

氏名	藤 沢 拓 生
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1859号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	培養軟骨細胞を用いた周期的メカニカルストレスによる軟骨破壊機序に関する研究
論文審査委員	教授 山本照子 教授 永井教之 教授 滝川正春

### 学位論文内容の要旨

【緒言】軟骨の機能維持にはメカニカルストレスが重要であると思われるが、軟骨に作用する過剰かつ断続的なメカニカルストレスは変形性関節症(OA)の発症の原因の一つと考えられる。近年このようなOAの病態形成機構の解明が進み、炎症性サイトカインだけでなく、タンパク分解酵素であるマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMPs)とメタロプロテイナーゼ阻害タンパク(TIMPs)の関節破壊への関与が示唆されているが、メカニカルストレスから軟骨破壊に至る経路、特にメカニカルストレスがこれらの因子を介して軟骨破壊を引き起こすか否かについては明らかにされていない。そこで、本研究ではヒト軟骨細胞様細胞株(HCS-2/8)およびウサギ軟骨初代培養細胞にフレクサーセルを用いて周期的伸展負荷を加え、周期的メカニカルストレスが軟骨細胞の増殖、基質の合成および軟骨破壊因子の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。

【方法】HCS-2/8細胞およびウサギ軟骨細胞は10%牛胎仔血清添加ダルベッコ変法イーグル培地で培養した。細胞がコンフルエントに達した後、細胞伸展装置フレクサーセルを用いて15 kPaおよび5 kPaの周期的伸展負荷(高頻度:30回/分, 中頻度:1回/2分, 低頻度:1回/4分)を加え、経時的に細胞層と培地をそれぞれ回収した。DNA合成能は $^3\text{H}$ チミジン, プロテオグリカン合成能は $^{35}\text{S}$ 硫酸, タンパクおよびコラーゲン合成は $[2, 3\text{-}^3\text{H}]$ プロリンの取り込みを指標として測定した。また、細胞内外に蓄積されるプロテオグリカン量は細胞層および培地中のウロン酸含有量をそれぞれ測定した。軟骨破壊因子の遺伝子発現の変化は、各時期に回収した細胞層からtotal RNAを抽出し, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPの共存下でRT-PCRを行い取り込まれた放射活性を測定することにより調べた。MMP-2およびMMP-9の産生は、ゼラチンザイモグラフィによって調べた。一酸化窒素(NO)産生量は培地中の亜硝酸濃度を測定することにより調べた。また、細胞の生死はトリパンブルー染色により判定した。

#### 【結果】

##### 1. DNA, タンパク質およびコラーゲン合成に対する影響

HCS-2/8細胞において15 kPaおよび5 kPaのどちらの負荷でもDNA合成能, タンパク合成能

およびコラーゲン合成能は高頻度のストレスによって有意に低下した。また、DNA 合成能に関しては負荷の頻度を減少させると、その影響は減弱した。なお、高頻度の負荷でも細胞死はまったく認められなかった。

## 2. プロテオグリカンの蓄積と合成に対する影響

HCS-2/8 細胞において細胞層のウロン酸量はどちらの負荷でも高頻度のストレスによって有意に減少したが、培養上清中のウロン酸量はほとんど影響を受けなかった。

さらに、HCS-2/8 細胞に 15 kPa の高頻度のストレスを加えると、プロテオグリカン合成は経時的に減少したのに対し、低頻度のストレスでは、負荷後初期にプロテオグリカン合成がわずかに減少したがその後はほとんど変化しなかった。

## 3. 周期的メカニカルストレスによるプロテオグリカン分解に対する MMP インヒビターの影響

HCS-2/8 細胞において経時的に硫酸化プロテオグリカン量を測定すると、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸で標識された培養上清中のプロテオグリカン量および総プロテオグリカン量は、高頻度のストレスを加えると 24 時間以降減少した。一方、対照群では、24 時間で最高値に達した後ほぼ一定の値を示したが、同じ条件下で、培養上清中に MMP インヒビターを添加すると、ストレス負荷後 24 時間以降の $[^{35}\text{S}]$ 硫酸化プロテオグリカンの減少が抑制された。

## 4. 軟骨破壊因子の遺伝子発現におよぼす影響

IL-1, MMP-2 mRNA については、どちらの負荷群においても負荷後早期に一時的な増加が認められた後、24 時間以内には元のレベルにまで戻った。これに対し、MMP-9 mRNA の発現は、15 kPa 負荷群では 24 時間まで増加し続けた。また、TIMP-1 mRNA の発現は、どちらの大きさの負荷においてもほとんど変化しなかった。

## 5. ゼラチナーゼ分泌に対する影響

5 kPa 負荷群では MMP-2, MMP-9 の産生はともにストレスの影響をほとんど受けなかったが、15 kPa 負荷群では潜在型および活性型 MMP-9 さらには潜在型 MMP-2 の産生が、ストレス負荷後 24 時間で対照群と比較して明らかに増加した。

## 6. NO 産生におよぼす影響

HCS-2/8 細胞に 15 kPa のストレスを低頻度の条件で加えても、NO 産生に対するストレスの影響はほとんど認められなかったが、高頻度の条件で負荷を加えた場合、NO 産生は負荷後 48 時間以降対照群と比較すると有意に上昇した。

【考察】今回用いた周期的な伸展刺激はその頻度、大きさに関わらず、軟骨細胞の基質合成に少なからず影響を及ぼすことが明らかとなった。しかし、その頻度を減少させることにより、ストレスの影響は減弱したことから、高頻度のストレスは軟骨細胞に対してより破壊的に作用するものと考えられる。また、高頻度のストレスの中でも今回用いた 5 kPa の負荷では、MMPs や IL-1 などの破壊因子がほとんど誘導されなかったため、この負荷では軟骨基質の破壊にまでは至らないものと思われる。一方、15 kPa の負荷では、早期に IL-1 や MMP-9 mRNA の発現量の増加がみられ、その後、MMP-2, MMP-9 タンパクの産生が誘導されたこと、また、培養上清中に MMP インヒビターを加えることでプロテオグリカンの分解が抑制されたこと、さらには NO の産生が誘導されたことより、過剰かつ高頻度のメカニカルストレスは IL-1 や MMPs を誘導し、その結果軟骨破壊を引き起こすものと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、メカニカルストレスによって引き起こされる軟骨破壊機序を、培養軟骨細胞を用いて軟骨基質の合成と分解の両面から解析したものである。

本研究の結果から、5 kPa と 15 kPa のメカニカルストレスを HCS-2/8 細胞およびウサギ肋軟骨細胞に 1 秒間隔で周期的に加えると、軟骨細胞の DNA 合成ならびに、タンパク、コラーゲンおよびプロテオグリカンなどの軟骨基質の合成が低下することが明らかとなった。また、15 kPa のストレスではこれらの合成系の阻害に加え MMPs や IL-1、さらには NO などの軟骨基質の分解に関与する因子の遺伝子発現ないしは産生が亢進し、その結果軟骨基質の分解が亢進することが明らかとなった。

これらの結果は、ストレスによって引き起こされる軟骨破壊機序を理解する上で重要な知見となると考えられる。

よって本論文は博士（歯学）の学位の授与に値するものと判定した。