

# 軟骨細胞に対する周期的牽引負荷がプロテオグリカン合成におよぼす影響：一酸化窒素の関与について

松川 将 隆

近畿大学医学部整形外科学教室

## 抄 録

変形性関節症の発症に重要な役割を果たす機械的ストレスと、その情報伝達機構の解明を目的とした。ウシ関節軟骨細胞を用いて、周期的牽引負荷に対する細胞代謝の変化について検討した。我々は軟骨細胞がフィブロネクチンと接着することによりケラタン硫酸合成能が亢進し、細胞内アクチンフィラメントの集積が増強することをみつけた。このような状態の細胞に周期的牽引負荷を加えると、一酸化窒素 (nitric oxide, NO)、プロテオグリカン合成が有意に亢進した。周期的牽引負荷による NO 産生の亢進は転写レベルで起こっており、NO 合成阻害剤の添加により NO 合成は抑制され、逆にプロテオグリカン合成は負荷によってさらに亢進した。したがって機械的ストレスによりプロテオグリカン合成は亢進するが、これは同時に産生される NO によりプロテオグリカン合成が抑制されていることが明らかにされた。

**Key words:** 変形性関節症, 軟骨細胞, 牽引負荷, プロテオグリカン, 一酸化窒素

## 緒 言

関節軟骨は軟骨細胞と細胞外基質より構成されている。軟骨基質に存在する代表的なプロテオグリカンは、コア蛋白とこれに付着するグリコサミノグリカンより構成される<sup>1</sup>。軟骨破壊の際に、これらの構成要素は関節液、更には血清中へ遊離され、これを定量することにより軟骨代謝の状態を知ることができる。ケラタン硫酸はこのグリコサミノグリカンの一種で、特有の糖鎖の繰返し配列よりなる。その分布は関節軟骨に比較的限定されていることにより、軟骨代謝の指標になると考え、我々はケラタン硫酸を「関節マーカー」としてきた<sup>2</sup>。

変形性関節症は、整形外科領域において最も頻度の高い関節疾患の一つである。関節軟骨を中心とした関節構成体における退行性および増殖性病変の混在を特徴とする慢性かつ進行性疾患である。その原因として、生化学的あるいは生体力学的メカニズムが関与することが示唆されてきたが、その細胞レベルでの検討がなされておらず、詳細は不明であった<sup>3</sup>。我々は局所における機械的ストレスが変形性関節症を発症させる最も重要な因子と考え、これまで

検討を重ねてきた<sup>4</sup>。その一つとして、コンピュータ制御により任意の条件で細胞に周期的牽引負荷を加えることができる Flexercell Strain Unit の導入がある。これまでに得られた知見として、この導入により軟骨細胞に対する弱いレベルの負荷はプロテオグリカン合成を促進し、強度の負荷ではこれが抑制されることが判明した<sup>5</sup>。

正常関節軟骨の構造上の特徴は、基質内に血管が存在しないことより軟骨細胞周囲の酸素分圧が少ないことがあげられる<sup>6</sup>。したがって、急激な酸素暴露により細胞障害や軟骨変性につながるものが想像される。我々はこれまでにフリーラジカルの軟骨変性に与える影響について検討を行ってきた<sup>7,8</sup>。具体的には、活性酸素<sup>9</sup>、パーオキシナイトライト<sup>10</sup>、過酸化水素<sup>11,12</sup>などが軟骨変性に関与することを明らかにしてきた。とりわけ一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は軟骨代謝に重要な意義を有することが示唆されている<sup>13</sup>。近年変形性関節症と NO の関連について注目されている<sup>14,15</sup>。軟骨細胞に対する機械的ストレスが NO 産生を促進させ、この NO によりプロテオグリカン合成が変化し、軟骨変性が引き起こされると考えられる。

機械的ストレスの細胞へのシグナル伝達は、細胞表面のレセプターであるインテグリンを介して行われることが報告されている<sup>16</sup>。インテグリンは分子量140~200 kDaの $\alpha$ 鎖と90~110 kDaの $\beta$ 鎖が非共有結合したヘテロダイマーの物質で、細胞外基質と結合し、細胞接着や移動のみならず基質集合に関与している<sup>17</sup>。インテグリンは主に細胞膜に存在し、一部は細胞質内でタリン、ビンキュリン、 $\alpha$ アクチニン等を介して細胞骨格に連結している。特に $\alpha_5\beta_1$ インテグリンは軟骨細胞においてフィブロネクチンレセプターとして働くとともに<sup>18,19</sup>、細胞外からの機械的ストレスを細胞内に情報伝達する作用、すなわちメカノレセプターであると考えられているがその詳細は不明である<sup>19</sup>。

### 材料と方法

#### 使用薬剤

使用した主な薬剤を以下に述べる。培養に使用したウシ血清は Gibco (Grand Island, NY) より、フィブロネクチンは Sigma (St. Louis, MO) より購入した。L-NG-monomethylarginine (L-NMMA) は同仁化学 (熊本, 日本) より購入した。

#### 軟骨の細胞培養

ウシ (生後10ヶ月) の関節軟骨を前足部 MP 関節より、無菌的に採取した。この際 FEATHER 社 (大阪) の10番剪刀を用い、手動的に関節面から深さ450~550  $\mu\text{m}$  の範囲を全層軟骨として切り出した。この全層軟骨より、軟骨細胞をコラゲナーゼ処理にて単離した<sup>20</sup>。これらの細胞を10%ウシ血清添加 MEM を用いて24穴カルチャープレート (Falcon, Oxford, CA) 及び flexible-bottom culture plates (BioFlex, Flexercell Corp., PA) に播種し、37°Cで5% CO<sub>2</sub>、飽和水蒸気圧の条件下で培養した。尚、プレートの膜表面をフィブロネクチン100  $\mu\text{g}/\text{well}$ 、Type 2 コラーゲン100  $\mu\text{g}/\text{well}$  でそれぞれコーティングし、37°Cで5% CO<sub>2</sub>、飽和水蒸気圧の条件下で48時間インキュベートしたものも使用した<sup>21</sup>。

#### 周期的牽引負荷

細胞を専用のプレート (flexible-bottomed culture plate, Flexercell 社) に  $1 \times 10^5$  個/well の密度で播種した。同プレートの底部は可撓性を有するシリコン膜よりなり、表面には Type1 コラーゲン処理がなされている<sup>5</sup>。牽引装置は Flexercell 社の装置 (FX-3000) を使用した。これはコンピューター制御のコントローラー、モニター、吸引機、培養プレート装置台より構成されている。培養プレートを設置した後、これに吸引を加えることにより膜が伸張し、

これに伴い付着した細胞に牽引力が加わる。コンピューターのコマンドを変更することにより、牽引周期及び牽引力を任意に設定することができる。細胞伸張割合と吸引レベル (kPa) には、正の相関関係がある。使用した牽引負荷の条件は1分間に10回の周期で全方向に牽引力を加え、最大伸張を5%とした。DNA 定量

サンプルは proteinase K 反応液 (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7) で処理し、56°Cで24時間インキュベートした。次に dissolving buffer (55 mM sodium Citrate, 30 mM EDTA, 0.15 M NaCl) を加え、3時間震盪した。Hoechst33258 で蛍光染色を行い、Cyto Fluor 4000 system (Perseptive Biosystems) で測定を行った<sup>22</sup>。

#### プロテオグリカン合成能

対照群及び機械的ストレス負荷群に4時間 [<sup>35</sup>S] sulfate 0.74 KBq/ml (Boston, MA, USA) を取り込ませた。培養液回収後、細胞破碎を行い、Econo-fluor (Du Point) 5 ml を加え、液体シンチレーションカウンターで測定した<sup>23</sup>。

#### ケラタン硫酸測定

96穴プレートを用いて BNC-Pg monomer 5  $\mu\text{l}$  (生化学工業, 東京) と chondroitinase ABC 10  $\mu\text{l}$  (生化学工業, 東京) を37°C 1時間インキュベートし、coating buffer を添加混合し、ELISA 測定用に固相作製した。次に inhibition mixture の作製を行った。サメ由来のケラタンサルフェイト (KS) で標準液を作製し、同時に回収したサンプルも96穴プレートに入れ (各100  $\mu\text{l}$ )、 $5 \times 10^6$  倍希釈した monoclonal anti-KS (生化学工業) を100  $\mu\text{l}$  ずつ加え、1時間37°Cでインキュベートした。固相に Inhibition mixture を100  $\mu\text{l}$  ずつ加え、更に  $1 \times 10^3$  倍希釈二次抗体 (抗マウス IgG) を100  $\mu\text{l}$  ずつ加え、室温で1時間反応後、ELISA analyzer EAR 400 (SLT Lab Instruments, Austria) を用い490 nm の波長で吸光度測定を行った<sup>20</sup>。

#### NO の測定

培養液中の NO ガスのほとんどが酸化された状態にあるため、これが還元されないよう、アスコルビン酸を含まない培養液を用いた。直径18.7 mm 高さ48.0 mm のガラス瓶に検体の培養液100  $\mu\text{l}$  を入れ、ゴム栓で密閉した。アスコルビン酸の飽和水溶液を加え、還元されて発生する NO を NO 専用測定機 (Scholar Tec 社製 FES-450) を用いて測定した。本機での NO 測定法は化学発光法に準じ、NO ガスの直接測定が可能である。NO 量は波形の積分値 (digit) として計算し、亜硝酸の溶解液より得られた標準曲線に外挿させた<sup>13</sup>。

## Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNAはISOGEN (Nippon Gene, Toyama, Japan)を使用し回収した。One Step RNA PCR Kit (Takara, Japan)を用いてRT-PCRを行った。誘導型NO合成酵素(以下iNOS)に対するRT-PCRアッセイはT3 Thermocycler (Biometra, Germany)で作製した。プライマーはウシiNOSに対するシーケンスを基に作製した<sup>24</sup>。Senseおよびantisenseの配列はそれぞれ、5'-TAGAGGAACATCTGGCCAGG-3', 5'-TGGCAGGGTCCCCTCTGATG-3'である。RNA (1 µg)は30分50°Cで逆転写し、逆転写酵素を2分94°Cで失活させた。cDNAの増幅は94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで1分、各0.2 µM primer, 2.5 U Taqと1 mM dNTPs存在下で27サイクル行った。PCR産物を電気泳動により分離した。反応終了後アガロース電気泳動を行い、372-bpの位置にiNOSバンドを確認した。対照としたβ-アクチンプライマーのsenseおよびantisenseはそれぞれ5'-CACACCTTCTACAATGAGCT-3'と5'-GAGGAGCAATGATCTTGATC-3'である。

## Quantitative RT-PCR assay

TaqMan PCRアッセイに使用したハイブリダイゼーションプローブとプライマーの配列を示す(表1)。Gene Bank データベースの塩基配列に基づき、Primer Express software (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Inc.)を使用し設計した。β-アクチンを対照として用いた。TaqMan プローブを使用し、クエンチャー色素から遊離したレポーター色素を測定した<sup>25</sup>。今回40サイクルの2ステップRT-PCR(熱変性95°C伸長反応62°C)を行った。iNOSとβ-actinに対するPCRアッセイはABI PRISM 7700 sequence detector (Perkin-Elmer Applied Biosystems Inc, CA, USA)を用いて、新たに生じた蛍光を測定し、PCR産物の増加量を検出した。

## アクチン線維の検出

培養細胞を1時間周期的牽引負荷後、rhodamine-phalloidinを加え、細胞内のアクチン線維を共焦点レーザー顕微鏡(MRC 2400 LSX imaging system:

Bio-Rad, England)にて観察した。なお使用したアルゴンレーザーは、出力250 mW、波長488 nm, 525 nmである。

## 統計処理

各データは平均値±標準偏差(mean±SD)で表し、有意差検定はStudent's t-testを用いた。

## 結 果

## ケラタン硫酸の合成

フィブロネクチンに接着した軟骨細胞の代謝の変化を検討するため、培養液中のケラタン硫酸量を測定した。各種コーティングしたプレートに1×10<sup>5</sup>個/wellの細胞密度で軟骨細胞を播種し、24時間後の培養液中のケラタン硫酸値を測定した。アルブミン、Type1, Type2 コラーゲンの上で培養した細胞ではケラタン硫酸合成に変化は認めなかった。これに対して、フィブロネクチンの上で培養した細胞では、ケラタン硫酸合成は有意に増加していた(図1)。

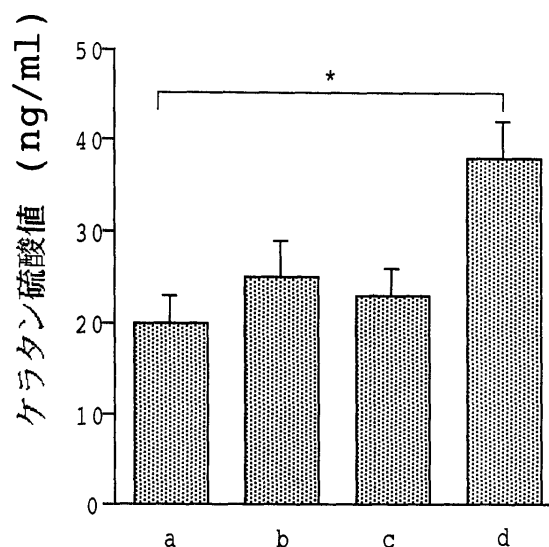


図1 各種コーティングにおけるケラタン硫酸値  
各種コーティングした専用プレートに1×10<sup>5</sup>個/wellの細胞密度で播種し、24時間後の培養液中のケラタン硫酸値を測定した。a: アルブミン b: Type1 コラーゲン c: Type2 コラーゲン d: フィブロネクチン n=6, \*p<0.01

表1 TaqMan PCRアッセイに使用したハイブリダイゼーション・プローブとプライマーの配列

iNOS	Forward	TCTGCAGACACGTGCGTTATG
	Reverse	AAGTCATGCTTCCCATCGCT
	Probe	FAM-CAACATCAGGTCGGCCATCACTGTGT-TAMRA
β-actin	Forward	AGGCATCCTGACCCCTCAAGTAC
	Reverse	GATCTTCTCCATGTGCTCCCA
	Probe	VIC-CATTGAGCACGGCATCGTCAACAA-TAMRA

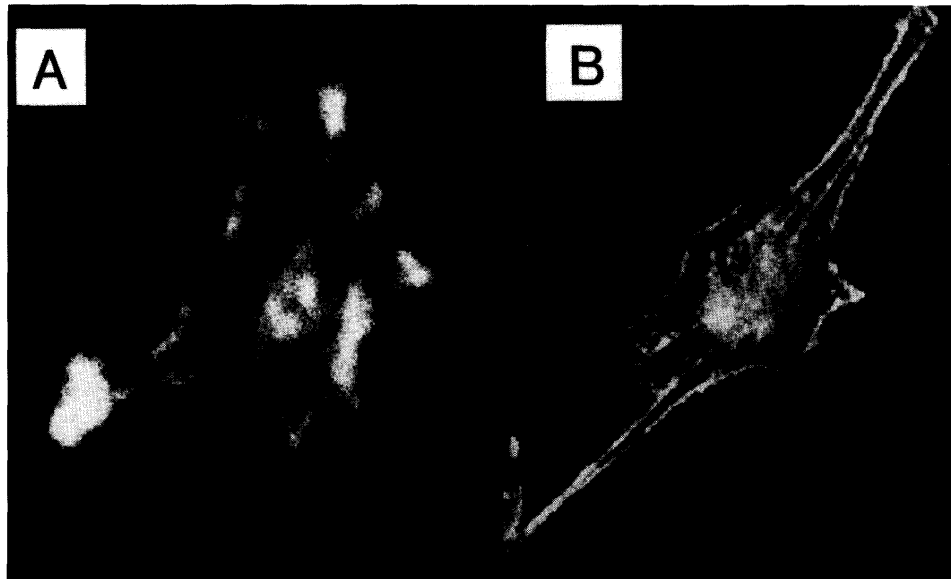


図2 アクチンフィラメントの集積  
A：Type1 コラーゲン，B：フィブロネクチンをコートしたプレート上で12時間培養した後，軟骨細胞のアクチンフィラメントの集積を観察した。A：アクチンフィラメントの集積なし B：アクチンフィラメントの集積あり×400

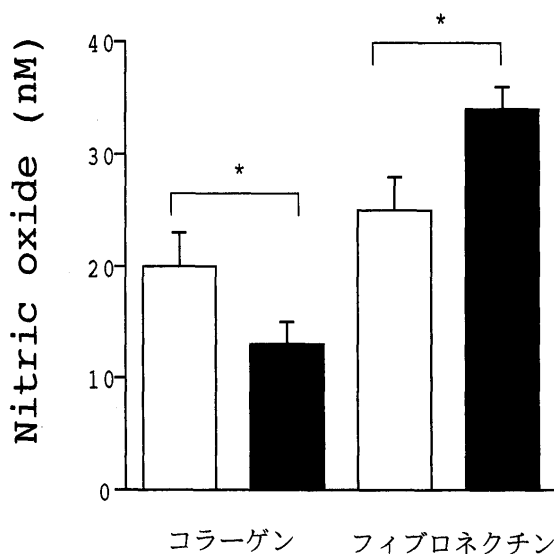


図3 周期的牽引負荷に対する内因性 NO 産生量  
Flexible-bottom culture plates の上で  $1 \times 10^5$  個/well の細胞密度で播種し，培養した軟骨細胞に，吸引力 10 kPa で頻度 10 回/分の割合で周期的牽引負荷を 24 時間加え，培養液内の NO 産生量を測定した。□：対照群 ■：牽引負荷群 n=6, \*p<0.01

#### アクチン線維の変化

フィブロネクチンへの細胞接着後に起こる細胞内骨格の変化を調べるためアクチンフィラメントの集積を観察した。12時間フィブロネクチンをコートしたプレート上で培養した軟骨細胞では，Type1 コラ

ーゲン上の細胞に比較して，アクチンフィラメントの明らかな集積を認めた (図 2)。

#### 周期的牽引負荷に対する内因性 NO 産生

Flexible-bottom culture plates の上で  $1 \times 10^5$  個/well の細胞密度で軟骨細胞を播種し，吸引力 10 kPa で頻度 10 回/分の割合で周期的牽引負荷を 24 時間加え，培養液内の NO 産生量を測定した。Type1 コラーゲン上の細胞では NO 産生が抑制されたが，フィブロネクチンコート上の細胞では NO 産生が有意に亢進していた (図 3)。

#### PCR による iNOSmRNA の発現

NO 産生の亢進が転写レベルで起こっていることを確認するために，12時間周期的牽引負荷後 iNOSmRNA の発現を PCR にて検討した。フィブロネクチンコート上の細胞では iNOSmRNA が明らかに強く発現していた (図 4)。

#### Quantitative RT-PCR による iNOSmRNA 定量

先に得られた結果を定量化するために，同じ条件で quantitative RT-PCR を施行した。フィブロネクチンコート上の細胞では Type1 コラーゲン上の細胞に比べて，iNOSmRNA が強く発現していた (図 5)。

#### 周期的牽引負荷のプロテオグリカン合成におよぼす影響

各種コーティングした専用プレートに  $1 \times 10^5$  個/well の細胞密度で播種し，24時間周期的牽引負荷後，プロテオグリカン合成能を  $[^{35}\text{S}]$  sulfate の細胞

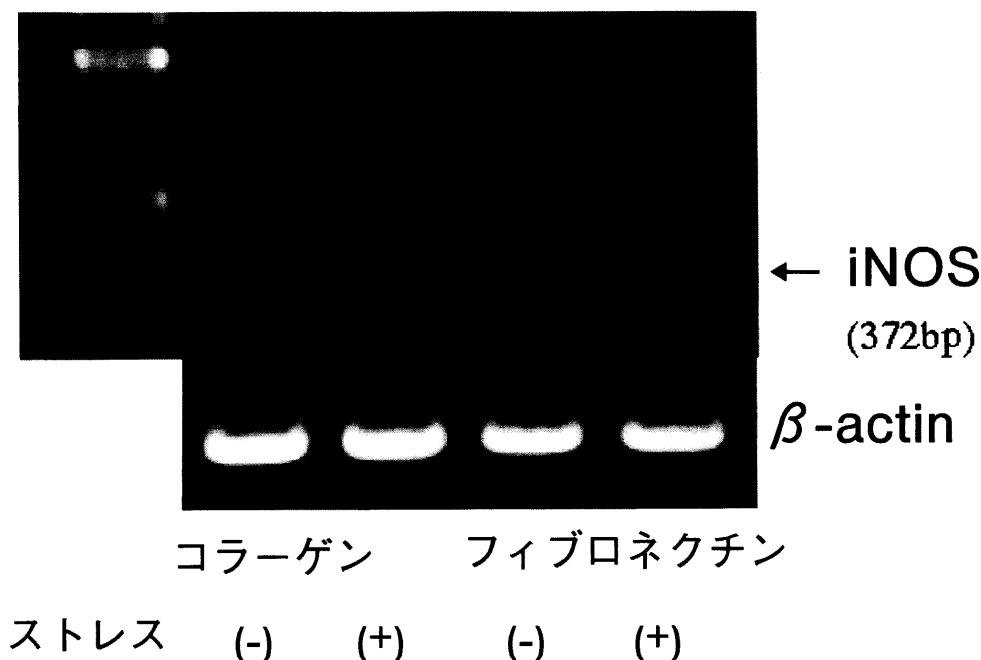


図4 PCRによるiNOS mRNAの発現  
12時間周期的牽引負荷後iNOS mRNAの発現をPCRにて測定した。

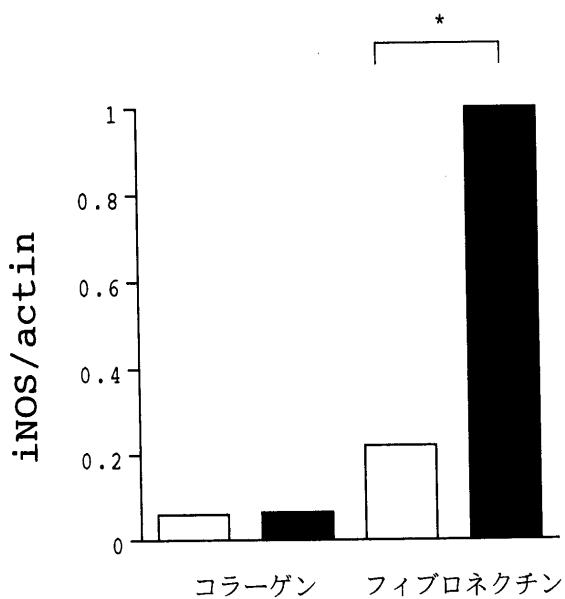


図5 Quantitative RT-PCRによるiNOS mRNA定量  
PCRで得られた結果を定量化するために、同じ条件でquantitative RT-PCRを施行した。フィブロネクチンコーティング群に周期的牽引を負荷した細胞からのiNOS mRNA発現量を1とした。□：対照群■：牽引負荷群 n=6, \*p<0.01

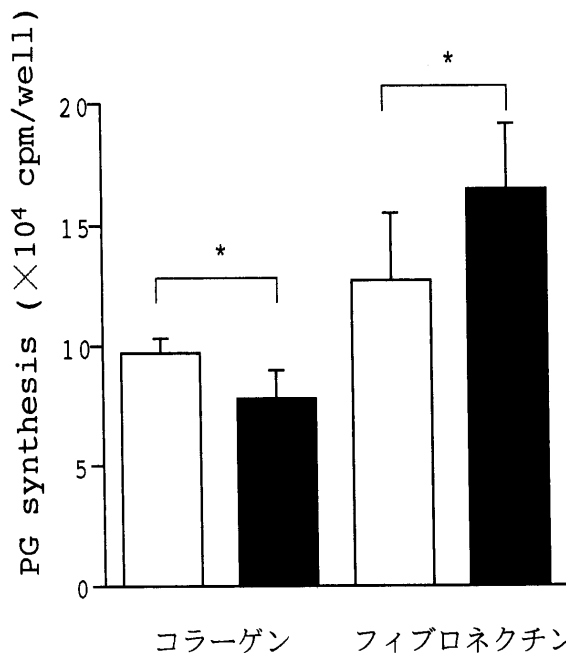


図6 周期的牽引負荷のPG合成におよぼす影響  
各種コーティングした専用プレートに1×10<sup>5</sup>個/wellの細胞密度で播種し、24時間周期的牽引負荷後、プロテオグリカン合成能を[<sup>35</sup>S] sulfateの細胞内への取り込みをもとに調べた。□：対照群■：牽引負荷群 n=6, \*p<0.05

内への取り込みをもとに調べた。Type1 コラーゲン上の細胞ではプロテオグリカン合成は約15%抑制された。一方フィブロネクチンコート上の細胞では

プロテオグリカン合成は有意に亢進した(図6)。内因性NOがプロテオグリカン合成に及ぼす影響さらに軟骨細胞への周期的牽引負荷により亢進し

表2 周期的牽引負荷によるNO, PG合成に対するNOインヒビター(L-NMMA)の影響

	NO/DNA (nM/ $\mu$ g)	PG/DNA ( $\times 10^4$ cpm/ $\mu$ g)
対照	15.3 $\pm$ 0.7	4.55 $\pm$ 0.77
牽引負荷群	19.0 $\pm$ 0.2*	6.86 $\pm$ 0.36*
牽引負荷群+L-NMMA	11.3 $\pm$ 0.3**	9.67 $\pm$ 0.29**

フィブロネクチンをコーティングした専用プレートに $1 \times 10^5$ 個/wellの細胞密度で播種し, 24時間培養後, L-NMMA (50 nM)を加え, 12時間周期的牽引を負荷し, 培養液中のNO産生と細胞内のPG合成量を測定した. n=6, \*p<0.01 対 対照群\*\*p<0.01 対 牽引負荷群

た内因性NOがプロテオグリカン合成に及ぼす影響を検討した. フィブロネクチンをコーティングした専用プレートに $1 \times 10^5$ 個/wellの細胞密度で播種し, 24時間培養後, NO合成阻害剤(L-NMMA, 50 nM)を加え, 12時間周期的牽引を負荷し培養液中のNO産生と細胞内のプロテオグリカン合成量を測定した. L-NMMAは基質結合部を標的とする阻害薬であり, 誘導型NO合成酵素(iNOS)に対して非可逆的に阻害作用を示す. 周期的牽引負荷によりNO産生は抑制され, プロテオグリカン合成は有意に上昇した(表2).

### 考 察

軟骨に対する機械的ストレスは, 変形性関節症の発症に対して, 主要な因子であることが知られている. 本研究では, 軟骨細胞に対する機械的ストレスがどのような情報伝達系を経て, 軟骨代謝を変動させるかを検討した. そのために, 可撓性を有する膜上でウシ軟骨細胞を培養し, 吸引力を利用して細胞に周期的牽引負荷を加えた. これまでに得られた結果として, 強いストレスによりプロテオグリカン合成が抑制され<sup>5</sup>, 陰圧の牽引により膜が湾曲し, それによって細胞に伸張負荷が加わることが判明している. この場合膜の中心と辺縁にある細胞との間に牽引力の差が生じていた<sup>26</sup>. 今回FX-3000 (Bioflex series)を用いることにより, 膜に均一な牽引負荷を加えることが可能となった. すなわち牽引の方向が全周性のため, 膜の湾曲がおこらない(図7). これにより個々の細胞に一樣な負荷が加わり, 機械的ストレスによる細胞応答をより正確に把握できるようになった<sup>27</sup>. 以前の方法では表面にType1コラーゲン処理を行ったプレートを使用していた. Type1コラーゲンは正常軟骨の細胞外基質には存在せず, これと接着することにより軟骨細胞は脱分化の状態に

### フレクサーセルシステム

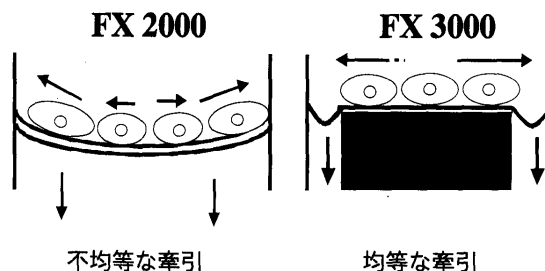


図7 フレクサーシステムについて

これまでの装置(FX-2000)では, 陰圧を利用した牽引により膜が湾曲し, それによって細胞に伸張負荷が加わる性質を利用していた. そのため膜の中心付近に存在する細胞に比べて, 辺縁の細胞により強い牽引力が加わる. このような構造上の欠点により, 個々の細胞全てに同じ大きさの伸張力を加えることが不可能であった. FX-3000 (Bioflex series)を新たに導入し, 膜に均一な牽引負荷を加えることが可能となった. すなわち牽引の方向が全周性のため, 膜の湾曲がおこらない. これにより個々の細胞に一樣な負荷が加わり, 機械的ストレスによる細胞応答をより正確に検討できるようになった.

おかれている可能性が考えられた<sup>28</sup>.

本実験では, まず軟骨細胞を種々の細胞外基質に接着させ, 軟骨代謝マーカーであるケラタン硫酸値を測定<sup>29,30</sup>することにより基質に対する接着と分化の関係を検討した. 軟骨細胞がアルブミン, Type1, Type2コラーゲンに接着した場合にはケラタン硫酸産生は増加しないが, フィブロネクチンと接着することにより, ケラタン硫酸合成能が有意に増加した. さらにアクチンフィラメントの細胞内集積も増強することも確認した. すなわち軟骨細胞がフィブロネクチンと結合することにより, より軟骨細胞に近い形態, いいかえれば, より分化した方向へと形質転換されたものと考えられる<sup>31</sup>.

このような条件で軟骨細胞に以前と同じ条件の周期的牽引負荷を加えた. 得られた結果は, プロテオグリカン合成が亢進した. したがって軟骨細胞は機械的ストレスに対して細胞が接着する基質によってその応答に変化があることが明らかにされた. フィブロネクチンは以前より変形性関節症の発症に重要な働きをすることが知られている<sup>32</sup>. 今回フィブロネクチンに接着した軟骨細胞にのみ, 周期的牽引負荷によりプロテオグリカン合成の促進が認められた. 仮に実際の関節軟骨でこの状態が長期に続いた場合, 軟骨代謝の亢進が継続することになり, ひいては軟骨細胞の疲弊からはじまる軟骨変性が引き起

こされることが考えられる。フィブロネクチンに関する情報伝達機構として、その受容体である  $\alpha_5\beta_1$  インテグリンの活性化にチロシンのリン酸化を伴うことが報告されている<sup>33</sup>。我々は機械的ストレスに対する細胞応答に、細胞骨格および guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G protein) の関与を明らかにした<sup>34,35</sup>。

さらに本実験では、ガスメディエータである NO が軟骨細胞に対する機械的ストレスの情報伝達機構を調節している可能性についても検討した。実際に変形性関節症の軟骨細胞は正常と比較して、NO 産生が増加していることが知られている<sup>32,34</sup>。本実験でもフィブロネクチンと接着した軟骨細胞が、牽引負荷により NO 産生を増加させることを遺伝子レベルでもはじめて明らかにした。そこで、この機械的ストレスによって増加する NO の意義について検討した。一般に軟骨のプロテオグリカン合成に対して NO は抑制的に働き、最終的に軟骨変性の方向に働くことが知られている<sup>36</sup>。本実験では、NO 合成阻害剤である L-NMMA を添加することにより、機械的ストレスによって増加した NO 産生が抑制され、同時にプロテオグリカン合成が亢進した。このことは周期的牽引負荷により誘導された NO が、軟骨変性ではなく、逆に軟骨防御の働きをしている可能性を示唆している。すなわち、機械的ストレスによって亢進したプロテオグリカン合成が続くと軟骨変性につながる可能性を先に述べたが、NO はこの経路に抑制的に働き、最終的には軟骨保護の働きをしていることが考えられる。

変形性関節症には種々の要因の関与が知られているが、特に機械的ストレスが重要である。本研究では、フィブロネクチンを介した情報伝達系の存在を明らかにするとともに、同時に誘導される NO がこの過程に抑制的に働くことが明らかとなった。このことは、今後の変形性関節症の発症機構を解明する上で重要な手掛りとなるとともに、新たな治療法開発の端緒となることが期待される。

#### 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甚なる謝意を表しますとともに、終始直接御指導と御助言を頂いた福田寛二助教授、並びに御協力頂いた教室員の皆様に心から感謝いたします。

本論文の要旨は第14日本軟骨代謝学会(平成13年、月、岐阜)において発表した。

#### 文 献

1. 福田寛二, 田中清介(1997) アグリカン. 岩田 久 新名 正由編. 関節マーカー, 大阪, メジカルビュー社: 33-39
2. 松村文典, 福田寛二, 田中清介ほか(1991) ケラタン硫酸. 関節外科9: 23-28
3. Dean DD, Pelletier JM, Pelletier JP, Howell DS, Woessner Jr JF (1989) Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 84: 678-685
4. Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K (1998) Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. *Semin Arthritis Rheum* 27: 392-399
5. Fukuda K, Asada S, Kumano F, Saitoh M, Otani K, Tanaka S (1997) Cyclic tensile stretch on bovine articular chondrocytes inhibits protein kinase C activity. *J Lab Clin Med* 130: 209-215
6. Grimshaw MJ, Mason RM (2000) Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 386-392
7. 福田寛二, 田中清介(1997) ガスメディエータ. 関節外科 16: 592-593
8. 福田寛二, 田中清介(1998) 関節疾患における軟骨破壊機序リウマチ科19: 410-414
9. Fukuda K, Takayama M, Ueno M, Oh M, Asada S, Kumano F, Tanaka S (1997) Hyaluronic acid inhibits interleukin-1-induced superoxide anion in bovine chondrocytes. *Inflamm Res* 4: 114-117
10. Oh M, Fukuda K, Asada S, Yasuda Y, Tanaka S (1998) Concurrent generation of nitric oxide and superoxide inhibits proteoglycan synthesis in bovine articular chondrocytes: involvement of peroxynitrite. *J Rheumatol* 25: 2169-2174
11. Asada S, Fukuda K, Oh M, Hamanishi C, Tanaka S (1999) Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes. *Inflamm Res* 48: 399-403
12. Asada S, Fukuda K, Nishisaka F, Hara F, Hamanishi C (2001) Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res* 50: 19-23
13. Fukuda K, Kumano F, Takayama M, Saito M, Otani K, Tanaka S (1995) Zonal differences in nitric oxide synthesis by bovine chondrocytes. *Inflamm Res* 44: 434-437
14. Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins PD, Evans CH (1999) Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 377-379
15. Hickery MS, Baylis MT (1998) Interleukin-1 induced nitric oxide inhibits sulphation of glycosaminoglycan chains in human articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1425: 282-290
16. Shakibaei M (1998) Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res* 240: 95-106
17. Wright MO, Nishida K, Bavington C, Godolphin JL, Dunne E, Walmsley S, et al (1997) Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: evidence of a role for  $\alpha 5 \beta 1$  integrin as a chondrocyte mechanoreceptor. *J Orthop Res* 15: 742-747

18. Salter DM, Hughes DE, Simpson R, Gardner DL (1992) Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br J Rheumatol* 31: 231-234
19. Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nakashima K, Mukudai Y, Boettiger D, Pacifici M, et al (1997) Involvement of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes. *J Bone Miner Res* 12: 1124-1132
20. Fukuda K, Yamasaki H, Nagata Y, Motoyoshi H, Matsumura F, Kuno T, et al (1991) Histamine H1-receptor-mediated keratan sulfate production in rabbit chondrocytes: involvement of protein kinase C. *Am J Physiol* 261: c413-c416
21. Athanasiou KA, Thoma BS, Lanctot DR, Shin D, Agrawal CM, LeBaron RG (1999) Development of the cytodetachment technique to quantify mechanical adhesiveness of the single cell. *Biomaterials* 20: 2405-2415
22. Teixeira CC, Hatori M, Leboy PS, Pacifici M, Shapiro IM (1995) A rapid and ultrasensitive method for measurement of DNA, calcium and protein content and alkaline phosphatase activity of chondrocyte cultures. *Calcif Tissue Int* 56: 252-256
23. Fukuda k, Matsumura F, Tanaka S (1991) Histamin H1-receptor-mediates keratan sulfate secretion in rabbit chondrocyte: role of cAMP. *Am J Physiol* 263: 1653-1657
24. DRR Hiscock, B Caterson, CR Flanny (2000) Expression of hyaruronan synthesis in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 120-126
25. Sheils OM, Sweeney EC (1999) TSH receptor status of thyroid neoplasms--TaqMan RT-PCR analysis of archival material. *J Pathol* 188: 87-92
26. Vadiakas G, Banes AJ (1992) Verapamil decreases cyclic load-induced calcium incorporation in ROS 17/2.8 osteosarcoma cell cultures. *Matrix* 12: 439-447
27. Jonathan L, Schaffer, Michael Rizen, Gilbert J. L' Italien, Aziz Benbrahim, Joseph Megerman, Louis C. Gerstenfeld, Martha L. Gray (1994) Device for the application of a Dynamic Biaxially Uniform and Isotropic Strain to a Flexible Cell Culture Membrane *Orthop Res* 12: 709-719
28. Benya PD (1990) Chondrocyte culture. *Methods in cartilage research*. A Maroudas, K Kuettner eds. *Ann NY Academic Press* pp 85-89
29. 福田寛二, 松村文典, 田中清介 (1991) 関節疾患と血清ケラタン硫酸. *Medical Topics Series リウマチ '91*. 大阪, メディカルレビュー社 p. 173-178.
30. Thonar EJ (1999) Molecular markers of metabolic changes in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 338-339
31. Daniels K, Solursh M (1991) Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. *J Cell Sci* 100: 249-254
32. Homandberg G (1999) Potential regulation of cartilage metabolism in osteoarthritis by fibronectin fragments. *Front Biosci* 4: 713-730
33. Lee HS, Millward-Sadler SJ, Wright MO, Nuki G, Salter DM (2000) Integrin and mechanosensitive ion channel-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and  $\beta$ -catenin in human articular chondrocytes after mechanical stimulation. *J Bone Miner Res* 15: 1501-1509
34. F. Hara, K. Fukuda, S. Asada, M. Matsukawa, C. Hamanishi (in press) Cyclic tensile stretch inhibition of nitric oxide release from osteoblast-like cells is both G protein and actin-dependent. *J Orthop Res*
35. Hara F, Fukuda K, Ueno M, Hamanishi C, Tanaka S (1999) Pertussis toxin-sensitive G proteins as mediators of stretch-induced decrease in nitric-oxide release of osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 17: 593-597
36. Hering TM (1999) Regulation of chondrocyte gene expression. *Front Biosci*. oct. 15: (4): D743-D761