

*Review article***Hyaluronic acid and articular cartilage**Mari Ogura<sup>1,2)</sup>, Wakako Takabe<sup>1)</sup>, Masayuki Yagi<sup>1)</sup>, Yoshikazu Yonei<sup>1)</sup>1) Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center, Faculty of Life and Medical Sciences,  
Doshisha University, Kyoto, Japan

2) Kyoto Bunkyo Junior College, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2018; 5 (1): 012-020

(c) Society for Glycative Stress Research

(総説論文－日本語翻訳版)

**ヒアルロン酸と関節軟骨**小椋真理<sup>1,2)</sup>、高部稚子<sup>1)</sup>、八木雅之<sup>1)</sup>、米井嘉一<sup>1)</sup>

1) 同志社大学大学院生命医学研究科アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター、京都

2) 京都文教短期大学食物栄養学科、京都

**抄録**

ロコモティブシンドロームの代表的な原因疾患である変形性関節症 (osteoarthritis: OA) は「関節軟骨の変性や物理的摩耗の影響によって惹起される二次性滑膜炎および軟骨・骨の新生増殖性変化などに基づく進行性の関節変性疾患」と定義される。OA の発症には加齢、機械的ストレス、酸化ストレスによる軟骨基質マトリックスの組成変化、それに伴って誘導される軟骨基質マトリックスの障害が惹起されることが明らかにされてきた。本総説では OA 発症初期に生じる関節軟骨組織に障害が生じる機序について、マトリックス構成因子ヒアルロン酸 (hyaluronic acid: HA) に焦点を当てて概説する。OA 患者あるいは OA モデル動物では早期の段階から HA の断片化、軟骨の組織の遊出が生じること、HA により抑えられてマトリックス分解酵素が活性化することが示されており、その結果として関節基質マトリックスに障害を生じる。外来 HA 投与がこれらの反応を一部緩和することが示されているが、障害を受けた軟骨は炎症性サイトカインを放出し、HA 分解酵素、アグリカン分解酵素などマトリックス分解酵素が誘導されるが、外来性 HA はマトリックス分解系酵素誘導に対し抑制的に作用し、軟骨からのマトリックス遊離 (HA やアグリカンの喪失) を緩和し、関節保護的に作用すると考えられる。しかし米国整形外科学会 (American Academy of Orthopaedic Surgeons: AAOS) は HA 関節内腔投与を推奨しない方針を掲げた。OA 予防のためには、軟骨基質マトリックスの障害機序を明らかにし、初期兆候を早期に見極め、早い段階から OA への進展を阻止する対策を施行することが重要である。

**KEY WORDS:** ヒアルロン酸 (hyaluronic acid)、ヒアルロナン (hyaluronan)、関節軟骨変性、変形性関節症 (osteoarthritis)、アグリカン (aggrecan)

## はじめに

我々の研究室はSIP(戦略的イノベーション創造プログラム)に参画している。これは日本を代表する複数の食品企業が有望な食品成分を提供、あるいは技術的な参加をすることにより、産官学からなる研究班を作り上げ、身体ロコモーション機能維持効果を持つ次世代機能性農林水産物・食品を開発することを目的とする。

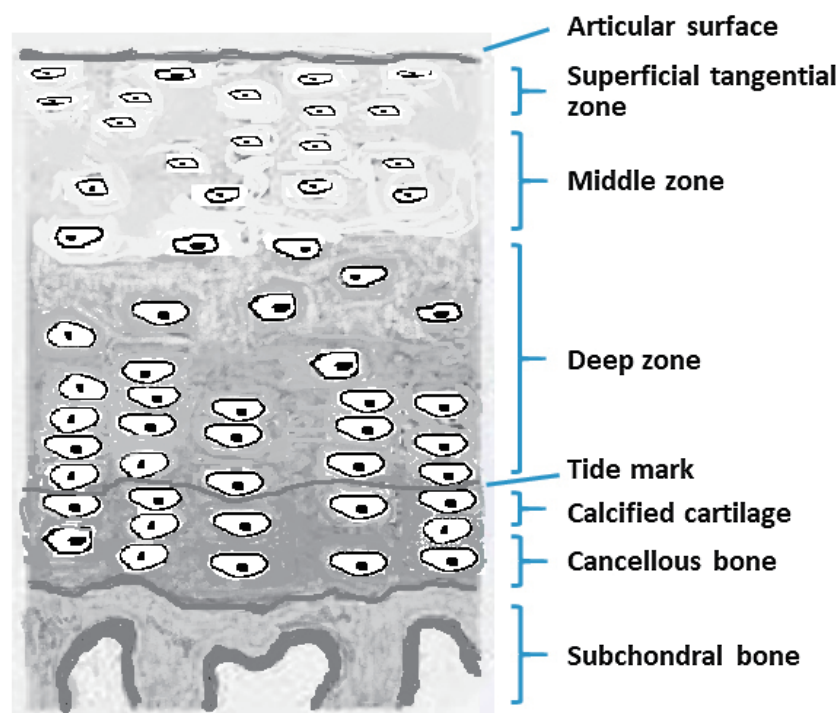
背景には、高齢化の進展が著しい我が国において、高齢者を含む国民の生活の質(QOL)の維持・向上は、社会全体の活力維持に必要不可欠であることが挙げられる。高齢者においては、日常生活動作(身体ロコモーション)機能が低下し、自立して生活を送るのが難しい要介護認定者が急増していることから、身体ロコモーション機能低下の原因を探り、その予防策を講じることが必要である。

変形性関節症(osteoarthritis: OA)はロコモティブシンドローム(ロコモ)の要因の一つである。関節軟骨及び関節基質マトリックスに生じる初期兆候を見極め、OA発症に至るまでの段階で進行を阻止することは予防の観点から重要である。腰痛やOAに伴う膝関節痛に焦点をあてた機能性食品としてヒアルロン酸(hyaluronic acid:

HA)やグルコサミンが商品化されている。関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)やOAの発症機序として糖化ストレスの関与が近年報告され<sup>1-5)</sup>、HAとの関連も示唆されている。本論文ではHAとOAに関する情報について解説する。欧米ではhyaluronic acidの名称よりも足場としてのhyaluronanの名称が好んで用いられるが、本論文では双方ともHAとして記載する。

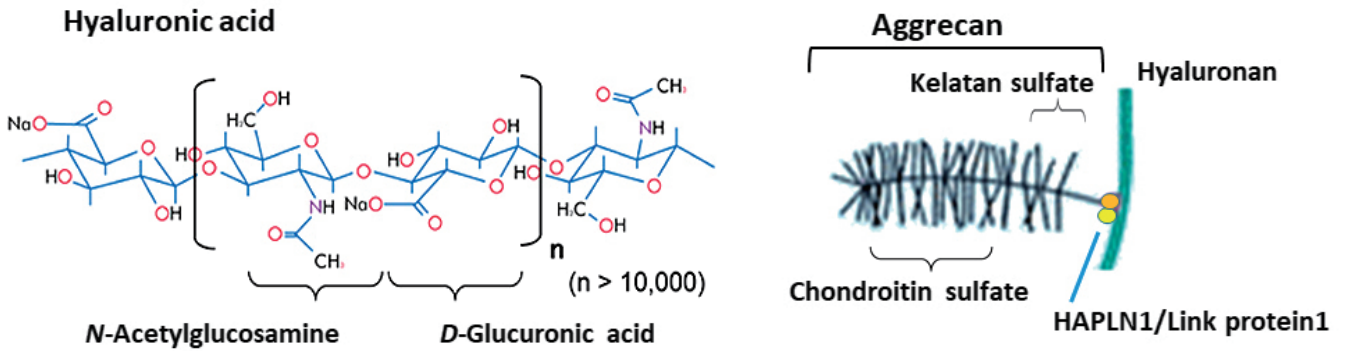
## 関節におけるアグリカン

関節軟骨の構造をFig. 1に示す。細胞間隙はプロテオグリカンファミリーの一員であるアグリカンに満たされている。アグリカンは糖と蛋白の複合体で、一般に分子量は数十万ダルトン以上、生体成分として多様な機能性を持ち、軟骨における主成分である。アグリカンは、コラーゲンやHA(Fig. 2)とマトリックスを作ることで軟骨をはじめとする関節組織を維持している(Fig. 3)。これらの成分は、組織形成や伝達物質としての役割など、組織維持修復に



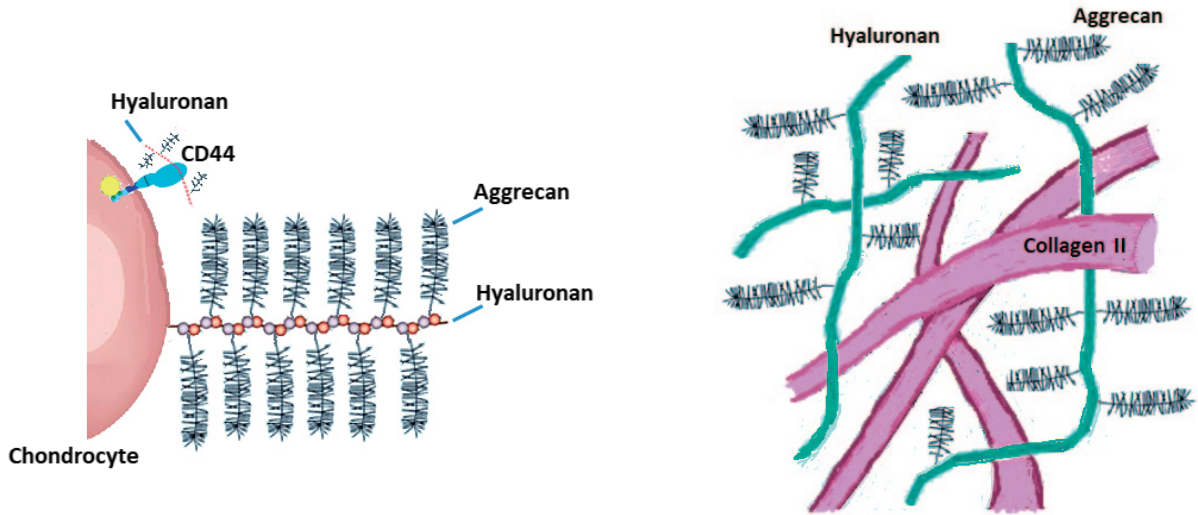
**Fig. 1.** Schema of cartilage tissues.

Cartilage tissues are resilient fibrous connective tissues and consist of cartilage cells, cartilage matrix of intercellular substances and perichondrium covering cartilage.



**Fig. 2. Structure of hyaluronic acid.**

HA has the structure of bound disaccharide unit of N-acetylglucosamine and D-glucuronic acid, with a high molecular weight, of more than several hundred thousand, often reaching millions. HA, hyaluronic acid.



**Fig. 3. Configuration of articular cartilage matrix..**

Aggrecan is a cartilage-specific proteoglycan core protein or chondroitin sulfate proteoglycan/keratan sulfate proteoglycan with a molecular weight of 2,500 kDa. Aggrecan is formed in a manner where core protein binds with keratan sulfate/chondroitin sulfate. Aggrecan binds with hyaluronic acid through HAPLN1/Link protein1. Hyaluronic acid functions as scaffolding for the matrix and binds to cartilage tissues through CD44. Hyaluronic acid, also through integrin and ICAM-1, binds to cartilage tissues. Normal hyaline cartilage consists of type II collagen microfibril and aggrecan. HAPLN1, hyaluronan and proteoglycan link protein 1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1.

関係する機能性成分である。アグリカンの多糖類部分であるグリコサミノグリカンと呼ばれ、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸がこれに相当する<sup>6-8)</sup>。

HAは主に表面細胞間および血管周囲腔の結合組織、コンドロイチン硫酸は高度に線維性な部分および血管周囲結合組織、デルマタン硫酸は表面間質および血管内皮細胞、ヘパラン硫酸は血管内皮細胞の部分に分布する<sup>7)</sup>。

RAやOAに伴う関節の炎症や加齢による退行性変化によりアグリカンやHAの局在ならびに量的・質的な変化をきたす。アグリカンにはコンドロイチン硫酸に富むものとケラタン硫酸に富むものがあり、後者は加齢とともに増加し、HAとの会合状態も変化する<sup>9)</sup>。

老化促進モデルマウス (SAMP8 および SAMR1) の顎関節下顎頭軟骨では、加齢により I 型コラーゲンおよび HA 結合蛋白 (HA-binding protein: HABP) の染色性低下、II 型および X 型コラーゲン染色性の増加がみられる<sup>10)</sup>。

OAにおける関節軟骨破壊の過程にはアグリカンマトリックスの分解が関わる。軟骨細胞外マトリックスは HA-アグリカンネットワークと II 型コラーゲン線維が相互作用により高次構造を形成している<sup>11)</sup>。HAはアグリカンと結合して関節軟骨を荷重から保護すると共に軟骨表面で潤滑化作用を発揮する<sup>12)</sup>。関節軟骨破壊では、HA-アグリカンネットワークが分解され、次いでコラーゲン線維分解へと進行する。細胞外マトリックスの分解には MMP (matrix metalloproteinase) と ADAMTS (a disintegrin and

metalloproteinase with thrombospondin motifs) 遺伝子ファミリー分子が重要な役割を果たす<sup>11)</sup>。関節軟骨破壊初期のアグリカン分解にはアグリカナーゼと呼ばれる ADAMTS4 や ADAMTS5 が主役を演じ、HA 分解には HYBID (hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization: KIAA1199) が重要である。

このように骨軟骨代謝はマトリックス生成と分解のバランスの上に成り立っている。機械的ストレスや酸化ストレス、炎症は分解系酵素を誘導し、高回転型の軟骨質の劣化を生じる。

## ヒアルロン酸

HA は全身臓器に分布するが、関節では関節滑膜から産生されて関節液の主成分となっている他、関節軟骨アグリカンの構成成分である<sup>13)</sup>。HA は保水性<sup>14-16)</sup>、関節の潤滑<sup>12, 17-21)</sup>、細胞間接着<sup>22, 23)</sup>、免疫調整作用<sup>24)</sup>に重要な役割を有する。

HA ではヒトの血中にも存在し、臨床的には関節疾患 (OA, RA など)、肝線維化の指標として用いられている。血中 HA 濃度は松浦らでは健常者:  $30.1 \pm 16$  ng/mL、RA 患者:  $220 \pm 204$  ng/mL、OA 患者:  $55.3 \pm 31$  ng/mL<sup>25)</sup>、中園らでは健常者:  $42.2 \pm 45.6$  ng/mL、RA 患者:  $372.5 \pm 401.2$  ng/mL<sup>26)</sup>、山田らでは健常者:  $33.7 \pm 24.2$  ng/mL、RA 患者:  $350.7 \pm 689.5$  ng/mL<sup>27)</sup>であり、RA 患者で高値である。血中 HA 濃度は CRP、WBC、進行ステージと相関がある。OA では疼痛症状や病期の進行に伴って血清 HA 濃度が上昇、RA では関節破壊の進行に伴って血清 HA 濃度が上昇する<sup>13)</sup>。

関節液中 HA 濃度は健常者 (平均 27.5 歳)  $3.4$  ng/mL である<sup>28)</sup>。関節液中 HA 濃度は健常者では加齢に伴い減少するが、OA 患者では加齢による変化はみられない<sup>29-31)</sup>。

OA では健常者に比べ関節液中 HA 濃度は低くなる傾向があり、特に関節液量が多いほど HA 濃度は低値となる<sup>32, 33)</sup>。OA では軟骨の破壊による HA 産生低下が原因と推察される。

RA では OA よりも関節液中 HA 濃度が低値を示すことがある<sup>34)</sup>。滑膜組織抽出液における HA 濃度は RA の方が OA より高値を示し、RA により増殖した滑膜細胞における HA 産生亢進が原因である<sup>35, 36)</sup>。RA 患者では初期例や活動期例の滑膜細胞では HA を分解するヒアルロニダーゼ (hyaluronidase) 産生が高まり、関節液中のヒアルロニダーゼ活性が高い症例では、HA はヒアルロニダーゼによって分解されてその量・濃度の低下が生じ、関節液粘度は減少する<sup>37)</sup>。

## 培養細胞実験

HA に関するこれまでの研究報告を培養細胞実験、動物実験、臨床試験に分けて記述する。軟骨基質分解産物は

マトリカインと呼ばれ、基質分解酵素を誘導して関節軟骨が破壊、その結果、関節機能障害が生じる。高分子 HA は OA、RA の病的軟骨に浸潤して、軟骨細胞表面の HA 受容体と結合し、サイトカイン、マトリカインの異化作用を抑制することで、軟骨破壊を防止する薬理作用を有する<sup>38)</sup>。

培養軟骨細胞に刺激を加えて、OA を再現する実験が行われてきた。軟骨細胞は酸化ストレス (例: oxygen-derived free radical [ODFR])、炎症、炎症性サイトカイン (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) による刺激、組織破壊に由来するコラーゲン断片や RA 関節液により刺激を受けて、様々な細胞応答を示す。これらの刺激は p38 MAP キナーゼの活性化を起し、核因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の活性化、リン酸化および核移行を促し、MMP (MMP-1, MMP-3, MMP-13) 産生、細胞外への分泌を増大させる<sup>39-41)</sup>。IL-1 $\alpha$  刺激により生成される物質として、C-C ケモカインの一種である RANTES<sup>42)</sup>、アグリカン分解活性を有する ADAMTS4<sup>43)</sup>、prostromelysin がある<sup>44)</sup>。軟骨保護的に作用する TIMP-1 (tissue inhibitors of metalloproteinases) の産生は抑制される<sup>44)</sup>。

IL-1 $\beta$  は軟骨基質の破壊を促進する。IL-1 $\beta$  は軟骨細胞の RHAMM mRNA 発現をアップレギュレーションさせ<sup>45)</sup>、コラーゲン産生に関わる  $\alpha$ 2 (VI),  $\alpha$ 1 (II),  $\alpha$ 1 (IX) および  $\alpha$ 2 (XI) コラーゲン遺伝子発現遺伝子の発現を低下させる<sup>46, 47)</sup>。一方で、軟骨細胞に作用して CD44 発現量を増加させる<sup>48, 49)</sup>。

C 末ヘパリン結合部位を含むフィブロネクチンフラグメント (HBFN-f) で刺激すると、軟骨細胞は誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) が誘導され、酸化窒素 (NO) 産生は増加する<sup>50)</sup>。これらの反応には細胞内カルシウムイオン濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 変化が関与する<sup>51)</sup>。これらの反応に対し HA はおおむね抑制的に作用する。

正常軟骨では HA 軟骨表層と親和性が強く軟骨組織内には取り込まれないが、OA 軟骨では軟骨深部にも取り込まれる<sup>52)</sup>。

HA は軟骨細胞のアグリカン合成にはほとんど影響しないが<sup>53, 54)</sup>、軟骨組織からのアグリカン遊出を抑制する<sup>52, 54, 55)</sup>。鶏冠由来 HA についてもアグリカン遊出抑制作用が確認されている<sup>54)</sup>。

HA は、軟骨細胞表面における HA の主要な受容体である CD44 を介して、アグリカン遊離、MMP 産生を抑制する<sup>39)</sup>。軟骨細胞において細胞間接着因子 (ICAM)-1 は HA 受容体と考えられており、コラーゲン断片起因性 MMP 産生に対する HA の抑制効果は ICAM-1 を介する<sup>56)</sup>。

HA は TIMP-1 の産生を促進する<sup>57)</sup>。HA はストロマリシン (stromelysin) 活性を増強するが、stromelysin/TIMP-1 分率は減少する<sup>57)</sup>。HA は軟骨細胞からのフィブロネクチン遊離を抑制する<sup>58)</sup>。

外来 HA は、軟骨細胞 IL-1 $\alpha$  刺激による ADAMTS4 産生を抑制し<sup>43)</sup>、IL-1 $\beta$  刺激による  $\alpha$ 2 (VI) VI 型コラーゲ

ン遺伝子発現の低下を抑制することが示されている<sup>46,47</sup>。

正常軟骨とOA軟骨を比べると、HBFN-fによるNO産生はOAで亢進しており、CD44がアップレギュレートされている<sup>59</sup>。HAはCD44との相互作用を介してNO産生亢進を抑制する。

軟骨細胞ではIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ によりRHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility) mRNA発現がアップレギュレーションされる<sup>60</sup>。OA患者の膝滑膜組織におけるHA受容体CD44とRHAMMについて検討した成績では、進行OA患者組織の方が健常者より強く染色され、ウエスタンブロット法ではCD44およびRHAMMの発現は双方ともOA患者で強かった<sup>61</sup>。これはOAの発症および進行にHA結合蛋白レベルで変化が生じていることを示す所見である。

HAは軟骨細胞の分化・成熟にも影響を及ぼす<sup>62</sup>。適量であれば軟骨への分化が促進されるが、高濃度HA添加など条件によっては分化が抑制される。HAは、軟骨幹細胞から軟骨細胞への分化の過程において、アグリカンやSox9等の軟骨分化に関する遺伝子発現が上昇し、CD44、TGF- $\beta$ 1、ヒアルロン酸合成酵素2遺伝子発現も上昇して、培養上清中のHA量やGAG量が増大させる<sup>63</sup>。外来HAはオートクリン、パラクリンのメカニズムによりHA産生を促進し、軟骨分化に促進的に働くと考えられている。

Hyaluronidase処理によるHAの断片化は、MMPの発現増強とCD44のアップレギュレーションを伴い、軟骨破壊をもたらす<sup>64</sup>。HAの断片化は活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) であるヒドロキシラジカルによっても生じる<sup>65</sup>。すなわち酸化ストレスが強い状態を放置した時やヒアルロニダーゼ活性亢進時には、外来性に投与されたHAが断片化して有害事象を惹起する可能性が考えられる。

HAは主に滑膜細胞にて産生される。OA、RAでは滑膜細胞のサイトカインが増加する<sup>38</sup>。滑膜細胞由来サイトカインの一つにペリオスチンがある。OAにおける炎症、軟骨変性の鍵分子であると考えられている。ペリオスチンは関節組織の細胞に対しNO産生の亢進を促し、炎症性サイトカイン、MMPの発現を上昇させる。ペリオスチン依存性NO産生はHAが濃度依存的に抑制する<sup>66</sup>。IL-13刺激は滑膜細胞におけるペリオスチン産生能を増加させ、HAはこれを抑制する作用がある<sup>67</sup>。

## 動物実験

動物実験では高分子HA関節腔内投与により疼痛抑制が報告されている<sup>68-75</sup>。高分子量HA特有の立体分子構造が大きく関与していることが考えられ、1) HAが滑膜などの組織の痛覚受容体を被覆する、2) 内因性の発痛物質を捕捉する、といった疼痛抑制機序が想定されている<sup>68</sup>。

ウシ圧迫ストレスOAモデルの関節では、ROS産生が増加しII型コラーゲンやアグリカンの遺伝子発現が抑制されること<sup>76</sup>、抑制HAが抗酸化作用を発揮してROS産生を抑制すること<sup>77</sup>、基質合成調節因子SOX9が圧迫負荷により発現量が減少しHA添加により回復すること<sup>76</sup>、圧迫負荷によりリン酸化p38、MMP-13発現が亢進しHA添加により抑制されること<sup>76</sup>が示されている。軟骨細胞に対する機械的ストレスはROS合成亢進とp38 MAPKリン酸化を引き起こし、それぞれ基質合成抑制とMMP13産生促進を介して、最終的に軟骨変性を惹起する。これに対してHAはその受容体であるCD44を介してROS産生抑制およびp38 MAPKリン酸化抑制を来すことより、軟骨保護作用を発揮する機序が想定されている<sup>76</sup>。

ウサギOAモデルでは、VEGFおよびVEGFR-2 mRNA発現は増加するが、HA関節腔内注入はVEGF mRNA発現への影響は少ないもののVEGFR-2 mRNA発現を抑制すること<sup>78</sup>、HA投与によりPGE2産生、MMP産生が抑制されること<sup>79</sup>、プロテオグリカン、II型コラーゲン、HAの残量が減り、アポトーシス細胞陽性率、アグリカン分解物が増加するが、高分子HA関節腔内注入はこれらの変化を是正すること<sup>80</sup>が報告されている。

ヨード酢酸起因性OAラット軟骨細胞におけるHA応答遺伝子DNA microarray解析の結果、OAによりIV、IX、XI型コラーゲン、アドレノメデュリン (adrenomedullin) の遺伝子発現が低下し、高分子HA関節腔内投与により回復すること、OAにより炎症関連因子 (phospholipase A2、Toll-like receptor 8など) の発現が亢進し、高分子HA投与はこれを抑制することが示された<sup>81</sup>。

OA軟骨において、高分子HAの関節内注射は、コラーゲン、抗炎症因子、炎症関連因子などの遺伝子発現を制御することにより病態に影響することが示唆された<sup>81</sup>。

HAによるOA進行抑制の作用機序にはVEGF mRNA発現抑制が部分的に関与していると考えられている<sup>79</sup>。

このような成績があるにも関わらず、2013年6月米国整形外科学会 (American Academy of Orthopaedic Surgeons: AAOS) は膝OAに関するガイドラインを改訂し、「HA関節腔内注入は膝OA治療法として推奨されない (推奨度:強)」としている。また国際変形性関節症学会 Osteoarthritis Research Society International (OARSI) でもHA関節腔内注入に否定的な見解となっている。

## 臨床試験

経口HAの疼痛軽減作用についてはいくつかの臨床試験で示されている。膝OA患者40例を対象に低分子化HAを含む鶏冠抽出物加工食品を摂取した無作為化二重盲検比較試験において、JOA評価基準の5つのサブスケールのうち「疼痛・歩行能」、「疼痛・階段昇降能」および各スコアの「合計」が有意に改善した<sup>82,83</sup>。サッカー選手66名を対象とした低分子化HAを含む鶏冠抽出物加工食品を摂取

した無作為化二重盲検比較試験において、足関節の圧迫時疼痛が改善傾向を示し、股関節の運動時疼痛が有意に改善した<sup>84)</sup>。膝関節に軽度の疼痛やこわばり、違和感を有する者 67 例を対象に N-アセチルグルコサミン配合調製豆乳を摂取した無作為化二重盲検比較試験において、階段昇降時および安静時の膝関節の疼痛が有意に改善した<sup>85)</sup>。OA 患者 46 名および RA 患者 22 名を対象にグルコサミン-コンドロイチン-ケルセチングルコシドを摂取した試験では、OA 患者では疼痛の改善がみられたが、RA では疼痛改善は認められなかった<sup>86)</sup>。

これらの臨床試験結果は OA 由来の関節疼痛に対し比較的小分子 HA が有効である可能性を示唆している。経口摂取された低分子 HA がどのように消化、分解され体内に吸収されるか、疼痛を軽減する作用機序に関しては不明な点が多く残されている。

HA の関節可動域に及ぼす影響については膝関節固定ウサギ OA モデルによる報告がある。本モデルにおける膝関節可動域の低下は高分子 HA 関節腔内投与により緩和される<sup>87)</sup>。この効果は分子量 202 万の HA の方が 95 万のものよりも大きい。本試験品のように低分子 HA に関する報告はない。HA の作用機序は明らかではないが、HA による線維化抑制作用、保水作用の関与<sup>88)</sup>、関節液の流動性を高めて関節液の機能を回復させる<sup>89)</sup>とともに、軟骨組織の構成成分であるグリコサミノグリカンの遊離を抑制し軟骨中グリコサミノグリカン量を回復させ、軟骨変性を抑制する<sup>90-92)</sup>といった機序が推定されている。

関節軟骨細胞は IL-1 や RA 関節液添加などの刺激によりアグリカンの細胞外への遊離を促進し、MMP 合成・分泌を誘導する。これらの反応は HA により促成される<sup>39)</sup>。また、HA はアグリカン合成にはほとんど影響しないが、基質からのアグリカンの遊離を抑制することがウサギ関節軟骨培養細胞においても確認されている<sup>53)</sup>。

N-アセチルグルコサミン配合調製豆乳を用いた二重盲検並行群間試験においても、関節可動域が摂取 8 週間後以降に有意に改善することが示されている<sup>85)</sup>。

## 糖化ストレスと HA の接点

これまで HA と糖化ストレスの関連についてはほとんど関心が持たれていなかった。しかし近年、OA の発症機序に糖化ストレスが関与していることが注目されている<sup>93-96)</sup>。OA の発症・進展には障害された細胞から関節腔内に放出された DAMPs (damage-associated molecular patterns) や HMGB-1 が免疫応答細胞上の TLRs (toll-like receptors) や RAGE (receptor for advanced glycation end products) を介して炎症性サイトカイン産生を促し、炎症性組織障害を惹起する機序が関与すると想定されている<sup>95)</sup>。OA 関節腔内では終末糖化産物 AGEs (advanced glycation end products) が RAGE や他のスカベンジャー

受容体を介して炎症を惹起すると考えられている<sup>96)</sup>。ウサギ OA モデルにおける血清マロンジアルデヒド濃度の検討では、対照群 (無処置) :  $2.05 \pm 0.37$  nmol/mL、ヒアルノナン単独群 :  $1.94 \pm 0.54$  nmol/mL、コルチゾン単独群 :  $1.98 \pm 0.37$  nmol/mL、両者併用群 :  $1.55 \pm 0.41$  nmol/mL で、無処置群に比べ両者併用群では有意に低かった<sup>97)</sup>。マロンジアルデヒドは AGEs 生成の過程で中間体として作用し、AGEs 生成を亢進させる作用がある。従って本所見は HA と糖化ストレスを関連付ける点で興味深い。

HA 含有飼料をラットに摂取させた実験では HA 摂取により腸内細菌フローラおよび血清コレステロール代謝に有益な影響を与えることが示されている<sup>98)</sup>。今回の試験における TC の有意な低下を裏付けるデータである。HA と腸内フローラとの関係、HA と糖脂質代謝との関係は大変興味深く、今後の研究の発展に期待がかかる。

## 結論

OA の病態を考える上で軟骨基質マトリックスの果たす役割は重要である。マトリックスの構成成分である HA に焦点を当てると、機械的ストレス、酸化ストレス、糖化ストレスにより早期の段階から HA の断片化、軟骨の組織の遊離が生じること、HA により抑えられてマトリックス分解酵素が活性化することがマトリックス障害の要因となっている。外来 HA はこれらの酵素誘導に対し抑制的に作用し、その結果として軟骨からのマトリックス遊離 (HA やアグリカンの喪失) が緩和される。しかし HA の分子サイズによる効果の差異などについては未解明のままである。OA 予防のためには、軟骨基質マトリックスの障害機序を明らかにし、初期兆候の段階から OA への進展を阻止する対策を施行する必要がある。

## 謝辞

本研究は総合科学技術・イノベーション会議の SIP (戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号 14533567) 「次世代農林水産業創造技術」(農研機構生研センター委託研究) によって実施された。

## 利益相反申告

本論文に関して利益相反に該当する事項はない。

## 参考文献

- 1) Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, et al. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 244: 45-49.
- 2) Hirose J, Yamabe S, Takada K, et al. Immunohistochemical distribution of advanced glycation end products (AGEs) in human osteoarthritic cartilage. *Acta Histochem*. 2011; 113: 613-618.
- 3) Hiraiwa H, Sakai T, Mitsuyama H, et al. Inflammatory effect of advanced glycation end products on human meniscal cells from osteoarthritic knees. *Inflamm Res*. 2011; 60: 1039-1048.
- 4) Terada C, Yoshida A, Nasu Y, et al. Gene expression and localization of high-mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama*. 2011; 65: 369-377.
- 5) Akasaki Y, Reixach N, Matsuzaki T, et al. Transthyretin deposition in articular cartilage: A novel mechanism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67: 2097-2107.
- 6) 小林淳二. 顎関節の構造と機能に関わる基質成分. *口腔病学会雑誌*. 1992; 59:105-123.
- 7) Nishida K, Inoue H, Toda K, Murakami T. Localization of the glycosaminoglycans in the synovial tissues from osteoarthritic knees. *Acta Med Okayama*. 1995; 49: 287-294.
- 8) 渋谷智明. ブタ顎関節プロテオグリカンの構造と機能に関する生化学的研究. *口腔病学会雑誌*. 1996; 63: 576-592.
- 9) 松本智子. メトリザミド密度勾配超遠心法による正常および病的ヒト軟骨プロテオグリカンの研究. *日本整形外科学会雑誌*. 1985; 59: 597-609.
- 10) 山田耕治. 老化促進モデルマウス (SAM) 顎関節下顎頭の加齢変化に関する免疫組織化学的研究. *日本顎関節学会雑誌*. 1995; 7: 497-510.
- 11) 岡田保典. 変形性関節症における関節軟骨破壊と再生機構: 現状と今後の展望. *Functional Food Research*. 2016; 12: 1-9.
- 12) 安井秀一, 山名 慶. 関節軟骨の潤滑性と細胞外マトリクス. *Medical Science Digest*. 2011; 37: 596-600.
- 13) 森田充浩. 【関節破壊のバイオマーカー】ヒアルロン酸 (HA). *Keynote R / A*. 2014; 2: 71-74.
- 14) 寺下隆夫, 白坂憲章, 楠田瑞穂, 他. 鶏冠由来低分子ヒアルロン酸の化学組成とヒト肌への臨床試験による保湿効果. *近畿大学農学部紀要*. 2011; 44: 1-8.
- 15) Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol*. 2012; 4: 253-258.
- 16) Zhang W, Mu H, Zhang A, et al. A decrease in moisture absorption-retention capacity of N-deacetylation of hyaluronic acid. *Glycoconj J*. 2013; 30: 577-583.
- 17) 近間英明. 関節潤滑に関する実験的研究 関節液蛋白およびヒアルロン酸の役割. *日本整形外科学会雑誌*. 1985; 59: 559-572.
- 18) 渡辺惣兵衛, 方宇寿恒, 横堀寿光, 他. 関節潤滑機構に及ぼすヒアルロン酸の役割について. 1994; 14: 891-895.
- 19) 飯阪正俊, 岡 正典, 池内 健, 他. ヒアルロン酸の関節潤滑に及ぼす効果. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*. 1998; 19: 247-252.
- 20) 遠藤太刀男, 八木英憲, 小島隆史, 他. 変形性膝関節症関節液の粘弾性挙動に基づく実験的考察. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*. 1998; 19: 253-257.
- 21) 貝山 潤, 宇月美和. 変形性膝関節症における関節液のヒアルロン酸とその性状の変化. *岩手医学雑誌*. 2006; 58: 9-21.
- 22) Hiramitsu T, Yasuda T, Ito H, et al. Intercellular adhesion molecule-1 mediates the inhibitory effects of hyaluronan on interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production in rheumatoid synovial fibroblasts via down-regulation of NF-κB and p38. *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45:824-832.
- 23) Nago M, Mitsui Y, Gotoh M, et al. Hyaluronan modulates cell proliferation and mRNA expression of adhesion-related procollagens and cytokines in glenohumeral synovial/capsular fibroblasts in adhesive capsulitis. *J Orthop Res*. 2010; 28: 726-731.
- 24) 能地 仁, 阿部里見, 小林 浩, 他. ヒアルロン酸ナトリウムの免疫調節能に関する検討. *膝*. 2005; 30: 155-158.
- 25) 松浦 豪, 近藤孝司, 秩父賢司, 他. 関節疾患の非侵襲性診断法: 慢性関節リウマチにおける血中ヒアルロン酸濃度の検討. *関節外科*. 1991; 10: 989-996.
- 26) 中園 清, 村沢 章, 遠山知香子, 他. 慢性関節リウマチ患者の血中ヒアルロン酸について. *中部リウマチ*. 1994; 25: 10-11.
- 27) 山田 登, 宇月美和, 力丸 暘, 他. 血中ヒアルロン酸濃度と慢性関節リウマチの病態. *リウマチ*. 1994; 34: 752-760.
- 28) Nakayama Y, Shirai Y, Yoshihara K, et al. Evaluation of glycosaminoglycans levels in normal joint fluid of the knee. *J Nippon Med Sch*. 2000; 67: 92-95.
- 29) 小島隆史, 北爪伸仁, 池田貴英, 他. 正常及び変形性関節症の関節液の粘度, 生化学的検討: とくに加齢変化について. *東京膝関節学会誌*. 1998; 18: 11-15.
- 30) 上坂真司, 伊藤博元, 宮崎匡輔. 健康膝関節液におけるコンドロイチン硫酸およびヒアルロン酸濃度の加齢変化および性差について. *関節の外科*. 2004; 31: 90-96.
- 31) Uesaka S, Miyazaki K, Ito H. Age-related changes and sex differences in chondroitin sulfate isomers and hyaluronic acid in normal synovial fluid. *Modern Rheumatology*. 2004; 14: 470-475.
- 32) 上坂真司, 中山義人, 藤井信人, 他. 変形性膝関節症における関節液の生化学的分析: 臨床所見, X線学的評価ならびに血液所見との関連について. *東京膝関節学会誌*. 1998; 18: 16-20.
- 33) 佐藤正夫, 四戸隆基, 馬場岳士, 他. 膝関節液中のプロテオグリカン, グルコサミノグリカン濃度: 女性例での検討. *中部日本整形外科災害外科学会雑誌*. 2006; 49: 287-288. 【英語】 Sato M, Shinohe T, Baba T, et al. Proteoglycan and glycosaminoglycan concentration in the knee synovial fluid: A study in female. *The Central Japan Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. 2006; 49: 287-288. (in Japanese)
- 34) 塩田悦仁, 有菌 剛, 国東芳顕. 各種膝関節症における関節液成分の検討. *中部日本整形外科災害外科学会雑誌*. 1994; 37: 63-64.
- 35) 篠崎昌人. ヒト関節滑膜中のヒアルロン酸含有量とその分布に関する検討. *岐阜大学医学部紀要*. 1995; 43: 750-757.
- 36) 宇月美和, 渡辺知幸, 桂 泰典, 他. 慢性関節リウマチ滑膜組織におけるヒアルロン酸 (HA) の分布と産生の定量的検索. *炎症*. 1998; 18: 31-43.

- 37) 徳永勢二, 宇月美和, 鎌滝章央, 他. 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. 2007; 59: 89-98.
- 38) 安田 義. ヒアルロン酸の薬理作用. *Clinical Calcium*. 2009; 19: 1644-1652.
- 39) 村田英明, 村上恒二, 生田義和, 他. 関節軟骨細胞の基質代謝に及ぼす HA と IL-1 の影響. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌. 1993; 36: 439-440.
- 40) Sasaki A, Sasaki K, Kontinen YT, et al. Hyaluronate inhibits the interleukin-1beta-induced expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 in human synovial cells. *Tohoku J Exp Med*. 2004; 204: 99-107.
- 41) Yasuda T. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is inhibited by hyaluronan via intercellular adhesion molecule-1 in articular chondrocytes stimulated with type II collagen peptide. *J Pharmacol Sci*. 2012; 118: 25-32.
- 42) 田中道明, 中村 洋, 増子佳世, 他. 軟骨細胞からの MMP-1 および RANTES 産生に対する高分子ヒアルロン酸の抑制作用. 臨床リウマチ. 2004; 16: 260-264.
- 43) 滝沢雅之, 谷田部 拓, 岡田愛子, 他. 関節軟骨における ADAMTS4 (aggrecanase-1) の発現と活性に対する高分子ヒアルロン酸の影響. 臨床リウマチ. 2004; 16: 265-270.
- 44) Yasui T, Akatsuka M, Tobetto K, et al. Effects of hyaluronan on the production of stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in bovine articular chondrocytes. *Biomedical Research*. 1992; 13: 343-348.
- 45) Tajima I, Endo K, Mizusawa N, et al. Upregulation of RHAMM mRNA expression by interleukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in cultured rabbit articular chondrocytes. *Connective Tissue*. 1999; 31: 1-6.
- 46) 田島吾郎, 村上秀樹, 水澤典子, 他. 高分子ヒアルロン酸の関節軟骨細胞コラーゲン遺伝子発現に及ぼす影響. 日本リウマチ・関節外科学会雑誌. 1995; 14: 63-72.
- 47) Goto H, Onodera T, Hirano H, et al. Hyaluronic acid suppresses the reduction of alpha2(VI) collagen gene expression caused by interleukin-1beta in cultured rabbit articular chondrocytes. *Tohoku J Exp Med*. 1999; 187: 1-13.
- 48) Toba T, Mizusawa N, Tajima G, et al. Upregulation of CD44 mRNA expression by interleukin-1 $\beta$  in cultured rabbit articular chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 1997; 15: 84-93.
- 49) 遠藤康二郎, 小野寺智彦, 後藤浩正, 他. ウサギ関節軟骨培養系における CD44 遺伝子発現に及ぼす高分子ヒアルロン酸の影響. 臨床リウマチ. 1998; 10: 162-169.
- 50) Yasuda T, Nakamura T. Inhibition of nuclear factor-kappaB by hyaluronan in rheumatoid chondrocytes stimulated with COOH-terminal heparin-binding fibronectin fragment. *Mod Rheumatol*. 2007; 17: 391-397.
- 51) 西坂文章. 表層, 深層の関節軟骨細胞における細胞内カルシウムイオン情報伝達系に関する検討. 近畿大学医学雑誌. 2000; 25: 25-34.
- 52) 坂本 崇, 水野祥二, 植 智子. ヒアルロン酸と関節軟骨: 軟骨表層に対する affinity とプロテオグリカン遊出抑制作用. 整形外科基礎科学. 1984; 11: 264-266.
- 53) Shimazu A, Jikko A, Iwamoto M, et al. Effects of hyaluronic acid on the release of proteoglycan from the cell matrix in rabbit chondrocyte cultures in the presence and absence of cytokines. *Arthritis Rheum*. 1993; 36: 247-253.
- 54) 平田総一郎, 木村琢也, 松原 司. 牛関節軟骨細胞のプロテオグリカン代謝に与えるヒアルロン酸の影響. 臨床リウマチ. 1993; 5: 43-51.
- 55) Kikuchi T, Shimmei M. Effect of hyaluronan on proteoglycan metabolism of rabbit articular chondrocytes in culture. *Japanese Journal of Rheumatology*. 1994; 5: 207-215.
- 56) Yasuda T. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is inhibited by hyaluronan via intercellular adhesion molecule-1 in articular chondrocytes stimulated with type II collagen peptide. *J Pharmacol Sci*. 2012; 118: 25-32.
- 57) Yasui T, Akatsuka M, Tobetto K, et al. Effects of hyaluronan on the production of stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in bovine articular chondrocytes. *Biomedical Research*. 1992; 13: 343-348.
- 58) 中村茂夫, 島津 篤, 笛吹恵美子, 他. 高分子ヒアルロン酸による細胞基質層からのフィブロネクチン (FN) の遊離の抑制: 関節軟骨細胞と滑膜細胞培養系を用いたヒアルロン酸 (HA) の抗炎症作用の解析. 関節外科. 1994; 13: 275-281.
- 59) Yasuda T. Comparison of hyaluronan effects among normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis cartilages stimulated with fibronectin fragment. *Biomed Res*. 2010; 31: 63-69.
- 60) Tajima I, Endo K, Mizusawa N, et al. Upregulation of RHAMM mRNA expression by interleukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in cultured rabbit articular chondrocytes. *Connective Tissue*. 1999; 31: 1-6.
- 61) Dunn S, Kolomytkin OV, Waddell DD, et al. Hyaluronan-binding receptors: Possible involvement in osteoarthritis. *Mod Rheumatol*. 2009; 19: 151-155.
- 62) 吉川勝久, 北村信人, 安田和則, 他. ヒアルロン酸は合成ハイドロゲルが ATDC5 細胞に対して有する軟骨分化誘導効果を in vitro で促進する. 日本関節病学会誌. 2013; 32: 9-15.
- 63) 中田 研, 室井悠里, 吉川秀樹. 関節軟骨とヒアルロン酸: ヒト幹細胞を用いた 3 次元培養組織の軟骨分化における力学刺激とヒアルロン酸. 臨床整形外科. 2007; 42: 313-318.
- 64) Ohno-Nakahara M, Honda K, Tanimoto K, et al. Induction of CD44 and MMP expression by hyaluronidase treatment of articular chondrocytes. *J Biochem*. 2004; 135: 567-575.
- 65) 山崎顕二. 軟骨細胞に対する機械的ストレスのヒアルロン酸に対する影響: ヒドロキシラジカルの関与について. 近畿大学医学雑誌. 2002; 27: 113-124.
- 66) 山田麻子, 松井真弓, 浅野和仁. 変形性膝関節由来関節滑膜細胞のペリオスチン依存性一酸化窒素 (NO) 産生に及ぼすヒアルロン酸の効果. 薬理と治療. 2015; 43: 783-789.
- 67) 樋口毅史, 石川慎太郎, 浅野和仁, 他. 変形性膝関節由来関節滑膜細胞のペリオスチン産生に及ぼすヒアルロン酸の効果. 薬理と治療. 2017; 45: 35-42.
- 68) 後藤幸子, 宮崎匡輔, 女屋純一, 他. ラットにおける実験的関節疼痛モデルとヒアルロン酸ナトリウムの鎮痛作用. 日本薬理学雑誌. 1988; 92: 17-27.
- 69) 相原静彦, 村上尚史, 石井律子, 他. ラットの実験的関節炎疼痛に対するヒアルロン酸ナトリウムの効果. 日本薬理学雑誌. 1992; 100: 359-365.
- 70) 清水憲次, 松井 裕, 正木文夫, 他. 高分子量ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) のビーグル犬におけるブラジキニン誘発関節疼痛に対する抑制効果. 薬理と治療. 1993; 21: S411-S419.)
- 71) 清水憲次, 松井 裕, 秋江靖樹, 他. 高分子量ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) のビーグル犬における尿酸塩結晶誘発関節疼痛に対する抑制効果. 薬理と治. 1995; 23: 3249-3254.



- 72) 山下 泉, 熱田裕司, 島崎俊司, 他. ラット膝関節疼痛モデルによる実験的研究: (2) ヒアルロン酸ナトリウムの効果. 北海道整形災害外科雑誌. 1993; 36: 33-36.
- 73) 山下 泉, 熱田裕司, 島崎俊司, 他. プラジキニンを用いたラット膝関節疼痛モデルにおけるプロスタグランジンE2とヒアルロン酸ナトリウムの影響. 日本整形外科学会雑誌. 1995; 69: 735-743.
- 74) 伊勢亀富士朗, 清水憲次, 松村豪一, 他. ヒアルロン酸のビーグル犬におけるプラジキニン関節疼痛抑制作用. 関節外科. 1994; 13: 391-398.
- 75) Yoshida M, Funasaki H, Kubota M, et al. Therapeutic effects of high molecular weight hyaluronan injections for tendinopathy in a rat model. *J Orthop Sci.* 2015; 20: 186-195.
- 76) 中川晃一. 機械的ストレスによる軟骨変性に対するヒアルロン酸の保護作用と細胞内情報伝達機構. 近畿大学医学雑誌. 2011; 36: 137-143.
- 77) 三木良久. 機械的ストレスによる軟骨障害に対するヒアルロン酸の軟骨保護作用. 近畿大学医学雑誌. 2009; 34: 59-66.
- 78) Zhou JL, Liu SQ, Qiu B, et al. Effects of hyaluronan on vascular endothelial growth factor and receptor-2 expression in a rabbit osteoarthritis model. *J Orthop Sci.* 2009; 14: 313-319.
- 79) Hashizume M, Koike N, Yoshida H, et al. High molecular weight hyaluronic acid relieved joint pain and prevented the progression of cartilage degeneration in a rabbit osteoarthritis model after onset of arthritis. *Mod Rheumatol.* 2010; 20: 432-438.
- 80) 原田真理, 宇月美和, 石黒直樹, 他. 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. 臨床リウマ. 2015; 27: 51-63.
- 81) 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. 2013; 25: 174-184.
- 82) 長岡 功. 低分子化ヒアルロン酸含有食品の変形性膝関節症患者における症状および軟骨代謝マーカーに対する効果. 2011; 26: 628-632.
- 83) 長岡 功. 低分子化ヒアルロン酸含有食品の変形性膝関節症患者における症状および軟骨代謝マーカーに対する効果. 細胞. 2012; 44: 306-310.
- 84) 長岡 功, 吉村雅文, 松永道敬, 他. 低分子化ヒアルロン酸含有食品のサッカー選手の関節痛および軟骨代謝マーカーに及ぼす効果. 日本未病システム学会雑誌. 2012; 18(1): 93-97.
- 85) 波多野健二, 林田賢治, 中川聡史, 他. N-アセチルグルコサミン配合調製豆乳の変形性膝関節症に対する長期摂取時の有効性および安全性の検討. 薬理と治療. 2006; 34: 149-165.
- 86) Matsuno H, Nakamura H, Katayama K, et al. Effects of an oral administration of glucosamine-chondroitin-quercetin glucoside on the synovial fluid properties in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73: 288-292.
- 87) 木戸裕子, 前山和子, 田川 勇, 他. ウサギ膝関節固定による実験的変形性関節症に対する高分子量ヒアルロン酸ナトリウム(SL-1010)の作用. 薬理と治療. 1993; 21: S393-S399.
- 88) 宮崎匡輔, 長野 聖, 鈴木啓太郎. ウサギ固定関節に対するヒアルロン酸ナトリウムの影響. 整形外科基礎科学. 1984; 11: 125-127.
- 89) 菊池孝紀, 山口敏二郎, 榊原康宏, 他. ウサギの装具固定による実験的変形性関節症に対する高分子量ヒアルロン酸ナトリウム(SL-1010)の治療効果. 薬理と治療. 1993; 21: S401-S409.
- 90) 鬼頭康彦, 桂巻常夫, 田中浩和, 他. ウサギ膝関節内へのパブリン注入による実験的変形性関節症に対する高分子量ヒアルロン酸ナトリウム(SL-1010)の効果. 日本薬理学雑誌. 1992; 100: 67-76.
- 91) 田中浩和, 鬼頭康彦, 桂巻常夫, 他. モルモット膝関節内へのパブリン注入による実験的変形性関節症に対する高分子量ヒアルロン酸ナトリウム(SL-1010)の効果. 日本薬理学雑誌. 1992; 100: 77-86.
- 92) 菊池孝紀, 伝田澄美子, 山口敏二郎. ヒアルロン酸ナトリウム(SL-1010)のウサギ関節軟骨におけるグリコサミノグリカン(GAG)の合成および遊離に対する作用. 薬理と治療. 1993; 21: S435-S441.
- 93) Ahmed U, Anwar A, Savage RS, et al. Protein oxidation, nitration and glycation biomarkers for early-stage diagnosis of osteoarthritis of the knee and typing and progression of arthritic disease. *Arthritis Res Ther.* 2016; 18: 250.
- 94) Eaton CB, Sayeed M, Ameeraz S, et al. Sex differences in the association of skin advanced glycation endproducts with knee osteoarthritis progression. *Arthritis Res Ther.* 2017; 19: 36.
- 95) Rosenberg JH, Rai V, Dilisio MF, et al. Damage-associated molecular patterns in the pathogenesis of osteoarthritis: potentially novel therapeutic targets. *Mol Cell Biochem.* 2017 May 4.
- 96) Zhao J, Yu Y, Wu Z, et al. Memantine inhibits degradation of the articular cartilage extracellular matrix induced by advanced glycation end products (AGEs). *Biomed Pharmacother.* 2017: 1193-1198.
- 97) Karakurum G, Karakok M, Tarakcioglu M, et al. Comparative effect of intra-articular administration of hyaluronan and/or cortisone with evaluation of malondialdehyde on degenerative osteoarthritis of the rabbit's knee. *Tohoku J Exp Med.* 2003; 199: 127-134.
- 98) 石橋源次. ラット血清脂質濃度および盲腸内フローラに及ぼすヒアルロン酸の影響. 日本家政学会誌. 2004; 55: 701-706.