Tetlow LC, Adlam DJ and Woolley DE (2001) Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage:

associations with degenerative changes. Arthritis Reum.
44: 585-594

Yagi R, McBurney D and Horton WE, Jr. (2005) Bcl-2

positively regulates Sox9-dependent chondrocyte gene
expression by suppressing the MEK-ERK1/2 signaling
pathway. J. Biol. Chem. 280: 30517-30525

A Potential Role of Angiogenetic Factors in Cartilage Degradation

Minako Murata¹ and Kayo Masuko²

¹Institute of Medical Science and ²Department of Biochemistry
St. Marianna University School of Medicine
2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki-shi
Kanagawa 216-8511 Japan

Abstract: Although articular cartilage is an avascular tissue, accumulating evidence suggests that angiogenesis and angiogenesis-related factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) could be involved in the pathophysiology of arthritis. Expression of the angiogenic factors are known to be regulated by hypoxic stimuli, thus indicating a hypoxia-angiogenesis axis occurring in the inflammatory joint milieu which might lead to cartilage destruction. Further investigations may open an avenue to establish a novel strategy against arthritis, by targeting the angiogenic process in articular cartilage.

Key words : *articular cartilage, chondrocyte, osteoarthritis, VEGF*