

ラット実験的変形性関節症モデルを用いた 関節軟骨におけるプロテインキナーゼC (PKC) の免疫組織学的研究

薩 摩 博

近畿大学医学部整形外科教室

抄 録

変形性関節症における関節軟骨の変性あるいは維持機構を軟骨細胞内伝達物質であるプロテインキナーゼC (PKC) の発現により解明することを目的とした。そのためラット膝関節に実験的変形性関節症モデルを作製し、経時的に5種類の抗PKC抗体を用い免疫組織学的に検索を行った。また軟骨基質グリコサミノグリカン (GAG) の局在を4種類の抗プロテオグリカン抗体を用いて同様に検索した。細胞内情報伝達物質であるPKCの様々な分子種のうち、正常関節軟骨では ϵ -PKCのみが浅層から中間層の軟骨細胞内基質と核に存在した。しかし関節症軟骨では α -PKCが中間層の軟骨細胞内基質と核に出現し、また ϵ -PKCも正常群より染色性が增强した。GAGは正常関節軟骨でみられるコンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸、ケラタン硫酸等が関節症早期に全ての層で軟骨細胞周囲基質に正常群に比較し染色性の增强を認め、コンドロイチン4-硫酸はさらに石灰化層にも発現した。また正常軟骨では存在しないデルマトン硫酸が関節症早期から軟骨細胞周囲・細胞外基質に発現した。これらにより軟骨細胞におけるPKCの存在が免疫組織学的に初めて証明され、さらにそれらにGAGの経時的な局在変化を対比させることにより、異常メカニカルストレスによってひきおこされる変形性関節症の軟骨変性および軟骨維持過程において前者では α -PKCによる、後者では ϵ -PKCによる細胞内情報伝達機構の存在が明らかとなった。

Key words : Protein kinase C (PKC), Glycosaminoglycan (GAG), Osteoarthritis (OA), Articular cartilage, Immunohistochemistry

緒 言

関節軟骨は軟骨細胞と細胞外基質から構成され、その代謝調節は主に基質を介して伝達される力学的因子ならびに液性因子 (関節液) により行われている¹。すなわち、軟骨細胞はプロテオグリカンやコラーゲンなどの基質構成成分とサイトカインや基質分解酵素を産生し、軟骨基質を合成し同時に分解している²。したがって、軟骨細胞の代謝回転に異常が生じると当然のことながら軟骨基質の合成も障害され基質は変性し破壊される³。

変形性関節症は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により特徴づけられる慢性、進行性関節疾患である。発症原因に関する記述は1926年の Heine⁴ の報告を始めとし

てこれまで数多くみられ、それらの結果として、変形性関節症は加齢変化により必発するのではなく、生化学的あるいは生体力学的メカニズムによる代謝異常に起因することが明らかにされてきた^{2,3,5,6,7,8}。軟骨細胞の増殖・分化過程は細胞内外の微細な環境 (micro-environment) によって調節されている。この micro-environment の解明、すなわち様々な外的刺激を細胞内へ伝達して細胞応答を引き起こす情報伝達機構を解明することは変形性関節症の根本的な治療につながると推察される。

情報伝達機構の一つとしてのプロテインキナーゼC (Protein kinase C, PKC) は細胞膜の伝達系であるイノシトールリン脂質代謝回転の際に活性化される細胞内情報伝達酵素である。骨軟骨組織においてもPKCの作用は重要であり、軟骨細胞の代謝機

構であるGAG合成にPKCを介する細胞内情報伝達の関与が明らかにされている⁹⁻¹⁴。教室の福田ら¹¹はPKCが軟骨細胞代謝機構において特にケラタン硫酸産生に重要な役割を果たすことを、Arnerら¹²はプロテオグリカンの合成における関与を、木村ら^{13,14}は軟骨細胞内のPKCがなんらかのグリコサミノグリカン(GAG)の合成を促進することを報告している。しかしこれまでの報告は培養軟骨細胞を用いた生化学的検索が主であり、実際の軟骨組織におけるPKCの局在、さらには異常ストレスに曝された軟骨組織内での経時的变化が観察されたものではない。そこで著者は正常軟骨組織におけるPKC分子種の局在を明らかにするとともに、実験的関節症モデルを作製し、各種のPKC分子種の関節症の進行におよぼす影響を知る目的で免疫組織学的検索を行った。また軟骨基質の指標としていくつかのGAGの経時的局在変化と比較することによってPKCの関与を検討した。

実験材料および方法

1. 実験動物

生後約10-12週齢(体重150-200g)のWistar系雄ラットを1週間以上の予備飼育を行った後、順調に発育したものの30匹を実験に供した。予備飼育期間、実験期間を通して室温、湿度一定の空調下で飼育した。照明は1日12時間人工照明とし、また飼料はラット飼育用固形飼料(CE-2, 日本クレア株式会社)を使用した。給水は水道水を使用し飼料とともに自由摂取とした。

2. 変形性関節症モデルおよび組織標本の作製

全例において、sodium pentobarbital (ネンブタール[®], ダイナボット, Osaka, Japan) 30-40 mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、後肢右膝関節を剃毛後、70%エタノール(和光純薬, Osaka, Japan)およびイソジン消毒後、膝蓋骨内側傍切開を行った。まず、内側側副靭帯を3-4mm切除し、次いで膝関節を外反させ、内側半月の摘出と、前・後十字靭帯の切離を行い動揺性関節とした¹⁵⁻¹⁷。十分な動揺性を確認した後、生理食塩水で関節内を洗浄後、5-0ナイロンにて皮膚縫合を行った。対照として左膝関節にシャム処置を施した¹⁸。

術後5日, 1, 2, 4, 6, 8, 10週に各々4-5匹ずつ, 0.2 Mリン酸で緩衝した4%パラホルムアルデヒド・0.2%ピクリン酸固定液(和光純薬, Osaka, Japan; pH 7.4)で灌流固定を行った後、両膝関節を一塊として採取し、膝関節を中心に肉眼的観察、軟X線学的および組織学的検索を行った。

3. 軟X線学的検索

軟X線撮影には、Hitex社製、Type HAP-100Rを使用した。フィルム管球間距離50 cm, 管電圧40 kV, 電流2.0 mAで、撮影時間50秒とし、フィルムはフジ・ソフテックスフィルムFRを使用した。正面像と側面像の2方向で撮影した。

4. 組織学および組織化学的検索

4-1. 組織学的観察

灌流固定後、右膝関節より荷重部である脛骨内側部で最も圧迫を受けていた部位の軟骨全層を含むように採取した軟骨小片を、上記の固定液で4°C・24時間浸漬固定した。その後、これらの試料を厚さ1 mm, 縦2 mm, 横2 mmに細切し、さらに、4°C・48時間浸漬固定した。5% EDTA-2Na(和光純薬, Osaka, Japan)で4°C・1週間脱灰した後、マイクロームクリオスタット(ティシューテックII)にて約10 μmの連続切片を作製した。形態学的変化をヘマトキシリン・エオジン染色で、軟骨基質における酸性ムコ多糖をサフラニンO染色で、光学顕微鏡(オリンパス, Tokyo, Japan)により組織学的観察を行った。

4-2. 関節軟骨変化に対する評価

サフラニンOは軟骨中におけるコンドロイチン6-硫酸およびケラタン硫酸と1対1の結合をし、アルコール、キシレンを通した永久標本ではorthochromasiaによる鮮赤色を呈する特異性を有している¹⁹。そして、ヘマトキシリン・エオジン染色との組みあわせにより、組織学的・組織化学的評価基準に従って関節軟骨の変性を評価した。本来のMankinら²⁰の提唱した組織学的・組織化学的評価基準はヒト変形性関節症の評価に用いられたもので構造の項目で関節軟骨への亀裂の深達度についての評価も加えられていたが、ラットを用いた本研究ではそれらの項目を表1のように簡略化して用いた。また、各データは平均値±標準偏差(mean±SD)で表した。

4-3. 免疫組織学的検索(PAP法²¹)

作製した10 μmの連続切片を各試薬の組織への浸透性を向上させるために0.03% Tritonを含む0.01 M phosphate buffered saline (0.01 MPBS-T)で洗浄した。次いで、組織の内因性ペルオキシダーゼ活性を抑えるために組織切片を0.3% H₂O₂を加えた0.1% sodium 溶液に室温・30分間浸漬し、0.01 PBS-Tで洗浄した。さらに、非特異的 background stainingを防止するため、正常ウサギ血清を室温・10分間反応させた。

第1抗体としてα, β I, β II, γおよびε-PKCに対するポリクローナル抗体(神戸大薬理学教室より供与)を4°C・24時間反応させ、0.01 MPBS-Tで

5分間・3回洗浄後、500倍希釈マウス抗ウサギ IgG 血清を室温・90分間反応させた。0.01 MPBS-T で同様に洗浄した後、500倍希釈 PAP ウサギ血清で 4°C・90分間反応させ 0.01 MPBS-T で洗浄した。これを DAB-H₂O₂-Tris buffer [3,3'-diaminobenzidine・4HCl (和光純薬, Osaka, Japan) 20 mg, 0.05 M Tris 緩衝液 75 ml, 30% H₂O₂ 15 μ l/100 ml] で室温・30分間反応させ、蒸留水で洗浄後、脱水、封入した後、光学顕微鏡 (オリンパス, Tokyo, Japan) で観察した。対照として第1抗体に非免疫血清 (正常ウサギ血清) を使用し、他の操作はすべて同様に行った。

また、GAG 分布の変化を検討するために、GAG に特異的な抗コンドロイチン 4-硫酸プロテオグリカン抗体 (2-B-6)、抗コンドロイチン 6-硫酸プロテオグリカン抗体 (3-B-3)、抗ケラタン硫酸プロテオグリカン抗体 (5-D-4) ならびに抗デルマタン硫酸プロテオグリカン抗体 (6-B-6) (生化学工業社, Osaka, Japan) の4種のモノクローナル抗体を第1抗体として用いた。

2-B-6, 3-B-3, 6-B-6 抗体は、プロテオグリカンをコンドロイチナーゼ ABC で消化した後に残るコンドロイチン硫酸の“切り株 (stubs)”と反応するため、より抗原を露出するべく試料をコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業社, Osaka, Japan) 溶液に 37°C・1時間浸漬した。この酵素溶液は 0.2 U/ml の割合に 0.1 M sodium acetate-0.1 M Tris-HCl buffer (和光純薬, Osaka, Japan; pH 7.3) で溶解したものを使用した²²。その後の操作はすべて同様に行った。第2抗体としてウサギ抗マウス IgG 血清、第3抗体として PAP マウス血清を用いて同様に観察した。対照としてコンドロイチナーゼ ABC 消化を省略し、第1抗体に非免疫血清 (正常マウス血清) を使用し、他の操作はすべて同様に行った。

結 果

1. 肉眼的観察

対照群

全経過を通じて大腿骨および脛骨関節面の軟骨の色調や光沢に変化は認められなかった。滑膜も同様に明らかな変化はなく、関節の腫脹や水腫も認められなかった。

関節症軟骨

術後2週までは軟骨表面に変化はみられず色調も正常であったが、滑膜には軽度の充血が認められた。術後4週では脛骨関節面辺縁部において結合組織性の増殖を認め、滑膜は充血性および浮腫状を呈し、関節面の光沢は失われていた。術後6週では脛骨関

節面辺縁部に肉芽組織性の増殖および骨棘様所見が観察された。軟骨表面は明らかに粗となり不整が認められ、このような変化は荷重部である内顆中央部に著明に認められた。さらに術後8週では骨棘の形成も著明となり、荷重部の軟骨には亀裂が形成され、関節拘縮も認められた。術後10週では軟骨下骨が露出し象牙化を呈していた。

2. 軟X線学的検索

対照群

全経過を通じて明らかな変化は認められなかった (図1-A)。

関節症軟骨

術後2週までは変化が認められなかったが、術後4週から大腿骨顆間部の狭小化、関節幅の増大、関節面の不整などの変化が認められ、これらの所見は経過にともなって増強傾向を示し、6週では軟骨下骨の硬化、関節裂隙の狭小化および脛骨顆部内側部に著明な骨棘形成が認められた (図1-B)。さらに、術後8週では骨棘の形成も著明となり、術後10週では軟骨の破壊による関節裂隙の消失を認めた (図1-C)。

3. 組織学的所見

ヘマトキシリン・エオジン染色所見

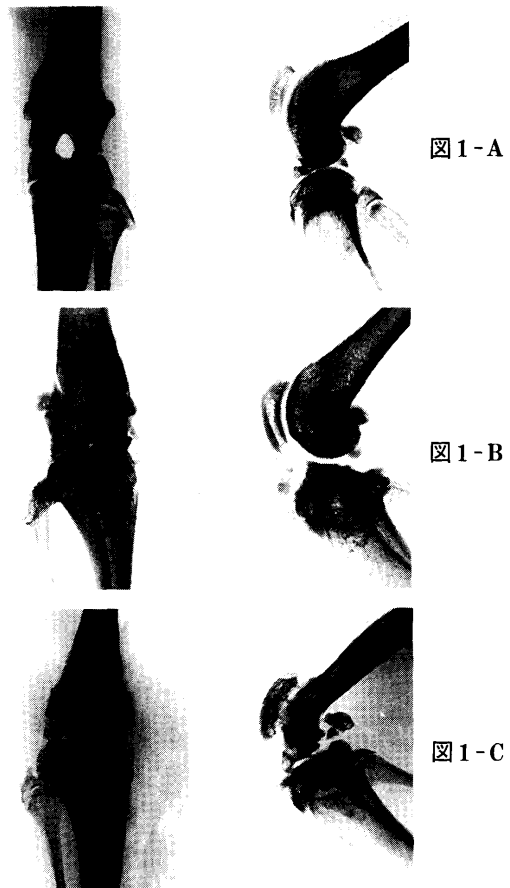


図1-A

図1-B

図1-C

対照群

関節軟骨は軟骨細胞の形態、配列や軟骨基質の状態から4層構造が認められ、関節面から浅層 (tangential layer)、中間層 (transitional layer)、軟骨細胞が柱状に配列する深層 (radial layer) および石灰化層 (calcified layer) に分けられた。さらに、軟骨細胞を中心として周囲に細胞周囲基質 (pericellular matrix) と細胞外基質 (extracellular matrix) が観察された。対照群では荷重部において術後10週に至るまで、軟骨細胞、軟骨基質、軟骨細胞の配列、細胞密度においても著明な変化を認めなかった (図2-A)。

関節症軟骨

術後2週

肉眼的には軟骨表面に変化を認めなかったが、組織学的には既に軟骨最表層は不整で粗造化がみられ、また浅層の細胞数の低下が認められた。しかし深層の柱状配列は保たれていた (図2-B)。

術後4週

表層の剝離がみられるようになり、深層の軟骨細胞の柱状配列に乱れが生じていた。またタイドマークも不整像を呈するようになった。

術後6週

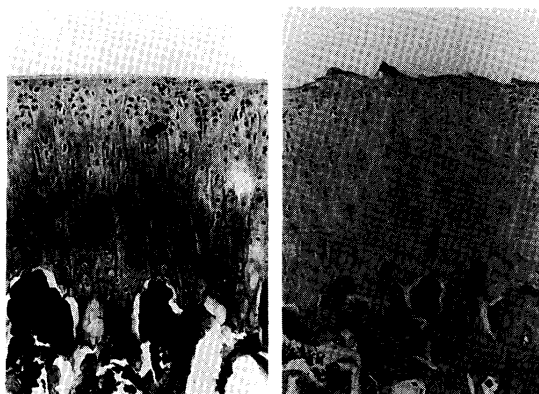


図2-A

図2-B

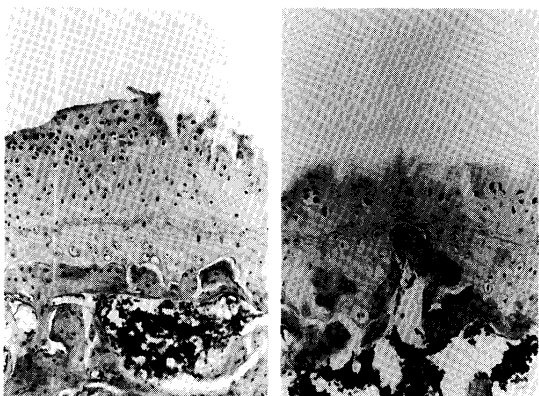


図2-C

図2-D

浅層は消失、中間層の厚さは減少し深層での軟骨細胞の柱状配列もほぼ消失していた。軟骨基質には深い亀裂を生じ、一部の細胞に集簇化形成がみられるようになった (図2-C)。またタイドマークは一部重層化し、深層における石灰化層の幅も減少し血管が石灰化層に侵入してタイドマークに達する部分も認められた。

術後8週

軟骨の厚さはいっそう減少しほぼ深層を残すのみとなった。軟骨基質は多数の亀裂を形成し、残存細胞に集簇化形成を認めた。幼若な結合組織をともなった血管が軟骨下骨領域より多数石灰化層に侵入し、重層化したタイドマークを貫通する部分もみられた。また血管先端部で内軟骨性骨化を示し軟骨下骨幅の増大につながる部分もみられた (図2-D)。

サフラニンO染色所見

対照群

サフラニンO染色標本においてその細胞外基質の染色性は浅層、中間層および深層の浅部では均一であり、深層の中間部から深部にかけては細胞周囲・細胞外基質に染色性が認められた。また特に深層の深部から石灰化層では細胞周囲で著明に濃染していた (図3-A)。観察開始から術後10週に至るまで特にこれらの所見に変化は認められなかった。

関節症軟骨

術後2週

表層から浅層における細胞数の減少にともなって細胞外基質の染色性は不均一となり軽度減少していた (図3-B)。また深層におけるタイドマーク周辺の細胞周囲・細胞外基質の染色性も減少していた。

術後4週

浅層、中間層、石灰化層での染色性の減少は著明となった。しかし深層では軟骨細胞の柱状配列の乱れにもかかわらず細胞周囲基質の染色性には変化は認められなかった。

術後6週

浅層は消失して軟骨の厚さは著明に減少し、中間層、深層における細胞周囲基質の染色性は中等度減少した。しかし深層の深部における細胞周囲基質の染色性は強く認められた (図3-C)。石灰化層の幅は減少しつつあり細胞周囲基質の染色性も減少していた。

術後8週

軟骨層はほぼ深層の深部のみ残存したが細胞周囲基質の染色性は維持されていた。石灰化層は骨と置換される部分が多く、残存軟骨基質には軽度の染色性を認めた (図3-D)。

4. 関節軟骨変化に対する評価

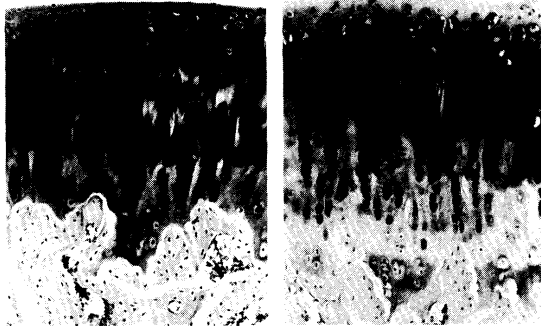


図 3-A

図 3-B

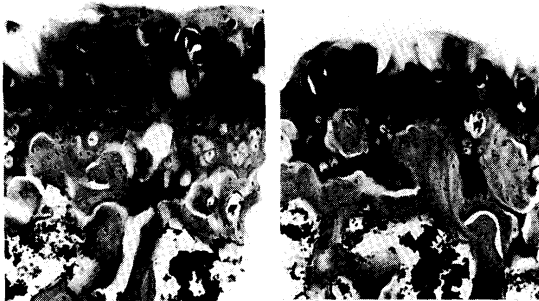


図 3-C

図 3-D

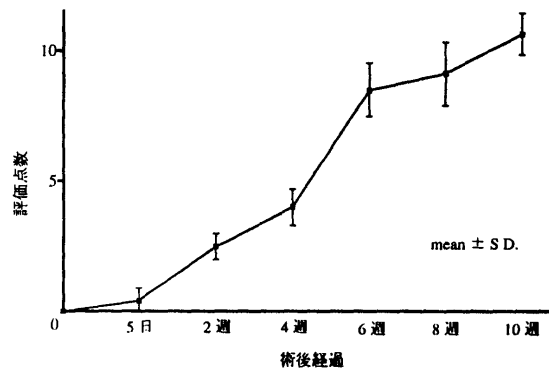


図 4

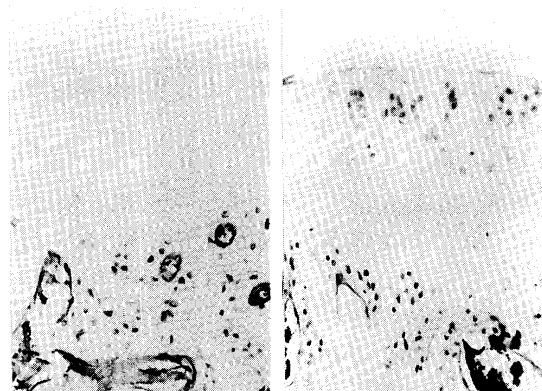


図 5-A

図 5-B

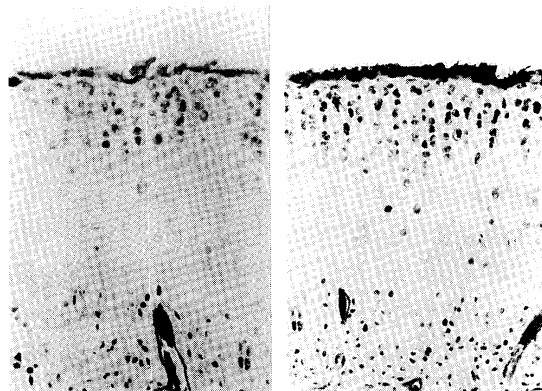


図 5-C

図 5-D

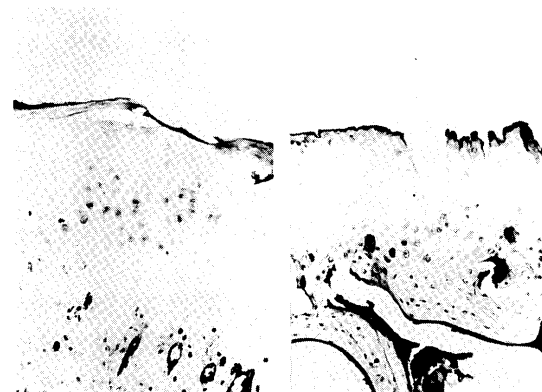


図 5-E

図 5-F

対照群

構造, 細胞, サフラニンOの基質染色性, タイドマークの各項目とも1点以上の明らかな変化はみられなかった。

関節症軟骨

術後5日では評価点数はほぼ正常と変わらず 0.40 ± 0.49 点 (n=5)であったが, その後4週ではサフラニンOの基質染色性は軽度減少となり 4.00 ± 0.49 点 (n=4)と増加した(図4)。術後6週になると亀裂形成が認められるようになり, またサフラニンOの基質染色性は中等度減少と評価され, 評価点数は 8.25 ± 1.09 点 (n=4)と2倍以上に上昇した。しかし8週では 9.00 ± 1.48 点 (n=3), 10週では 10.00 ± 0.87 点 (n=4)と点数の上昇は緩徐となった。

5. PKC免疫組織染色所見

β I, β IIおよび γ -PKCに対する免疫反応は正常軟骨, 関節症軟骨のいずれにおいても全経過を通じて認められなかった。

α -PKC免疫染色

正常関節軟骨

α -PKCは軟骨層の全領域で陽性反応を認めることはできなかった(図5-A)。

関節症軟骨

術後5日

浅層の軟骨細胞質および中間層の軟骨細胞質と核に免疫反応を認めた (図 5-B)。

術後 2 週

最表層には乱れがみられ、浅層の軟骨細胞質と核に軽度の免疫反応を認めた。中間層における軟骨細胞質と核の染色性はより明らかとなった (図 5-C)。深層の浅部の軟骨細胞質にも染色性が認められた。

術後 4 週

浅層、中間層における軟骨細胞質と核の染色性は術後 2 週よりさらに強く認められ、深層の深部の軟骨細胞質および核にも染色性を認めるようになった (図 5-D)。

術後 6 週

浅層は消失し、残存する中間層においても染色性は著明に低下した。しかし深層における軟骨細胞の染色性は保たれていた (図 5-E)。

術後 8 週

中間層はほぼ消失し、タイドマークの周辺部における石灰化層の細胞質にのみ陽性反応を認めた (図 5-F)。

ϵ -PKC 免疫染色

正常関節軟骨

ϵ -PKC は浅層から中間層の軟骨細胞の細胞質と核に免疫反応を認めた (図 6-A)。

関節症軟骨

術後 2 週

浅層の細胞質に軽度の反応がみられ、中間層および深層では細胞質と核に明らかな免疫反応が認められた。特に深層の深部の肥大した軟骨細胞において染色性は著明であった (図 6-B)。

術後 6 週

浅層は消失し、残存する中間層では細胞質に軽度の反応がみられ、深層では軟骨細胞の細胞質と核に明らかな免疫反応が認められた (図 6-C)。しかし石灰化層では陽性反応を認めることはできなかった。

術後 8 週

残存する全ての軟骨細胞から染色性は消失した (図 6-D)。

なお、対照として処理した試料には、上記部位における反応性は認められなかった。

6. GAG 免疫組織染色所見

コンドロイチン 4-硫酸免疫染色

正常関節軟骨

浅層の軟骨細胞内・細胞周囲基質に強い免疫反応を認めた。中間層では細胞内、細胞周囲および細胞外基質に染色性を認めた。深層では細胞周囲・細胞外基質に染色性を認めた。石灰化層においては染色

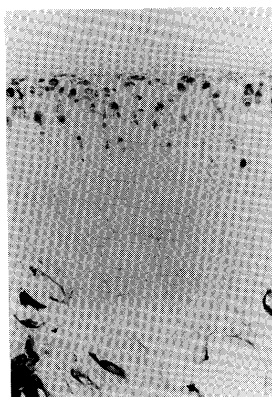


図 6-A

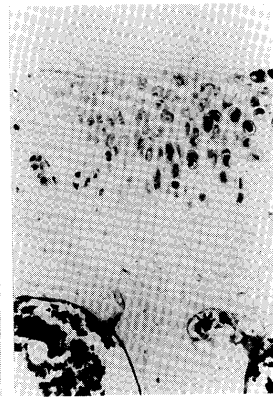


図 6-B

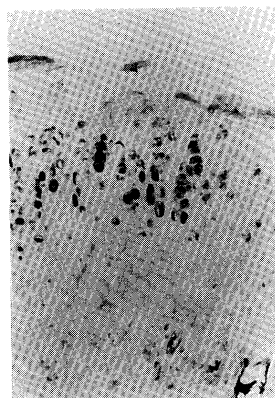


図 6-C



図 6-D

性を認めなかった (図 7-A)。

関節症軟骨

術後 2 週

浅層、中間層から深層にかけて細胞内、細胞周囲および細胞外基質に染色性を認めた (図 7-B)。石灰化層においても細胞内に染色性が認められた。

術後 6 週

関節症は進行し、中間層で細胞内、細胞周囲および細胞外基質に強い染色性を認めた (図 7-C)。深層は幅が著明に減少し、細胞周囲基質に軽度の染色性を認めた。軟骨細胞の染色性は石灰化層においてもみられた。

術後 8 週

残存する深層の細胞内、細胞周囲および細胞外基質に染色性を認めた (図 7-D)。

コンドロイチン 6-硫酸免疫染色

正常関節軟骨

浅層から深層に至るまで軟骨細胞周囲・細胞外基質に免疫反応を認めたが細胞内基質には正常、関節症いずれにも染色性を殆ど認めなかった (図 8-A)。

関節症軟骨

術後 2 週

浅層から深層に至る全領域で細胞周囲基質の染色性は維持されていたが、細胞外基質での染色性は減

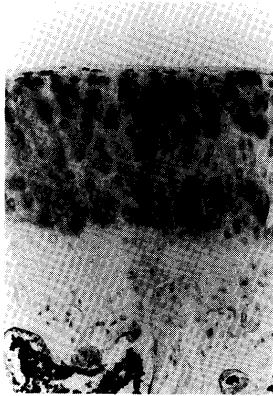


図 7-A

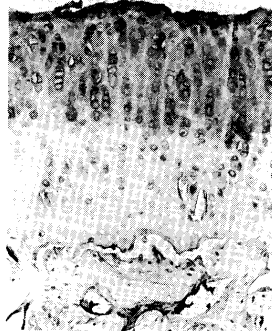


図 7-B

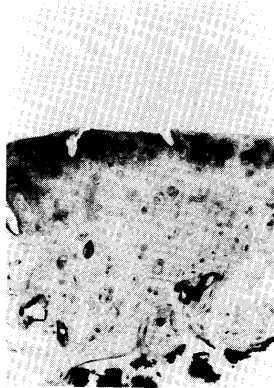


図 7-C

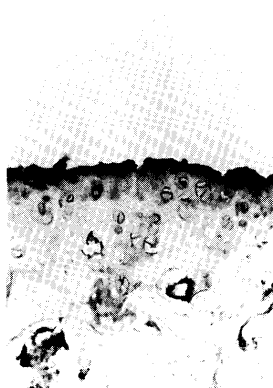


図 7-D

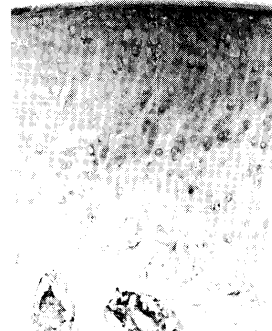


図 8-A

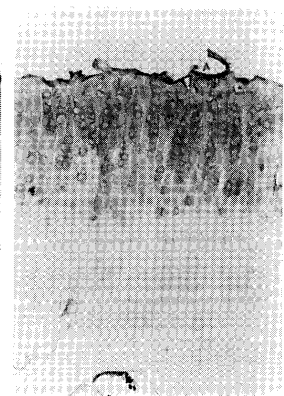


図 8-B

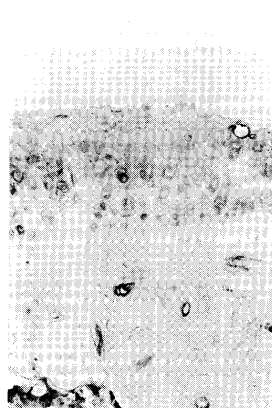


図 8-C

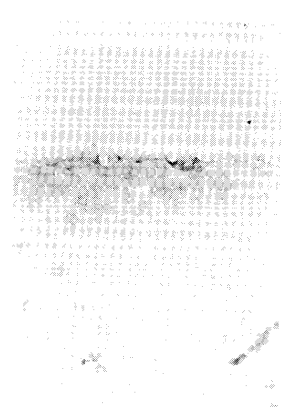


図 8-D

弱していた (図 8-B).

術後 6 週

中間層での細胞周囲基質での染色性はさらに減弱しており、深層の細胞周囲に僅かに認めるのみであった (図 8-C).

術後 8 週

残存する深層の細胞周囲にのみ染色性が認められた (図 8-D).

ケラタン硫酸免疫染色

正常関節軟骨

浅層から深層にいたる全領域で軟骨細胞周囲・細胞外基質に強い染色性を認めた (図 9-A)。また細胞内基質にも弱いながら染色性が認められた。

関節症軟骨

術後 2 週

浅層、中間層および深層の中間部に至る細胞周囲・細胞外基質に染色性の増強を認めた (図 9-B)。しかし深層の深部では染色性は殆んど認められなかった。

術後 6 週

残存する中間層および深層の細胞周囲・細胞外基質において明らかな染色性を認めた (図 9-C)

術後 8 週

残存する深層の細胞周囲・細胞外基質にわずかに

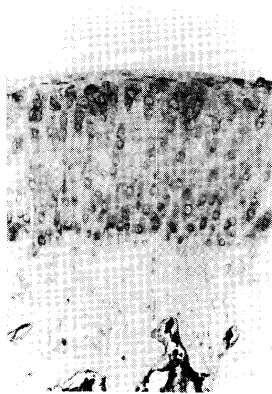


図 9-A



図 9-B



図 9-C



図 9-D

染色性がみられるのみであった (図9-D)。

デルマトン硫酸免疫染色

正常関節軟骨

軟骨層の全領域で陽性反応を認めることはできなかった (図10-A)。

関節症軟骨

術後5日

浅層の細胞周囲基質においてわずかに染色性が認められた (図10-B)。中間層から深層の細胞外基質に染色性を認めた。

術後2週

中間層から深層において細胞周囲・細胞外基質に

おいて著明な染色性を認めた (図10-C)。また細胞内基質にも明らかに染色性が認められた。

術後4週

浅層、中間層および深層において細胞内、細胞周囲および細胞外基質において明らかな染色性が出現した (図10-D)。

術後6週

残存する深層の細胞周囲・細胞外基質に染色性を認めた (図10-E)。

術後8週

残存する深層の細胞外基質に染色性がみられた (図10-F)。

なお、対照として処理した試料には、上記部位における反応性は認められなかった。

考 察

変形性関節症モデル

変形性関節症の軟骨変性機序についてこれまでウサギ^{15,17}、イヌ¹⁸など様々の実験動物を用いた多数の報告がみられる。しかし今回の研究のようにラット膝関節に変形性関節症を作製した報告はみられない。ラットを実験動物として用いる有利さは他の動物に比較し、多くの系が確立されていることと、様々の蛋白や因子に対するモノクローナル抗体やDNAプローブが豊富に入手でき、詳細な代謝研究が可能である点などである。本研究でラット膝関節において内側側副靭帯切除、内側半月の摘出と、前・後十字靭帯切離により作製された関節の経時的病理学的変化は、関節症の組織学的・組織化学的評価基準に照らして明らかに関節症変化を呈し、ヒトの変形性関節症の進行を再現できる優れたものであった。

軟骨における PKC の局在

PKCは1977年に西塚²³により発見されて以来、様々な情報伝達に関与していることが証明され、細胞内情報伝達機構における最も重要な酵素として知られてきた。教室の福田ら¹¹はすでに家兎関節軟骨における PKC の存在を証明し、軟骨代謝に重要な役割を果たすことを示唆している。現在までに10種類以上の PKC 分子種の構造が示され、各分子種はそれぞれ微妙に異なる活性化様式をもち、独自の分布を示し、細胞内の特定のコンパートメントに局在することが明らかにされている²⁴⁻²⁹。今回の実験で α 、 β I、 β II、 γ および ϵ -の5分子種の PKC の免疫組織学的検索を行ったが、正常関節軟骨では ϵ -PKC のみが観察され、関節症軟骨では新たにカルシウム依存性の α -PKC の発現が証明された。

カルシウムイオン (Ca^{2+}) もまた細胞内情報伝達物質の一種であり、一般に細胞増殖に重要な役割を

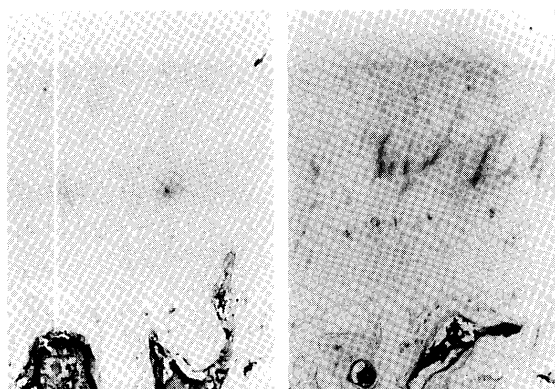


図10-A

図10-B

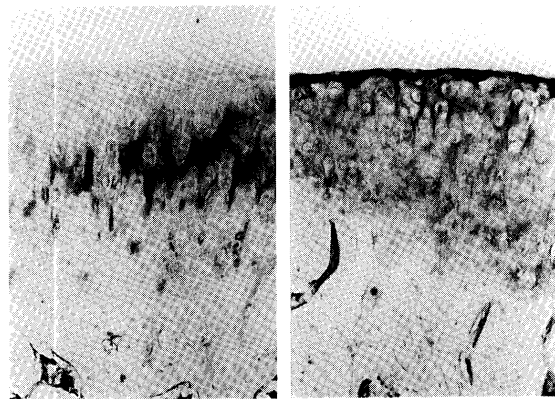


図10-C

図10-D

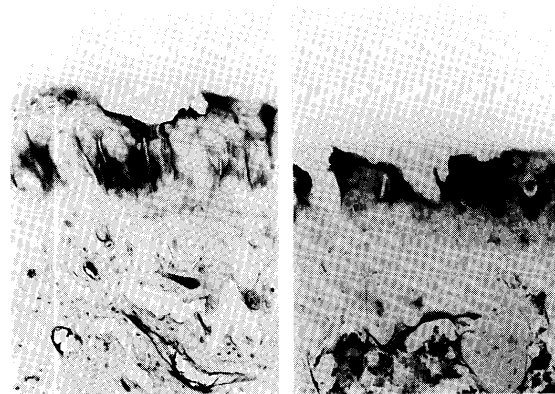


図10-E

図10-F

担っていると考えられている。受容体刺激によりイノシトールリン脂質代謝回転が亢進することにより小胞体から放出され、さらに細胞外からも流入して細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇する。そしてジアシルグリセロール (DAG) と共同して α -PKC が細胞内で活性化されると考えられる。PKC の活性化に必要な Ca^{2+} 濃度は $100 \mu\text{M}$ 以上であり正常時の Ca^{2+} 濃度約 100nM に比較し 1000 倍の濃度勾配が必要になる³⁰。

Kaibuchi ら³¹ は Ca^{2+} との相互作用により PKC による細胞内代謝機構の活性化に相乗効果がみられることを様々な細胞で証明している。

Ca^{2+} 調節機構のひとつとして Pamela ら³² は接着した培養線維芽細胞において、interleukin-1 (IL-1) 刺激により濃度依存性に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することを報告し、カルシウム依存性 PKC の活性化の可能性を示唆している。IL-1 は軟骨変性にも関係しているサイトカインであり、正常軟骨細胞内では認められないが、亀裂形成や細胞の集簇化の存在を認める関節症軟骨では集簇化細胞において強い染色性を認めることが報告されている³³。

本研究において α -PKC は IL-1 と同様に正常軟骨細胞では染色性を認めなかったが、術後早期に浅層から中間層の軟骨細胞に著明に出現し、中期には IL-1 と同様に深層の集簇化を呈した細胞において発現が認められた。すなわち細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇している可能性のある時期と場所で α -PKC の活性化も認められたことになる。一方、 ϵ -PKC は日常的なストレスにさらされ易い浅層と中間層で正常軟骨に認められ、日常的な細胞内情報伝達機構に関与すると考えられた。また関節症軟骨でその発現量が正常軟骨に比べ著明に亢進し、軟骨変性の進行とともに α -PKC と同じように ϵ -PKC の染色性も徐々に深層肥大細胞へと移動した。したがって軟骨細胞の変性や崩壊にもなってこれらの PKC の発現が観察されたことになる。そのため PKC の発現とその情報伝達によっていかなる細胞機能が活性化されているかを知るために、軟骨細胞特有の GAG の経時的局在を観察した。

軟骨における GAG の局在

GAG は軟骨基質の主要構成成分であるプロテオグリカン分子の重合に関与し、関節症の発症、進行過程、恒久化、修復などにおいて重要な役割を果たしており、関節軟骨に常在するものとしてはコンドロイチン 4-硫酸、コンドロイチン 6-硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸などの存在が知られている。GAG は生体内においてほとんどが蛋白と結合してプロテオグリカンとして存在している。すなわち一

本のコア蛋白に、約 100 本のケラタン硫酸と約 80 本のコンドロイチン硫酸が共有結合してプロテオグリカンモノマーを形成している。GAG の分布も軟骨の各層や各領域でそれぞれ組成が異なっており、ケラタン硫酸は軟骨浅層に比べ深層において高濃度に認められ、コンドロイチン硫酸も深層の軟骨細胞において優位に産生されている。さらに細胞内基質にはコンドロイチン硫酸が、細胞周囲基質にはコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸が、細胞外基質にはケラタン硫酸がそれぞれ高濃度に存在することが生化学的分析により明らかにされている。この構造的特徴が粘性や弾性、多量の水分を吸収して大きな体積を含める水和ゲルを形成していると考えられている^{34,35}。また変形性関節症における軟骨の変性過程においても様々の代謝過程の変化が探られてきている³⁶⁻³⁸。Mathews と Glagov³⁶、Matthews³⁷ は、その初期において、GAG 合成の異常を生化学的定量により指摘している。Bollet と Nance³⁸ はその過程においてコンドロイチン硫酸の減少を報告し、Benmaman ら³⁹ はケラタン硫酸の減少を報告している。Mankin ら^{1,20} は軟骨変性過程におけるコンドロイチン 4-硫酸の増加とケラタン硫酸の減少を述べており、OA 変化にともなう軟骨基質においてはプロテオグリカンの減少を補うために軟骨細胞が多量のムコ多糖を未熟な状態で合成しているのではないかと推測している。

本研究では正常軟骨の GAG については、コンドロイチン 4-硫酸、コンドロイチン 6-硫酸、ケラタン硫酸ともに浅層から深層に至る軟骨細胞周囲基質に強い染色性を認めた。また領域別に分布を調べると、細胞質にはコンドロイチン 4-硫酸、細胞周囲基質にはコンドロイチン 4-硫酸、ケラタン硫酸、細胞外基質ではコンドロイチン 6-硫酸の染色性が優位にみられた。

また実験的変形性関節症モデルでは、術後 2 週にコンドロイチン 4-硫酸とケラタン硫酸では全ての層で細胞外基質に正常群に比較し染色性の増強を認めた。それらの染色性は関節症の進行により残存する中間層から深層に移行し、コンドロイチン 4-硫酸はさらに石灰化層にも認められるようになった。デルマタン硫酸は正常関節軟骨では染色性を認めなかった。しかし関節症軟骨では術後 5 日より浅層および中間層における細胞外基質でわずかながら染色性が出現し、術後 2 週では中間層、深層の細胞内基質、細胞周囲基質、細胞外基質に強い染色性が認められた。そして関節症の進行とともに他の常在性の GAG と同じように残存する深層の細胞外基質に染色性が移行した。すなわち特にコンドロイチン 4-硫

酸の細胞外基質における著明な増加と、軟骨には存在しないデルタマン硫酸の発現が確認されたが、これらはOA変化にともない軟骨細胞が多量のムコ多糖を未熟な状態で合成しているのではないかとMankinら^{1,20}の考えと関連するものではないかと考えられた。

また術後2週で浅層から深層に至る細胞周囲・細胞外基質で染色性の増強が見られたケラタン硫酸に関して、当教室の段⁴⁰はケラタン硫酸値の測定が関節症患の治療効果の判定に有用であることを確認し、IL-1が直接あるいは間接的にケラタン硫酸の産生を抑制し、このことが関節軟骨の変性に作用していることを報告した。また教室の松村ら⁴¹は変形性関節症のX線撮影と血清ケラタン硫酸値の測定を経時的に行い比較検討したところ、X線像で何ら変化が認められなかった時期において、血清ケラタン硫酸値の明らかな上昇を認め、これが初期OAの早期診断法として有用であると報告している。今回の早期における浅層から深層に至る細胞周囲・細胞外基質での染色性の増強が血清ケラタン硫酸値の上昇と関連している可能性も考えられる。

デルタマン硫酸は一般的には正常関節軟骨には存在せず、変性軟骨において出現するGAGと考えられている。本研究でも健康な軟骨基質には染色性は認められなかった。変性軟骨ではこれまで江口と貝原⁴²が変形性関節症を呈した大腿骨頭を用いて生化学的分析を行い比較的病変が軽度な症例においてもデルタマン硫酸の出現を認め、中川⁷は関節症軟骨においてプロテオグリカン合成量の約10%程度のデルタマン硫酸を証明したと述べている。Kristineら⁴³はin vitroにおいてデルタマン硫酸が細胞接着を強く阻害することを報告している。しかしこれらの生化学的、あるいはin vitroの研究に対し今回のような関節症モデルを用いたしかもin vivoの研究はこれまでみられなかった。本研究においても江口と貝原⁴²と同様に術後5日あるいは2週といった早期には細胞内基質に、さらに4週では浅層から深層の細胞内、細胞周囲および細胞外基質においてデルタマン硫酸は著明に出現した。しかし4週を過ぎると組織学的・組織化学的評価基準に従った関節軟骨評価点数も急速に上昇しており、この時期を過ぎると変性、破壊に対する異常、正常のGAG合成による修復機構は限界を超え、非可逆的な変性に陥るものと推察された。

PKCとGAG

PKCの発現とその情報伝達によっていかなる細胞機能が活性化されているかを知るために、GAGの局在を経時的に観察した。正常軟骨では α -PKC

とデルタマン硫酸の染色性が認められず、一方関節症軟骨内では両者ともに発現した。木村ら¹³は α -PKCのcDNAを添加した関節軟骨細胞においてなんらかのGAGの合成が促進されることを認めている。 α -PKCとデルタマン硫酸の発現は特に軟骨細胞の集簇化がよく認められた層でみられたが、ここは同時にIL-1の発現も報告された部位であり³³、 Ca^{2+} 濃度の上昇とカルシウム依存性の α -PKCの活性化が軟骨変性に関与する可能性が示唆された。

ϵ -PKCは浅層から中間層において染色性を認めた。これは関節運動という機能上、絶えず荷重、摩擦といったメカニカルストレスに曝されている表層側より日常的にカルシウム非依存性の ϵ -PKCによって経時的に細胞内情報伝達系は賦活されていると考えられる。 ϵ -PKC陽性の軟骨細胞の経時的分布とほぼ一致するのはコンドロイチン4-硫酸であり、関節症における細胞質と細胞周囲基質の染色性が浅層で減弱し、深層へ経時的に移動する点などが一致した。またサフラニンOの染色性とも類似していた。Arnerら¹²はウシ関節軟骨の器官培養系においてIL-1による軟骨破壊に対しPKCは防御的に働くと報告している。さらに当教室で最近PKCの活性物質であるPMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)を関節内に投与することにより、今回の実験にみられたような関節症の進行をほぼ完全に抑制することができることを観察した(未発表, unpublished observation)。これらの結果は常在する ϵ -PKCの働きと考えれば理解できる。すなわち ϵ -PKCは軟骨組成の維持に関与していると考えられる。

以上、本研究により軟骨細胞におけるPKCの存在が免疫組織学的に初めて証明され、さらにそれにGAGの経時的な局在変化を対比させることにより、異常メカニカルストレスによって引き起こされる変形性関節症の軟骨変性および軟骨維持過程において前者では α -PKCによる、後者では ϵ -PKCによる細胞内情報伝達機構の存在が明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師田中清介教授に深甚なる感謝の意を捧げます。本研究を遂行するにあたって全般にわたり直接御指導、御助言をいただきました浜西千秋助教授、各種PKC抗体を御提供いただいた神戸大学医学部薬理学教室 田中千賀子名誉教授ならびに神戸大学バイオシグナル研究センター 斎藤尚亮教授に深く感謝致します。本論文の要旨は、第36回日本組織細胞化学会(平成7年9月10, 11日, 札幌)、第10回日本整形外科学会基礎学術集会(平成7年10月12, 13日, 軽井沢)において発表した。

文 献

1. Mankin HJ, Lippiello L (1971) The glycosaminog-

- lycans of normal and arthritic cartilage. *J Clin Invest* 50: 1772-1779
2. Ehrlich MG, Houle PA, Vigliani G, Mankin HJ (1978) Correlation between articular cartilage collagenase activity and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 21: 761-766
 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. Heine J (1926) *Über die Arthritis deformans*. *Virchows Archiv*; Bd 260: 521-663
 5. 新名正由 (1987) 軟骨代謝—研究の進歩とその臨床的意義—. *日整会誌* 61: 975-989
 6. Pelletier JM, Pelletier JP, Cloutier JM, Howell DS, Mnamneh LG, Woessner JF (1984) Neutral proteases capable of proteoglycan digesting activity in osteoarthritic and normal human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 27: 305-312
 7. 中川 正 (1975) 関節軟骨の病態. *臨整外* 10: 875-879
 8. Chrisman OD (1969) Biochemical aspects of degenerative joint disease. *Clin Orthop* 64: 77-86
 9. Ase K, Berry N, Kajikawa U, Kishimoto A, Nishizuka Y (1988) Differential down-regulation of protein kinase C subspecies in KM3 cells. *FEBS Lett* 236: 396-400
 10. Grove DS, Mastro AM (1988) Prevention of TPA-mediated down-regulation of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 94-99
 11. Fukuda K, Yamasaki H, Nagata Y, Motoyoshi H, Matsumura F, Kuno T, Tanaka S (1991) Histamine H1-receptor-mediated keratan sulfate production in rabbit chondrocytes: involvement of protein kinase C. *Am J Physiol* 261: C413-416
 12. Amer EC, Pratta MA (1991) Modulation of interleukin-1-induced alterations in cartilage proteoglycan metabolism by activation of protein kinase C. *Arthritis Rheum* 34: 1006-1013
 13. 木村琢也, 藤岡宏幸, 松原 司, 伊藤 宏 (1994) 培養関節軟骨細胞の基質合成におけるプロテインキナーゼCの役割. *臨床リウマチ* 5: 240-246
 14. 木村琢也, 黒田 司, 松原 司, 廣畑和志 (1991) 軟骨細胞のグリコサミノグリカン合成における細胞内伝達系とそれに対する炎症球由来の過酸化水素の影響. *関節外科* 10: 1009-1014
 15. Hulth A, Lindberg L, Telhag H (1970) Experimental osteoarthritis in rabbits. *Acta orthop Scandinav* 41: 522-530
 16. Telhag H, Lindberg L (1972) A method for inducing osteoarthritic changes in rabbits' knees. *Clin Orthop* 86: 214-223
 17. Telhag H (1972) Mitosis of chondrocytes in experimental "Osteoarthritis" in rabbits. *Clin Orthop* 86: 224-229
 18. Myers SL, Brandt KD, O'Conner BL, Visco DM, Albrecht ME (1990) Synovitis and osteoarthritic changes in canine articular cartilage after anterior cruciate ligament transection: effect of surgical hemostasis. *Arthritis Rheum* 33: 1406-1415
 19. Rosenberg L (1971) Chemical basis the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *J Bone and joint surg* 53-A: 69-82
 20. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips II. correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg* 53-A: 523-537
 21. 永井教之 (1992) 骨歯牙組織の病理検査法と研究技術の実際. 東京: 学際企画
 22. Couchman JR, Caterson B, Christner JE, Baker JR (1984) Mapping by monoclonal antibody detection of glycosaminoglycans in connective tissues. *Nature* 307: 650-652
 23. Nishizuka Y (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308: 693-698
 24. Saito N, Kikkawa U, Nishizuka Y, Tanaka C (1988) Distribution of protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain. *J Neurosci* 8: 369-382
 25. Saito N, Kose A, Ito A, Hosoda K, Mori M, Hirata M, Ogita K, Kikkawa U, Ono Y, Igarashi K, Nishizuka Y, Tanaka C (1989) Immunocytochemical localization of β II subspecies of protein kinase C in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3409-3413
 26. Shuntoh H, Taniyama K, Tanaka C (1989) Involvement of protein kinase C in the Ca^{2+} -dependent vesicular release of GABA from central and enteric neurons of the guinea pig. *Brain Res* 483: 383-388
 27. Ito A, Saito N, Hirata M, Kose A, Tsujino T, Yoshihara C, Ogita K, Kishimoto A, Nishizuka Y, Tanaka C (1990) Immunocytochemical localization of the α subspecies of protein kinase C in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3195-3199
 28. Tanaka C, Saito N (1992) Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. *Neurochem int* 4: 499-512
 29. Saito N, Itouji A, Totani Y, Osawa I, Koide H, Fujisawa N, Ogita K, Tanaka C (1993) Cellular and intracellular localization of ϵ -subspecies of protein kinase C in rat brain; presynaptic localization of the ϵ -subspecies. *Brain Res* 607: 241-248
 30. Inagaki M, Hagiwara M, Saitoh M, Hidaka H (1986) Protein kinase C negatively modulated by phorbol ester. *FEBS* 3789 202: 277-281
 31. Kaibuchi K, Takai Y, Sawamura M, Hoshijima M, Fujikera T, Nishizuka Y (1983) Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J. Biol Chem* 258: 6701-6704
 32. Pamela DA, Johnny Ma, Weixian M, Tony C, Christopher AGM (1995) Interleukin-1-induced calcium flux in human fibroblasts is mediated through focal adhesions. *J Biol Chem* 270: 6042-6049
 33. 山下文治, 楠田喜三郎, 楠崎克之, 竹下秀之, 葛原 啓,

- 杉本茂之(1988) 関節軟骨におけるインターロイキン1の免疫組織化学的局在. 日整会誌62(7): S768
34. Zanetti M, Ratcliffe A, Watt FM (1985) Two subpopulations of differentiated chondrocytes identified with a monoclonal antibody to keratan sulfate. *J Cell Biol* 101: 53-59
35. Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE (1988) Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes. II. proteoglycan metabolism. *Connect Tiss Res* 18: 223-234
36. Mathews MB, Glogov S (1966) Acid mucopolysaccharide patterns in aging human cartilage. *J Clin Invest* 45: 1103-1111
37. Matthews BF (1953) Composition of articular cartilage in osteoarthritis. *British Medical Journal* 19: 660-661
38. Bollet A, Nance J (1966) Biochemical finding in normal and osteoarthritic articular cartilage. II. chondroitin sulfate concentration and chain length, water, and ash content. *J Clin Invest* 45: 1170-1177
39. Benmaman JD, Ludowieg JJ, Anderson CE (1969) Glucosamine and galactosamine distribution in human articular cartilage: Relationship to age and degenerative joint disease. *Clin Biochem* 2: 461-464
40. 段 秀和 (1994) 関節軟骨細胞に対する interleukin 1 の作用. 近畿大医誌19: 93-107
41. 松村文典, 福田寛二, 本吉 寛, 田中清介 (1991) ケラタン硫酸. 関節外科9: 23-28
42. 江口正雄, 貝原信紘 (1975) 関節軟骨の病態とムコ多糖. 臨整外10: 892-901
43. Kristine L, Haing UC, Lawrence CR, Luciano Z, Lloyd AC (1987) Fibronectin-mediated adhesion of fibroblasts: inhibition by dermatan sulfate proteoglycan and evidence for cryptic glycosaminoglycan-binding domain. *J Cell Biol* 105: 1443-1454