

# 酸化低比重リポ蛋白による培養ウシ関節軟骨細胞の 老化誘導

頭 司 敏 史 赤 木 将 男

近畿大学医学部整形外科教室

## 抄 録

血管内皮の酸化低比重リポ蛋白 (酸化 LDL) 受容体として同定されたレクチン様酸化低比重リポ蛋白受容体-1 (LOX-1) の軟骨細胞での発現が示され、酸化 LDL と軟骨変性の関連が示唆されている。本研究の目的は、酸化 LDL と LOX-1 の結合によりウシ培養軟骨細胞の老化が誘導されるかを検討することである。

まず老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色、および、BrdU 取込みによる細胞分裂能を測定した。次に酸化 LDL 添加によるテロメラーゼ活性の変化、PI3 kinase/Akt 経路のテロメラーゼ活性に及ぼす影響を調べた。さらに酸化 LDL による PI3 kinase/Akt 経路への影響を検討した。酸化 LDL 添加は培養軟骨細胞の老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を亢進させ、細胞分裂能を低下させた。また酸化 LDL は経時的、経量的にテロメラーゼ活性を抑制し、抗 LOX-1 抗体 (TS-20) 前処理によりテロメラーゼ活性は回復した。PI3 kinase の抑制によりテロメラーゼ活性は抑制され、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) はこの抑制を回復した。酸化 LDL により Akt のリン酸化は抑制され TS-20 により回復した。すなわち酸化 LDL は LOX-1 との結合を介して PI3 kinase/Akt 経路依存性に軟骨細胞のテロメラーゼ活性を抑制する事が示された。また、これらの結果は全て継代を必要とせず24時間以内に生じた。酸化 LDL は軟骨細胞の未成熟老化を誘導するとともに、テロメラーゼ活性の抑制を介して細胞老化に関与する可能性が示された。酸化 LDL は細胞老化促進因子として軟骨変性に関与することが示唆された。

**Key words:** Oxidized LDL, LOX-1, Chondrocyte, Premature Senescence, Telomerase activity, PI3 kinase/Akt pathway

## 緒 言

近年、生活習慣病の一つである動脈硬化症の主要原因物質として酸化 LDL が認知されるようになり<sup>1-2</sup>、また血管内皮細胞における酸化 LDL の受容体としてレクチン様酸化 LDL 受容体 (LOX-1) が同定された<sup>3</sup>。LOX-1 は血管平滑筋細胞においても発現が認められており、炎症性サイトカイン、機械的ストレスやリガンドである酸化 LDL などにより発現が亢進し、動脈硬化症の進行に大きな役割を果たすことが示されている<sup>4,5</sup>。

一方、変形性膝関節症 (OA) においても過酸化脂質と軟骨変性との関連が示唆されてきた<sup>6,7</sup>。OA の疫学調査でも高血圧症と高脂血症が独立した関節症の増悪因子として示されている<sup>8</sup>。Nakagawa らはラット実験的関節炎モデルにおいて変性関節軟骨に

おける LOX-1 の発現、軟骨組織における酸化 LDL の存在を示し、また、抗ラット LOX-1 マウスモノクローナル抗体投与が滑膜炎、軟骨変性を抑制することを示した<sup>9</sup>。また、ラット培養軟骨細胞において酸化 LDL と LOX-1 の結合は PI3 kinase (PI3k)/Akt 経路を抑制し細胞活性を低下させ、非アポトーシス性細胞死を誘導することを示した<sup>10</sup>。当教室においては、ウシ関節軟骨細胞培養系において低レベルながらも恒常的な LOX-1 発現が認められ、酸化 LDL と LOX-1 の結合により活性酸素種が産生されること<sup>11</sup>を示した。さらにヒト膝変形性関節症 (OA) 軟骨における酸化 LDL の存在と軟骨細胞における LOX-1 の発現、軟骨細胞における酸化 LDL の存在および LOX-1 発現の程度と軟骨変性の程度に相関が認められることを示した。そして、これらの分子はヒト OA における軟骨変性の進行を mod-

ulate する分子であることを示唆した<sup>12,13</sup>。

動脈硬化症と変形性関節症は両者ともに加齢とともに発生頻度が著しく増加することが疫学的に示されている<sup>14-17</sup>。さらに、動脈硬化を生じた血管内皮細胞は細胞老化を生じており<sup>18,19</sup>、変形性関節症軟骨細胞も細胞老化を生じていることが既に示されており<sup>20,21</sup>、両疾患における細胞老化と組織レベルでの老化との関連が指摘されている。

細胞老化のメカニズムを説明する仮説として最も一般的であるものがテロメア仮説であろう<sup>22-25</sup>。テロメアは染色体の両端に存在する TTAGGG リピートであり様々なテロメア結合タンパクとともに染色体の安定性に寄与する。DNA ポリメラーゼの不完全な DNA 複製のためテロメアは細胞分裂に伴い短縮していくと考えられている<sup>22</sup>。テロメアが臨界長まで短縮すると細胞は分裂を停止し細胞老化の状態となる (replicative senescence)<sup>23,25</sup>。テロメラーゼは逆転写酵素および鋳型 RNA から構成されるリボ核蛋白であり、染色体の塩基配列末端に存在するテロメアを伸長する機能を持つ<sup>26,27</sup>。ヒト培養血管平滑筋細胞のテロメラーゼ遺伝子を活性化することによって分裂に伴うテロメアの短縮は抑制され、細胞寿命の延長が可能であったことから<sup>28</sup>、血管平滑筋の細胞老化におけるテロメラーゼの重要性が示唆されている。テロメアの短縮は培養血管細胞のみならずヒト血管組織においても観察されており、動脈硬化との関連性が示されている<sup>29,30</sup>。一方、OA の軟骨細胞においてもテロメアの短縮が認められること<sup>20,21</sup>、細胞老化を示す OA 関節軟骨細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入することにより細胞寿命が延長することが示されており、軟骨細胞老化とテロメラーゼ活性の関連が示されてきた<sup>31-33</sup>。

さらに、細胞老化には、細胞分裂の繰り返しによるテロメア長の臨界短縮の結果生じる細胞分裂停止状態 (replicative senescence) とは異なり、細胞が十分に分裂を繰り返すことなく (テロメア長の臨界短縮を伴わない) 細胞分裂停止状態が知られている。後者はストレス誘導未成熟細胞老化 (stress-induced premature senescence) と呼ばれており、ストレス因子として DNA 損傷、酸化ストレス、最適化されていない環境での細胞培養、PI3 kinase inhibitor、酸化 LDL などが知られている<sup>19</sup>。いずれの細胞老化においても細胞分裂は抑制され、生理的な細胞機能の低下、遺伝子発現の特徴的な変化が認められ、慢性疾患の病態にはテロメア短縮による細胞老化とストレス誘導未成熟細胞老化の両者が関与している可能性が指摘されている<sup>19</sup>。

本研究では、酸化 LDL によるウシ培養軟骨細胞

の未成熟細胞老化の誘導について検討を行った。すなわち、酸化 LDL が細胞老化関連マーカーである老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (Senescence associated  $\beta$ -Galactosidase, SA $\beta$ -GAL) 活性、および、細胞分裂能に与える影響について検討した。また、酸化 LDL が軟骨細胞テロメラーゼ活性に与える影響、およびテロメラーゼ活性の制御に関わる細胞内シグナルについて検討した。さらに、これらの変化が酸化 LDL と LOX-1 の結合を介するかについて検討を行った。

## 材料と方法

### 1. 使用薬剤

酸化 LDL, native LDL, 抗ウシ LOX-1 マウスモノクローナル抗体 (TS-20) は国立循環器病センター研究部、脈管生理部部長、沢村達也先生のご好意により提供された。酸化 LDL はヒト血漿を超速心分離し、単離した LDL を酸化させることで作製した。LDL の酸化は LDL 濃度を 3 mg protein/ml の状態で 37°C, 20 時間, 7.5  $\mu$ M の CuSO<sub>4</sub> に曝露することで行った<sup>3</sup>。非特異的マウス IgG は Equitech-Bio (Kerrville, TX) より、LY294002 及びヒト遺伝子組み換えインスリン様成長因子 (IGF-1) は Sigma (St. Louis, MO)、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Akt (pAkt) 抗体、抗ラビット IgG horse raddish peroxidase (HRP) 標識抗体は Cell Signaling Technology (Boston, MA) より購入した。

### 2. 軟骨細胞の分離と培養

ウシ (生後10ヶ月) の関節軟骨を前足部 MP 関節より無菌的に採取し、コラゲナーゼ処理にて軟骨細胞を分離し、10% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY) にて培養し、70% および 100% コンフルエントになった時点で細胞を回収した。なお軟骨細胞の培養の際にはインキュベーター内の酸素濃度を 5% とし、低酸素状態での培養とした。これは生理的な軟骨組織酸素濃度が 5% であり、21% 酸素濃度では酸化ストレスにより細胞寿命が短縮することが知られているためである<sup>34</sup>。

### 3. Real-Time PCR 法による 2 型コラーゲンおよびアグリカン mRNA 発現の検討

本研究に用いる 70% コンフルエントの軟骨細胞が軟骨細胞としての形質を保持しているか、また、培養条件と分裂活性および軟骨基質産生の関連を検討するため、Real-Time PCR 法を用いて 2 型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA の発現を検討した。比較には 100% コンフルエントの培養軟骨細胞を用いた。

## 1) RNA の抽出

軟骨細胞からの RNA の抽出は QIAGEN RNeasy® PLUS MINI® (QIAGEN Japan, 東京) を用いて行った。1 サンプルあたり  $5 \times 10^5$  個の軟骨細胞を Buffer RLT Plus 350  $\mu$ l にて融解し, gDNA Eliminator Mini Spin Column に入れ 30 秒遠心分離し, 70% エタノールを 350  $\mu$ l 加えピペティングした後 RNeasy Mini Spin Column に移し 15 秒遠心分離した。その後 Buffer RWI 700  $\mu$ l を加え 15 秒遠心分離し洗浄した。そして 2 回 Buffer RPE 500  $\mu$ l にて計 2 回遠心分離し洗浄した。そして水分を除去し, RNase-Free Water 50  $\mu$ l を上記カラムに加え 1 分間遠心分離し RNA を抽出した。

## 2) 逆転写反応

抽出した RNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription kit® (Applied Biosystems, Foster city, U.S.A) を用いて逆転写し, cDNA を合成した。10 $\times$ RT Buffer 1  $\mu$ l, 25 $\times$ dNTP MIX 0.4  $\mu$ l, 10 $\times$ RT Random Primer 1  $\mu$ l, Multi Scribe Reverse Transcriptase 0.5  $\mu$ l, RNase Inhibitor 0.5  $\mu$ l, RNase-Free Water 1.6  $\mu$ l, RNA 抽出液 5  $\mu$ l を混合し計 10  $\mu$ l とし, サーマサイクラーにて 25°C 10 分間, 37°C 120 分間, 85°C 5 秒で逆転写反応を行い, 最後に 1 $\times$ Tris-EDTA (TE) にて 5 倍希釈し逆転写反応液とした。

## 3) Real-time PCR 法

Real-time PCR 法には SYBR Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)® (タカラバイオ, 大津) を用いた。ウシ 2 型コラーゲンおよびアグリカンの cDNA に対するプライマーの塩基配列を表 1 に示す。これらが目的遺伝子に対して特異的である事を確認し, SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$ ) 10  $\mu$ l, PCR Forward Primer 0.8  $\mu$ l, PCR Reverse Primer 0.8  $\mu$ l, ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ l, 滅菌蒸留水 7  $\mu$ l, 逆転写反応液 1  $\mu$ l で計 20  $\mu$ l Mixture を作製し, Real-time PCR 法を行った。初期変性は 95°C 10 秒, その後 95°C 5 秒, 60°C 30 秒の 2 step PCR を 40 サイクル行った。ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector にて各 mRNA の発現量は cycle threshold 値 (Ct 値) を算出し, さらに  $\beta$ -アクチン及びコントロールの Ct 値で補正し, デルタデルタ Ct 値を算出し, 各遺伝子共に発現量は 70% コンフルエント細胞に対するパーセンテージで算出

した。

4. 老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (SA $\beta$ -GAL) 染色による細胞老化の評価

酸化 LDL による軟骨細胞における細胞老化の評価を SA $\beta$ -GAL 染色 (Senescent Cells Histochemical Staining Kit®, Sigma) を用いて行った。35 mm dish に軟骨細胞を  $1 \times 10^6$  個播種し 70% コンフルエントになった時点で native LDL (100  $\mu$ g/ml), または, 酸化 LDL (0, 50, 100  $\mu$ g/ml) を加え, 24 時間反応させ, 培地を除去し Phosphate-Buffered Saline (PBS) で一度洗浄し Fixation Buffer を加え室温で 7 分間インキュベートした。その後 3 回 PBS にて洗浄し, Staining Mixture を加え 12 時間 37°C でインキュベートした。最後に倒立顕微鏡 (PHASE CONTRAST-2 ELWD0.3, Nikon, 東京) にて軟骨細胞を観察した。同様に前処理として抗ウシ LOX-1 マウスモノクローナル抗体 (TS-20), 非特異的マウス IgG をそれぞれ 40  $\mu$ g/ml を 30 分間反応させた後に酸化 LDL を 100  $\mu$ g/ml を 24 時間加え, 同様に染色を行い観察した。

## 5. 5'-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) の取り込みによる細胞分裂能の評価

軟骨細胞の細胞分裂能の評価を BrdU に対する蛍光染色 (BrdU ラベリング&ディテクションキット I®, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, カタログ No. 1 296 736) を用いて評価した。軟骨組織より分離し, 培養する前の軟骨細胞及び 35 mm dish に  $1 \times 10^6$  個播種し, 70% および 100% コンフルエントになった時点での軟骨細胞に対し, 培養メディアウムで 1000 倍希釈した BrdU 標識メディアウムを 1 well あたり 5 ml 加え 37°C にて 60 分間反応させた。その後洗浄液にて洗浄しマイナス 20°C にて 1 時間エタノール固定液 (70 ml の無水エタノールに 50 mM のグリシン溶液を 10 ml 加えたもの) 1 well あたり 1 ml にて固定し, 3 回洗浄液にて洗浄した後に抗 BrdU をインキュベーション緩衝液にて 10 倍希釈した抗 BrdU 反応液を 1 well あたり 3 ml 加え 37°C, 30 分間インキュベートした。そして 3 回洗浄液にて洗浄し PBS にて 10 倍希釈したフルオレセイン標識抗マウス Ig 反応液を 1 well あたり 3 ml 加え 37°C, 30 分間インキュベートした。そして共焦点レーザー顕微鏡 (LCM5 PASCAL Laser Scanning Microscope, Carl Zeiss, 東京) を用い 200 mw アルゴン

表 1 本研究に用いたプライマー塩基配列

cDNA	Forward primer	Reverse primer
Bovine type II collagen	TGGTATCGCCGGACCCAAG	CTCGTCCACCGTCTCTCCC
Bovine aggrecan	CACCTGTAAAAAGGGCACAGTG	GCATTGATCTCGTATCGGTCC

レーザー、波長488 nmで励起し、525 nmのFITCフィルターにて細胞を観察した。

さらにELISA法 (Cell Proliferation Elisa, BrdU®, Roche DiagnosticsカタログNo.1 647 229)を用いて、培養前の軟骨細胞、および70%コンフルエント細胞と100%コンフルエント細胞のBrdU取込みを定量した。また、70%コンフルエント細胞に対してはnative LDL (0, 10, 50, 100 µg/ml) および酸化LDL (0, 10, 50, 100 µg/ml)を加え、24時間インキュベートした後に、BrdU取込みを定量した。同時に酸化LDL添加前にTS-20 40 µg/ml, および非特異的マウスIgG 40 µg/mlを前処理として30分間反応させLOX-1の抑制実験を行った。

プロトコールに従い、96 wellプレートに1 wellあたり軟骨細胞を $2 \times 10^4$ 個播種し37°Cで培養した。培養後培養メEDIUMで10倍希釈したBrdU標識溶液1 wellあたり10 µl加え37°Cで2時間培養した。培養後培養メEDIUMを除去し、1 wellあたり200 µlのFixDenatを加え室温で30分間反応させた。反応後FixDenatを除去し、ブロッキング剤(ブロッケーヌ®, 雪印乳業, 札幌)を200 µl/well加え15分間作用させた。そしてブロッキング剤を除去後、抗体希釈液にて10倍希釈した抗BrdU-PODストック液を1 wellあたり100 µl加え室温で90分間作用させた。最後に3回1 wellあたり200 µlの洗浄液にて洗浄し1 wellあたり100 µlの基質液を加え5分間室温で反応させ、マイクロプレートリーダー (Model 680 MICROPLATE READER, BIO-RAD, Hercules, CA)にて波長370 nm (対照波長492 nm)における吸光度を測定した。

#### 6. 軟骨細胞のテロメラーゼ活性の測定

軟骨細胞のテロメラーゼ活性の測定にはstretch PCR法 (TeloChaser®, TOYOBO co LTD, 大阪)を用いた。1アッセイあたりの細胞数は $2 \times 10^4$ 個とし、陽性対照にはキット付属のHeLa細胞抽出液を用いた。

##### 1) 細胞抽出液の作製

回収した軟骨細胞にキット添付のLysis Solutionを加え、氷上にて30分間静置した後に15,000回転/分、20分間遠心分離し、その上清を細胞抽出液とした。

##### 2) テロメラーゼ反応

作製した細胞抽出液20 µlに滅菌蒸留水8 µl, キット添付のextension buffer及びPrimer mix (1)をそれぞれ4 µl加え計40 µlとし、サーマルサイクラーにて37°C, 30分間インキュベートしテロメラーゼ反応を行った。

##### 3) 精製

テロメラーゼ反応液40 µlにclean up solution Aを20 µl加え攪拌し、そしてイソプロパノールを加えたclean up solution Bを130 µl加え、氷上にて10分間静置後懸濁し、12,000回転/分、10分間遠心分離した。上澄を除去し、ペレットに対し200 µlの80%エタノールを加え、デキャンテーションにてエタノールを除去、この操作を2回施行し、最後に遠心分離機でフラッシュしエタノールを完全に除去した。残ったペレットは室温で乾燥させた。

##### 4) PCR法

乾燥したペレットに滅菌蒸留水17.46 µl, PCR Buffer 6 µl, Primer mix (2), Primer mix (3)をそれぞれ3 µl, Platinum Taq polymerase®(Invitrogen, Auckland, New Zealand)を0.54 µl加え計30 µlとしサーマルサイクラーを用いPCRを行った。温度条件は初めに95°C 2分30秒加温し、その後95°C30秒, 68°C30秒, 72°C45秒で33サイクル施行した。得られたPCR反応液に対しLoading Dyeを加えた上で10%ポリアクリルアミドゲルを用い100V, 1時間で電気泳動した。泳動後ゲルを0.5 µg/mlのエチジウムブロマイド溶液に15分浸漬しプリントグラフ (ATTO AE-6932)を用いUV照射下に撮影しバンドを検出した。検出されたバンドの強度は画像解析ソフトウェア (Image-J ver. 1.37, NIH)を用い測定した。

#### 7. ウェスタンブロットによる軟骨細胞におけるAkt, pAktの検出

軟骨細胞においてAkt及びpAktを検出するためにウェスタンブロットを施行した。

##### 1) 細胞溶解液の作製

1アッセイあたりの細胞数を $2 \times 10^4$ 個とし、sample buffer solution (和光純薬, 大阪)を加え5分間煮沸し、その後12,000回転/分、10分間遠心分離し上清のみ回収し細胞溶解液とした。

##### 2) 電気泳動およびメンブレンへの転写

細胞溶解液はsodium dodecyl sulfate (SDS)含有10%ポリアクリルアミドゲルにて150V, 1時間で電気泳動しさらにPVDFメンブレン (High performance chemiluminescence film, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England)に150V, 1時間で転写を施行した。その後ブロッキング剤と4°C, over nightで反応させた。

##### 3) 抗体との反応と検出

ブロッケーヌとの反応後0.2% TWEEN-PBSとブロッケーヌを9:1の割合で混合し抗体希釈液を作製し、1000倍希釈した1次抗体にメンブレンを浸し室温で1時間、7500倍希釈した2次抗体にて

震盪しながら1時間、室温にて反応させた。0.2% Tween-PBSにて3回洗浄後 ECL plus Western Blotting Detection System® (Amersham Bioscience) を使用し、メンブレンを遮光下に5分間反応させフィルムに感光後現像した。検出されたバンドの強度は (Image-J ver. 1.37, NIH) を用い測定した。

#### 8. 統計学的検討

得られた各データは平均値±標準偏差 (mean±SD) で表し、有意差検定には paired Student's t-test 及び分散分析法 (One-way ANOVA) を用いた。P<0.05を統計的有意とした。

## 結 果

### 1. Real-time PCR 法によるアグリカンおよび2型コラーゲン mRNA の発現の検討

70%コンフルエント細胞, 100%コンフルエント細胞共に2型コラーゲンおよびアグリカンの mRNA の発現を認めた。両遺伝子ともに70%コンフルエント細胞において発現が高い傾向が認められた (図1)。このことから本研究に用いる70%コンフルエント細胞は軟骨細胞としての形質を保持し、積極的に軟骨基質を産生していると考えられた。

### 2. 老化関連β-ガラクトシダーゼ (SA β-GAL) 染色

SA β-GAL 染色では酸化 LDL 0, 50, 100 μg/ml を添加した軟骨細胞は濃度依存性に淡青色の染色性が亢進し、SA β-GAL 活性の上昇を示した (図2 A-C)。Native LDL 100 μg/ml を添加した軟骨細胞では SA β-GAL 活性の上昇を認めなかった (図2

D)。また、酸化 LDL 100 μg/ml を添加する際に、抗ウシ LOX-1 マウスモノクローナル抗体 (TS-20) 前処理 (40 μg/ml, 30分間) を行うと SA β-GAL 活性の上昇が抑制されるが (図2 E)、非特異的マウス IgG 前処理 (40 μg/ml, 30分間) では抑制されなかった (図2 F)。

### 3. BrdU 取込みによる細胞分裂能の評価

蛍光顕微鏡を用いた軟骨細胞の BrdU 取り込みの観察において、70%コンフルエント細胞と100%コンフルエント細胞を比較すると、70%コンフルエント細胞の蛍光強度が強く、また、軟骨組織から分離直後、培養前の軟骨細胞では蛍光はほとんど認められなかった (図3 A)。ELISA 法による軟骨細胞の BrdU 取込みの定量的測定でも同様の結果が得られ

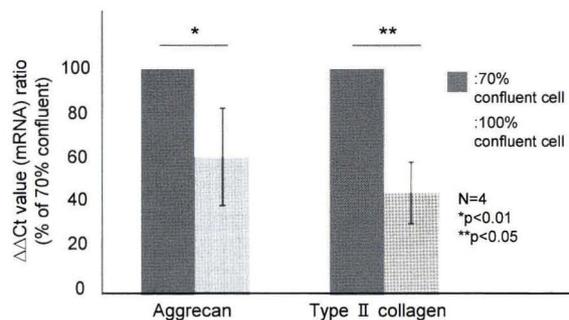


図1 70%および100%コンフルエントのウシ培養軟骨細胞における軟骨基質遺伝子発現。Real-time PCR 法を用い軟骨細胞によるアグリカン (Aggrecan) および2型コラーゲン (Type II collagen) mRNA の発現量を比較した (N=4, \* p<0.05, \*\* p<0.01, Student's paired t-test)。

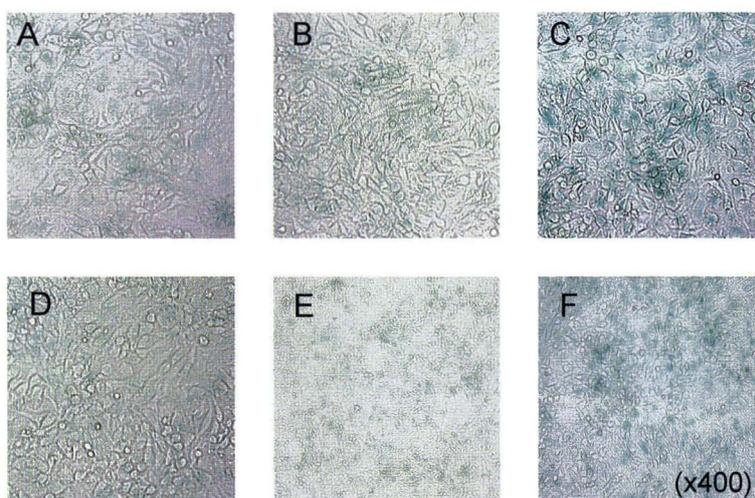


図2 酸化 LDL 添加による老化関連β-ガラクトシダーゼ (SA β-GAL) 活性の変化。70%コンフルエントとなったウシ関節軟骨細胞にそれぞれ酸化 LDL 0 μg/ml (A), 50 μg/ml (B), 100 μg/ml (C), native LDL 100 μg/ml (D) を添加し、24時間培養した後に SA β-GAL 染色を行い、倒立顕微鏡にて観察した。さらに、抗ウシ LOX-1 マウスモノクローナル抗体 (TS-20) (E)、非特異的マウス IgG (mouse-IgG) (F) を40 μg/ml 添加し30分間前処理した後に、酸化 LDL 100 μg/ml を添加し、同様に SA β-GAL 染色を行った (×400倍)。

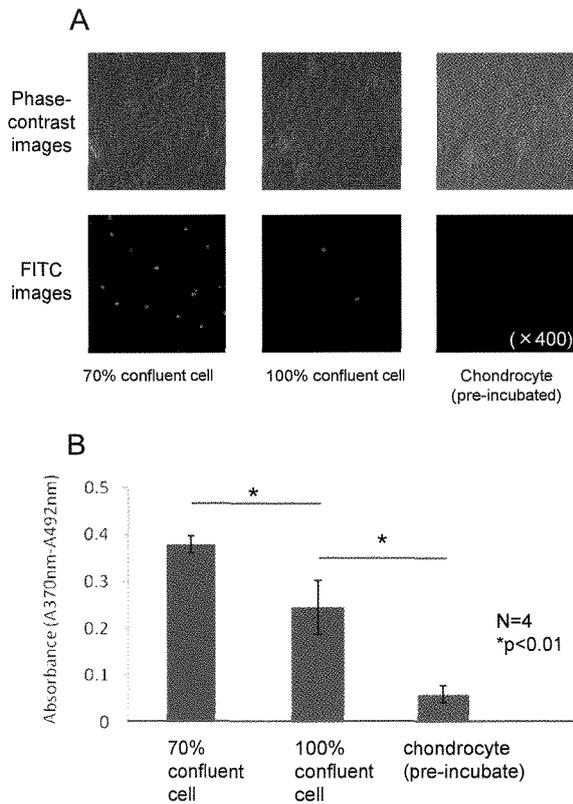


図3 BrdU 取込みによる細胞分裂能の評価。A. 蛍光顕微鏡を用いた軟骨細胞の BrdU 取込みの観察。70%, および100%コンフルエントの軟骨細胞, 培養前の軟骨細胞の BrdU の取り込みを拡大率400倍にて観察した。B. ELISA 法にて各軟骨細胞の BrdU の取り込みを定量した。結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示す。(N=4, ANOVA, \* p<0.01)

た(図3B)。次に, 酸化 LDL 添加が70%コンフルエント細胞の分裂能に与える影響について検討した。ELISA 法による BrdU 取込みの測定では native LDL (0, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加した際には吸光度に変化が見られなかったが(図4A), 酸化 LDL (0, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加した際には濃度依存性に吸光度の減少を認めた(図4B)。また, この吸光度の減少は TS-20 前処理 (40  $\mu\text{g/ml}$ , 30分間)により回復し(図4C), 非特異的 mouse IgG 前処理 (40  $\mu\text{g/ml}$ , 30分間)では濃度依存性の吸光度の減少を認めた(図4D)。

4. 酸化 LDL の培養軟骨細胞テロメラーゼ活性に与える影響

1) 培養軟骨細胞テロメラーゼ活性の評価

HeLa 細胞のテロメラーゼ活性を100%として比較すると, 70%コンフルエント軟骨細胞のテロメラーゼ活性は $7.75 \pm 1.44\%$ であった。100%コンフルエント軟骨細胞では $1.90 \pm 1.19\%$ と著しく低値であった。また, 軟骨組織から分離した直後の軟骨細胞ではテロメラーゼ活性はほとんど検出されなかった(図5)。画像解析ソフト (Image-J ver. 1.37) による定量化の結果を表2に示す。以下のテロメラーゼ活性の測定実験では, 70%コンフルエント軟骨細胞を用いた。

2) 酸化 LDL 添加によるテロメラーゼ活性の経時的变化

酸化 LDL 50  $\mu\text{g/ml}$  を添加し, 0, 3, 6, 12, 24時間経過後のテロメラーゼ活性を stretch PCR 法で検出し, 画像解析ソフト (Image-J ver. 1.37)

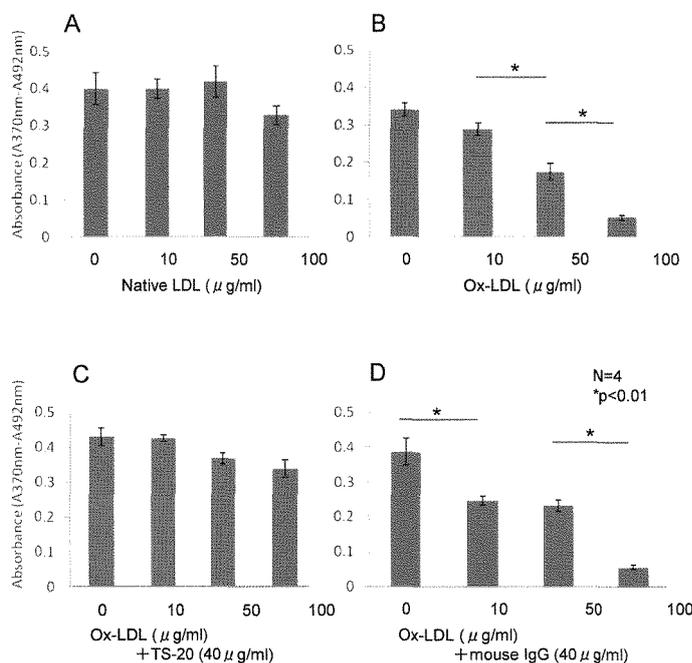


図4 酸化 LDL による軟骨細胞の細胞分裂能の変化。

70%コンフルエントの軟骨細胞に native LDL (0, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) (A), 酸化 LDL (ox-LDL) (0, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) (B) を添加し, 24時間インキュベートした後に BrdU 取込みを ELISA 法にて定量した。酸化 LDL (0, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) の添加前に TS-20 (40  $\mu\text{g/ml}$ , 30分間) (C), および, 非特異的マウス IgG (40  $\mu\text{g/ml}$ , 30分間) (D)にて前処理を行い, LOX-1 の抑制実験を行った。結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示す (N=4, ANOVA, \* p<0.01)。

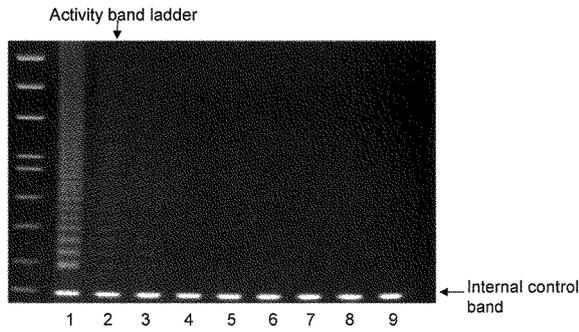


図5 ウシ培養軟骨細胞におけるテロメラーゼ活性の評価。  
軟骨細胞におけるテロメラーゼ活性を stretch PCR 法を用い検出した。テロメラーゼ活性は activity band ladder として観察される。Positive control として HeLa 細胞を使用した。各サンプルの熱処理は 85°C, 10 分間とした。1: HeLa cell, 2: 70% confluent cell, 3: 100% confluent cell, 4: Pre-incubated chondrocyte 5: HeLa cell (熱処理), 6: 70% confluent cell (熱処理), 7: 100% confluent cell (熱処理), 8: Pre-incubated chondrocyte (熱処理), 9: Negative control. (キット添付の Lysis solution のみ)

表2 各培養軟骨細胞のテロメラーゼ活性

	Telomerase activity (% of HeLa cells) (Mean ± SD, N=4)
70% confluent cell	7.75 ± 1.44
100% confluent cell	1.90 ± 1.19
Pre-incubated cell	0.25 ± 0.56

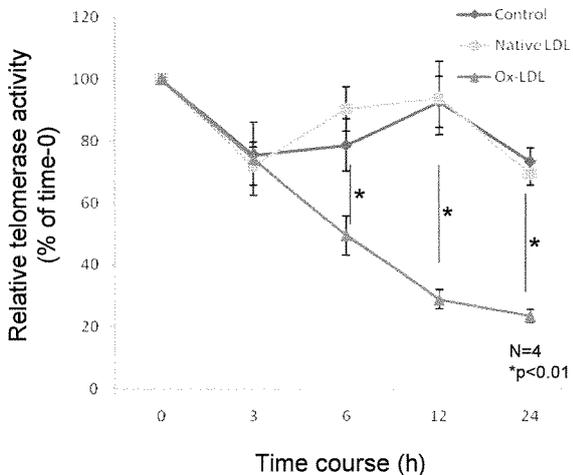


図6 Native LDL, 酸化 LDL を 50 μg/ml 添加した際のテロメラーゼ活性の経時的変化。各系列の数値は Time-0 でのテロメラーゼ活性に対する相対値の平均値で示した。エラーバーは標準偏差を示す。Control には培養メディアのみで培養した軟骨細胞のテロメラーゼ活性を示す (N=4, ANOVA, \* p < 0.01)。

により定量した。テロメラーゼ活性は経時的に低下し、添加後24時間で time-0 の 23.4 ± 4.44% となった。コントロールおよび native LDL 50 μg/ml 添加では経時的に有意な変化は認められなかった (図6)。

3) 酸化 LDL による軟骨細胞のテロメラーゼ活性の経量的変化

酸化 LDL (0, 10, 50, 100 μg/ml) を 12 時間反

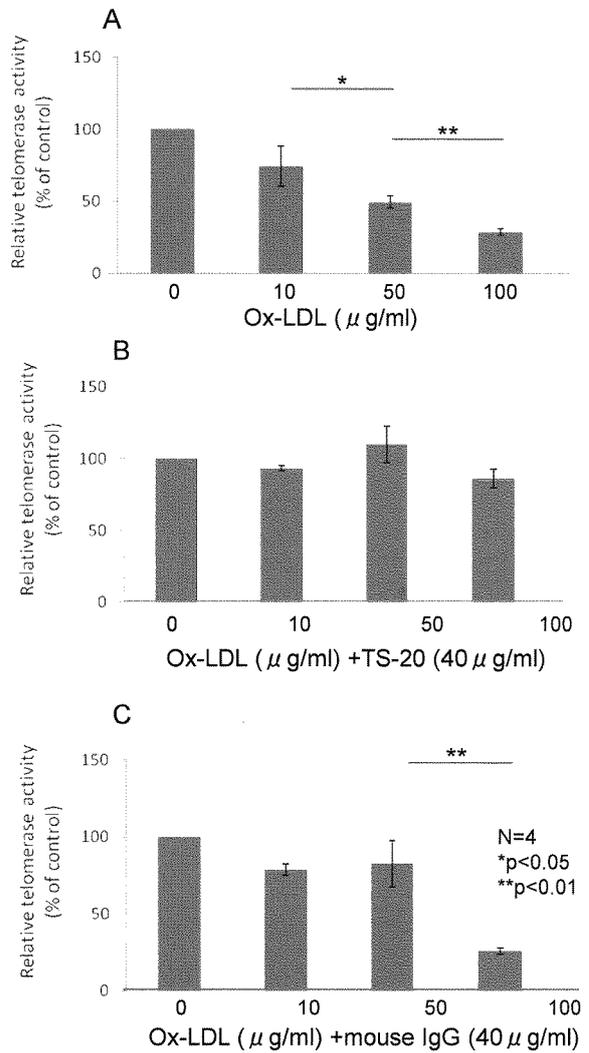


図7 酸化 LDL による軟骨細胞テロメラーゼ活性の用量反応。  
A. 軟骨細胞に酸化 LDL (0, 10, 50, 100 μg/ml) を添加し、12 時間インキュベートした後にテロメラーゼ活性を測定した。B. 前処理として TS-20 を 40 μg/ml, 30 分間反応させ、同様にテロメラーゼ活性を測定した。C. mouse IgG を 40 μg/ml を加え 30 分間反応させ、同様にテロメラーゼ活性を測定した。各系列において酸化 LDL 添加濃度 0 μg/ml でのテロメラーゼ活性の平均値に対する相対値を算出した。エラーバーは標準偏差を示す (N=4, ANOVA, \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01)。

応させ、軟骨細胞のテロメラーゼ活性を stretch PCR 法で検出し、画像解析ソフト (Image-J ver. 1.37) により定量した。酸化 LDL 添加により軟骨細胞テロメラーゼ活性は濃度依存性に低下した (図 7 A)。TS-20 前処理 (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30分間) によりテロメラーゼ活性は回復したが、非特異的マウス IgG 前処理 (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30分間) では、酸化 LDL 添加により濃度依存性にテロメラーゼ活性は低下した (図 7 B, C)。

5. PI3k/Akt 経路のテロメラーゼ活性におよぼす影響

軟骨細胞に PI3 kinase の特異的阻害剤 LY294002 (0, 0.05, 0.5, 1.0 nM) を添加し12時間反応させ、テロメラーゼ活性を測定した。テロメラーゼ活性は LY294002 添加によりの濃度依存性に低下した。また、酸化 LDL (0, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加する際に PI3 kinase の活性化因子 IGF-1 100 ng/ml を同時に添加し12時間反応させると、酸化 LDL によるテロメラーゼ活性の低下は回復した (図 8 A)。

6. ウェスタンブロットによる PI3k/Akt 経路の検討

1) LY294002, IGF-1 による Akt リン酸化反応への影響

軟骨細胞に LY294002 を 0.5 nM 添加すると経時的な pAkt 量の減少を認め、添加後10分で pAkt 量は著しく減少した。また、酸化 LDL 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加においても添加後10分で pAkt 量は著しく減少した。酸化 LDL 添加の際に IGF-1 を 100 ng/ml 同時に添加すると酸化 LDL による経時的な pAkt 量の減少は回復した (図 9 A)。これらの結果は、繰り返

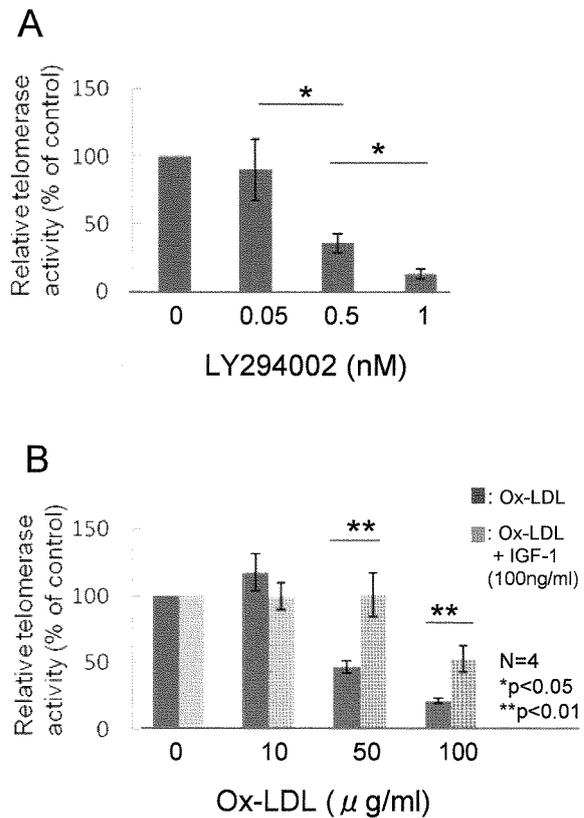


図 8 PI3 kinase 特異的阻害剤 LY294002 と酸化 LDL 添加時のテロメラーゼ活性の変化。A. 軟骨細胞に PI3 kinase 特異的阻害剤である LY294002 (0, 0.05, 0.5, 1.0 nM) を添加し、24時間後のテロメラーゼ活性を測定した。B. 軟骨細胞に酸化 LDL (0, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し、12時間後のテロメラーゼ活性を測定した。同時に PI3 kinase 活性化因子である IGF-1 100 ng/ml を添加した場合のテロメラーゼ活性も示す。数値はコントロールに対する相対値で示した。エラーバーは標準偏差を示す (N=4, ANOVA, \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ )。

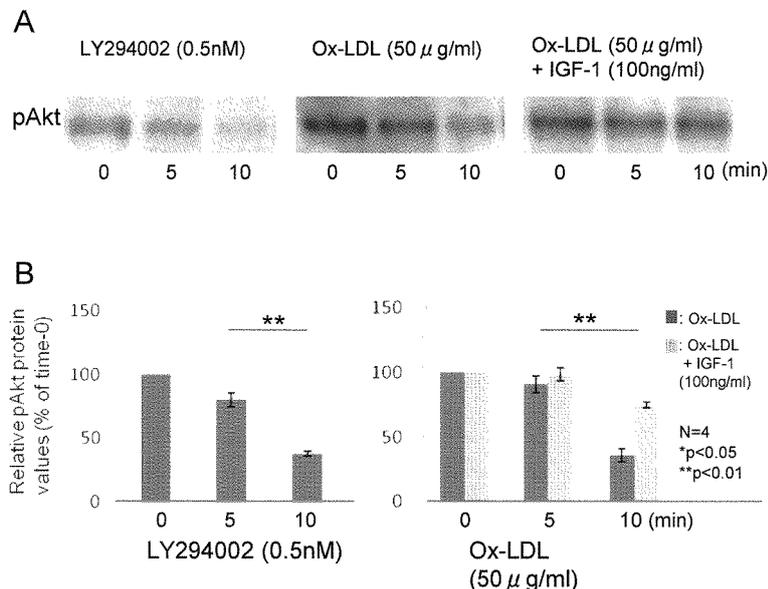
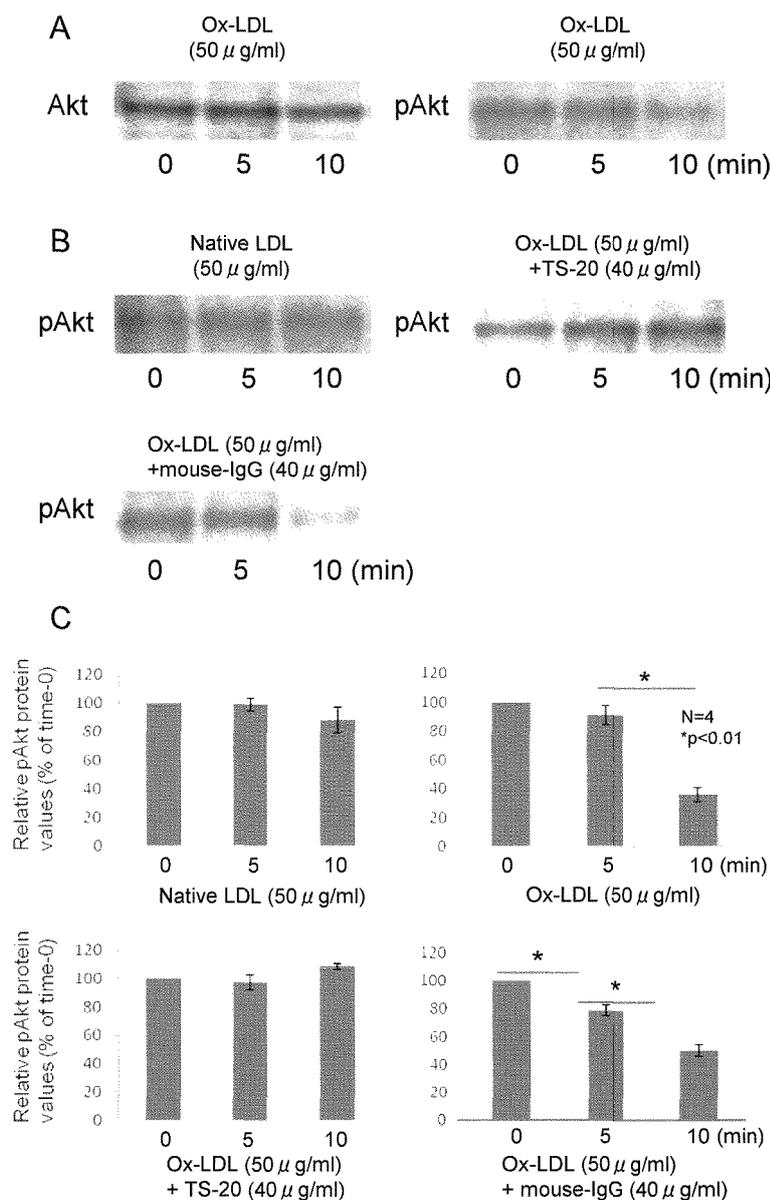


図 9 Western Blot によるリン酸化 Akt (pAkt) の検出。A. 軟骨細胞に LY294002 を 0.5 nM, 酸化 LDL を 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 酸化 LDL と同時に IGF-1 を 100 ng/ml 添加し、0, 5, 10分経過した時点での pAkt を Western Blot にて検出した。B. 検出されたバンドの強度を画像解析ソフト (Image-J ver. 1.37) を用い測定し、time-0 の強度に対する相対値を平均値  $\pm$  標準偏差で示した (N=4, ANOVA, \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ )。



**図10** 酸化 LDL 添加によるリン酸化 Akt (pAkt) 量の変化。  
 A. 軟骨細胞に酸化 LDL を 50 μg/ml 添加し Western Blot にて Akt および pAkt を検出した。B. Native LDL 50 μg/ml を添加したサンプル、前処理として TS-20 40 μg/ml および mouse IgG 40 μg/ml を 30 分間反応させた後に酸化 LDL 50 μg/ml を添加したサンプルにて pAkt を検出した。C. Western Blot による pAkt のバンド強度を画像解析ソフト (Image-J ver. 1.37) にて定量し、time-0 での pAkt のシグナル強度に対する相対値を平均値 ± 標準偏差で示した (N=4, ANOVA, \* p<0.01)。

し 4 回行った実験結果を画像解析ソフト (Image-J ver. 1.37) により定量化したものにおいて確認された (図 9 B)。

## 2) 酸化 LDL による Akt リン酸化反応への影響

軟骨細胞に酸化 LDL 50 μg/ml を添加しても、Akt 量に変化を認めなかったが、pAkt 量には経時的な減少を認め、添加後 10 分で著明に減少した (図 10A)。一方、native LDL 50 μg/ml 添加では pAkt 量の経時的な減少を認めなかった (図 10B)。また、酸化 LDL 添加による pAkt 量の減少は TS-20 前処理 (40 μg/ml, 30 分間) により回復するが、非特異的マウス IgG 前処理 (40 μg/ml, 30 分間) では pAkt 量の回復は認められなかった (図 10B)。これらの結果は、繰り返し 4 回行った実験結果を画像解析ソフト (Image-J ver. 1.37) により定量化したものに

いて確認された (図 10C)。

## 考 察

早期変形性関節症における変性軟骨組織の特徴的な病理所見として、軟骨表層の線維化に伴う軟骨細胞の増殖がある。軟骨細胞は基質中に埋め込まれた成長因子の刺激を受け活性化され、細胞分裂能と基質産生は亢進していることが知られており、また、軟骨細胞は集簇しクローニング (クラスターリング) と呼ばれる特徴的な組織像を呈する<sup>35,36</sup>。この病理所見は軟骨組織の修復反応と考えられ、変形性関節症における軟骨変性は、軟骨細胞老化に伴う細胞分裂能および細胞機能の低下により生じる不十分な修復反応が関与すると考えられている。すなわち、早期には成長因子刺激により軟骨細胞の分裂能と基質

産生能は亢進するが、経過とともに軟骨細胞は老化し分裂能および基質産生が低下する<sup>35</sup>。実際、OA 軟骨の軟骨細胞はテロメアの短縮、SA  $\beta$ -GAL の発現、細胞分裂能や基質産生能の低下など、老化細胞に特徴的な表現形を示していることが報告されており、細胞老化と軟骨変性の関連が示されている<sup>20,21,33</sup>。

本研究では、まず、実験に用いる軟骨細胞の基質産生能について Real-time PCR 法にて検索をおこなった。培地に添加する FBS の刺激を受け増殖過程にある70%コンフルエント軟骨細胞は接触阻止 (contact inhibition) を生じた100%コンフルエント軟骨細胞に比較してアグリカン、2型コラーゲンともに発現が亢進していた。また、BrdU 取込み能による細胞分裂能の評価においても70%コンフルエント軟骨細胞は100%コンフルエントおよび組織より分離した直後の軟骨細胞に比べて分裂能が高かった。すなわち、実験に用いられた70%コンフルエント培養軟骨細胞は成長因子により活性化された OA 軟骨細胞に近い表現形をもつものと思われた。

次いで、我々が注目する酸化 LDL が培養軟骨細胞に対して細胞老化促進因子として作用するかを検討した。まず、細胞老化の生物学的マーカーである SA $\beta$ -GAL 染色を行なった。SA $\beta$ -GAL は変性軟骨におけるクローニング細胞に活性が高いことが示されており、軟骨組織においても細胞老化の生物学的マーカーと考えられている<sup>21,33,37</sup>。酸化 LDL 添加により培養軟骨細胞の SA $\beta$ -GAL 染色性は亢進し、抗ウシ LOX-1 抗体前処理にて染色の抑制が観察された。また、酸化 LDL による軟骨細胞分裂能の変化を BrdU の取込み能にて評価した。70%コンフルエントの軟骨細胞培地に酸化 LDL を添加すると、BrdU 取込み能は用量依存性に低下し、抗ウシ LOX-1 抗体前処理にて BrdU の取込み能が回復した。同様の結果は血管内皮細胞においても示されており<sup>38</sup>、酸化 LDL が軟骨細胞においても老化促進因子として作用することが示された。酸化 LDL のこの老化促進作用は継代培養が不要であり、酸化 LDL 添加後24時間で明らかな変化が認められたことより未成熟細胞老化であると考えられる<sup>19</sup>。

細胞老化のメカニズムを説明する仮説として最も一般的なものにテロメア仮説がある。テロメア長を維持するテロメラーゼ活性は細胞老化に関わる重要な酵素活性である<sup>39</sup>。テロメラーゼは生殖細胞や癌細胞、株化細胞のような不死化細胞では高い活性が認められるが、体細胞では活性が低いとされてきた<sup>26,27,40-43</sup>。本研究では、まず、増殖活性が低いとされる軟骨細胞がテロメラーゼ活性を示すのか、また、

成長因子を含むウシ血清を添加して行う細胞培養により、テロメラーゼ活性が変化するかを検索した。細胞を単離した直後の軟骨細胞ではテロメラーゼ活性は認められず、70%コンフルエンスにおいては HeLa 細胞の約8%、100%コンフルエンスにおいては約2%であった。すなわち、成長因子刺激を受けて活性化した軟骨細胞では、HeLa 細胞に比較して低いながらも明らかなテロメラーゼ活性が認められた。これは、通常の体細胞においてもテロメラーゼ活性が認められ、細胞増殖に関与するとの報告<sup>44,45</sup>、および、培養下に増殖する軟骨細胞においてテロメラーゼ活性が認められるとの報告を支持する結果であった<sup>46,47</sup>。また、ほとんど全ての体細胞は増殖に際してテロメラーゼ活性の生理的制御を受けることが報告されており<sup>48</sup>、変性軟骨組織において増殖活性を示す軟骨細胞のテロメラーゼ活性は上昇し、軟骨細胞の老化遅延および機能維持に役割を担うものと考えられる。すなわち、テロメラーゼ活性はテロメア構造の維持を介して組織修復に関与していることが推察される。

次に酸化 LDL によるテロメラーゼ活性の変化を経時的、経量的に観察した。酸化 LDL 添加により経時的にテロメラーゼ活性は抑制され、24時間後には添加前の約20%となった。また、酸化 LDL は用量依存性にテロメラーゼ活性を抑制し、抗ウシ LOX-1 抗体による前処理は酸化 LDL によるテロメラーゼ活性の抑制を回復した。以上より、酸化 LDL は LOX-1 との結合を介してテロメラーゼ活性を抑制することが示された。前述の如く、OA 軟骨細胞は増殖活性を示し、増殖細胞においては生理的な制御としてテロメラーゼ活性の亢進が生じるものと考えられる。増殖軟骨細胞におけるテロメラーゼ活性の抑制はテロメアの短縮やテロメア構造の不安定化をもたらす細胞老化を導くため、酸化 LDL は組織の修復を阻害する可能性がある。実際、OA 軟骨細胞においてはテロメアの短縮が示されており、テロメア長の短縮と SA- $\beta$ GAL 発現亢進、分裂能の低下の間には強い相関が認められている<sup>32</sup>。

さらに本研究においては、テロメラーゼ活性の制御に関わる細胞内経路について検討を行った。テロメラーゼはテロメラーゼ逆転写酵素部分のリン酸化により活性の制御を受けており、そのリン酸化酵素として、PKC および Akt (PKB) の関与が示されてきた<sup>19</sup>。一般に、PI3k/Akt 経路は細胞周期の進行、核内転写因子の制御、細胞生存に重要な役割を果たすと言われ<sup>49-51</sup>、軟骨細胞において、この経路は軟骨細胞の分化やアポトーシスの制御を行い<sup>52</sup>、アグリカンの発現調整を行うと報告されている<sup>53</sup>。また、ラ

ット軟骨細胞において、酸化 LDL は PI3 k/Akt 経路を不活化し、細胞活性を抑制することが知られている<sup>10</sup>。さらに、Breitschopf らは血管内皮細胞において酸化 LDL は PI3k/Akt 経路を不活化し、テロメラーゼ活性を抑制することを報告している<sup>54</sup>。そこで、ウシ軟骨細胞においても、酸化 LDL が PI3k/Akt 経路の不活化を介してテロメラーゼ活性の抑制を行うかを検討した。PI3 kinase の特異的阻害薬である LY294002 は用量依存性にテロメラーゼ活性を抑制し、PI3 kinase の活性化増殖因子 IGF-1 は酸化 LDL によるテロメラーゼ活性を回復した。また、酸化 LDL はリン酸化 Akt 量を経時的に減少させ、抗 LOX-1 抗体は酸化 LDL によるリン酸化 Akt 量の減少を回復した。これらのことから、酸化 LDL によるテロメラーゼ活性の抑制は LOX-1 との結合を介した PI3k/Akt 経路の不活化によることが示された。

今回の研究においてはテロメア長の変化に関しては検討していない。一般に、ストレス因子である酸化 LDL や TNF- $\alpha$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は明らかなテロメア短縮を伴わずにテロメラーゼ活性を抑制し、未成熟細胞老化を誘導すると考えられている<sup>19,53</sup>。また、テロメア長非依存性の細胞老化が分裂能を制限し、老化軟骨細胞の蓄積に関与すること<sup>55</sup>、テロメラーゼ活性はテロメア伸長のみならずテロメア長非依存性に体細胞の分裂能を制御することが示されている<sup>18</sup>。また、本研究においても酸化 LDL による SA $\beta$ -GAL 活性の亢進、細胞分裂能の低下は酸化 LDL 添加後 24 時間以内に生じており、テロメア長の臨界短縮とは関連なく生じる現象であると思われる。しかし、実際に OA 軟骨細胞においてテロメア長の短縮が示されており、酸化 LDL は分裂し増殖する軟骨細胞において認められるテロメラーゼ活性を抑制することよりテロメア長の短縮をもたらす可能性がある。今回のデータはそれらを示唆するものであるが、酸化 LDL 添加によるテロメア長の変化に関しては今後の検討課題としたい。また、未成熟老化が誘導された細胞においては癌抑制遺伝子である p53 の安定化や Rb の低リン酸化が、あるいは p53-p21-pRb 経路の活性化が生じると言われている<sup>19,37,56,57</sup>。特に SA $\beta$ -GAL 活性の亢進には P53 によるライソソームの透過性亢進が関与するとされているため<sup>58</sup>、酸化 LDL によるこれら老化関連遺伝子の発現状況は興味深い点である。これらの点に関しても今後の検討課題である。

我々は本研究において酸化 LDL がその受容体 LOX-1 との結合を介して軟骨細胞の未成熟老化を誘導するとともに、テロメラーゼ活性の抑制を介して細胞老化に関与する可能性を示した。軟骨細胞老

化は細胞機能の低下により組織修復能の低下をもたらすと考えられる。酸化 LDL は変形性関節症の病態形成に大きな意義を持つと思われる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を頂いた浜西千秋教授に深く謝意を表します。また、本研究にあたり御助力頂いた整形外科学教室大学院生の岸本英樹先生、三木良久先生、高度先端総合医療センター再生部門の寺村岳士先生、実験助手の皆様に心から感謝申し上げます。

## 文 献

1. Kita T, Nagano Y, Yokode M, Ishii K, Kume N, Ooshima A, Yoshida H, Kawai C (1987) Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5928-5931
2. Witztum JL, Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785-1792
3. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386: 73-77
4. Aoyama T, Fujiwara H, Masaki T, Sawamura T (1999) Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 31: 2101-2114
5. Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G (2006) Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* 69: 36-45
6. Tiku ML, Shah R, Allison GT (2000) Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem* 30: 20069-20076
7. Shah R, Raska K Jr, Tiku ML (2005) The presence of molecular markers of in vivo lipid peroxidation in osteoarthritic cartilage: a pathogenic role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52: 2799-2807
8. Hart DJ, Doyle DV, Spector TD (1995) Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J Rheumatol* 22: 1118-1123
9. Nakagawa T, Akagi M, Hoshikawa H, Chen M, Yasuda T, Mukai S, Ohsawa K, Masaki T, Nakamura T, Sawamura T (2002) Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 46: 2486-2494
10. Nakagawa T, Yasuda T, Hoshikawa H, Shimizu M,

- Kakinuma T, Chen M, Masaki T, Nakamura T, Sawamura T (2002) LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death-possible role of dephosphorylation of Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 91-97
11. 西村俊司, 赤木将男, 浜西千秋 (2003) 培養軟骨細胞における酸化低比重リポ蛋白とレクチン様酸化低比重リポ蛋白受容体 (LOX-1) の結合による細胞内活性酸素種の発生とNF- $\kappa$ Bの活性化. *近畿大医誌* 28: 109-119
  12. Akagi M, Kanata S, Mori S, Itabe H, Sawamura T, Hamanishi C (2007) Possible involvement of the oxidized low-density lipoprotein/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 281-290
  13. 赤木将男 (2008) 変形性関節症: 最近の知識 酸化低密度リポ蛋白 (LDL) とレクチン様酸化 LDL 受容体: 生活習慣病と運動器機能病を結ぶ分子. *別冊整形外科* 53: 33-37
  14. Buckwalter JA, Martin J, Mankin HJ (2000) Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* 49: 481-489
  15. Rice DP (1992) Data needs for health policy in an aging population (including a survey of data available in the United States of America). *World Health Stat Q* 45: 61-67
  16. Felson DT, Radin EL (1994) What causes knee osteoarthritis: are different compartments susceptible to different risk factors?. *J Rheumatol* 21: 181-183
  17. Speake SC, Szebenyi B, Dieppe PA (1995) Quantitative serial assessment of patellofemoral joint osteoarthritis from lateral knee radiographs. *Osteoarthritis Cartilage Suppl A*: 89-96
  18. Minamoto T, Komuro I (2007) Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 100: 15-26
  19. Chen J, Goligorsky MS (2006) Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1729-1739
  20. Martin JA, Buckwalter JA (2003) The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am. A Suppl* 2: 106-110
  21. Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, Clark IM (2002) The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 1: 57-65
  22. Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636
  23. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460
  24. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10114-10118
  25. Greider CW (1990) Telomeres, telomerase and senescence. *Bioessays* 12: 363-369
  26. Bryan TM, Cech TR (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 11: 318-324
  27. Meyerson M (2000) Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol* 18: 2626-2634
  28. Minamoto T, Mitsialis SA, Kourembanas S (2001) Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Mol Cell Biol* 21: 3336-3342
  29. Minamoto T, Komuro I (2008) Role of telomeres in vascular senescence. *Front Biosci* 13: 2971-2979
  30. Minamoto T, Komuro I (2007) Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 100: 15-26
  31. Piera-Velazquez S, Jimenez SA, Stokes D (2002) Increased life span of human osteoarthritic chondrocytes by exogenous expression of telomerase. *Arthritis Rheum* 46: 683-693
  32. Martin JA, Buckwalter JA (2001) Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: B172-179
  33. Martin JA, Buckwalter JA (2002) Human chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biorheology* 39: 145-152
  34. Martin JA, Klingelutz AJ, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA (2004) Effects of oxidative damage and telomerase activity on human articular cartilage chondrocyte senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59: 324-37
  35. Aubrey J H (2007) Pathology of osteoarthritis. Lippincott Williams & Wilkins, In Osteoarthritis, 4th Edition, Section 1: Basic Consideration. Philadelphia, pp 51-72
  36. Sandel LJ, Heinegard D, Hering TM (2007) Cell Biology, Biochemistry, and Molecular Biology of Articular Cartilage in Osteoarthritis. Lippincott Williams & Wilkins, In Osteoarthritis, 4th Edition, Section 1: Basic Consideration. Philadelphia, pp 73-106
  37. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367
  38. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I (2004) Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31: 407-413
  39. Liu JP (1999) Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 13: 2091-2104
  40. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.

- Science 266 : 2011-2015
41. Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33 : 787-791
  42. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279 : 349-352
  43. Steinert S, Shay JW, Wright WE (2000) LinksTransient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 273 : 1095-1098
  44. Broccoli D, Young JW, de Lange T (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 9082-9086
  45. Zhu X, Kumar R, Mandal M, Sharma N, Sharma HW, Dhingra U, Sokoloski JA, Hsiao R, Narayanan R (1996) Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 6091-6095
  46. Parsch D, Fellenberg J, Brummendorf TH, Eschbeck AM, Richter W (2004) Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Mol Med* 82 : 49-55
  47. Parsch D, Brummendorf TH, Richter W, Fellenberg J (2002) Replicative aging of human articular chondrocytes during ex vivo expansion. *Arthritis Rheum* 46 : 2911-2916
  48. Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC (2003) Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114 : 241-253
  49. Jeong SJ, Dasgupta A, Jung KJ, Um JH, Burke A, Park HU, Brady JN (2008) PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1-transformed cells. *Virology* 370 : 264-272
  50. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA (2004) Advances in protein kinase B signalling : AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 29 : 233-242
  51. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival : a play in three Akts. *Genes Dev* 13 : 2905-2927
  52. Oh CD, Chun JS (2003) Signaling mechanisms leading to the regulation of differentiation and apoptosis of articular chondrocytes by insulin-like growth factor-1. *J Biol Chem* 278 : 36563-36571
  53. Starkman BG, Cravero JD, Delcarlo M, Loeser RF (2005) IGF-1 stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK. *Biochem J* 389 : 723-729
  54. Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism. *FEBS Lett* 493 : 21-25
  55. Martin JA, Mitchell CJ, Klingelutz AJ, Buckwalter JA (2002) Effects of telomerase and viral oncogene expression on the in vitro growth of human chondrocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57 : B48-53
  56. Bringold F, Serrano M (2000) Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35 : 317-329
  57. Chen QM (2000) Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints. *Ann N Y Acad Sci* 908 : 111-125
  58. Yuan XM, Li W, Dalen H, Lotem J, Kama R, Sachs L, Brunk UT (2002) Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 6286-6291