

## 培養軟骨細胞代謝に対する周期的牽引の影響

齋藤政克

近畿大学医学部整形外科学教室

Effect of cyclic tensile stretch on the metabolism of articular cartilage chondrocytes

Masakatsu Saitoh

Department of Orthopaedic Surgery, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan

### ABSTRACT

Although it is known that in osteoarthritis, a common pathway of joint deterioration results from mechanical stress on the joint tissue, the underlying mechanism has not been clarified. To elucidate this problem, cyclic tensile stretch was loaded on rabbit and bovine articular chondrocytes. Cyclic stretch reduced keratan sulfate release and enhanced glycosaminoglycan release from the chondrocytes into the medium. Cyclic stretch also reduced proteoglycan synthesis and protein kinase C was clearly involved in this action. Further, cyclic stretch enhanced nitric oxide synthesis, leading to the inhibition of proteoglycan synthesis. These data suggest that mechanical stress on the chondrocyte modulates its metabolism via protein kinase C and nitric oxide.

**Key words :** chondrocytes, mechanical stress, osteoarthritis, protein kinase C, nitric oxide

### 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40万のコア蛋白質に、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-結合型オリゴ糖等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<sup>1</sup>。

変形性関節症 (osteoarthritis) は関節軟骨の変性に基づく非炎症性、慢性、進行性の関節疾患である。変性した関節軟骨はメカニカルストレス、内因性の破壊酵素などにより摩耗、破壊されてゆく一方で非荷重部では骨軟骨の増殖がみられ、破壊と増殖という相反するものが混在していることが特徴である<sup>2</sup>。

そこで、変形性関節症を引き起こす要因のも

とで、軟骨細胞の分化、増殖の機序を解明することが根本的な治療につながるものと思われる。以前より変形性関節症の発症原因として軟骨に対するメカニカルストレスの影響が挙げられている<sup>3-5</sup>。例えば関節に外固定を行った不動化モデルでは、変形性関節症様変化が生じることが知られている<sup>6-8</sup>。非荷重で関節運動を行った場合、関節軟骨はむしろ萎縮を示すとされ<sup>9</sup>、逆に関節軟骨に恒常的に圧迫負荷を加えた場合、変形性関節症様変化をきたしたとする報告もある<sup>7</sup>。このように変形性関節症の病因として、メカニカルストレスの重要性を示す多数の報告があるが、これらは実験動物を対象としてきたため、変形性関節症の原因となるメカニカルストレスの影響を細胞レベルで検討することができなかった。

最近になって培養細胞に牽引負荷を加える装置が開発された<sup>10</sup>。これは通常の培養器に設置できるので1週間以上の長期培養が可能であり、さらには牽引負荷がコンピューターで制御されることで周期的牽引力を加えることも可能である。今回この周期的牽引負荷が軟骨代謝にどのような影響を与えるかを細胞レベルで検討した。

さて、軟骨細胞の増殖あるいは分化は様々な外界の情報によって調節されている。この情報を細胞内に伝達し様々な細胞応答を引き起こす情報伝達機構の解明は、細胞の増殖あるいは分化の制御機構を探る上で重要であると考えられる。教室では、軟骨基質に特徴的に分布するKSを指標としてこの問題を検討してきた<sup>11-14</sup>。従来はcAMPをセカンドメッセンジャーとする系に加えて<sup>15</sup>、プロテインキナーゼC (protein kinase C, PKC) が軟骨細胞代謝、特にKS産生に重要な役割を果たすことを報告し<sup>16</sup>、さらに最近では軟骨代謝におけるKS産生の自己調節機構を見出した<sup>17</sup>。

本研究では、関節軟骨細胞に対して周期的牽引負荷を加え、その代謝の変動を検討するとともに、その情報伝達機構にPKCが関与するかどうかを検討した。さらに、最近新しい情報伝達

物質<sup>18</sup>として注目されている一酸化窒素 (nitric oxide, NO) の果たす役割について検索した。

## 材料および方法

### 1. 細胞培養

家兎の関節軟骨細胞は体重2kgの日本白色家兎の膝および肩関節軟骨より、ウシの関節軟骨細胞は生後2-3年のウシ前足部MP関節より無菌的に採取しcollagenase処理にて単離した<sup>13,14</sup>。これらの細胞を10%ウシ血清添加minimum essential medium (Gibco Laboratories, USA) を用いて、各種プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 飽和水蒸気圧の条件下で培養した。家兎軟骨細胞は継代細胞を、ウシ軟骨細胞はprimary cultureをそれぞれ実験に用いた。

### 2. 周期的牽引負荷

牽引装置は最近開発されたFlexorcell社の装置を使用した。これはコンピューター制御のコントローラー、モニター、吸引器、培養プレート設置台より構成されている<sup>19,20</sup>。本機には専用のプレート (flexible bottomed culture plate, Flexorcell Corp) があり、その底部は可撓性を有するシリコン膜よりなり、表面にタイプIIコラーゲン処理がなされていて細胞の接着を容易にしている。軟骨細胞をプレートに家兎の場合は $5 \times 10^4$ 個、ウシの場合は $1 \times 10^5$ 個/wellの細胞密度で播種した。プレートをFlexorcellに設置した後、これに吸引を加えることにより膜が湾曲し、これにともない付着した細胞に牽引力を加えることができる。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。主な実験条件として細胞に対する牽引力は1分間に10回のサイクルで最大伸張を17%とした<sup>21</sup>。牽引負荷は非血清存在下で37°C、5% CO<sub>2</sub> 飽和水蒸気圧の条件下で行った。

### 3. 薬剤

phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) はSigmaより、プロテインキナーゼインヒビターで

ある H7 は生化学工業より購入した。Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> (specific radioactivity, 17.08 GBq/mmol) は Du Pont より <sup>3</sup>H-thymidine (specific radioactivity, 37 MBq/ml) は Amersham より購入した。NO 誘導剤である S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) は同仁化学研究所、色素である 1,9-dimethyl methylene blue (DMB) は和光純薬工業より購入した。

#### 4. 組織学的検討

牽引負荷後48時間の軟骨細胞をアセトン/エタノール (v/v: 50/50) にて固定後、ヘマトキシリン染色を行った。

#### 5. KS 測定法

培養細胞の血清による影響を除去するため、血清無添加 MEM 培地あるいは各種リガンドを含む血清無添加培養液で48時間牽引を行った。培養上清を10倍希釈の PBS (phosphate-buffered saline, Gibco) で透析し、凍結乾燥後、0.1 ml の蒸留水で溶解し、KS 量を測定した。KS の測定は Thonar ら<sup>22</sup> および Motoyoshi ら<sup>23</sup> の方法に準じた酵素抗体標識測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: 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) 5 μg 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, 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 (bovine serum albumin, BSA), 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 (1/20/5/D4, 生化学工業) 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 (Costar) 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, 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1,000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、サメ肋軟骨から精製した KS (生化学工業) を用いた。細胞は PBS で3回洗浄後、トリプシン処理により採取し、ソニケーター (Handy Sonic UR-20P, トミー精工) で破碎し、Lowry 法に従って細胞の蛋白量を測定した。

#### 6. プロテオグリカン合成能

培養細胞の血清による影響を除去するため、血清無添加 MEM 培地で48時間牽引付加を加えた。細胞を3回洗浄後、各種リガンドを含む血清無添加培養液に Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> (specific radioactivity: 17.08 GBq/mmol, Du Pont) を 4 μCi/ml 添加し、4時間培養した。その後培養液を回収し、0.15 N 水酸化ナトリウムを加え、Rubber policeman (Falcon cell scraper, Becton Dickinson and Company, USA) で細胞を完全に回収した。培養液と細胞を混合し、6N 塩酸で中和した。5 mM 塩化カルシウムと 2 mg/ml の pronase E (1,000 tyrosine units/mg; 科研製薬) を含む pH 7.8, 0.05 M Tris-HCl 緩衝液を 2 ml 加え、55°C, 12時間反応させた。その後、1 mg/ml の濃度のコンドロイチン硫酸 (Sigma) 50 μl, 2 mM 硫酸マグネシウム 1 ml, 1% cetylpyridinium chloride (CPC) 1 ml を加え、37°C, 1時間反応させ、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 (Du Pont) 10 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<sup>13,14</sup>。

#### 7. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 合成能

軟骨細胞が合成する PGE<sub>2</sub> を培養上清を検体として測定した。培養上清 100 μl を採取し、

Prostaglandin E<sub>2</sub> <sup>125</sup>I kit (Du pont) を用いて PGE<sub>2</sub> 量を測定した。

#### 8. DNA 合成能

細胞を PBS で 3 回洗浄し, <sup>3</sup>H-thymidine を 2 μCi/ml となるよう培養液に加えた。37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 飽和水蒸気圧の条件下で 1 時間培養後, 細胞層をさらに 3 回 PBS で洗浄した。細胞に 5 % トリクロロ酢酸 (半井) とエタノール/エチルアルコール (3:1) を加え, rubber policeman で細胞を完全に回収した。遠沈により不溶画分を抽出し, 0.3 N NaOH で溶解させ, 6 N 塩酸で中和した。Econofluor (Du Pont) を 10 ml を加え, 液体シンチレーションカウンターを用いて測定した<sup>21</sup>。

#### 9. GAG 測定法

GAG (glycosaminoglycan) の定量は Farndale らの方法にしたがった<sup>24</sup>。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ケラタン硫酸である。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。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ケラタン硫酸のみが反映される。反応液は DMB 16 mg を 5 ml のエタノールで溶解し, sodium formate 2 g と formic acid 2 ml を加え, さらに蒸留水で全量が 1,000 ml になるよう加え作製した。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 (生化学工業) を使用した。検体の培養上清液 100 ul に DMB 反応液 100 ul を加え, 525 nm の波長で吸光度を測定した。

#### 10. protein kinase C (PKC) の検討

PKC を down regulation させる目的で PKC を活性化する phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) を添加し前処理を行った。またプロテインキナーゼインヒビターである H7 を添加し, それぞれ周期的牽引負荷を加え, 軟骨細胞代謝に対する影響を検討した。また PDBu の

異性体で, PKC を活性化しないフォルボールエステルである 4α-PDD についても検討した。

#### 11. 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。備品のガラス瓶に検体の培養液 100 μl 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 chemiluminescence 法に準じ, NO ガスの直接測定が可能である<sup>25</sup>。NO 量は波形の積分値 (digit) として計算した。

#### 12. 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

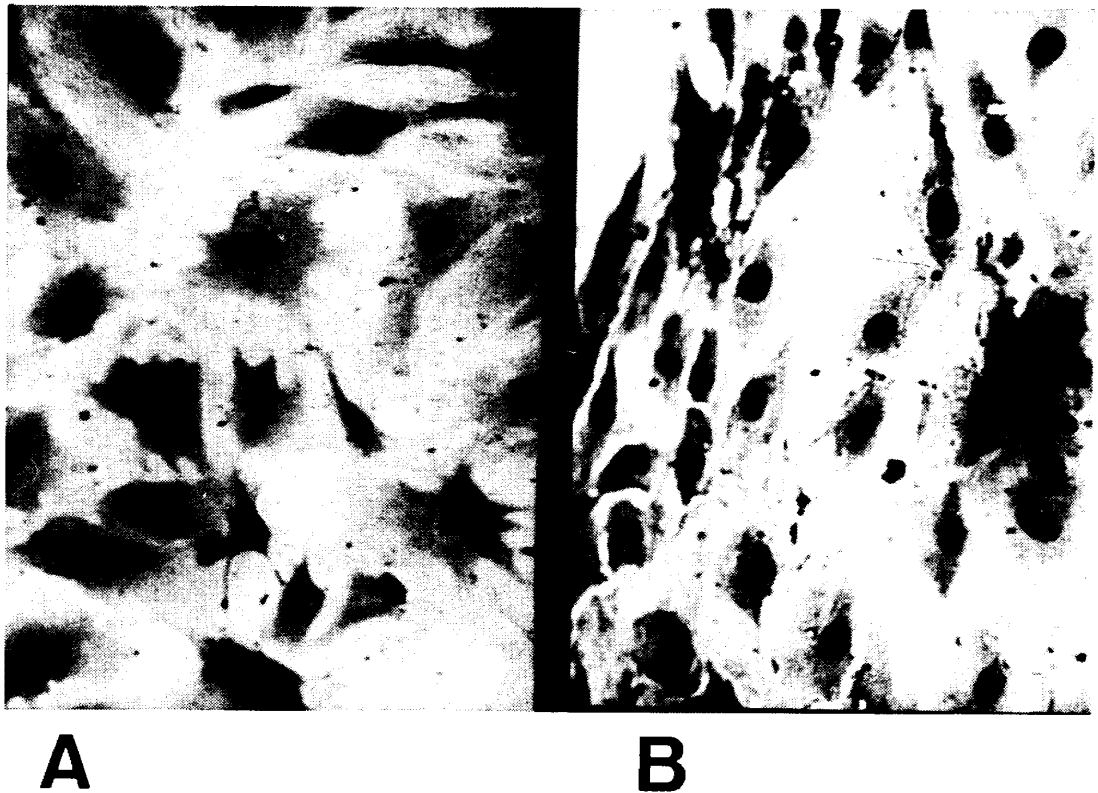
### 1. 家兔関節軟骨を用いた検討

#### 1.1. 組織学的検討

牽引開始 48 時間後の軟骨細胞の形態を組織学的に検討した。非負荷の対照では細胞は多形性を示し, 均一な配列様式を示さない。牽引負荷により軟骨細胞はその負荷の方向に直交する方向に配列し, その形態は線維芽細胞様を呈した (Fig. 1)。

#### 1.2. KS 遊離

培地内に放出される KS 量を ELISA 法を用いて測定した。10 Hz で細胞に 5 % の延長の得られる条件を設定し, 牽引負荷 24 時間を加えた。軟骨細胞の KS 遊離は対照に比較して明らかに低下した (Table 1)。牽引負荷の条件を変えて培地内の KS 量を測定したが, いずれの条件でも KS 量は低下していた。つぎに, KS 遊離の抑制を引き起こすために必要な刺激の条件を検討した。細胞に 10 Hz で 17 % の延長が得られる条件を設定し, 1, 12, 24 時間の牽引負荷を加えた。この結果, 必要な刺激の時間は 1



**Fig. 1** Effect of cyclic tensile stretch on the morphology of rabbit articular chondrocytes. Chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $5 \times 10^4$ /ml. Cyclic tensile stretch, 10 Hz, 17% of stretch, was loaded. After 48 h, the cells were fixed and stained with hematoxylin. A: control, B: stress (hematoxylin  $\times 400$ )

**Table 1** Effect of cyclic stretch on keratan sulfate release from rabbit chondrocytes

Frequency (Hz)	Stretch (%)	KS (ng/mg protein)	
		Control	Stretch
10	5	$0.72 \pm 0.16$	$0.52 \pm 0.13^*$
10	17	$0.71 \pm 0.14$	$0.53 \pm 0.12^*$
20	5	$0.69 \pm 0.17$	$0.44 \pm 0.18^*$

Rabbit chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $5 \times 10^4$ /ml. Cyclic tensile stretch was loaded under different conditions (frequency and percent of stretch). Keratan sulfate release in the medium was measured using ELISA. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 6 wells. \* $p < 0.05$

時間で充分であることがわかった (Fig. 2).

### 1.3. プロテオグリカン合成能

周期的牽引負荷を24時間、家兎関節軟骨に加え、その後  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  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。牽引負荷によりプロテオグリカン合成能は明らかに低下

した (対照:  $1.92 \pm 0.35$ , 牽引負荷:  $1.42 \pm 0.32 \times 10^3$  cpm,  $n=6$ , \* $p < 0.05$ ).

## 2. ウシ関節軟骨を用いた検討

### 2.1. 組織学的検討

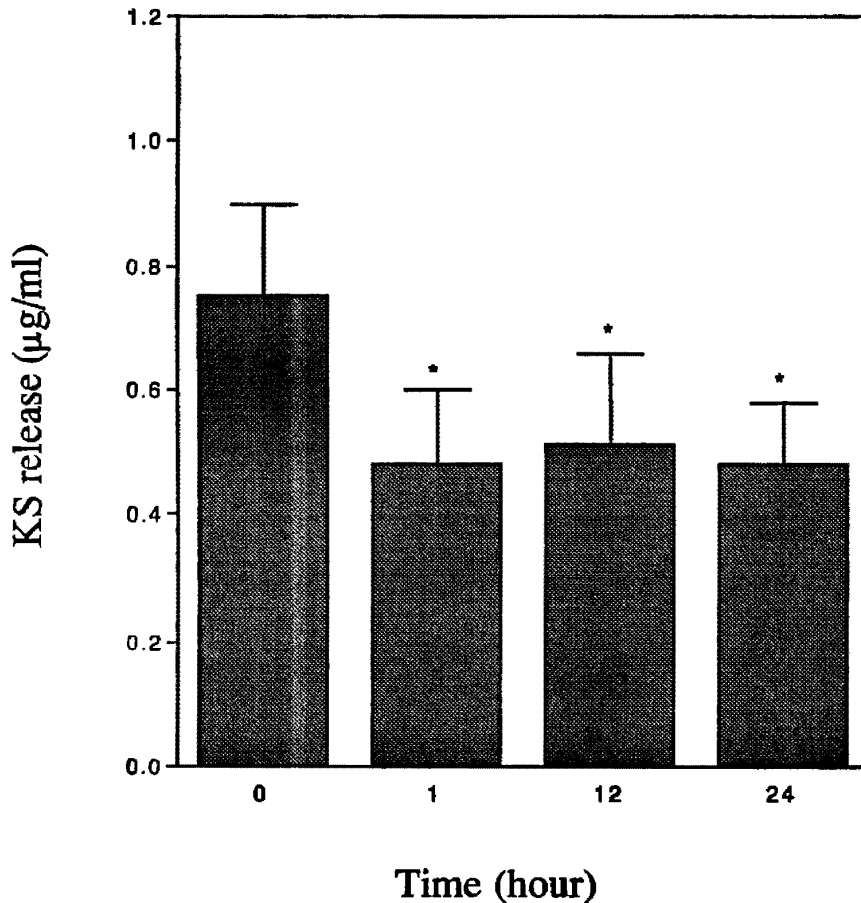
非負荷の対照では細胞は多形性を示し、均一な配列様式を示さない。ウシ関節軟骨細胞では、48時間の周期的牽引負荷により細胞の配列に変化は認められなかった (Fig. 3).

### 2.2. KS 遊離

培地内に放出される KS 量を ELISA 法を用いて測定した。放出される KS 量はウシの個体により異なるため、同様な実験を3回繰り返した。何れの実験においても牽引負荷により軟骨細胞の KS 遊離は対照に比較して有意に抑制された (Table 2).

### 2.3. プロテオグリカン合成能

周期的牽引負荷によって、ウシ関節軟骨細胞においても、プロテオグリカン合成能は低下することが明らかになった (Table 3).



**Fig. 2** Effect of cyclic tensile stretch on keratan sulfate release from rabbit articular chondrocytes.

Chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $5 \times 10^4$ /ml. Cyclic tensile stretch, 10 Hz, 17% of stretch, was loaded for 1, 12 and 24 h, respectively. After 24 h, the medium was collected and the level of keratan sulfate was measured with ELISA. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 6 wells. \* $p < 0.01$

### 2.3.1. 周期的牽引負荷における PKC の関与

#### 2.3.1.1. フォルボールエステルによる前処理

軟骨細胞の PKC を down regulation させる目的で、フォルボールエステル (PDBu,  $10 \mu\text{M}$ ) 存在下で軟骨細胞を12時間培養した後、軟骨細胞に48時間の周期的牽引負荷を加えた。フォルボールエステルの前処理により、周期的牽引負荷によるプロテオグリカン合成能の抑制はみられなかった (Fig. 4)。PDBu の異性体で、PKC を活性化しないフォルボールエステルである  $4\alpha$ -PDD にはこの作用がなかった。

#### 2.3.1.2. PKC 阻害剤の影響

PKC の阻害剤である H7 ( $10 \mu\text{M}$ ) の存在

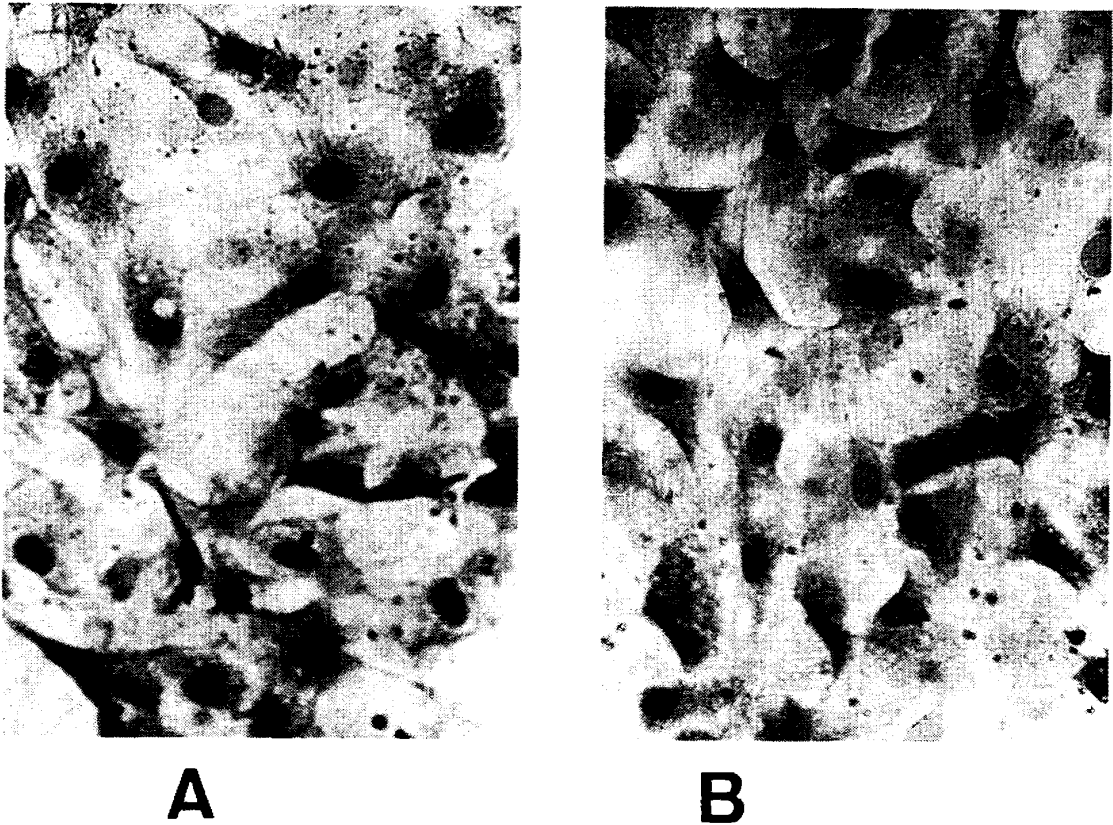
下で、軟骨細胞に48時間の周期的牽引負荷を加えた。周期的牽引負荷によるプロテオグリカン合成能の抑制は H7 存在下では観察されなかった (Fig. 5)。

### 2.4. PGE2 合成能

ウシ関節軟骨細胞に24時間の周期的牽引負荷を加えて培養液内の PGE2 量を RIA で測定した。牽引負荷は PGE2 合成を有意に増加させた (対照:  $27.1 \pm 13.2$ , 牽引負荷:  $45.2 \pm 10.6 \text{ pg/ml}$ ,  $n=6$ , \* $p < 0.05$ )。

### 2.5. DNA 合成能

集密状態および増殖期にあるウシ関節軟骨細胞を対象に、周期的牽引負荷を加えて DNA 合成を測定した。集密状態にある軟骨細胞に対しては、牽引負荷は影響を及ぼさなかったが、増



**Fig. 3** Effect of cyclic tensile stretch on the morphology of bovine articular chondrocytes. Chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $10^5$ /ml. Cyclic tensile stretch was loaded. After 48 h, the cells were fixed and stained with hematoxylin. A: control, B: stress (hematoxylin $\times$ 400)

**Table 2** Effect of cyclic tensile stretch on keratan sulfate release from bovine chondrocytes

	KS release(ng/ml)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Control	37.3 $\pm$ 11.6	58.9 $\pm$ 13.3	108.6 $\pm$ 12.9
Stress	11.0 $\pm$ 6.2*	37.9 $\pm$ 5.4*	77.5 $\pm$ 13.2*

Bovine chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $10^5$ /ml. Cyclic tensile stretch, 10Hz, 17% of stretch, was loaded (Stress). Keratan sulfate released into the medium was measured using ELISA. Three representative results using different cell preparations are shown. Data are expressed as the mean $\pm$ SD of 6 wells. \* $p$ <0.01

殖期にある軟骨細胞の DNA 合成を明らかに増加させた (Fig. 6).

### 2.6. GAG 遊離

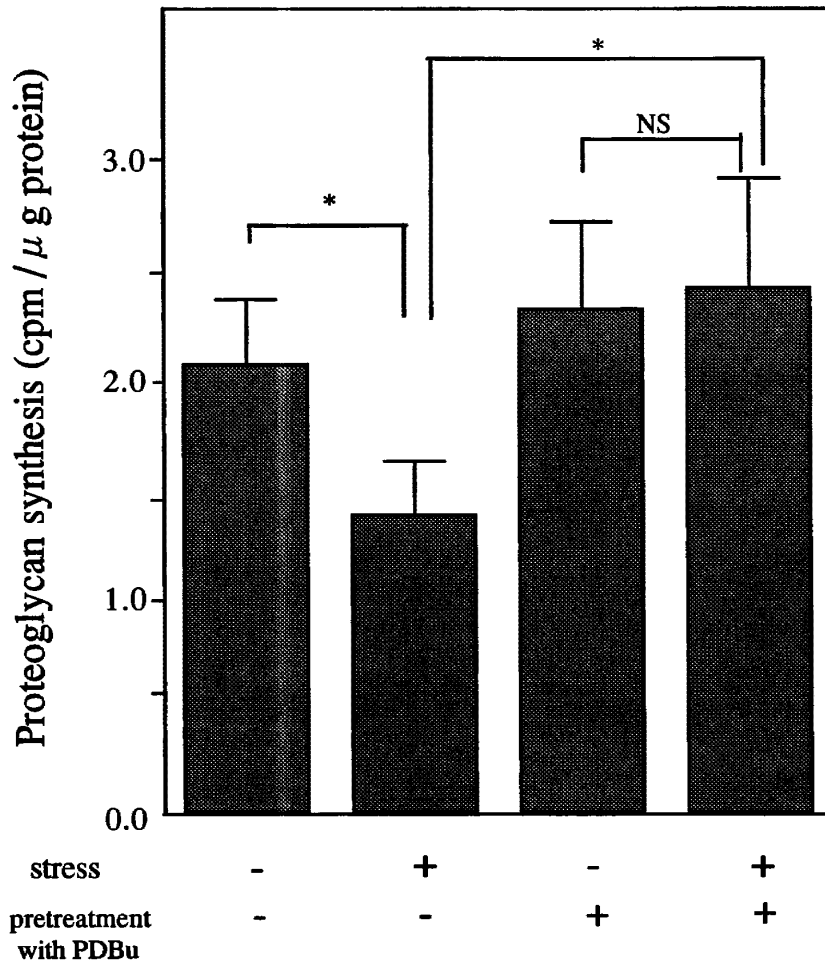
軟骨細胞に周期的牽引負荷を48時間加え、培地内に放出される GAG 量を計測した。牽引負

**Table 3** Effect of cyclic stretch on proteoglycan synthesis in bovine chondrocytes

	Proteoglycan synthesis (cpm/well)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Control	664 $\pm$ 132	426 $\pm$ 40	3238 $\pm$ 277
Stress	344 $\pm$ 91*	266 $\pm$ 42*	2416 $\pm$ 129*

Bovine chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $10^5$ /ml. Cyclic tensile stretch, 10Hz, 17% of stretch, was loaded (Stress). Proteoglycan synthesis was measured using radiolabeled tracer. Three representative results using different cell preparations are shown. Data are expressed as the mean $\pm$ SD of 6 wells. \* $p$ <0.01

荷により軟骨細胞の GAG 遊離は対照に比較して有意に増加した (Table 4)。また、その時間経過を検討すると、周期的牽引負荷開始後24時間より GAG 遊離は有意に亢進した (Fig. 7)。さらに実験開始1時間のみ牽引負荷を加えた細



**Fig. 4** Effect of pretreatment with phorbol ester on stress mediated inhibition of proteoglycan synthesis.

After chondrocytes reached confluence, cells were pretreated with phorbol ester ( $10\mu\text{M}$ , PDBu) and cell layers were washed three times with ice cold PBS. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 6 wells. \* $p < 0.01$

胞でも、有意に GAG 遊離がみられた。

## 2.7. 周期的牽引負荷に対する NO の関与

### 2.7.1. 周期的牽引負荷による NO の誘導

軟骨細胞に周期的牽引負荷を加えて培地内に産生される NO 量を経時的に測定した。NO は牽引開始 5 分より検出可能となり、40 分で平衡状態に達した (Fig. 8)。対照の軟骨細胞も NO を産生するが、牽引負荷は 15 分より有意に NO 産生を増加させた。

### 2.7.2. NO によるプロテオグリカン産生の変化

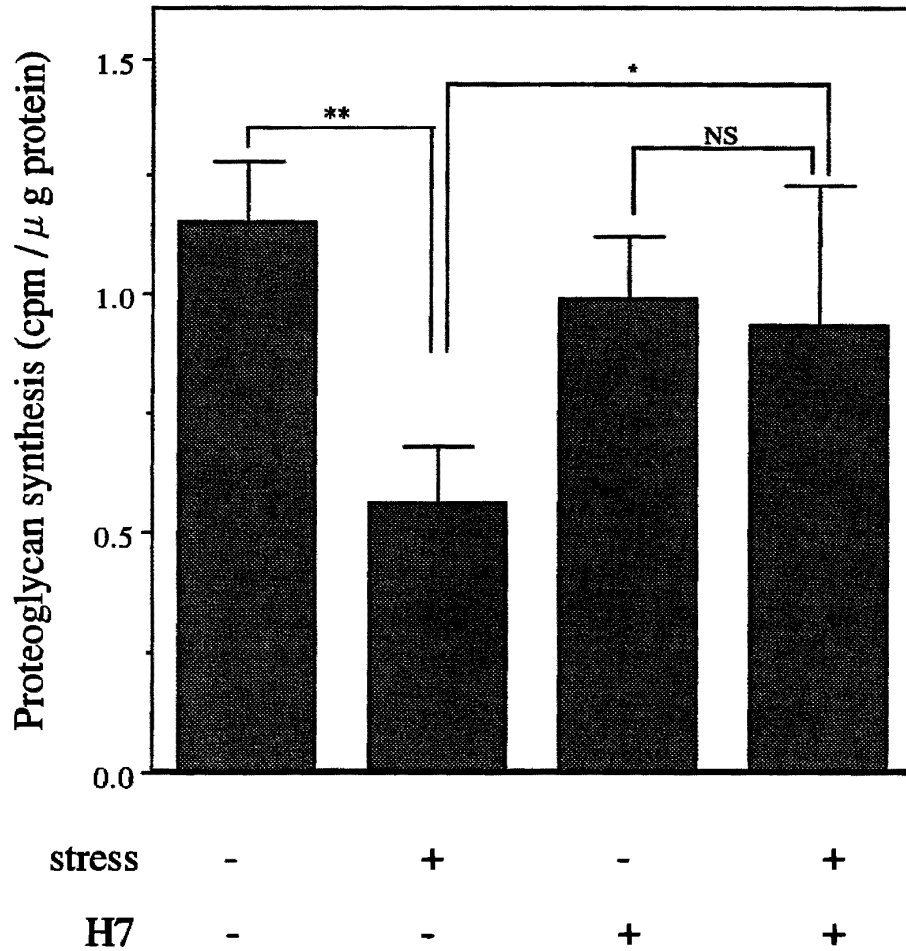
NO 誘導剤である S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) を添加し 1 時間反応させた後、プロテオグリカン合成能を検討した。

SNAP 添加によりプロテオグリカン合成能は有意に抑制された (Fig. 9)。

## 考 察

変形性関節症の原因として、メカニカルストレスの重要性を示唆する多数の報告がある。これらはどれも動物実験で得られた結果であり、メカニカルストレスの制御機構の検討には至っていない。これまでに細胞レベルで、メカニカルストレスの影響を検討した報告がある<sup>26</sup>が、これは静水圧 (hydrostatic pressure) を軟骨細胞に加える実験系であって、今回著者が行った牽引負荷という、より生体に近い状態を再現したものではない。





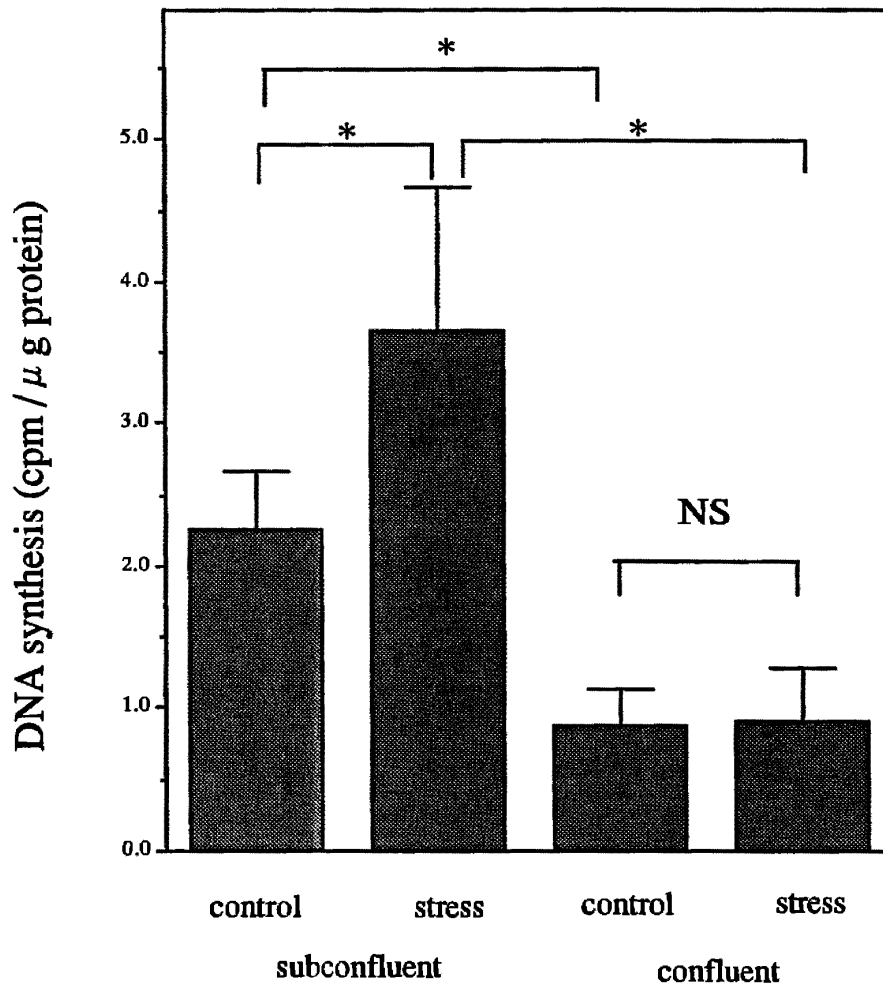
**Fig. 5** Effect of protein kinase C inhibitor (H7) on stress-mediated inhibition of proteoglycan synthesis.

Bovine chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $10^5$ /ml. Cyclic tensile stretch (stress) was loaded for 24 h in the absence or presence of  $10 \mu$  M of H7. Proteoglycan synthesis was measured with a radiolabeled tracer. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 6 wells. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

本研究では、著者は最近開発された Flexor-cell strain unit を使用し、軟骨細胞に周期的牽引力を加え、種々の細胞応答を検討した。この装置は血管内皮細胞に最初に応用され<sup>19</sup>、また Buckley らは骨芽細胞に牽引負荷を加え同様の細胞の形態変化を報告している<sup>27</sup>。我々の教室でも、同様に骨芽細胞に周期的牽引負荷を加えると、その細胞形態が線維芽細胞様に変化することを見出し報告した<sup>21</sup>。本研究では、家兎関節軟骨細胞では同様にその形態が線維芽細胞様に変化した。ウシ関節軟骨細胞では細胞形態には明らかな変化は認められなかった。したがって、周期的牽引負荷による細胞形態の

変化は種によって異なると考えられる。

また、周期的牽引負荷は軟骨細胞の DNA 合成能を増加させた。軟骨細胞の増殖の異常は初期変形性関節症における特徴的な所見であり、この意味で今回のメカニカルストレスは変形性関節症発生の検討には適切なモデルと考えられる。血管内皮細胞や骨芽細胞では、周期的牽引負荷により DNA 合成の増加が報告されている<sup>19</sup>。逆に血管平滑筋細胞では牽引負荷により DNA 合成の抑制が起こることより<sup>20</sup>、細胞形態の場合と同様に、メカニカルストレスによる DNA 合成能の変化は細胞によって異なるといえよう。



**Fig. 6** Effect of cyclic tensile stretch on DNA synthesis in bovine articular chondrocytes.

Chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $10^5$ /ml. Cyclic tensile stretch, 10 Hz, 17% of stretch, was loaded on subconfluent and confluent cells for 48 h, respectively. DNA synthesis was measured with  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 6 wells. \* $p < 0.05$

**Table 4** Effect of stretch on GAG release from bovine chondrocytes

	GAG release ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
	Exp. 1	Exp. 2
Control	$5.4 \pm 1.7$	$10.5 \pm 0.3$
Stress	$8.9 \pm 1.3^*$	$17.9 \pm 0.4^*$

Bovine chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $10^5$ /ml. Cyclic tensile stretch, 10Hz, 17% of stretch, was loaded for 48h (Stress). GAG release in the medium was measured using DMB assay. Two representative results using different cell preparations are shown (Exp. 1 and 2). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 6 wells. \* $P < 0.01$

さて、軟骨細胞の固有機能として GAG の産生があげられる。周期的牽引負荷はこれらの固有機能にも変化をきたした。すなわち、周期的牽引負荷は GAG 遊離を促進させ、逆に KS 遊離を抑制した。したがって軟骨細胞に対するメカニカルストレスは GAG の質的变化を引き起こすと考えられる。特に KS の変動については、関節軟骨代謝の良好な指標となることが知られており<sup>22,28</sup>、分子サイズの検討などが今後の課題と思われる。

次に、周期的牽引負荷が軟骨細胞のもう一つの重要な機能であるプロテオグリカン合成に及ぼす影響について検討した。家兎およびウシ関節軟骨いずれの種でもメカニカルストレスはプ

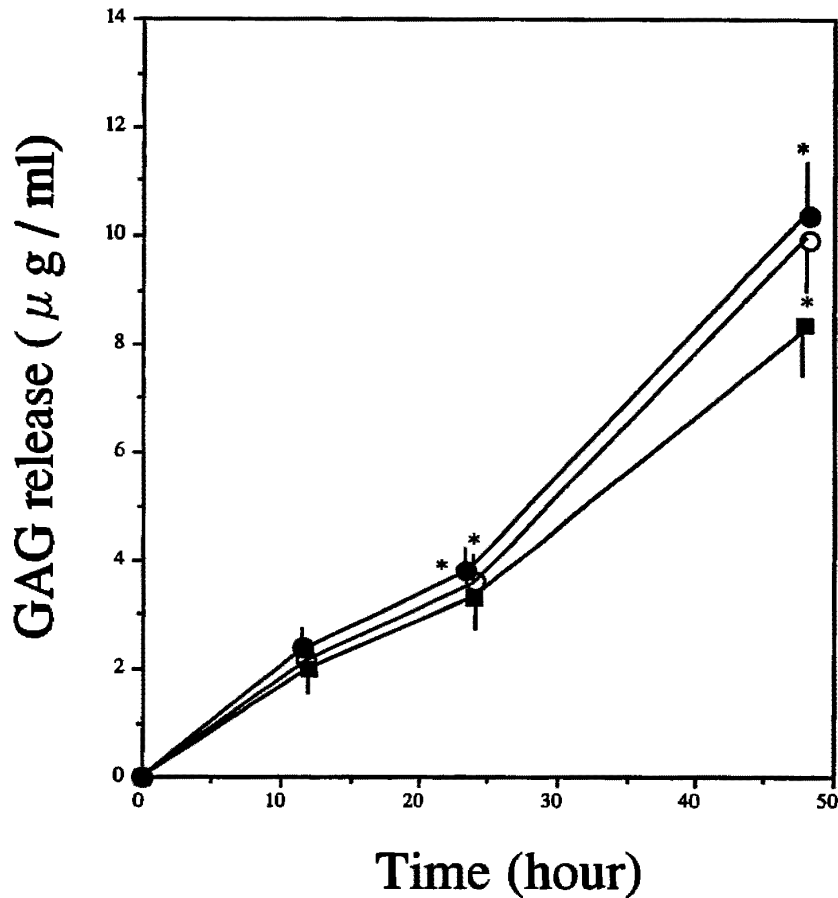


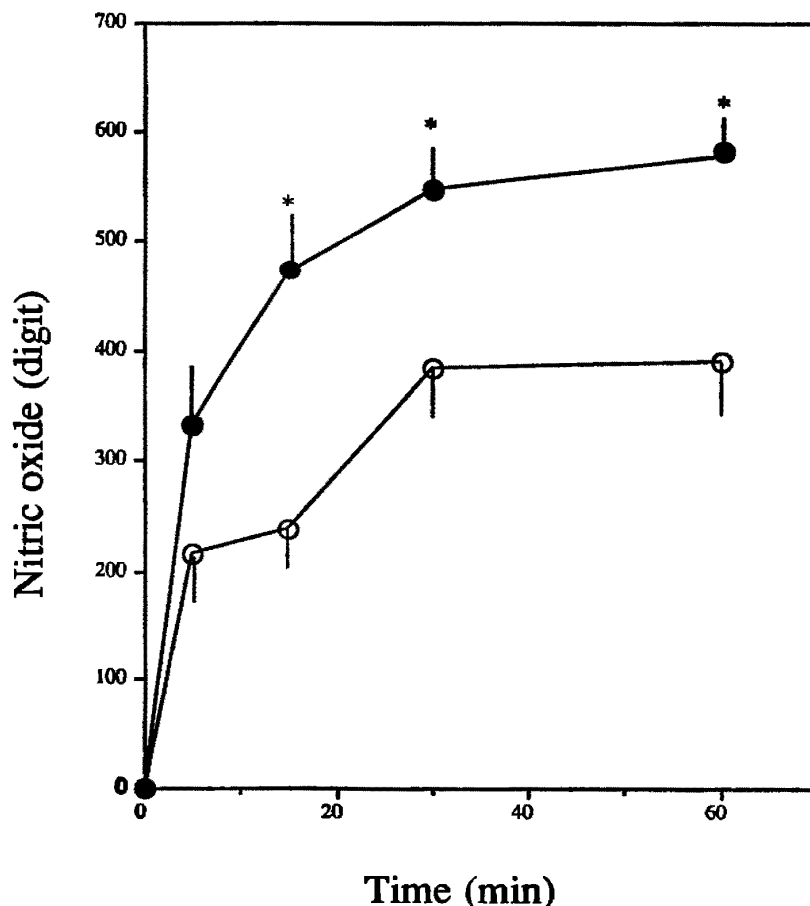
Fig. 7 Kinetics of GAG release with cyclic tensile stretch.

Cyclic tensile stretch was loaded on bovine chondrocytes and medium was collected at each point. GAG release was measured with DMB assay. ■: control, ○: cyclic stretch for 1 h, ●: cyclic stretch for 48 h. Data are expressed as the mean ± SD of 6 wells. \*p<0.01

ロテオグリカンの合成を抑制した。そこで、この機序について検討することとした。教室の Nishioka は骨芽細胞の場合、周期的牽引力により PGE2 産生が抑制され、これが逆に骨芽細胞の固有の機能であるアルカリフォスファターゼ活性を亢進させることを証明した<sup>21</sup>。今回の軟骨細胞では、これとは逆に培地内に放出される PGE2 量はむしろ増加した。教室の段は軟骨細胞におけるプロテオグリカン合成の抑制が PGE2 を介して起こることを証明した<sup>14</sup>。しかし、軟骨細胞におけるプロテオグリカン合成の抑制に必要な PGE2 濃度は 100 nM であり、牽引負荷によって生じる PGE2 産生が約 0.2 nM (45.2 ± 10.6 pg/ml) であることより、この可能性は否定的である。しかし PGE2 の産生増加は PKC の活性化で起こる<sup>29,30</sup> ので、本

研究では周期的牽引負荷におけるプロテオグリカン合成の抑制に対する PKC の関与を検討することにした。

PKC は1977年西塚により発見された<sup>31</sup>。ジアシルグリセロールにより本酵素が活性化されることが報告されて以来、この酵素は受容体刺激に共役したイノシトールリン脂質の代謝回転の鍵となることが知られている。教室の Fukuda はすでに家兎関節軟骨に PKC が存在することを証明し、軟骨代謝に重要な役割を果たすことを示唆している<sup>16</sup>。本研究では細胞内の PKC を直接活性化することが知られている PDBu で前処理してから牽引負荷を加えると、プロテオグリカン合成の抑制は起こらなかった。さらに、PKC の阻害剤を共存させた条件では、牽引負荷によって起こるプロテオグリカン合成の



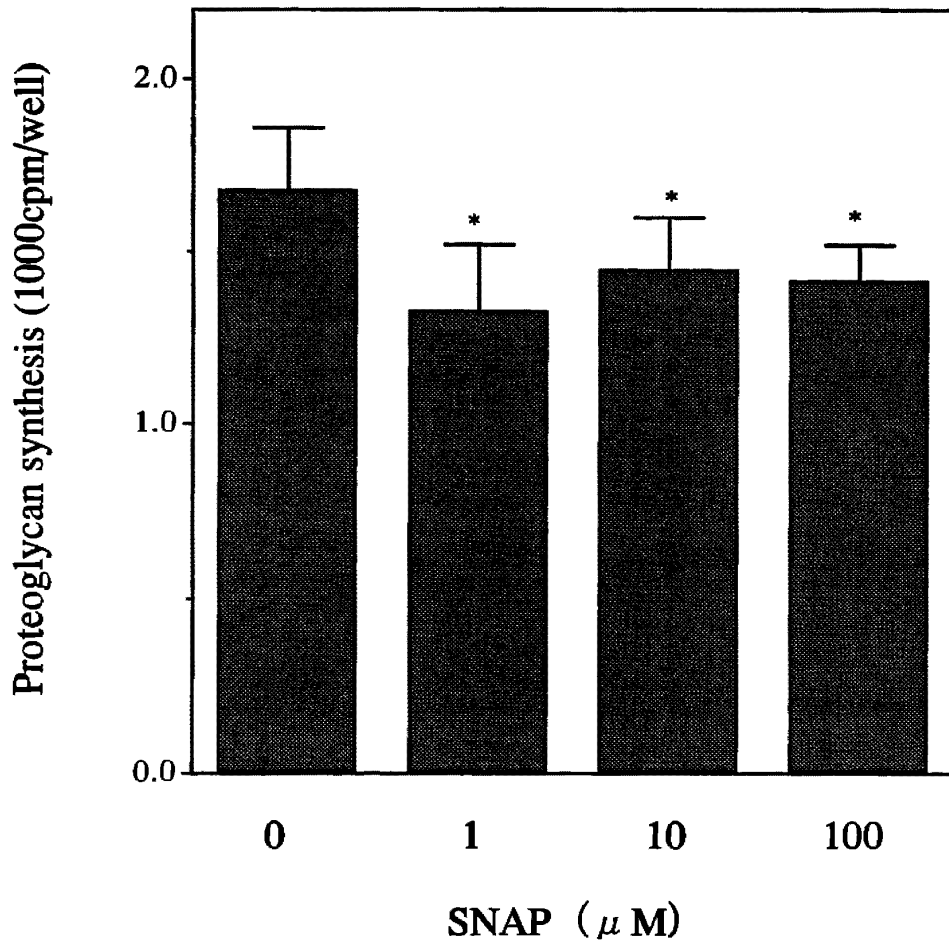
**Fig. 8** Effect of cyclic tensile stretch on nitric oxide synthesis of bovine articular chondrocytes. Chondrocytes were seeded in a flexorcell culture dish at a density of  $10^5$ /ml. Cyclic tensile stretch was loaded. Levels of nitric oxide in the medium were measured by chemiluminescence. ○: control, ●: cyclic stretch. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 3 wells. \* $p < 0.05$

抑制が回復された。これらの結果は明らかに牽引負荷によって起こるプロテオグリカン合成抑制に PKC が関与していることを示唆するものである。

そこで、本研究ではこの問題をさらに詳細に検討することにした。NO (nitric oxide) は低分子であり、半減期が短いことより、生体内で重要な役割を果たさないと想像されてきた<sup>32</sup>。しかし、最近血管内皮由来弛緩因子と考えられていた物質が NO そのものであることが明らかにされ<sup>33</sup>、種々の臓器においてその重要性が注目されるようになった<sup>32</sup>。変形性関節症における NO の役割については、変形性関節症患者の関節液中に正常者血清に比較して多量の NO が検出された<sup>34</sup> 以外には、これまでに報告はない。本研究では関節軟骨細胞においてメカ

ニカルストレスによって NO が誘導されることを初めて報告した。今回のメカニカルストレスにより誘導された NO 量は、亜硝酸ナトリウムを標準希釈液として用いた場合  $0.96 \mu\text{M}$  であった。一方、変形性関節症患者の関節液中での NO 量は  $0.354 \mu\text{M}$ <sup>34</sup> と報告されており、*in vitro* においても変形性関節症患者の関節液中に相当する量が誘導されていることがわかった。したがって、このモデルでは生体内で起こる NO を介した反応を *in vitro* でも反映できるものと考えられる。

NO は細胞内の NO 合成酵素 (NO synthase: NOS) により、L-arginine より合成される。NOS はその kinetics より構成性 (constitutive, cNOS) および誘導性 (inducible, iNOS) に大別される。cNOS は NO の誘導が



**Fig. 9** Effect of SNAP (No generator) on proteoglycan synthesis.

Bovine articular chondrocytes were seeded in a 96-well culture plate at a density of  $10^4$  cells/ml. Different concentrations of SNAP were added and cells were cultured for 1h. Proteoglycan synthesis was measured with a radiolabeled tracer. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of 12 wells. \* $p < 0.01$

極めて短時間で起こり、一過性でかつ少量の NO の産生であり、また細胞内カルシウム濃度を増加させる薬剤により誘導されることが報告されている<sup>35</sup>。cNOS は生体内に広く存在することが知られている<sup>25</sup>が、関節軟骨細胞における存在は報告されていない。他方 iNOS については、細胞内カルシウムイオンには依存せず、数時間の lag period を経て大量の NO を産生することが報告されている<sup>32</sup>。また関節軟骨細胞は interleukin-1 や tumor necrosing factor に反応して、NO を産生することが知られている<sup>36,37</sup>。この際の NOS は NO 産生の時間経過や細胞内カルシウムイオンへの依存性より考えて明らかに iNOS であると思われる<sup>35</sup>。最近、ヒトの iNOS の塩基配列が決定さ

れた<sup>38</sup>。本研究においてメカニカルストレスによって誘導される NO は10分以内に誘導されたことより、cNOS によって制御されている可能性が高い。NO の関節軟骨における作用としては、現在までに軟骨細胞の DNA 合成を抑制するとする報告があるのみである<sup>39</sup>。最近、NO 誘導剤として新たに SNAP が開発された<sup>40</sup>。すなわち、この薬剤はニトロソチオールに分類され、安定した NO ドナーである。本研究により初めて NO によるプロテオグリカン合成抑制作用が証明された。プロテオグリカン合成抑制は変形性関節症の軟骨における代表的な代謝変化であり、本研究によりメカニカルストレスと変形性関節症発症との関連が初めて細胞レベルで明らかになったといえよう。さらに、

最近周期的牽引負荷によって活性化されるチャネル(stretch-activated ion channels)の存在が報告されており<sup>26</sup>, 周期的牽引負荷が細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させるとする報告もある<sup>41</sup>. このチャネルを NO が直接開くとする最近の報告もある<sup>42</sup>. したがって, 周期的牽引負荷によって起こる NO 産生における細胞内情報伝達機構を解明することは本研究に続く研究課題であり, これにより, さらに変形性関節症の病態が解明されるだけでなく, 新しい治療法の開発にも大きな示唆を与えるものと期待される.

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり, ご指導, ご校閲を賜りました恩師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御協力いただいた教室の諸先生方に心から感謝致します. 本論文の要旨は第6回日本軟骨代謝研究会(平成5年2月26, 27日, 神戸)において発表した.

#### 文 献

1. 加藤幸夫. 関節軟骨細胞. 関節外科 1990 ; 9 : 増刊号 : 11-31.
2. 山本 真, 糸満 盛憲, 変形性関節症. 塩川優一編. リウマチ学. 東京 : 同文書院, 1989 ; 917-946.
3. Gritzka TL, Fry LR, Cheesman RL, La Vigne A. Deterioration of articular cartilage caused by continuous compression in a moving rabbit joint. J Bone Joint Surg 1973 ; 55A : 1698-1720.
4. Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Saamanen AM, Helminen HJ. Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. Arthritis Rheum 1987 ; 30 : 801-809.
5. Saamamen AM, Kiviranta I, Jurvelin J, Helminen H, Tammi M. Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular cartilage following 20 km daily running exercise for 15 weeks. Connective Tissue Res 1994 ; 30 : 191-201.
6. Hall MC. Articular changes in the knee of the adult rat after prolonged immobilization in extension. Clin Orthop 1964 ; 34 : 184-195.
7. Palmoski MJ, Perricone E, Brandt KD. Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. Arthritis Rheum 1979 ; 22 : 508-515.
8. Videman T, Eronen I, Friman C. Glycosaminoglycan metabolism in experimental osteoarthritis caused by immobilization. Acta Orthop Scand 1981 ; 52 : 11-21.
9. 大塚哲也. 非荷重下の大腿骨頭関節軟骨病変に関する実験的研究. 日整会誌 1991 ; 65 : 70-80.
10. Banes AJ, Gilnert J, Taylor D, Monbureau O. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cycle tension or compression to cells in vitro. J Cell Sci 1985 ; 75 : 35-42.
11. 松村文典, 福田寛二, 本吉 寛, 田中清介. ケラタン硫酸. 関節外科 1991 ; 9 : 23-28.
12. 福田寛二, 松村文典, 田中清介. 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 1991 ; 173-178.
13. 大谷和裕. 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 1993 ; 18 : 241-252.
14. 段 秀和. 関節軟骨細胞に対する interleukin 1 の作用. 近畿大医誌 1994 ; 19 : 93-107.
15. Fukuda K, Matsumura F, Tanaka S. Histamine H2 receptor mediates keratan sulfate secretion in rabbit chondrocytes : role of cAMP. Am J Physiol 1993 ; 265 : C1653-1657.
16. Fukuda K, Yamasaki H, Nagata Y, et al. Histamine H1-receptor-mediated keratan sulfate production in rabbit chondrocytes : involvement of protein kinase C. Am J Physiol 1991 ; 261 : C413-416.
17. Fukuda K, Ohtani K, Matsumura F, Tanaka S. Keratan sulfate inhibits its rabbit chondrocyte. connective Tissue Res 1993 ; 30 : 75-83.
18. Culotta E, Koshland DE. No news is good news. Science 1992 ; 258 : 1862-1865.
19. Sumpio BE, Banes AJ, Levin LG, Johnson G. Mechanical stress stimulates aortic endothelial cells to proliferate. J Vascular Surg 1987 ; 6 : 252-256.
20. Sumpio BE, Banes AJ. Response of porcine aortic smooth muscle cells to cyclic tensional deformation in culture. J Surg Res 1988 ; 44 : 696-701.
21. Nishioka S, Fukuda K, Tanaka S. Cyclic stretch increases alkaline phosphatase activity

- of osteoblast-like cells: a role for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Bone Mineral* 1993 ; 21 : 141-150.
22. Thonar EA, Lenz ME, Klintworth GK, et al. Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis Rheum* 1985 ; 28 : 1367-1376.
23. Motoyoshi H, Tanaka S, Nagata Y, Yamasaki H, Kita H, Fukuda K. Age related alterations of the serum keratan sulfate levels in orthopaedic patients. *Jpn J Orthop Association* 1989 ; 63 : 1464-1468.
24. Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 1982 ; 9 : 247-248.
25. Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide. *Am J Clin Pathol* 1993 ; 100 : 567-575.
26. Wright M, Stockwell R, Nuki G. Response of plasma membrane to applied hydrostatic pressure in chondrocytes and fibroblasts. *Connective Tissue Res* 1992 ; 28 : 49-70.
27. Buckley MJ, Banes AJ, Levin LG, et al. Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. *Bone and Mineral* 1988 ; 4 : 225-236.
28. Fukuda K, Tanaka S, Motoyoshi H, Nagata Y, Yamasaki H, Matsumura F. Serum keratan sulfate in rheumatoid arthritis. *Med Sci Res* 1990 ; 18 : 255-256.
29. Conquer J, Kandel R, Cruz T. Interleukin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate induce collagenase and PGE<sub>2</sub> production through a PKC-independent mechanism in chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1992 ; 1134 : 1-6.
30. Arner EC, Pratta MA. Modulation of interleukin-1-induced alterations in cartilage proteoglycan metabolism by activation of protein kinase C. *Arthritis Rheum* 1991 ; 34 : 1006-1013.
31. Nishizuka Y. Studies and perspective of protein kinase C. *Science* 1986 ; 233 : 305-312.
32. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994 ; 120 : 227-237.
33. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. *Nature* 1987 ; 327 : 524-6.
34. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis* 1992 ; 51 : 1219-1222.
35. Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans C. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum* 1993 ; 36 : 1036-1044.
36. Palmer R, Hickery M, Charles I, Moncada S, Bayliss M. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; 28 : 398-405.
37. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar T, et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991 ; 147 : 3915-3920.
38. Charles I, Palmer R, Hickery M, et al. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 11419-11423.
39. Kondo S, Ishiguro N, Iwata H, Nakashima I, Isobe K. The effects of nitric oxide on chondrocytes and lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; 197 : 1431-1437.
40. Stalerm JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992 ; 258 : 1898.
41. Davis MJ, Meininger GA, Zawieja DC. Stretch-induced increases in intracellular calcium of isolated vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992 ; 263 : H1292-1299.
42. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994 ; 368 : 850-853.