

関節軟骨破壊におけるヒアルロン酸の作用

高山正文

近畿大学医学部整形外科学教室

抄 録

変形性関節症の治療のひとつとして、最近ヒアルロン酸 (HA) の関節内投与が広く行われている。しかし、その作用機序については多くの報告があり未だ不明な点が多い。また、Interleukin-1 (IL-1) は種々のサイトカインの中で軟骨破壊の最も重要な調節因子と考えられている。今回の研究の結果、ヒアルロン酸は高濃度では IL-1 により誘導される活性酸素を抑制することにより軟骨破壊を修飾し、低濃度では IL-1 により抑制されたプロテオグリカン合成能を回復させるという二相性の作用が明らかになった。さらに外因性ヒアルロン酸が IL-1 処理された軟骨組織内に進入し、軟骨周囲基質に至ることを組織学的に証明した。

Key words: chondrocytes, interleukin-1 (IL-1), keratan sulfate (KS), prostaglandin E2 (PGE2), hyaluronic acid (HA), superoxide anion (SA)

緒 言

関節軟骨における細胞外基質は、軟骨細胞が合成するコラーゲンとプロテオグリカンから構成される。このうち、軟骨基質の主成分であるプロテオグリカンは、分子量約40万のコア蛋白に、多数のコンドロイチン硫酸鎖と少数のケラタン硫酸鎖 (keratan sulfate, KS), および O-結合型および N-結合型オリゴ糖などのグリコサミノグリカン (GAG) が結合することで構成されている (プロテオグリカンモノマー)。さらにこれらがヒアルロン酸 (hyaluronic acid) と非共有結合することにより、巨大な集合体を形成し、関節の支持性に重要な役割を果たしている。

KS は関節軟骨に特異的なプロテオグリカン鎖である。Thonar ら¹, Motoyoshi ら² は酵素標識抗体測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) を用いた KS 量の測定法を確立した。血清 KS 値が関節軟骨代謝の良好な指標となることが、現在までの教室における検討で明らかにされている³⁻⁵。

慢性関節リウマチ (RA) は関節滑膜を病変の主座とする原因不明の慢性炎症性疾患である。病変部位は初発の関節滑膜にとどまらず、やがて軟骨、骨組織の破壊をひき起こす。関節軟骨の破壊は RA にお

ける最も特徴的な病態であり、予後を決する最大の因子である⁶。RA 患者の関節液中には種々のサイトカインが存在することが知られており、これらが関節破壊の原因となることが示唆されている。中でも interleukin-1 (IL-1) は軟骨破壊の最も重要な調節因子と考えられている⁷。最近の研究では、IL-1 はマクロファージ、単球、滑膜細胞、血管内皮細胞のみならず、軟骨細胞自身からも産生されていることが報告されている⁸。近年、軟骨破壊の機序として、IL-1 はコラゲナーゼやストロメライシンなどのマトロプロテアーゼ産生を mRNA レベルで軟骨細胞に誘導することが明らかとなった⁹。これらの活性型プロテアーゼはプロテオグリカンモノマーを切断し、関節軟骨からのプロテオグリカン放出を促進する¹⁰。また、IL-1 は軟骨細胞のホスホリパーゼ A2 を活性化することが知られており、アラキドン酸カスケードの活性化を介してプロスタグランジン E2 (PGE2) の合成を促進する¹¹。このように IL-1 は関節破壊に重要な働きをすることは明らかであるが、その機序については完全に解明されたとはいえない。本研究では、活性酸素 (superoxide-anion, O₂⁻) という最近同定されたガスメディエーターを中心に、IL-1 による軟骨破壊の病態を検討することを一つの目的とした。

最近、変形性関節症に対し、軟骨細胞外基質であ

るヒアルロン酸の関節内注入が臨床的に広く行われている。また、RA に対してもヒアルロン酸の関節内注入の臨床治験が進行している¹²。それでは関節疼痛の改善や水腫の軽減などの臨床効果は報告されているものの、軟骨代謝に及ぼす影響は不明であった。本研究のもう一つの目的は、IL-1 による軟骨破壊機序をヒアルロン酸がどのように修飾するかを検討することとした。

材料および方法

1. 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 HyClone (Logan, USA) より、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン、アンフォテリシン B、ネオマイシン) は Gibco (Grand Island, USA) より購入した。IL-1 β は R&D systems (Minneapolis, USA) より、パパイン、ヒアルロニダーゼ、セチルピリジリウムクロライド (cetylpyridinium chloride, CPC) は Sigma (St. Louis, USA) より、サメ由来のコンドロイチン硫酸、KS、抗 KS モノクローナル抗体 (1/20/5/D4) は生化学工業 (Tokyo, Japan) より、1,9-dimethylmethylene blue (DMB) は Serva (Heidelberg, Germany) より購入した。ビオチン標識ヒアルロン酸結合蛋白、ヒアルロン酸測定キットは中外製薬 (Tokyo, Japan) より、³⁵S-sulfate は New England Nuclear (Boston, USA) より、PGE2 の測定キットおよびエコノフローは Du pont (Wilmington, USA) より購入した。蛍光アミン標識のヒアルロン酸および FITC 標識抗 CD44 は生化学工業 (Tokyo, Japan) より、活性酸素の中和剤である superoxide dismutase (SOD) および活性酸素の測定に用いた発光合成基質 (L012) は武田薬品工業 (Tokyo, Japan) より供与された。

2. 軟骨の培養

2.1. 軟骨の器官培養

ヒト関節軟骨は患者 (6 名, 年齢 50-80 歳) の同意を得た上で、手術中に切除された大腿骨頭より採取した。1 名は骨盤への転移性骨腫瘍で、人工股関節置換術を施行され、他の 5 名は大腿骨頸部骨折に対して人工骨頭置換術を受けた患者である。いずれも関節軟骨は肉眼的には正常であった。関節軟骨を無菌的に、剪刀で厚さ 6 mm の均一な細片として切り出した。ウシの関節軟骨細胞は生後 2-3 年のウシ前足部 MP 関節より、無菌的に同様な操作で切り出した。これらを重量を計測した後、24 穴プレート (Falcon) に入れた。10% ウシ血清添加 DEME にて

平衡状態¹³ に達するまで 7 日間培養した後、培養液を血清無添加 DMEM に代え、実験を開始した。

2.2 軟骨の細胞培養

ウシの関節軟骨細胞をコラゲナーゼ処理にて単離した^{11,14}。これらの細胞を 10% ウシ血清添加 MEM を用いて、各種プレートに播種し、37°C で 5% CO₂ 飽和水蒸気圧の条件下で培養した。

3. GAG 量の計測

GAG の定量は Farndale らの方法にしたがった¹⁵。反応液は DMB 16 mg を 5 ml のエタノールで溶解し、ギ酸緩衝液 2 ml を加え、さらに蒸留水で全量が 1000 ml になるよう加えて、作製した。GAG の標準希釈溶液はサメ軟骨より精製されたコンドロイチン硫酸を使用した。検体の培養上清液 100 μ l に DMB 反応液 100 μ l を加え、525 nm の波長で吸光度を測定した。

4. PGE2 量の計測

軟骨細胞が合成する PGE2 を培養上清を検体として測定した。培養上清 100 μ l を採取し、測定キットを用いて PGE2 量を測定した。

5. プロテオグリカン合成能

軟骨細片を 3 回洗浄後、血清無添加培養液に ³⁵S-sulfate を 20 μ Ci/ml 添加し、4 時間培養した。その後培養液を除去し、軟骨片を PBS で 3 回洗浄後パパイン (0.5 μ g/ml) を添加し、65°C の条件で 12 時間処理した。100 μ l の可溶画分に対して CPC (10%) を 10 μ l 加え、37°C で 1 時間反応させた。フィルター (Whatman GF/F) で沈澱物を回収し、さらに 1% CPC-0.02 M NaCl 1 ml で 5 回洗浄した。フィルターを乾燥させ、エコノフロー 1 ml を加え、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した¹⁶。

6. KS の測定

培養上清 100 μ l を対象に KS 量を測定した。KS の測定は Motoyoshi ら² の方法に準じた酵素抗体標識測定法 (ELISA) を用いて行った。ウシ鼻中隔プロテオグリカンモノマー (ICN Immuno Biologicals, USA) 5 μ g をコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業) 0.01 unit で 37°C、1 時間消化した後、20 mM 炭酸・重炭酸塩緩衝液 (pH 9.2) で 10 ml に希釈し、37°C で 2 時間 96 穴プレート (Costar) に吸着させた。検体 0.1 ml を 0.1% ウシ血清アルブミン、0.05 M EDTA、0.05% Tween 20 添加 PBS で 5 万倍希釈した抗 KS モノクローナル抗体 0.1 ml と 37°C、1 時間反応させた。抗原を吸着させた 96 穴プレートを 0.05% Tween 20 添加 PBS で 3 回洗浄し、これに先に述べた検体と抗 KS モノクローナル抗体との反応液 0.1 ml を注入し、37°C で 1 時間反応させ余剰の

抗体をプレート上の抗原と結合させた。プレートを3回洗浄後、0.05% Tween 20 添加 PBS で1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (Organon) 0.1 ml を注入し、室温で1時間反応させた。再びプレートを3回洗浄後、o-phenyldiamine (Sigma) 調製0.1 ml を注入し発色させた。15分後に2N 硫酸を加えて反応を停止させ、492 nm の波長で吸光度を測定した。吸光度の測定には ELISA analyzer EAR 400 (SLT Labinstruments) を用いた。KS 標準希釈溶液として、サメ軟骨から精製した KS を用いた。

7. ヒアルロン酸の計測

ヒアルロン酸の測定は Nagata ら¹⁷ の方法に準じた酵素抗体標識測定法を用いて行った。ヒアルロン酸 (human umbilical cord, Sigma) 水溶液 (0.2 mg/ml) を 20 mM 炭酸・重炭酸塩緩衝液 (pH 9.2) で 0.1 mg/ml の濃度に調整し、96穴プレート (Costar) に吸着させた。ウシ鼻中隔プロテオグリカンモノマーを 0.1% BSA 添加 PBS に溶解して、0.125 mg/ml の濃度に調整した。ヒアルロン酸の標準希釈溶液および検体 0.1 ml をウシ鼻中隔プロテオグリカンモノマー溶液 0.1 ml と混和し、37°C で1時間反応させ、この反応液の 0.1 ml を先に調整したプレートに移して、4°C の条件で12時間反応させた。これを 0.05% Tween 20 添加 PBS で3回洗浄し、5万倍希釈した抗 KS モノクローナル抗体 0.1 ml と 37°C、1時間反応させた。プレートを3回洗浄後、0.05% Tween 20 添加 PBS で1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 0.1 ml を注入し、室温で1時間反応させた。プレートを5回洗浄後、KS 測定法と同様に 492 nm の波長で吸光度を測定した。

8. 活性酸素の計測

画像解析装置である Argus 50 (浜松フォトニクス) を使用した。この装置はマイクロプレートからの発光を超高感度ビデオカメラを用いて解析し、活性酸素産生量を発光強度 (Intensity) で表示する装置である。

ウシ関節軟骨細胞を 10^3 /ml の濃度で播種し、37°C で1時間、5 µg/ml の濃度の発光合成基質 (L012) 存在下で培養した。IL-1 およびヒアルロン酸を加え、活性酸素の発生を EIA モードを用いて計測した¹⁸。

9. 関節軟骨におけるヒアルロン酸および CD44 の局在

培養軟骨を 4°C の酢酸エタノールに10分間浸漬固定し、クリオスタットにて 10 µm の薄切片を作成した。切片を Tengblad の方法¹⁹ にしたがって精製したビオチン標識ヒアルロン酸結合蛋白 (2 µg/ml) と

12時間反応させ、発色はストレプトアビジンおよびペルオキシダーゼ液 (Techniclone International) にて行った。CD44 の染色も同様に FITC 標識抗 CD44 (100倍希釈) の中で12時間反応させ、蛍光顕微鏡下 (Nikon) に観察した。

10. ヒアルロン酸の進入

ウシ関節軟骨片を24時間 IL-1 (5 ng/ml) 存在下で培養した。その後、培養液を蛍光アミン標識のヒアルロン酸 (1%) を含む培養液に交換し、さらに24時間の培養を行った。軟骨片は PBS にて3回洗浄した後、クリオスタットにて 6 µm の薄切片を作成し、蛍光顕微鏡下 (Nikon) に観察した。

11. 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

1. ヒアルロン酸の GAG 遊離におよぼす影響

今回の検討では、軟骨破壊の指標として培養液中に遊離される GAG 量を測定した。今回の実験に使用した最大の濃度である 1 mg/ml のヒアルロン酸を加え、標準曲線におよぼす影響を検討したが、ヒアルロン酸は標準曲線に影響を与えなかった (図

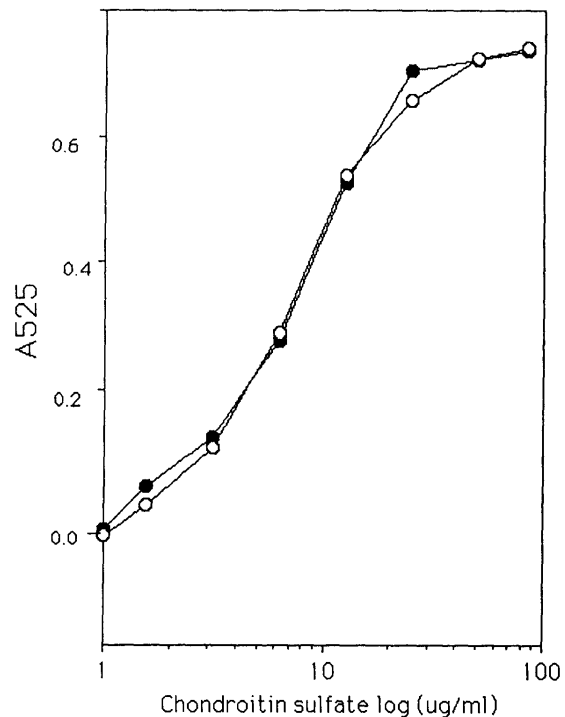


図1 ヒアルロン酸の GAG 測定におよぼす影響
培養液内の GAG 量を Farndale らの方法にしたがって測定した。標準はコンドロイチン硫酸 (○) とし、これに 1 mg/ml の濃度のヒアルロン酸を加え (●), 波長 525 nm における吸光度 (A525) を測定した。

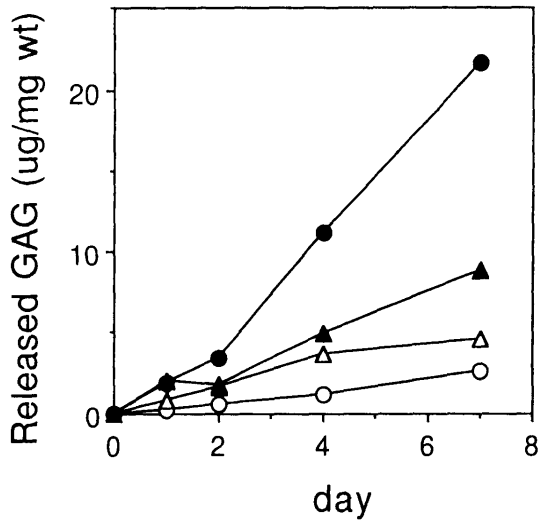


図2 軟骨培養系に与える血清の影響。
ウシの関節軟骨を24穴プレートに入れ、培養液内に放出されたGAG量を計測した。○：無血清培地，●：無血清培地，IL-1(5 ng/ml)添加，△：血清培地，▲：血清培地，IL-1(5 ng/ml)添加

1)。

2. 軟骨培養系に与える血清の影響

関節軟骨より全層の細片を切りだし、これを器官培養した。軟骨をまず7日間5%血清存在下で培養し、軟骨代謝が平衡状態に達したものを実験に使用した¹³。IL-1を添加するに先立ち、関節破壊におよぼす血清の影響を検討した。血清非存在下では、基礎的なGAG遊離量が明らかに低下していた。さらに、血清非存在下の条件では、IL-1(4 ng/ml)はGAG遊離を血清存在下の約3倍に増加させた。したがって、以下の実験は血清非存在下で行うこととした(図2)。

3. IL-1の軟骨破壊に与える影響

軟骨片を種々の濃度のIL-1存在下に48時間培養した。IL-1は濃度依存性にGAG, KS, およびヒアルロン酸の遊離を亢進させた(図3)。

4. ヒアルロン酸の軟骨破壊に与える影響

種々の濃度のIL-1およびヒアルロン酸を加え、培養液中に遊離されるGAG量を計測した。まずヒアルロン酸の正常軟骨への影響を調べる目的で、

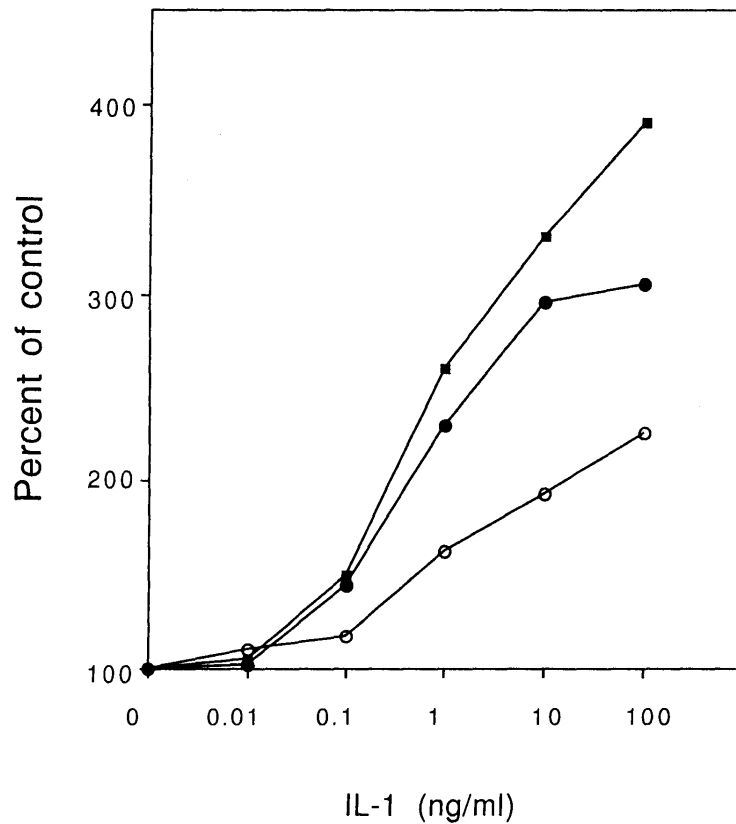


図3 IL-1の軟骨破壊に与える影響
ウシ関節軟骨を培養し、種々の濃度のIL-1を加え、培養液中に遊離されたGAG量(■), KS量(●), ヒアルロン酸量(○)を各々測定し、IL-1を添加していない状態を100%としたpercent of controlで示した。

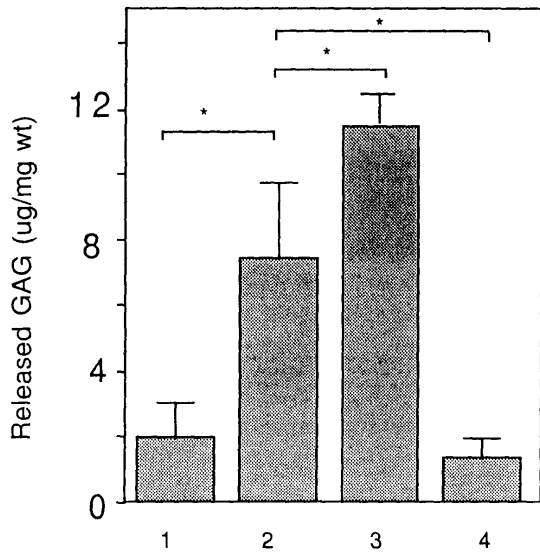


図4 ヒアルロン酸の軟骨破壊に与える影響
ウシ関節軟骨を培養し、培養液内に放出されたGAG量を計測した。
1: IL-1, ヒアルロン酸非添加 2: IL-1 (5 ng/ml), 3: IL-1 (5 ng/ml)+ヒアルロン酸 (10 μg/ml), 4: IL-1 (5 ng/ml)+ヒアルロン酸 (1 mg/ml), *: p<0.01

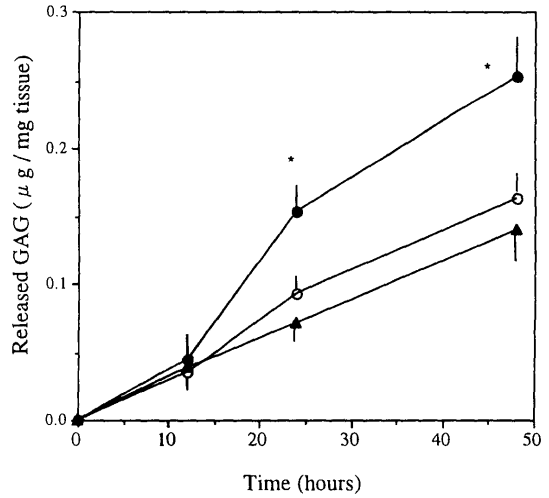


図5 SODの軟骨破壊における作用(1)
ヒト関節軟骨を培養し、培養液内に放出されたGAG量を時間経過とともに計測した。
○: IL-1, SOD 非添加, ●: IL-1 10 ng/ml, ▲: IL-1 10 ng/ml+SOD 150 μg/ml, *: p<0.05.

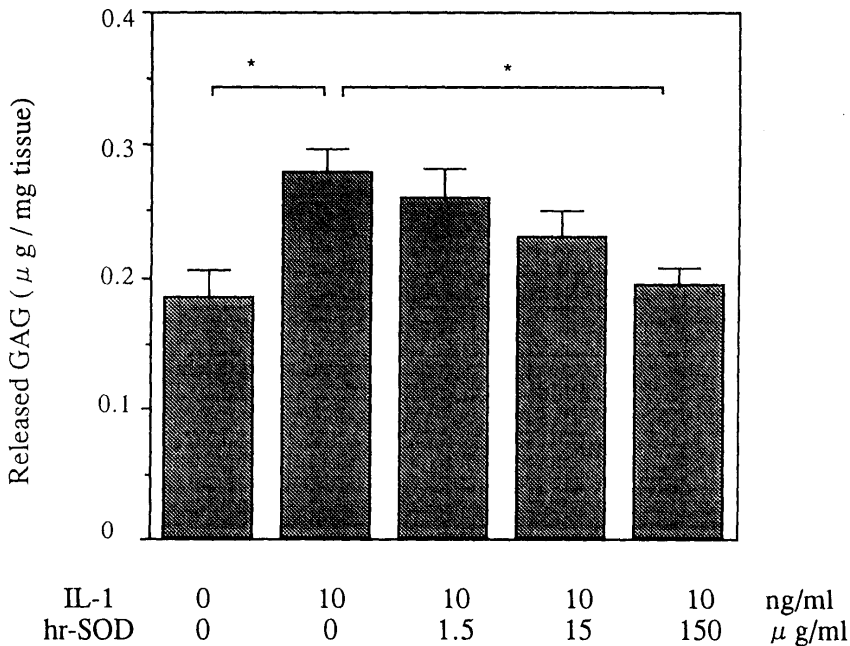


図6 SODの軟骨破壊における作用(2)
ヒト関節軟骨を48時間培養し、培養液内に放出されたGAG量を計測した。*: p<0.05.

種々の濃度 (1-1000 μg/ml) のヒアルロン酸を48時間反応させ、培養液中のGAG量を計測したが、ヒアルロン酸単独では遊離されるGAG量には有意の影響を与えなかった。低濃度のIL-1 (5 ng/ml) は明ら

かに軟骨破壊を惹起するが、これに対して低濃度のヒアルロン酸 (10 μg/ml) は明らかに培養液中に遊離されるGAG量を増加させ、逆に高濃度 (1 mg/ml) のヒアルロン酸はGAG遊離を有意に抑制した

(図4)。

5. SODの軟骨破壊における作用

この実験にはヒト関節軟骨を使用した。血清非存在下に関節軟骨片を培養すると、時間の経過とともに培養液内のGAG量は増加した。IL-1は時間依存性にGAG遊離を惹起したが、SOD (150 µg/ml)の共存下では明らかにGAG遊離が抑制された(図5)。SOD単独投与ではGAG遊離には影響を与えなかった。さらに、SODは濃度依存性にIL-1によって惹起されるGAG遊離を抑制した(図6)。

6. IL-1による活性酸素の誘導

ウシ関節軟骨細胞の培養系を対象とした。37°Cの条件でIL-1 (10 ng/ml)を1時間作用させると、活性酸素は明らかにを誘導された。ヒアルロン酸は有意にこの活性酸素の誘導を抑制した。しかし、ヒアルロン酸とともにGAGの構成物質であるコンドロイチン硫酸およびケラタン硫酸ではIL-1による活性酸素の誘導の抑制はみられなかった(図7)。

7. IL-1の軟骨基質プロテオグリカン合成に与える影響とヒアルロン酸の作用

³⁵S-sulfateのプロテオグリカンへの取り込みを指標にプロテオグリカン合成能を測定した。IL-1は

濃度依存性にプロテオグリカン合成を抑制した(図8)。またヒアルロン酸は低濃度でIL-1によるプロテオグリカン合成抑制を回復させた(図9)。

8. SODのプロテオグリカンおよびPGE2合成能に与える影響

IL-1により惹起される軟骨破壊をSODが抑制することは先に述べたが、この系におけるプロテオグリカンおよびPGE2合成能を測定した。IL-1はプロテオグリカン合成を抑制し、PGE2の産生を亢進したが、SODはこの二つの指標に何ら影響をおよぼさなかった(表1)。

9. 正常関節軟骨におけるヒアルロン酸の局在

ヒアルロン酸結合領域(HABR)を指標に、ヒアルロン酸の局在を組織学的に検討した。正常関節軟骨では、細胞質および細胞周囲基質に強い陽性顆粒が観察された。IL-1処理後にはこの陽性顆粒がほぼ消失した(図10)。

10. 外因性ヒアルロン酸の軟骨基質への進入

ウシ関節軟骨をIL-1非存在下および存在下で培養し、蛍光アミン標識のヒアルロン酸を外因性に添加した。IL-1非処理の関節軟骨では、大部分のヒアルロン酸は軟骨表面にとどまり、軟骨基質内への進

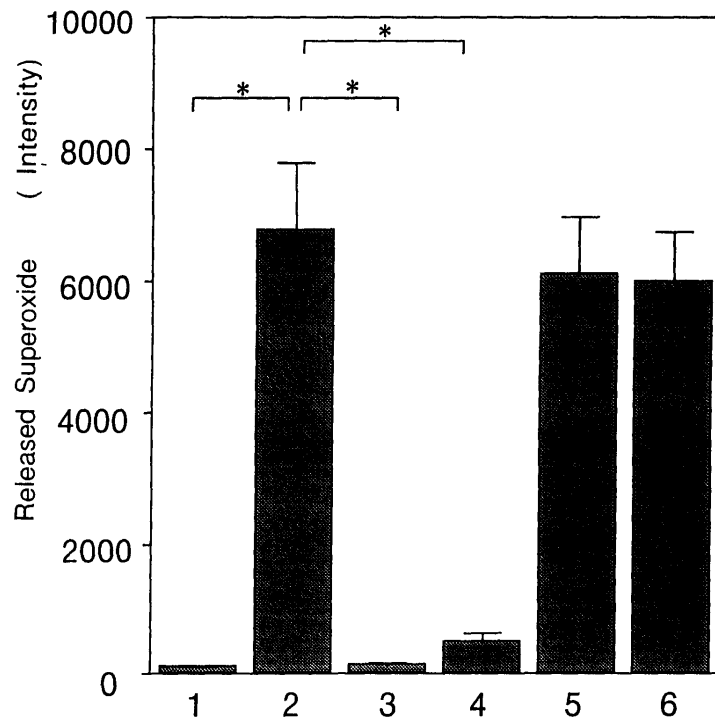


図7 IL-1による活性酸素の誘導

ウシ関節軟骨細胞を培養し、培養液内の活性酸素量を測定した。

1: 対照群, 2: IL-1 (10 ng/ml), 3: IL-1 (10 ng/ml) + SOD (150 µg/ml), 4: IL-1 (10 ng/ml) + ヒアルロン酸 (10 µg/ml), 5: IL-1 (10 ng/ml) + コンドロイチン硫酸 (10 µg/ml), 6: IL-1 (10 ng/ml) + ケラタン硫酸 (10 µg/ml), *: p < 0.01.

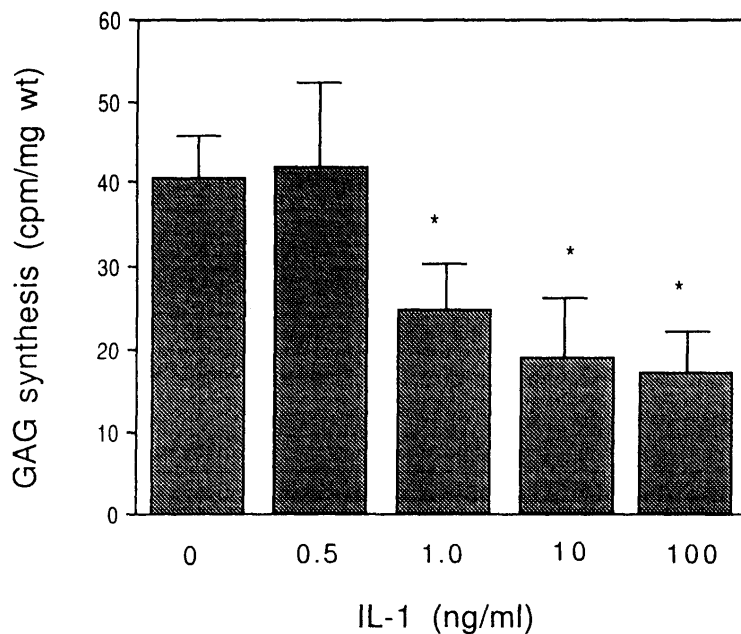


図8 IL-1の軟骨基質プロテオグリカン合成に与える影響
ウシ関節軟骨を培養し、種々の濃度のIL-1を加え、プロテオグリカン合成能を測定した。*: p<0.01.

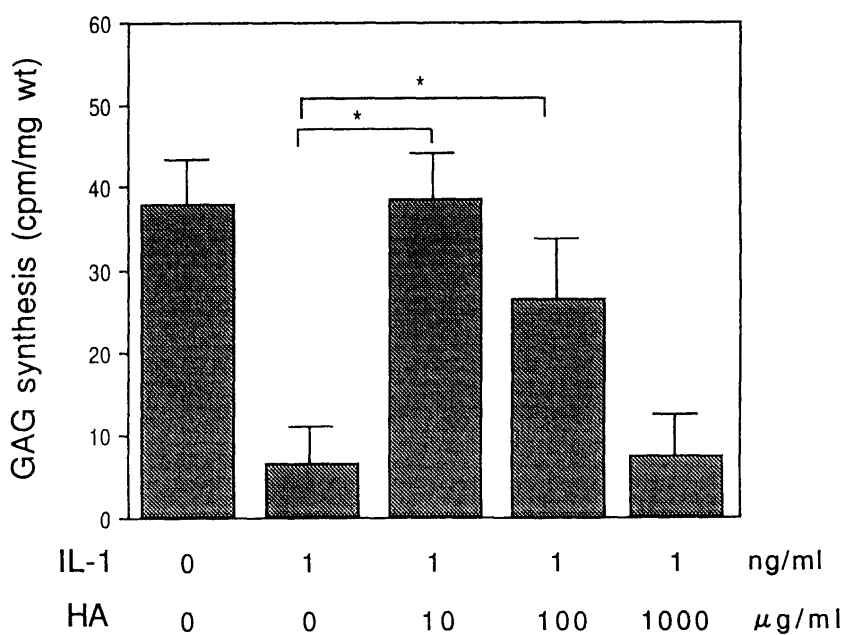


図9 ヒアルロン酸の軟骨基質プロテオグリカン合成に与える影響
ウシ関節軟骨を培養し、IL-1およびヒアルロン酸を加えプロテオグリカン合成能を測定した。*: p<0.01.

表1 SODのプロテオグリカン(PG)およびPGE2合成能におよぼす影響

	PG 合成能	PGE2 合成能
対照群	117.7±31.0	0.77±0.38
IL-1	8.0± 1.6*	3.36±0.49*
IL-1+hr-SOD	9.6± 3.9*	4.12±0.53*

*p<0.01

入は認めなかった。しかし、IL-1処理を行った関節軟骨には、ヒアルロン酸が明らかに軟骨内へ進入し、細胞外基質に集積していることが確認された(図11)。

11. 軟骨基質におけるCD44の存在

ウシ関節軟骨において、軟骨細胞表面に強い蛍光が存在することが観察された(図12)。

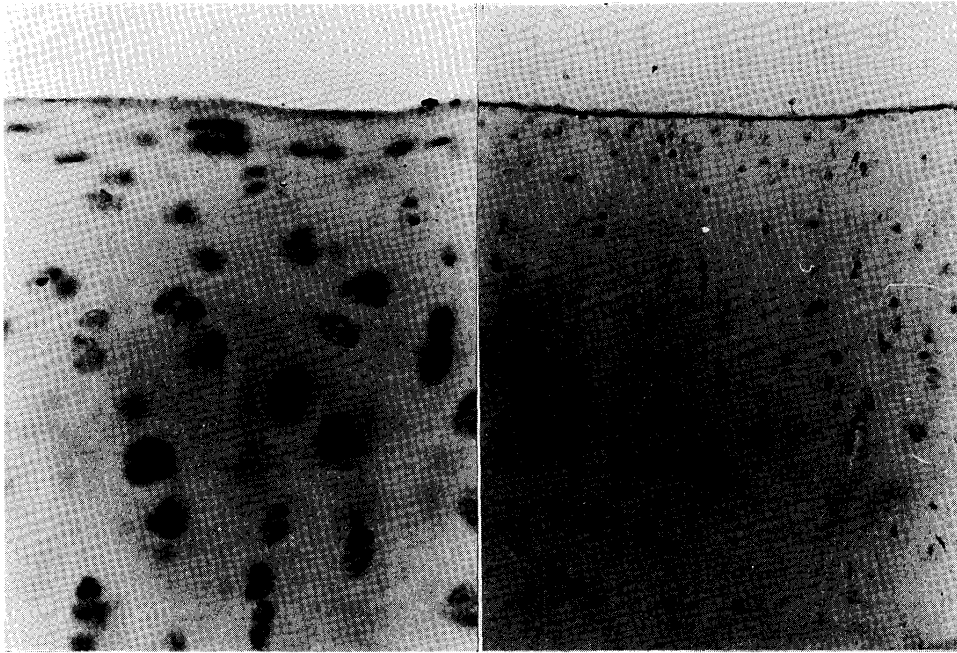


図10 正常関節軟骨におけるヒアルロン酸の局在
 ヒアルロン酸の存在は、その特異的結合蛋白であるビオチン標識ヒアルロン酸結合蛋白 (HABP) を用いて観察した。
 左：正常関節軟骨
 右：IL-1 (5 ng/ml) 処理 (×200)

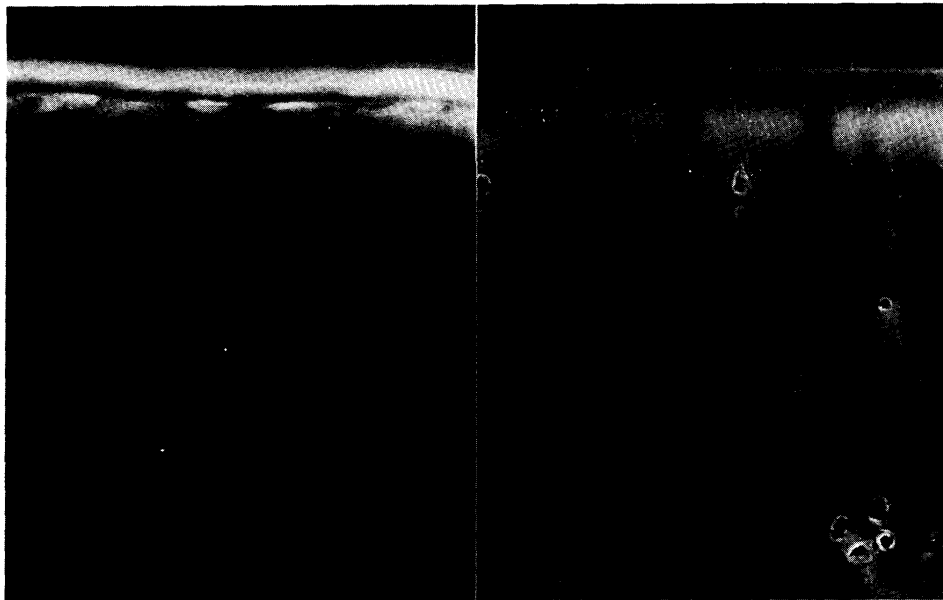


図11 外因性ヒアルロン酸の軟骨基質への進入を蛍光標識ヒアルロン酸を用いて観察した。
 左：正常関節軟骨
 右：IL-1 (5 ng/ml) 処理 (×200)

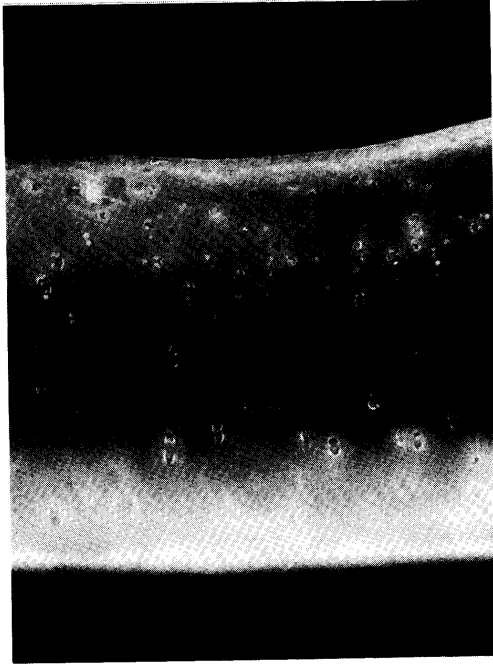


図12 軟骨基質におけるCD44の存在を蛍光標識CD44抗体を用いて観察した。(×100)

考 察

Fukudaらは主に単層培養系を用いて関節軟骨細胞代謝を検討してきた^{16,20,21}。この培養法は受容体の存在や情報伝達機構の解析などの細胞レベルでの検討には有用である。しかし軟骨破壊を考えた場合、軟骨を器官(organ)として評価する必要があり、今回軟骨片の器官培養系を導入した。この培養法により軟骨基質破壊と合成を分離して測定することが可能となった。

軟骨破壊の評価として、培養液中に遊離されるGAG量を色素法(DMB assay)で計測した。ヒアルロン酸も軟骨基質に存在するGAGである。実験を開始する前に、外因性に添加するヒアルロン酸のこの測定法の標準曲線におよぼす影響を検討した。この結果、外因性に添加するヒアルロン酸は標準曲線には全く影響を与えなかった。軟骨基質に存在するGAGはヒアルロン酸を除いて硫酸基を有しており、その大部分はコンドロイチン硫酸とKSである。本法は色素であるDMBがGAGの硫酸基と反応して異染性を呈することを利用した方法である¹⁵。したがって、軟骨基質に存在するプロテオグリカン以外の構成物、例えば、ヒアルロン酸、タイプIIコラーゲンなどとは反応せず、コンドロイチン硫酸とKS量のみが反映される。ヒアルロン酸がDMBと反応しないのはこのためと考えられた。

今回の実験系でも他の報告と同様、IL-1は軟骨破

壊を誘導した¹⁰。この作用は血清非存在下の方が血清存在下に比較して明らかに強く認められ、血清中に存在するインスリン様増殖因子などがIL-1の作用を修飾したものと考えられる²²。また、血清存在下では組織メタロプロテアーゼインヒビター(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)の誘導増加も報告されており²³、これらの作用が総合して、血清非存在下で軟骨のIL-1に対する反応性が亢進したと思われる。

まず、正常関節軟骨にヒアルロン酸を単独で作用させGAGの遊離を計測したが、ヒアルロン酸は有意の作用を認めなかった。しかし、IL-1との併用では低濃度のヒアルロン酸(10 µg/ml)は明らかにGAG量を増加させ、逆に高濃度(1 mg/ml)のヒアルロン酸はGAG遊離を抑制した。このようにヒアルロン酸は正常関節軟骨には作用しないが、変性関節軟骨に対しては、二相性の作用を有することが証明された。そこで、ヒアルロン酸の関節破壊抑制作用の機序について、検討をおこなった。

これまでの検討では、IL-1はストロメライシンなどの蛋白分解酵素の誘導を介して関節破壊を惹起することがわかっている⁹。またIL-1はTIMPの誘導を抑制し、ヒアルロン酸はこの作用を回復させるとする報告もある²⁴。このようにヒアルロン酸が蛋白分解酵素のレベルで軟骨破壊の抑制に働く可能性が考えられる。これらの検討とは別に、今回の検討では最近新たな生理活性物質として注目されている活性酸素に着目した。活性酸素は以前はマクロファージや好中球などで産生されると考えられてきた。近年、ウサギ関節軟骨細胞における活性酸素の副生成産物である過酸化水素(hydrogen peroxide)の産生が証明された²⁵。また、フリーラジカルが軟骨基質の破壊に促進的に働くという現象も観察された²⁶。そこで、IL-1によっておこる軟骨破壊に活性酸素が関与するという仮説をたてた。今回の実験において、活性酸素を中和するSODを加えると、IL-1による軟骨破壊は完全に抑制された。また細胞培養系でIL-1が活性酸素を実際に誘導することも証明された。したがって、IL-1による軟骨破壊に活性酸素は明らかに関与することが証明された。興味深い点は、ヒアルロン酸は明らかに活性酸素の誘導を抑制したことである。さらに、ヒアルロン酸とともにGAGの構成物質であるコンドロイチン硫酸とKSではその抑制作用がみられなかったことより、その活性酸素誘導抑制作用はヒアルロン酸に特異的なものであることが示唆された。この機構の解明には今後の検討を要するが、ヒアルロン酸が細胞膜の安定化を促し、その結果として細胞内情報伝達機構に何らかの影響

をおよぼした可能性が考えられる。現在、以前より教室で研究してきたプロテインキナーゼCの活性化経路²⁷⁻²⁹との関連に注目し、検討を行っている。

IL-1は軟骨基質の破壊を惹起するのみならず、軟骨基質の合成を抑制することが知られている。この機序については不明とされていたが、FukudaらはIL-1により誘導されるPGE2により、軟骨基質の合成抑制がもたらされることを最初に報告した³⁰。今回の検討でも、IL-1は軟骨のPGE2産生を増加させ、プロテオグリカン合成を抑制したが、SODはこのプロテオグリカン合成抑制およびPGE2産生促進には影響をおよぼさなかった。したがって、活性酸素はIL-1により誘導される軟骨破壊には関与するものの、基質合成の抑制には関与していないことが明らかになった。

IL-1を作用させた関節軟骨細胞において、低濃度のヒアルロン酸(10 µg/ml)は明らかにGAG遊離を増加させたことは先に述べた。この現象は、ヒアルロン酸がIL-1の存在下で関節軟骨破壊を増強するようにも解釈される。しかし、この条件でプロテオグリカン合成能を測定すると、ヒアルロン酸はプロテオグリカン合成に逆に促進作用を有することが明らかになった。そこで、この現象の説明として外因性に添加したヒアルロン酸が軟骨基質に包埋された軟骨細胞と直接接触することにより、この現象が発現されるとする仮説をたてた。この仮説を証明するために、まず正常関節軟骨におけるヒアルロン酸の局在について検討した。プロテオグリカンのコア蛋白に存在するヒアルロン酸結合領域(HABR)は、ヒアルロン酸と特異的に結合することが知られており、組織学的手法に利用されてきた³¹。今回の検討で、正常関節軟骨ではヒアルロン酸は細胞質および細胞周囲基質に存在することを組織化学的に明らかとしたがこれは生化学的手法を用いたこれまでの報告と一致する³²。今回の検討で、IL-1処理関節軟骨では培養液中のヒアルロン酸遊離量が増加したが、これはIL-1により引き起こされる軟骨破壊により内在性のヒアルロン酸が軟骨基質から遊離した結果と考えられる。そして、外因性に添加したヒアルロン酸は、IL-1により遊離された内在性のヒアルロン酸に置き換わるようにして軟骨基質に進入し、細胞周囲に達しているのが蛍光組織化学的に証明された。外因性ヒアルロン酸がこの部位でプロテオグリカン合成に関与すると考えられる。さらに最近、ヒアルロン酸がCD44を受容体として生理活性を発揮することが報告された³³。そこで実際にウシ関節軟骨においてCD44の発現を検討したところ、CD44が軟骨細胞に存在することが明らかにされた。今後

は、この受容体を介して、どのような情報伝達機構のもとに、ヒアルロン酸がプロテオグリカン合成促進に働くかを検討してゆく必要がある。

ヒアルロン酸は現在変形性関節症の治療に広く用いられており、RAに対しても治験が進行しているが、その作用機序については不明な点が多い^{12,34}。実験的検討においても、PGE2産生の抑制³⁵、軟骨破壊の抑制³⁶などの報告がある。しかし、ヒアルロン酸による変性軟骨におけるプロテオグリカン合成亢進作用の報告はなく、今回の検討によりその作用の一端がはじめて明らかにされた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました田中清介教授に深謝致します。また、直接のご指導、ご助言をいただいた福田寛二講師ならびに本研究にご協力いただいた教室の諸先生がたに心から感謝致します。

本論文の要旨は第15回日本炎症学会(平成6年7月14日、東京)、第9回日本整形外科学会基礎学術集会(平成6年10月7、8日、神戸)、第8回日本軟骨代謝研究会(平成7年3月4日、東京)、において発表した。

文 献

1. Thonar EJ, Lenz ME, Klintworth GK, Carterson B, Pachman LM, Glicknan P, Katz R, Huff J, Kuettner E (1985) Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis Rheum* 28: 1367-1376
2. Motoyoshi H, Tanaka S, Nagata Y, Yamasaki H, Kita H, Fukuda K (1989) Age-related alterations of the serum keratan sulfate levels in orthopaedic patients. *Jpn J Orthop Association* 63: 1464-1468
3. 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. 柏崎禎夫監, 橋本博史, 新名正由編. *Medical Topics Series* リウマチ '91. 大阪, メディカルレビュー社: 173-178
4. Fukuda K, Tanaka S, Motoyoshi H, Nagata Y, Yamasaki H, Matsumura F, Kita H (1990) Serum keratan sulfate in rheumatoid arthritis. *Med Sci Res* 18: 255-256
5. 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
6. 石黒直樹, 岩田 久(1995) 慢性関節リウマチの関節軟骨. *臨床リウマチ* 7: 3-7
7. McDonnell J, Hoerrner L, Lark M, Harper C, Dey T, Lobner J, Eiermann G, Kazazis D (1992) Recombinant human interleukin-1 β -induced increase in levels of proteoglycans, stromelysin, and leukocytes in rabbit synovial fluid. *Arthritis Rheum* 35: 799-805
8. Rath NC, Oronsky AL, Kerwar SS (1988) Synthesis of interleukin-1-like activity by normal rat chondrocytes in culture. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 39-46
9. Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, Bayliss MT, Iwata K, Nagase H (1992)

- Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest* 66: 680-690
10. Tyler J, Bolis S, Dingle J, Middleton J (1992) Mediator of matrix catabolism. in *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. ed K. Kuettner et al. Raven Press, Ltd. New York
 11. 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
 12. 田中清介, 宗圓 聡, 山本 真, 小松原良雄, 菅原幸子, 松原 司 (1994) 慢性関節リウマチに対する NRD101 (高分子ヒアルロン酸ナトリウム) の長期投与試験. *臨床リウマチ* 6: 122-151
 13. Handry CJ, NG CK, Curtis AJ (1990) Short-and long-term explant culture of cartilage. in *Methods in cartilage research* ed K. Kuettner et al. Academic Press, London
 14. 大谷和裕 (1993) ウサギ関節軟骨細胞のケラタン硫酸代謝における transforming growth factor-beta の役割. *近畿大医誌* 18: 241-252
 15. Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ (1982) A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 9: 247-248
 16. Fukuda K, Matsumura F, Tanaka S (1993) Histamine H2 receptor mediates keratan sulfate secretion in rabbit chondrocytes: role of cAMP. *Am J Physiol* 265: C1653-1657
 17. Nagata Y, Matsumura F, Motoyoshi H, Yamasaki H, Fukuda K, Tanaka S (1992) Secretion of hyaluronic acid from synovial fibroblasts is enhanced by histamine; a newly observed metabolic effect of histamine. *J Lab Clin Med* 120: 707-712
 18. Nishinaka Y, Aramaki Y, Yoshida H, Masuya H, Sugawara T, Ichimori Y (1993) A new sensitive chemiluminescence probe L-012, for measuring the production of superoxide anion by cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 554-559
 19. Tengblad A (1979) Affinity chromatography on immobilized hyaluronate and its application to the isolation of hyaluronate binding proteins from cartilage. *Biochim Biophys Acta* 578: 281-289
 20. 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: 413-416
 21. Fukuda K, Matsumura F, Ohtani K, Tanaka S (1993) Keratan sulfate inhibits its release in rabbit chondrocyte. *Connect Tissue Res* 30: 75-83
 22. Fosang AJ, Tyler JA, Hardingham TE (1991) Effect of interleukin-1 and insulin like growth factor-1 on the release of proteoglycan components and hyaluronan from pig articular cartilage in explant culture. *Matrix* 11: 17-24
 23. Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G (1990) Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor α of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1052: 366-378
 24. Yasui T, Akatsuka M, Tobetto K, Umemoto J, Ando T, Yamashita K, Hayakawa T (1992) Effects of hyaluronan on the production of stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in bovine articular chondrocytes. *Biomedical Res* 13: 343-348
 25. Tiku ML, Liesch JB, Robertson FM (1990) Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. *J Immunol* 145: 690-696
 26. Burkhardt H, Schwinger M, Menninger H, Macartney HW, Tschesche H (1986) Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 29: 379-386
 27. Nishioka S, Fukuda K, Tanaka S (1993) Cyclic stretch increases alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells: a role for prostaglandin E2. *Bone Mineral* 21: 141-150
 28. 斎藤政克 (1994) 培養軟骨細胞代謝に対する周期的牽引の影響. *近畿大医誌* 4: 521-535
 29. Fukuda K, Ueno M, Saitoh M, Nishioka S, Tanaka S (1995) Activation of protein kinase C and the involvement of prostaglandin E2 in the inhibition of osteosarcoma-derived cell alkaline phosphatase activity. *J Lab Clin Med* 126: 269-74
 30. Fukuda K, Ohtani K, Dan H, Tanaka S (1995) Interleukin-1 inhibits keratan sulfate production by rabbit chondrocytes: possible role of prostaglandin E2. *Inflamm Res* 44: 178-181
 31. Asari A, Miyauchi S, Miyazaki K, Hamai A, Horie K, Takahashi T, Sekiguchi T, Machida A, Kohno K, Uchiyama Y (1992) Intra- and extracellular localization of hyaluronic acid and proteoglycan constituents (chondroitin sulfate, keratan sulfate, and protein core) in articular cartilage of rabbit tibia. *J Histochem Cytochem* 40: 1693-1703
 32. Poole C., Matsuoka A, Schofield JR (1991) Chondrons from articular cartilage III. Morphological changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 34: 22-35
 33. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill C, Seed B (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61: 1303-1313
 34. Peyron JG (1993) Intraarticular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis: State-of-the-art review. *J Rheumatol* 20 (s39): 10-15
 35. Yasui T, Akatsuka K, Tobetto M, Hayashi M, Ando T (1992) The effect of hyaluronan on interleukin-1 α -induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. *Agents Actions* 37: 155-156
 36. Shimazu A, Jikko A, Iwamoto M, Koike T, Yan W, Okada Y, Sinmei M, Nakamura M, Kato Y (1993) Effect of hyaluronic acid on the release of proteoglycan

- from the cell matrix in rabbit chondrocyte cultures in the presence and absence of cytokines. *Arthritis Rheum* 36: 247-253
37. Fukuda K, Kumano F, Takayama M, Saitho M, Ohtani K, Tanaka S (1995) Zonal difference in nitric oxide synthesis by bovine chondrocytes exposed to interleukin-1. *Inflamm Res* 44: 434-437