

# 滑膜線維芽細胞に対する灌流負荷による アポトーシスの誘導と 細胞内カルシウムイオンの関与

岡本佳之

近畿大学医学部整形外科教室

## 抄 録

目的：教室ではこれまでに変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) および慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis, RA) に対し、最終的治療として人工関節置換術といった大侵襲の手術を行う前の段階で、関節鏡を用いて大量の生理的食塩水によって関節内を洗浄するという最小侵襲治療により長期にわたる良好な臨床成績が得られることを報告し、その作用機序につき検討を加えてきた。この関節洗浄療法の有効性を炎症の主座である滑膜線維芽細胞のアポトーシス誘導という観点より検討した。

ヒト滑膜線維芽細胞を材料とし、灌流負荷を行いアポトーシス検出および、細胞内カルシウムイオン ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を計測した。

OA および RA の滑膜線維芽細胞において灌流量及び灌流時間に依存してアポトーシス率の増加を認め、また灌流により  $[Ca^{2+}]_i$  が一過性に増加し、この細胞内カルシウムをキレートすることによりアポトーシスの発生は抑制された。

滑膜線維芽細胞に対する灌流負荷はアポトーシスを惹起し、その情報伝達機構において  $[Ca^{2+}]_i$  の一過性上昇が関与することが明らかにされ、関節洗浄療法の有効性が実験的に裏付けられた。

**Key words:** synovial fibroblast (滑膜線維芽細胞), apoptosis (アポトーシス), intracellular calcium ion (細胞内カルシウムイオン)

## 緒 言

正常の関節滑膜は約3層の細胞より構成される表層細胞層 (synovial lining) とその深部の結合組織層 (sublining) に分類される。表層の細胞層の厚さは通常50  $\mu\text{m}$  で、骨髄の単球-マクロファージ由来であるA細胞と、線維芽細胞であるB細胞より構成される。B細胞は関節軟骨の潤滑な動きに重要なヒアルロン酸を分泌するとともに、A細胞に比較して増殖能が高く、滑膜増殖における主役を務める<sup>1</sup>。

慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis, RA) は関節滑膜を炎症の主座とする慢性炎症性疾患であり、滑膜の増殖によるパンプスにより関節軟骨破壊をきたす。その機序については未だ不明な点もあるが、山口はリンパ球の滑膜・軟骨との接着が重要な

因子となることを報告してきた<sup>2</sup>。一方、変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) は機械的ストレスによっておこる軟骨変性が主たる病態であり、これまでにこの観点より軟骨編成機序に関する基礎的研究の報告がある<sup>3,4</sup>。しかし一方ではOAにおいても二次的に滑膜炎が惹起され、RAと同様な滑膜増殖が引き起されている。これまでにOAおよびRAに対し人工関節置換術といった最終治療を行う前の段階として、関節鏡視下に増殖滑膜の切除を行わず、大量の生理的食塩水でただ洗浄を行うだけで長期にわたる良好な臨床成績を挙げてきた<sup>5-9</sup>。この洗浄療法の望外の有効性に注目し、その後海外の施設からも同様な報告が散見される<sup>10,11</sup>。しかしその基礎的な作用機序に関しては biological あるいは biomechanical なさまざまな可能性が推測されはするが明らかな実

験的根拠は未だ示されていない。一方細胞のアポトーシスが注目されて以来、滑膜増殖とアポトーシスの関係について多くの報告をみるようになった<sup>12-18</sup>。しかし治療としての関節内洗浄による滑膜増殖抑制効果とアポトーシスとの関連に注目した報告は見られない。そこで、ヒト OA および RA の滑膜線維芽細胞を対象とし、洗浄によるアポトーシス誘導効果を *in vitro* で検討した。また Asada ら<sup>19</sup> によって明らかにされた過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) による軟骨細胞アポトーシス誘導における  $[Ca^{2+}]_i$  の関与が、滑膜線維芽細胞のアポトーシスにおいても同様の情報伝達系として関与しているかどうかについても検討した。

## 方 法

### 滑膜線維芽細胞の培養

1987年 ACR による診断基準を満たす RA 患者 5 例と OA 患者 5 例から人工膝関節置換術の際に膝関節の滑膜組織を採取した。研究に際して1975年のヘルシンキ宣言 (東京改訂) の原則を守り、被験者に実験内容を説明し承諾を得た。

手術時に採取した滑膜組織を剪刀にて約  $2\text{ mm}^3$  の大きさに細切した後、0.2% コラゲナーゼ (Type I) (Sigma, St. Louis, USA) を含む minimum essential medium (MEM: Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) で  $37^\circ\text{C}$ 、2 時間酵素処理を行い、金属メッシュ (目の大きさ  $150\ \mu\text{m}$ ) にて濾過し、 $1500\times G$ 、 $4^\circ\text{C}$  の条件下で10分間遠沈した。沈渣中の細胞を hematic solution [ $155\ \text{nM}$  の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (和光純薬, 大阪) と  $10\ \text{mM}$  の  $\text{KHCO}_3$  (和光純薬) と  $1\ \text{mM}$  の  $\text{NaEDTA}$  (和光純薬) を11の蒸留水に溶解した] にて攪拌した後  $800\times G$ 、 $4^\circ\text{C}$  で5分間遠沈し血球成分を除去後、10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone Laboratories, Inc. Logan, USA) 添加 MEM に播種し、Falcon<sup>®</sup> 3003  $100\times 20\ \text{mm}$  円形培養フラスコ (Becton and Dickson Company, USA) に移して  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  飽和水蒸気圧の条件下で、2~3 日毎に培養液を交換しコンフルエント ( $1.5\times 10^6\ \text{cell/ml}$ ) に達するまで培養した。第3継代以降の細胞は均一な線維芽細胞様形態を呈し、第5~8継代の細胞を実験に供した。アポトーシス検出用に Falcon<sup>®</sup> 3002  $60\times 15\ \text{mm}$  円形培養フラスコ (Becton and Dickson Company) 上に、また  $[Ca^{2+}]_i$  計測用に flexiperm-disc (W.C. Heraeus) を粘着させたカバーガラス上に、細胞を  $1\times 10^4$  個播種し、5~7 日間培養後、実験に供した。

### 細胞内カルシウムキレート剤の前処理

細胞内カルシウムイオンのキレート剤である bis-(*o*-aminophenoxy)-N,N,N,N'-tetraacetic acid acetoxymethyl ester (BAPTA-AM, 和光純薬) を  $1\ \mu\text{M}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$  で30分間培養をおこなった。

### 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) による処理

$H_2O_2$  (三菱化学, 東京) で処理した。MEM 中に 0.01% の濃度で  $H_2O_2$  を添加し15および60分間培養後一度洗浄し、annexinV 染色を施行した。 $[Ca^{2+}]_i$  の測定も同様に0.01% の濃度で刺激を行った。

### 灌流方法

滑膜線維芽細胞を直径60 mm の円形培養フラスコおよび flexiperm-disc 上に播種しコンフルエントに達するまで5~7 日間培養、シャーレ側壁に18 ゲージ留置針を沿わせペリスターティックポンプを用いて一方は流入、一方は流出で  $37^\circ\text{C}$  の生理食塩水を灌流した (図1)。対照は灌流せず  $37^\circ\text{C}$  の生理食塩水を浸した非灌流群を用いた。

### アポトーシスの検出

アポトーシス検出には、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT, TUNEL) および annexinV を利用した。

### TUNEL 法

細胞を固定後、*in situ* apoptosis kits (Takara Co, Ltd, Nagoya, Japan) を用いて TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling 法<sup>20</sup> にて染色した。具体的には、フラスコ上の接着細胞を4% パラホルムアルデヒドで固定し、proteinaseK で処理後 DNA の末端標識した。dUTP-biotin を DNA の断片化によってできた 3'-OH DNA 末端に結合させさらに FITC 標識した。出力250 mW で488 nm, 525 nm の波長のアルゴンレーザーを装備した共焦点レーザー顕微鏡 (MRC 2400 LSX imaging system: Bio-Rad, Hertfordshire, England) にて検出した。

### annexinV 染色

annexinV 染色は使用手順 (Trevigen Inc, Gaithersburg, USA) に沿って行った。具体的には  $10\ \mu\text{l}$  annexinV-FITC ( $1\ \text{mg/ml}$ ) と  $10\ \mu\text{l}$  propidium iodide ( $2.5\ \text{mg/ml}$ ) を円形培養フラスコ上の接着細胞に添加し暗所にて5~15分培養し上記 TUNEL 法同様 FITC 標識し、共焦点レーザー顕微鏡にて検出した。

### アポトーシス率

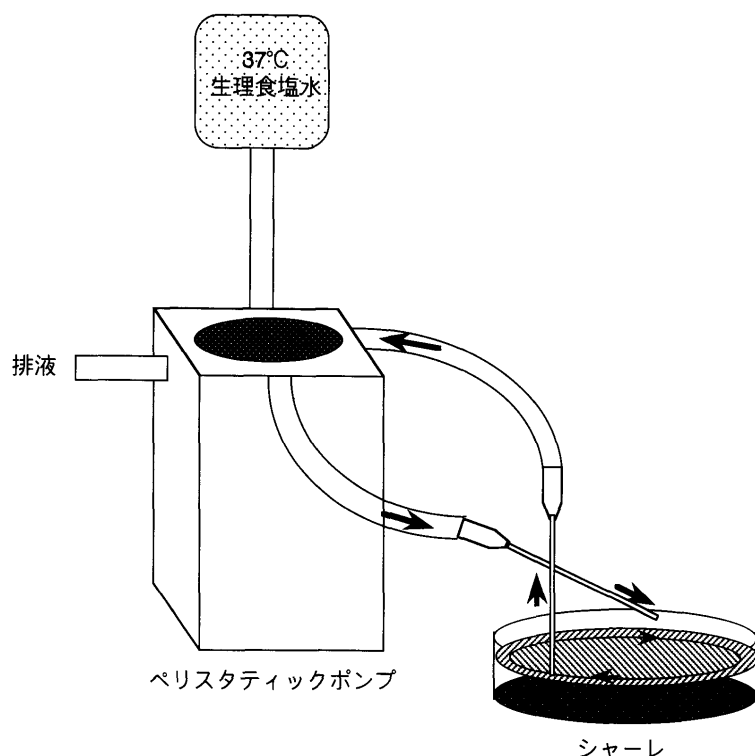


図1 灌流装置模式図

直径60 mmの円形シャーレ上及び Flexiperm-Disc 上で付着培養した滑膜線維芽細胞に対し灌流負荷をおこなった。シャーレ側壁より18ゲージ留置針を2本沿わせ、ペリスタティックポンプを用いて流入および流出の経路とした。37°Cに加温した生理食塩水を灌流に使用した。

アポトーシス率は TUNEL 法, annexinV 法で共焦点レーザー顕微鏡の200倍モニター画像を各実験10視野カウントし全細胞中の陽性細胞をパーセント表示した。続いてコントロール群でもアポトーシスを検出し、アポトーシス率をパーセント表示した。

#### 灌流速度および灌流時間の検討

##### 灌流速度

OA, RA 各滑膜線維芽細胞に対し1000 ml/hの流速で60分間37°Cの生理食塩水を灌流した。その後培養液をFBS添加MEMに交換し24時間培養後、TUNEL法により、アポトーシス細胞を観察し、アポトーシス率を求めた。続いて流速を100 ml/h, 200 ml/h, 500 ml/h, 1000 ml/h, 2000 ml/hで60分間灌流し、24時間培養後 TUNEL法により、アポトーシス細胞を観察し、アポトーシス率を求めた。

##### 灌流時間

OA および RA 滑膜線維芽細胞に対して灌流速度を1000 ml/hで一定とし6分, 12分, 30分, 60分灌流を行いアポトーシスの誘導を TUNEL法により観察し、アポトーシス率を求めた。

##### [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の測定

flexiperm-disc 上に単層培養した OA, RA 各滑膜線維芽細胞を140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM

MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 20 mM HEPES (pH 7.4), 0.3% bovine serum albumin (BSA) を含む HEPES-buffer saline (HEPES-solution) で3回洗浄後, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化測定用に蛍光試薬である fura-2 acetoxy methylester (Fura-2 AM) 5 μM のを含む 1 ml の HEPES solution にて 37°C の条件下で 30 分間培養した。細胞を洗浄後, 0.5 ml の HEPES solution を加えて [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の測定用とした。今回用いた [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定装置は、倒立顕微鏡 (TMP-EF2 : Nikon), 電動フィルター切り替え装置 (C4312 : Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan), VIM カメラ (C2400-47 : Hamamatsu Photonics), イメージプロセッサ (ARUGS-50 : Hamamatsu Photonics) より構成される。この顕微鏡を用いて上述の調整した細胞に 340 nm, 380 nm のキセノンランプより発射される 2 種類の波長の励起光を照射し、それぞれの蛍光強度を測定し割り算することによりカルシウムイオン濃度により変化する各蛍光強度比 (レシオ値) を求めた<sup>21</sup>。このとき、Fura-2AM とカルシウムイオンとの解離定数は 224 nM として計算し<sup>22</sup>, calcium calibration buffer kit (Molecular probes, Inc.) を用いて検量線の作成を行った。灌流群は、上記方法により灌流させながら経時的に測定した。BAPTA-AM 前処置群も前処置後、灌流群と同様に [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の変化を経時的に測定した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理による測定ではペリスタティック

ポンプで37°Cに加熱した HEPES solution を低流量で灌流させながら0.01%の濃度で刺激を行い、経時的に  $[Ca^{2+}]_i$  を測定、非灌流群は37°Cの生理食塩水を浸し、経時的に測定した。

#### 統計学的検討

各データは平均±標準偏差 (mean±SD) で表われ、有意差検定には student's t-test を用いた。

### 結 果

#### 滑膜線維芽細胞に対する $H_2O_2$ の作用

##### アポトーシスの誘導

MEM にて培養中の OA, RA 各滑膜線維芽細胞に0.01%の  $H_2O_2$  を添加し、37°Cで15および60分間培養後 MEM にて一度洗浄、15分刺激はさらに45分間培養後、60分刺激は洗浄後 annexinV 染色を施行

した。OA, RA 共にほぼ全細胞に annexinV 陽性細胞を認め、また60分刺激では propidium iodide (PI) の核への取込みを認めた (図2)。

##### $[Ca^{2+}]_i$ の変化

OA, RA 各滑膜線維芽細胞において0.01%の  $H_2O_2$  添加により速やかな  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を認めた。 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇ピーク値は OA で RA よりも高い傾向を示したが有意差はなかった (図3)。

##### 滑膜線維芽細胞に対する灌流とアポトーシス 灌流速度とアポトーシス

OA および RA 滑膜線維芽細胞に対し、1000 ml/h の流速で生理食塩水を用いて60分間の灌流を行ったところ OA 滑膜線維芽細胞において多くの細胞が TUNEL 陽性を示した。また RA 滑膜線維芽細胞に

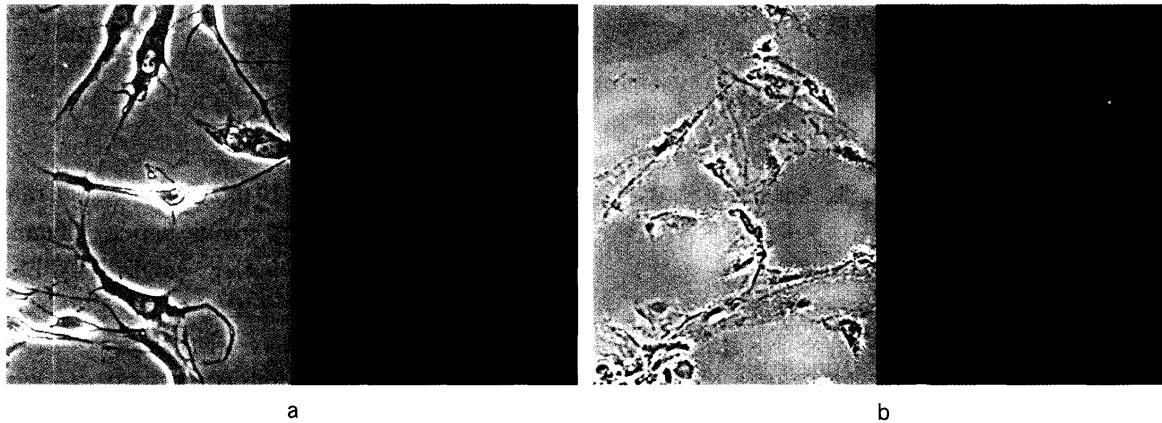


図2  $H_2O_2$  によるアポトーシスの誘導

RA 滑膜線維芽細胞に対して、0.01%の  $H_2O_2$  を添加し15および60分刺激し annexinV 染色を行った。左は共焦点レーザー顕微鏡による透過像、右は annexinV による蛍光染色である。15分刺激 (a)、60分刺激 (b) 共に100%近い細胞が annexinV 陽性であったが、60分刺激では膜の破綻による PI の核への取り込みを認めた。OA でも同様の結果を認めた。(×200)

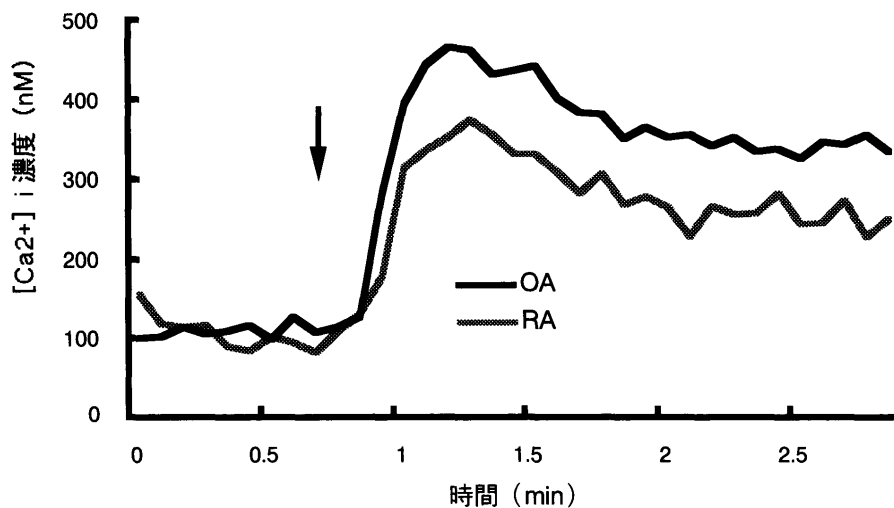


図3

##### $H_2O_2$ 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化

0.01%  $H_2O_2$  を添加し  $[Ca^{2+}]_i$  を計測した。OA, RA 共に  $H_2O_2$  添加後速やかに  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を認めた。 $[Ca^{2+}]_i$  のピーク値は OA で RA よりも高い傾向を示したが有意差はなかった。矢印は  $H_2O_2$  添加を示す。

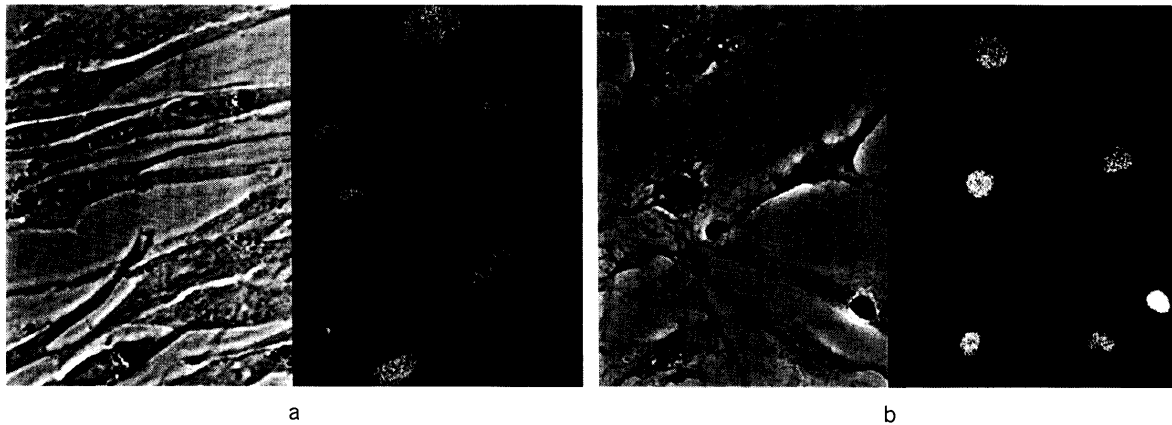


図4 灌流による滑膜線維芽細胞のアポトーシス  
1000 ml/h で60分間灌流後, 24時間培養し, TUNEL 法により蛍光染色を行った. 左は透過像, 右は TUNEL 法による蛍光染色である. OA, RA 共に核が発光した TUNEL 陽性細胞を多数認めた. a : OA, b : RA. ( $\times 400$ )

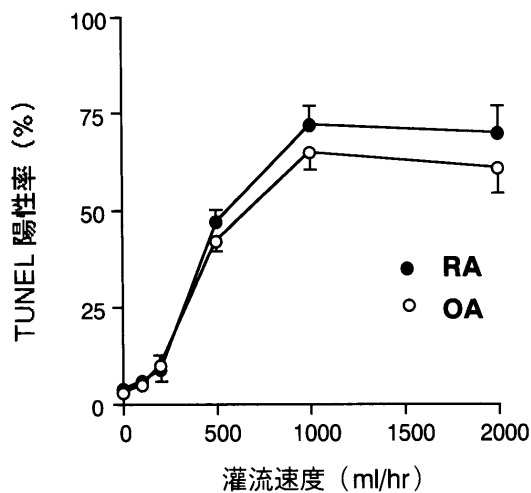


図5 灌流速度によるアポトーシスの検討  
種々の速度で生理食塩水を60分間灌流させ, 24時間後 TUNEL 法でアポトーシスを検出し陽性率を求めた. OA, RA 共に500 ml/h 以上でアポトーシス率の急激な上昇を認め, 1000 ml/h で平衡状態に達した.

においても同様に1000 ml/h の流速で TUNEL 陽性細胞が観察された(図4). 次に灌流速度を変えて60分間の灌流を行い, アポトーシス率の変化を検討したところ, 200 ml/h よりアポトーシス率の有意な上昇 ( $p < 0.01$ ) が認められ, 1000 ml/h で平衡状態に達した(図5). しかし2000 ml/h の速度の灌流では, 約30%の細胞が剥がれたため, 以後の実験で至適灌流速度を1000 ml/h と設定した.

#### 灌流時間とアポトーシス

OA および RA 滑膜線維芽細胞に対して灌流速度を1000 ml/h で一定とし, 種々の時間灌流を行いア

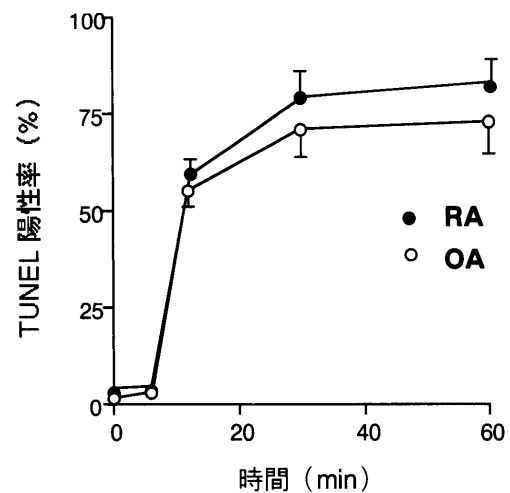


図6 灌流時間によるアポトーシスの検討  
1000 ml/h の一定速度で生理食塩水を各種時間灌流させ, 24時間後 TUNEL 法でアポトーシス率を求めた. OA, RA 共に12分よりアポトーシス率の急激な上昇を認め, 30分で平衡状態に達した.

ポトーシスの誘導を上記の灌流速度とアポトーシスの関係と同様に, TUNEL 法によりアポトーシス率の変化を検討した. その結果12分の灌流により TUNEL 陽性細胞が出現し, 30分で平衡状態に達することが明らかにされた(図6). このため以後の実験では至適灌流時間を30分と設定した.

#### [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化

対照とした非灌流群では OA, RA 共に [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の基礎値に差はなかった. 灌流開始5分過ぎより OA, RA 共に [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の急激な上昇を認め, 320~350 nM に達した. そのピーク値は OA で RA に比べ高い傾

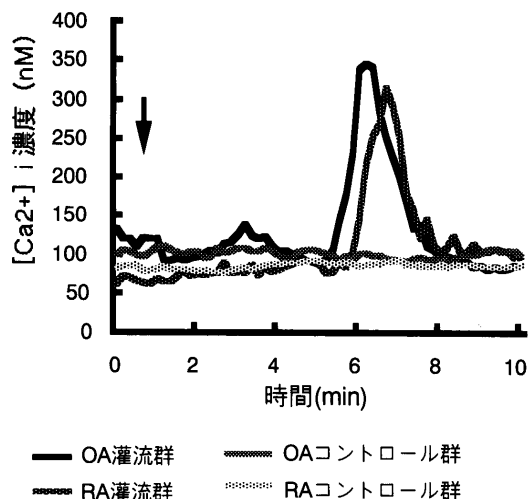


図7 灌流による  $[Ca^{2+}]_i$  変化  
1000 ml/h の流速で生理食塩水を灌流しながら  $[Ca^{2+}]_i$  を計測した。OA, RA 共に灌流開始後約5分から  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を認めた。矢印より灌流を開始した。

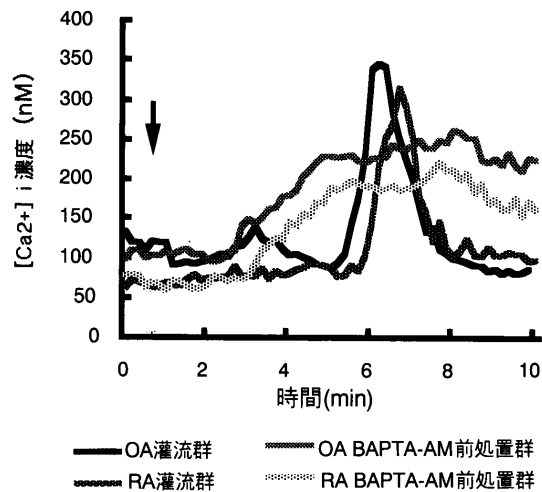
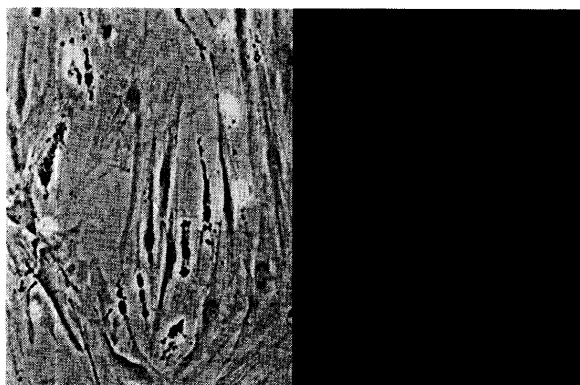
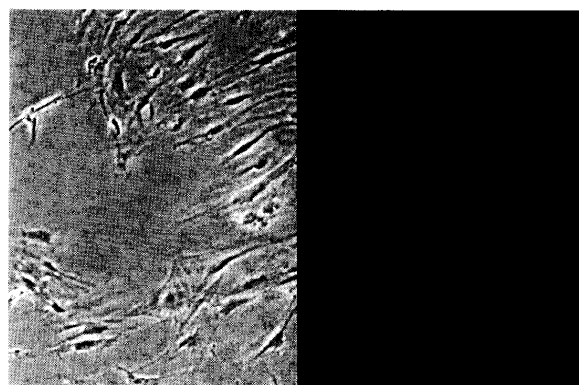


図8 BAPTA-AM 前処理による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の抑制  
BAPTA-AM 前処置後, 1000 ml/h で生理食塩水を灌流しながら  $[Ca^{2+}]_i$  を計測した。BAPTA-AM 前処置により OA, RA 共に灌流による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が有意に抑制された。矢印より灌流を開始した。



a



b



c

図9 BAPTA-AM 前処理によるアポトーシスの抑制  
RA 滑膜線維芽細胞に対して BAPTA-AM 非処理 (a) および前処置 ( $1 \mu M$  で30分間, b) 後に1000 ml/h で生理食塩水で30分間灌流し, 2時間培養後, annexinV 染色を行った。左は透過像, 右は annexinV による蛍光染色である。BAPTA-AM 前処理により annexinV 陽性細胞は減少した。OA 滑膜線維芽細胞でも同様の結果を得た。コントロール群 (c) では特異的な染色は認められなかった。 ( $\times 200$ )

向を示したが, 有意差は認められなかった。その後  $[Ca^{2+}]_i$  は約1分後に基礎値に低下した (図7)。灌流刺激に対する細胞内カルシウムキレート剤

(BAPTA-AM) の作用  
 $[Ca^{2+}]_i$  変化

BAPTA-AM 前処置を行うことにより, 灌流によ

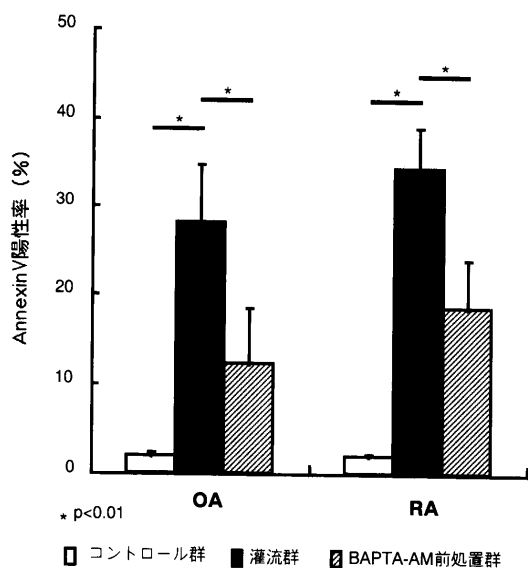


図10 BAPTA-AM 前処理によるアポトーシス率の変化

1000 ml/h で30分間灌流後,annexinV 染色を行い,アポトーシス率を求めた.またBAPTA-AM 前処理群も同様に灌流しアポトーシス率を求めた.OA, RA ともにBAPTA-AM 前処理により灌流によるアポトーシスの誘導は抑制された.

る緩徐な  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を認めたがそのピーク値はOA, RA 共に有意に抑制された(図8).

#### アポトーシス

灌流刺激によるアポトーシスの変化をannexinVにより検討した.灌流群では1000 ml/hの流速で生理食塩水を用いて30分間の灌流,またBAPTA-AM前処置群では30分間の前処置後30分間灌流,コントロール群は30分間生理食塩水を浸し,その2時間後にannexinVによる染色をおこなった.灌流により増加したannexinV陽性細胞はBAPTA-AM前処置により明らかに減少していた(図9-a, b).コントロール群では特異的な染色は認められなかった(図9-c).OA, RAについてコントロール群,灌流群,BAPTA-AM前処置群に分けてannexinV陽性細胞率を計測した.BAPTA-AM前処置により灌流処置で誘導されるannexinV陽性細胞数は有意に減少した( $p < 0.01$ )(図10).

#### 考 察

高齢社会を迎え激増が予想される変形性関節症や慢性関節リウマチに対し,最小侵襲で施行できる関節内洗浄療法はなによりも患者さんにとって福音であり,コスト対効果からも重要な治療法として確立されるべきである.今回この治療法の有効性を滑膜

細胞のアポトーシス誘導という観点から証明することを試みた.すなわち滑膜線維芽細胞に対する灌流作用とアポトーシスについての基礎的検討として,まず灌流速度・時間とアポトーシスの関係について検討したところ,200 ml/hよりアポトーシス率の有意な上昇が認められ1000 ml/hで平衡状態に達したため,1000 ml/hの流速条件を,さらに12分の灌流によりTUNEL陽性細胞が観察され30分で平衡状態に達したため30分の灌流時間を至適条件として設定することができた(図5, 6).このような灌流実験による滑膜線維芽細胞のアポトーシス誘導の報告はこれまでみられない.関節洗浄療法の臨床的有効性は主として疼痛の改善や関節水腫の軽減による.その作用機序としては関節液の排除によって疼痛や炎症を惹起する細胞成分や液性成分が一時的に除去されることにもあることは当然予想される.しかしそれらのみではこれらの臨床効果が長期にわたって持続する理由を説明することはできない.さらにRA患者で関節洗浄後に滑膜炎が軽減し滑膜の体積が明らかに減少する例も経験される.そのため今回の灌流実験によって滑膜細胞のアポトーシスが誘導されることが証明されたことは,その長期有効性を裏付ける根拠の一端となりうると思われる.また臨床的に実際の関節洗浄は約1時間をかけて5ないし10 lの洗浄液を用いて実施しており,今回の実験で設定されたアポトーシス誘導のin vitroにおける至適条件である流速1000 ml/hで30分間の灌流という条件はin vivoにおいても十分に満たしていると思われる.

Asadaらはウシ軟骨細胞において強力なガスメディエーターである $H_2O_2$ がアポトーシスを誘導し,その情報伝達機構に $[Ca^{2+}]_i$ が重要な働きをすることを見いだした<sup>19</sup>.本実験では,0.01%15ないし60分間の $H_2O_2$ 刺激によるアポトーシスをannexinV法で検討した.annexinV法は蛍光標識annexinVとpropidium iodide (PI)を用いる.アポトーシスの特徴のひとつに,細胞膜の構造変化があり,アポトーシス早期には,細胞膜のリン脂質の非対称性が失われ,通常は細胞膜内層に存在するPhosphatidylserine (PS)が,アポトーシスが誘導されると膜の構造は保ったままで細胞膜外層にでてくる.annexinVはPSに高い親和性を持つタンパク質で,細胞膜外層に露出したPSと結合する.したがって,アポトーシス早期細胞ではannexinVの結合は観察されるが,細胞膜は保たれているため,PIはDNAと結合できない.一方アポトーシス後期/ネクロトーシス細胞の場合には,細胞膜の構造が崩壊するため,DNAとPIの結合が観察される<sup>23,24</sup>.今回ヒト

OA および RA の滑膜線維芽細胞を対象に検討を行ったところ  $H_2O_2$  は明らかに annexinV 陽性細胞を増加させたが、15分刺激では PI の核への取り込みはほとんど認められなかったが60分間の (図2)  $H_2O_2$  刺激では細胞膜構造の破綻をきたし PI の細胞内への取り込みを認めネクローシスに近い状態を示した (図2)。また  $H_2O_2$  刺激により  $[Ca^{2+}]_i$  の一過性の上昇を認めた (図3)。したがって滑膜線維芽細胞においても、ガスメディエーターがアポトーシスの重要な因子となることが示された。当教室ではこれまで滑膜増殖にケミカルメディエーターやサイトカインが関与することを報告<sup>25-27</sup>している。一方ケミカルメディエーターやサイトカインによる情報伝達機構の一つに、ホスホリパーゼCの活性化にはじまる  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇があることが知られている<sup>28</sup>。そこで本研究では灌流によるアポトーシスの誘導と  $[Ca^{2+}]_i$  の関連についても特に注目し実験した。その結果灌流により OA および RA 滑膜線維芽細胞において明らかに  $[Ca^{2+}]_i$  の増加が認められ (図7)、細胞内カルシウムイオンのキレート剤である BAPTA-AM 前処置によりその増加が抑制された (図8)。本実験では灌流液としてカルシウムを含まない生理食塩水を使用しており  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は細胞外からのカルシウムイオンの流入ではなく、細胞内のカルシウム貯蔵からの放出によることが示された。最近神経細胞に加えられるずり応力が DNA の断片化を誘導したとする報告がある<sup>29</sup>。さらに血管内皮細胞においてはずり応力が superoxide dismutase や nitric oxide を誘導したと報告されており<sup>30</sup>、さらにその詳細な機構についても解明されつつある<sup>31</sup>。したがって本実験において灌流刺激がアポトーシスを誘導した原因として、灌流のずり応力としてのメカニカルストレスが  $H_2O_2$  などのガスメディエーターを介してアポトーシスを誘導したのではないかという可能性も示唆される。

本実験では、OA および RA の間では灌流刺激に対する細胞応答に差はなかった。この二つの疾患における滑膜増殖の病的意義は異なると思われるが臨床的には両疾患ともに関節洗浄の効果は明らかであり、今回の実験結果からもそれが裏付けられたことになる。そして両疾患ともに灌流によって惹起されたアポトーシスに  $[Ca^{2+}]_i$  が関与していた。一般にアポトーシスはカスパーゼの活性化により引き起こされることが知られているが、最近小胞体からの  $[Ca^{2+}]_i$  の放出がその引き金となることが報告されている<sup>32</sup>。滑膜線維芽細胞にアポトーシスを誘導するさらに詳細な情報伝達機構の解析には今後の検討を必要とする。

関節鏡視下洗浄術は手技的にも容易であり最小侵襲手術であるとともに臨床的にも十分な効果が長期間にわたって持続される。特に RA では根治的な治療は未だなく、炎症の主座である滑膜組織において増殖が最も強く観察される滑膜線維芽細胞にアポトーシスを洗浄により誘導することが可能であることが示されたことから、関節洗浄療法は今後 OA のみならず RA においても新たな関節局所治療手段として試みられるべき治療法であるといえる。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました浜西千秋教授に深謝致します。また、直接の御指導、御助言をいただきました宗圓 聡助教授、並びに本研究に御協力いただいた教室の方々から感謝致します。

本論文の要旨は第14回日本整形外科学会基礎学術集会 (平成12年9月、京都) において発表した。

#### 文 献

- Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K (2000) Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 63: 17-31
- 山口真一 (1994) 慢性関節リウマチにおける軟骨基質破壊とリンパ球、滑膜線維芽細胞の相互作用. *近畿大医誌* 19: 513-520
- 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
- 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
- 田中清介, 宗圓 聡 (1993) 慢性膝関節疾患に対する関節鏡による関節洗浄術. *整形外科 MOOK 増刊* 2: 93-95
- 宗圓 聡, 田中清介 (1995) 関節鏡視下洗浄療法. *リウマチ科* 13: 251-254
- 辻本晴俊, 宗圓 聡, 丹 彰浩, 田中清介 (1996) 変形性膝関節症患者に対する関節鏡視下洗浄療法の効果. *膝* 21: 45-46
- 宗圓 聡, 田中清介 (1998) 壮年期初期 OA に対する関節洗浄. *関節外科* 17(4): 95-97
- 辻本晴俊, 宗圓 聡, 浜西千秋, 田中清介 (2000) 慢性関節リウマチに対する膝関節鏡視下洗浄療法の効果. *臨床リウマチ* 12: 53-56
- Sharma A, Baethge BA, Acebes JC, Lisse JR (1996) Arthroscopic lavage treatment in rheumatoid arthritis of the knee. *J Rheumatol* 23: 1872-1874
- Hubbard MJ (1996) Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle: a five-year study. *J Bone Joint Surg Br* 78: 217-219
- Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, Tomita T, Haya-



- shida K, Takeuchi E, Kaneko M, Takano H, Nagata S, Ochi T (1998) Soluble Fas ligand in the joint of patient with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41: 657-662
13. Mizushima N, Kohsaka H, Miyasaka N (1998) Ceramide, a mediator of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha, as well as Fas receptor signalling, induces apoptosis of rheumatoid arthritis synovial cells. *Ann Rheum Dis* 57: 495-499
14. Ichinose Y, Eguchi K, Migita K, Kawabe Y, Tsukada T, Koji T, Abe K, Aoyagi T, Nakamura H, Nagataki S (1998) Apoptosis induction in synovial fibroblasts by ceramide: in vitro and in vivo effects. *J Lab Clin Med* 131: 410-416
15. Aupperle KR, Boyle DL, Hendrix M, Seftor EA, Zvaifler NJ, Barbosa M, Firestein GS (1998) Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 152: 1091-1098
16. Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T, Hasunuma T, Sumida T, Nishioka K (1999) Tumor necrosis factor alpha regulation of the FAS-mediated apoptosis-signaling pathway in synovial cells. *Arthritis Rheum* 42: 519-526
17. Wakisaka S, Suzuki N, Takeba Y, Shimoyama Y, Nagafuchi H, Takeno M, Saito N, Yokoe T, Kaneko A, Asai T, Sakane T (1998) Modulation by proinflammatory cytokines of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 114: 119-128
18. Firestein GS, Nguyen K, Aupperle KR, Yeo M, Boyle DL, Zvaifler NJ (1996) Apoptosis in rheumatoid arthritis p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 149: 2143-2151
19. 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
20. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501
21. Katayama S, Shuntoh H, Matsuyama S, Tanaka C (1994) Effect of heat shock on intracellular calcium mobilization in neurblastoma glioma hybrid cells. *J Neurochem* 62: 2292-2299
22. Grykiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of  $Ca^{2+}$  indicator with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450
23. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148: 2207-2216
24. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51
25. 堀越正智 (1997) 慢性関節リウマチにおける軟骨基質破壊へのサブスタンスPの影響とヒアルロン酸の効果. *近畿大医誌* 21: 231-238
26. 藤田昌彦 (1997) ヒト滑膜線維芽細胞 PKC 活性に対するサブスタンスPの影響. *近畿大医誌* 22: 191-197
27. 福岡 宏 (1998) プラジキニン刺激の滑膜線維芽細胞内カルシウムイオン濃度, pH およびヒアルロン酸放出への影響. *近畿大医誌* 23: 165-175
28. Nishizuka Y (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312
29. Triyoso DH, Good TA (1999) Pulsatile shear stress leads to DNA fragmentation in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *J Physiol* 515 (Pt2): 355-365
30. Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zeiher AM (1999) Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 656-64
31. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605
32. Huseyin Mehmet (2000) Caspases find a new place to hide. *Nature* 403: 29-30