

# ウサギ関節軟骨細胞におけるヒスタミン受容体機能

松村 文典

近畿大学医学部整形外科学教室

The role of histamine receptors on rabbit articular chondrocytes

Fuminori Matsumura

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

## ABSTRACT

Using the radioligand histamine H<sub>1</sub> antagonist [<sup>3</sup>H]-pyrilamine and H<sub>2</sub> antagonist [<sup>3</sup>H]-tiotidine, we characterized the histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors on rabbit articular chondrocytes. We found that single class of binding of [<sup>3</sup>H]-pyrilamine and [<sup>3</sup>H]-tiotidine existed on these cells, respectively. The measured K<sub>D</sub> of binding for [<sup>3</sup>H]-pyrilamine and [<sup>3</sup>H]-tiotidine were 90±20 and 122±23 nM, and the maximum binding 56±17 and 2.3±0.5 fmol/10<sup>4</sup> cells, respectively. Histamine H<sub>1</sub> receptor agonists (2-methylhistamine and 2-pyridylethylamine) stimulated the release of keratan sulfate in a dose dependent manner. Histamine H<sub>2</sub> receptor agonists (dimaprit and 4-methylhistamine) inhibited the release of keratan sulfate in a dose dependent manner. The effect of histamine H<sub>1</sub> receptor agonist was inhibited by the protein kinase C inhibitor (sphingosine). When protein kinase C in the chondrocytes was down regulated by preincubation with phorbol 12,13-dibutyrate, a direct activator of protein kinase C, the effect of histamine H<sub>1</sub> agonist was abolished. These findings indicate that the histamine H<sub>1</sub> receptor is regulated by protein kinase C.

**Key words :** histamine receptors, chondrocytes, keratan sulfate, proteoglycan, protein kinase C, cyclic adenosine monophosphate

## 緒 言

慢性関節リウマチ患者の関節液中にはヒスタミン<sup>1-3</sup> や種々のサイトカイン<sup>4-6</sup> が高値を示しており、サイトカインの中でもインターロイキン1 (IL-1) やインターロイキン6 (IL-6) は、関節軟骨破壊に重要な役割を果たしていること

が知られている<sup>7-9</sup>。ヒスタミンもまた関節炎患者の関節軟骨になんらかの影響を及ぼしていることが想像される。ヒスタミンはまた種々の細胞で、細胞表面に存在する特異的受容体であるヒスタミン受容体と結合し作用することが示されており<sup>10-11</sup>、ヒスタミン受容体にはヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体とヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体があり、

それぞれ異なった作用を示すことが報告されている<sup>12-14</sup>。これまでの我々の教室における研究では、コラーゲン関節炎マウスのリンパ球<sup>15</sup>や骨髄細胞<sup>16</sup>、慢性関節リウマチ患者の関節滑膜細胞<sup>17</sup>にヒスタミン  $H_2$  受容体機能低下を認めることを明らかにしてきた。軟骨細胞におけるヒスタミン受容体については、Taylor ら<sup>18</sup>が結合実験により結合親和性 ( $K_D$  値) や最大結合量 ( $B_{max}$ ) を直接検討していないが、ヒスタミン  $H_1$  および  $H_2$  受容体の存在を示唆し、軟骨細胞の prostaglandin E (PGE) 合成に影響を及ぼすことを報告した程度である。

関節軟骨は軟骨細胞と細胞外基質からなり、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。近年プロテオグリカンの構成要素であるケラタン硫酸に対するモノクローナル抗体が開発され<sup>19</sup>、酵素標識抗体測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) を用いて容易にケラタン硫酸量を測定することが可能となった<sup>20,21</sup>。また、これまでの我々の教室における研究から、血清ケラタン硫酸値が関節疾患における関節軟骨代謝を反映していることが明らかとなった<sup>22,23</sup>。したがって、軟骨細胞が合成するケラタン硫酸量は、軟骨細胞代謝の重要な指標になると考えられる。

今回の研究では、ヒスタミンの関節軟骨に対する作用をより明確にするため、ウサギ培養関節軟骨細胞を用い、その細胞表面に存在するヒスタミン  $H_1$  および  $H_2$  受容体の存在を結合実験により検討するとともに、軟骨細胞が合成するケラタン硫酸放出量を軟骨代謝の指標として  $H_1$  および  $H_2$  受容体を個々に検討した。さらに、それらの受容体を介した軟骨細胞の細胞内情報伝達機構についても検討した。

## 材料および方法

### 1. 軟骨細胞の培養

北摂産業から購入した体重 1.5—2.0 kg の雄性日本白色在来種ウサギに致死量の sodium pentobarbital を静脈内注射し、麻酔死させた。

直ちに、肩関節および膝関節から関節軟骨を無菌的に採取し、ハサミで細断後、0.2% コラゲナーゼで3時間酵素処理し、軟骨細胞を単離した<sup>24</sup>。この細胞を10% ウシ血清添加 Ham's F-12 medium (Gibco Laboratories, New York) を用いて、Falcon 3003 円形培養フラスコ (Becton Dickinson and Company, USA) に播種し、37°C、5%  $CO_2$  飽和水蒸気圧の条件下で培養した。細胞がコンフルエントに達してから、Falcon 3047 24 well plate に  $1 \times 10^4$  個/well となるように播種継代し、コンフルエントに達した細胞を実験に用いた。

### 2. 結合実験

結合実験は、Taylor ら<sup>14,18,25</sup> の方法に準じてコンフルエントの単層培養軟骨細胞を用いて行った。

#### 2.1. ヒスタミン受容体結合実験

細胞を結合緩衝液 (Hanks' basic salt solution, HBSS, 5 mM histidine, pH 7.4) 1 ml で3回洗浄後、種々の濃度の [pyridinyl-5- $^3H$ ]-pyrilamine ( $H_1$  antagonist, specific radioactivity: 884.3 GBq/mmol, Du Pont) または [methyl- $^3H$ ]-tiotidine ( $H_2$  antagonist, specific radioactivity: 3,219.0 GBq/mmol, Du Pont) を含む結合緩衝液 0.6 ml に4°C、30分間作用させた。その後、結合緩衝液 1 ml で3回洗浄し、0.25% トリプシン処理により細胞を採取し、液体シンチレーションカウンター (LKB Wallac 1219 Rackbeta) で放射性同位元素の量を測定し、全結合量を求めた。非特異的結合量は 300  $\mu M$  の chlorpheniramine ( $H_1$  antagonist) および ranitidine ( $H_2$  antagonist) 存在下でそれぞれ作用させ、測定した。特異的結合量は全結合量から非特異的結合量を除いて求めた。

#### 2.2. ホルボールエステルを用いた結合実験

結合緩衝液として Hanks' basic salt solution, HBSS, 10 mM HEPES, pH 7.4 を用い、 $^3H$  標識ホルボールエステルとして [20- $^3H$ [N]-phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu, specific radioactivity 688.2 GBq/mmol, Du Pont) を

使用し、ヒスタミン受容体結合実験と同様の方法で行った。非特異的結合量は 60  $\mu$ M 非標識 PDBu 存在下で作用させ、測定した。

### 3. 各種薬剤によるケラタン硫酸の変動

培養細胞の血清による影響を除去するため、血清無添加 Ham's F-12 medium で24時間培養した。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で48時間培養した。培養上清は 0.1 $\times$ PBS (phosphate-buffered saline, Gibco, New York, USA) で透析、凍結乾燥後、0.1 ml の蒸留水で溶解し、ケラタン硫酸量を測定した。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, トミー精巧, 東京) で破碎し、Lowry 法<sup>26</sup> に従って細胞の蛋白量を測定した。

使用したリガンドは H<sub>1</sub> アゴニストとして 2-methylhistamine dihydrochloride, 2-pyridylethylamine dihydrochloride (Smith Kline & French laboratories Ltd., Herts, UK), H<sub>1</sub> アンタゴニストとして chlorpheniramine maleate salt, pyrillamine maleate salt (Sigma, St. Louis, laboratories Ltd.), H<sub>2</sub> アゴニストとして dimaprit dihydrochloride, 4-methylhistamine dihydrochloride (Smith Kline & French laboratories Ltd.), H<sub>2</sub> アンタゴニストとして ranitidine (Sigma), ホルポールエステルとして phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu, Sigma), 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate (4 $\alpha$ -PDD, Sigma), 細胞内 cAMP 量を増加させる薬剤として dibutyryl cAMP sodium salt (和光純薬, 大阪), prostaglandin E<sub>1</sub> (Sigma), theophylline (Sigma) である。

### 4. ケラタン硫酸の測定

ケラタン硫酸の測定は本吉ら<sup>20,21</sup>の方法に準じた酵素標識抗体測定法 (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 (bovine nasal cartilage proteoglycan monomer, D1 fraction, BN-D1 PG, ICN Immuno Bio-

logicals, Lisle, IL) 5  $\mu$ g をコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業, 東京) 0.01 unit で37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, 2時間で抗原として Costar 96 well plate 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 albumine, BSA), 0.05 M EDTA, 0.05% Tween20 添加 PBS で 5 万倍希釈した抗ケラタン硫酸モノクローナル抗体 (1/20/5/D4, 生化学工業) 0.1 ml と37 $^{\circ}$ C, 1時間反応させた。抗原を吸着させた Costar 96 well plate を0.05% Tween20 添加 PBS で3回洗浄し, この反応液を 0.1 ml 注入し, 37 $^{\circ}$ 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% Tween20 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 Teknika Corporation, West Chester, USA) 0.1 ml を注入し室温で1時間反応させた。プレートを3回洗浄後, o-phenyldiamine (Sigma) 調製液 0.1 ml を注入し発色させ, 15分後に 2 N 硫酸を加え反応を停止させ, 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, Austria) を用いた。ケラタン硫酸標準希釈溶液としてサメ肋軟骨から精製したケラタン硫酸 (生化学工業) を用いた。

### 5. 各種リガンドによるグリコサミノグリカンの変動

軟骨細胞が合成するグリコサミノグリカン量の測定は, Kato ら<sup>27</sup>の方法に従って行った。培養細胞の血清による影響を除去するため, 血清無添加 Ham's F-12 medium で24時間培養した。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><sup>2-</sup> (specific radioactivity 17.08 GBq/mmol, Du Pont) 4  $\mu$  Ci/ml を添加し培養した。48時間培養後, 培養液を回収し, 0.15 N 水酸化ナトリウムを加え rubber policeman で細胞を完全に回収した。培養液と細胞を混合し, 6 N 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, 東京) を含む pH 7.8 の 0.05 M Tris-HCl 緩衝液を 1 ml の溶液につき 2 ml 加え, 12時間55°C で培養した. その後, 1 mg/ml コンドロイチン硫酸 (Sigma) 50  $\mu$ l, 2 mM 硫酸マグネシウム 1 ml, 1% cetylpyridinium chloride 1 ml を加え, 1時間37°C で培養し, Polysaccharides を沈澱させた. Whatman GF/F glass microfibre filter (Whatman, England) で沈澱物を回収し, さらに 1% cetylpyridinium chloride -0.02 M NaCl 1 ml で 5 回洗浄した. filter を乾燥させ, econofluor (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測定した.

#### 6. 細胞内 cAMP 量の測定

培養細胞の血清による影響を除去するため, 血清無添加 Ham's F-12 medium で 24 時間培養した. 細胞を 3 回洗浄後, 各種リガンドと  $5 \times 10^{-4}$  M 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX, Sigma) を含む血清無添加培養液で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 飽和水蒸気圧の条件下で各時間培養し, ソニケーターで細胞を破碎した. 細胞内 cAMP 量はヤマサ cAMP 測定キットを用いて測定した.

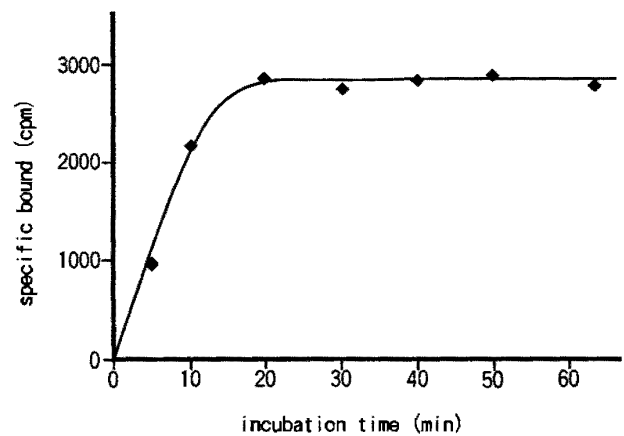
#### 7. 統計処理

各データは平均値  $\pm$  標準偏差 (mean  $\pm$  SD) で表し, 有意差検定は Student's t-test を用い  $p < 0.05$  を統計学的有意とした.

## 結 果

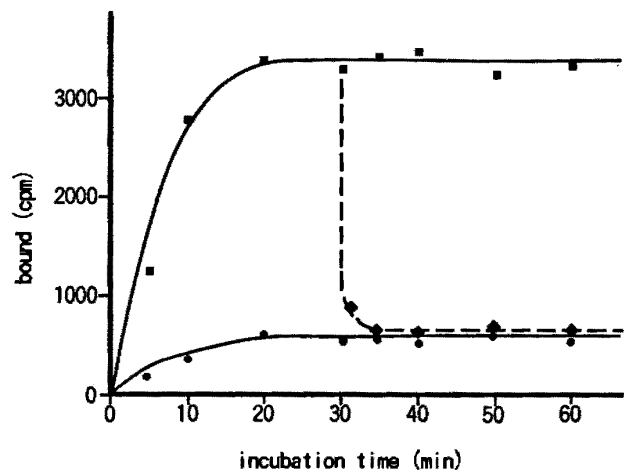
### 1. ヒスタミン受容体結合実験

100 nM の [<sup>3</sup>H]-pyrilamine を 4°C の条件下で軟骨細胞に作用させると, 特異的結合量は急速に上昇し, 約 20 分で平衡状態に達した (Fig. 1). また 100 nM の [<sup>3</sup>H]-pyrilamine を 4°C の条件下で平衡状態に達するまで作用させた後, 300  $\mu$ M の非標識 chlorpheniramine を添加すると, [<sup>3</sup>H]-pyrilamine 全結合量は 1 分後までに急激に減少し, 5 分後には非特異的結合量のレベルとなり, その後維持された (Fig. 2).



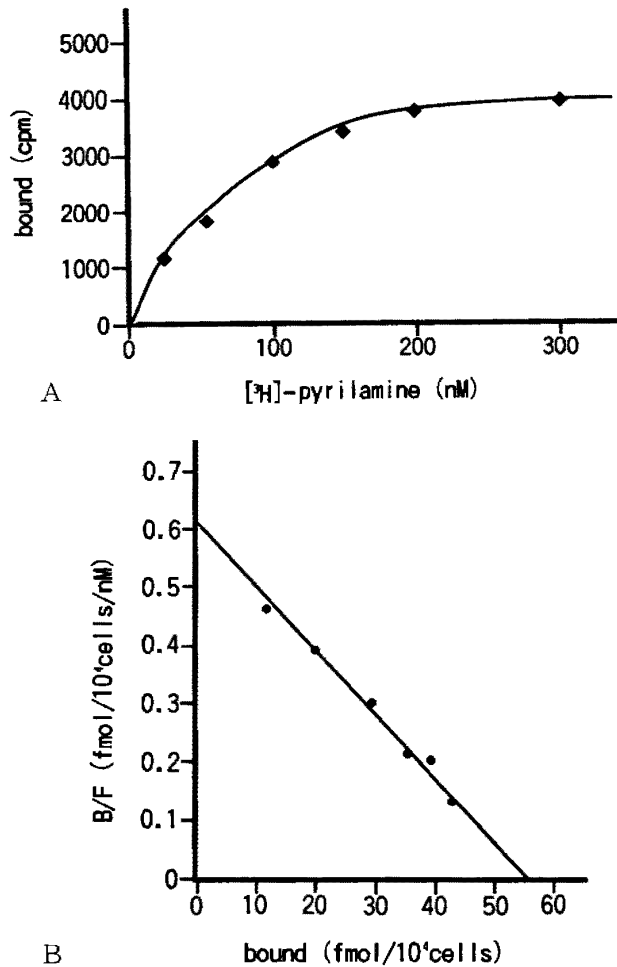
**Fig. 1** Time course for specific binding of [<sup>3</sup>H]-pyrilamine to rabbit articular chondrocytes

Chondrocytes were incubated with 100 nM [<sup>3</sup>H]-pyrilamine in the presence or absence of 300  $\mu$ M chlorpheniramine at 4°C and specific binding was determined after the indicated times. The specific binding increased rapidly and reached a steady-state plateau after 15-20 min.



**Fig. 2** Reversibility of [<sup>3</sup>H]-pyrilamine binding

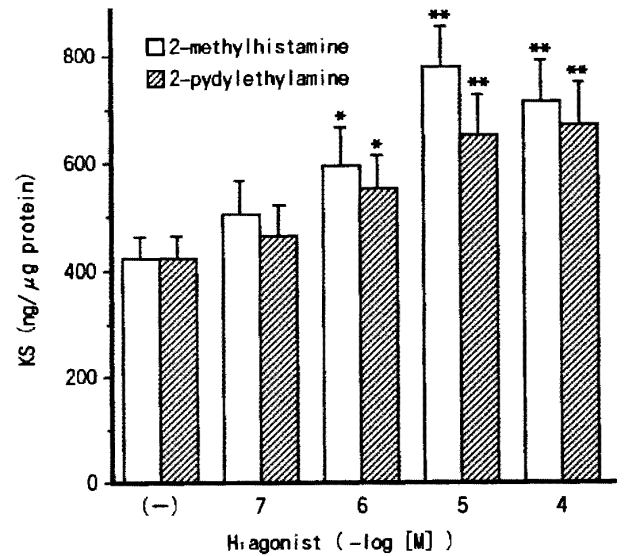
Chondrocytes were incubated with 100 nM [<sup>3</sup>H]-pyrilamine in the presence (non-specific binding, ●) or absence (total binding, ■) of 300  $\mu$ M chlorpheniramine at 4°C. After 30 min. 300  $\mu$ M chlorpheniramine was added to a portion of the cells which had been incubated in the absence of chlorpheniramine (◆), and assay of binding under all conditions was continued. The specific binding was reversed by the addition of 300  $\mu$ M chlorpheniramine.



**Fig. 3** A: Concentration dependency of  $[^3\text{H}]$ -pyrilamine binding  
Chondrocytes were incubated with 0-300 nM  $[^3\text{H}]$ -pyrilamine in the presence or absence of 300  $\mu\text{M}$  chlorpheniramine at 4°C for 30 min. The specific binding ( $\blacklozenge$ ) was plotted at each concentration by subtracting nonspecific binding from total binding. The figure depicts one representative experiment out of four. Each point is the mean of three experiments.  
B: Scatchard plot of  $[^3\text{H}]$ -pyrilamine binding to the rabbit chondrocytes

種々の濃度の  $[^3\text{H}]$ -pyrilamine または  $[^3\text{H}]$ -tiotidine を作用し得られた濃度-結合曲線から Scatchard 解析を行なうと、負の傾きを持つ直線となった (Fig. 3 A, B).

$[^3\text{H}]$ -pyrilamine の結合親和性 ( $K_D$  値) は  $90 \pm 20$  nM, 最大結合量 ( $B_{\text{max}}$ ) は  $56 \pm 17$  fmol/ $10^4$  cells (平均値  $\pm$  SD,  $n=4$ ) であった。また,  $[^3\text{H}]$ -tiotidine の  $K_D$  値は  $122 \pm 23$  nM,  $B_{\text{max}}$  は  $2.3 \pm 0.5$  fmol/ $10^4$  cells (平均値  $\pm$  SD,



**Fig. 4** Effect of histamine  $H_1$ -receptor specific agonist on the release of keratan sulfate from the chondrocytes  
Chondrocytes were cultured in the absence or presence of different concentrations of  $H_1$  agonist, 2-methylhistamine or 2-pyridylethylamine, at 37°C for 48 hr. The culture medium was collected for KS assay. Results are expressed as ng/ $\mu\text{g}$  protein of cells. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of six determinations, using different cell preparations. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus basal control value.

$n=4$ ) であった。

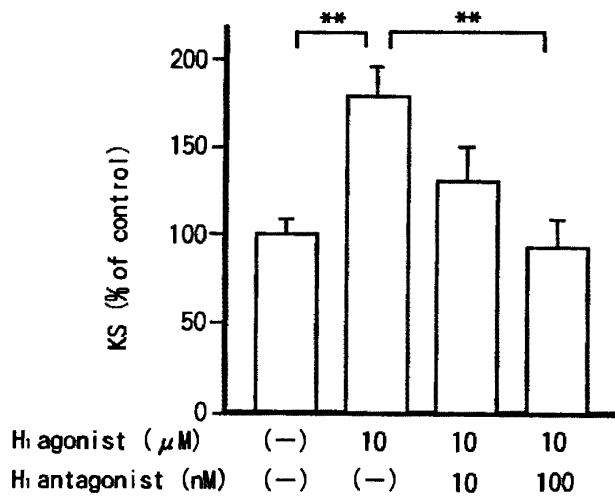
## 2. ヒスタミン受容体刺激によるケラタン硫酸の変動

### 2.1. ヒスタミン $H_1$ 受容体刺激によるケラタン硫酸の変動

ヒスタミン  $H_1$  受容体アゴニストの 2-methylhistamine または 2-pyridylethylamine を添加し, 48時間培養を行った。培養液中に放出されるケラタン硫酸量は対照に比べ有意に増加した (Fig. 4)。この作用はヒスタミン  $H_1$  受容体アンタゴニストの同時添加により抑制された (Fig. 5)。

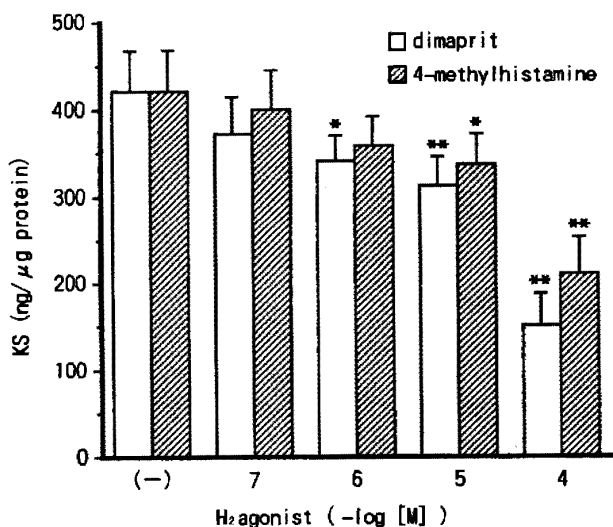
### 2.2. ヒスタミン $H_2$ 受容体刺激によるケラタン硫酸の変動

ヒスタミン  $H_2$  受容体アゴニストの dimaprit または 4-methylhistamine を添加し, 48時間培養を行った。培養液中に放出されるケラ



**Fig. 5** Effect of histamine H<sub>1</sub>-receptor specific antagonist on the release of keratan sulfate stimulated by histamine H<sub>1</sub>-receptor specific agonist

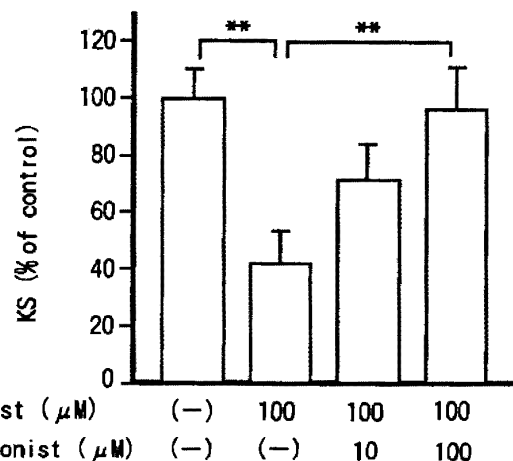
Chondrocytes were cultured in the absence or presence of 10 μM 2-methylhistamine (H<sub>1</sub> agonist) at 37°C for 48hr. Co-administration of pyrilamine (H<sub>1</sub> antagonist) inhibited the release of keratan sulfate stimulated by 2-methylhistamine. Results are expressed as percentage of basal control value. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of four determinations, using different cell preparations. \*\*p < 0.01.



**Fig. 6** Effect of histamine H<sub>2</sub>-receptor specific agonist on the release of keratan sulfate from the chondrocytes

Chondrocytes were cultured in the absence or presence of different concentrations of H<sub>2</sub> agonist, dimaprit or 4-methylhistamine, at 37°C for 48 hr. The culture medium was collected for

KS assay. Results are expressed as ng/μg protein of cells. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of six determinations, using different cell preparations. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 versus basal control value.



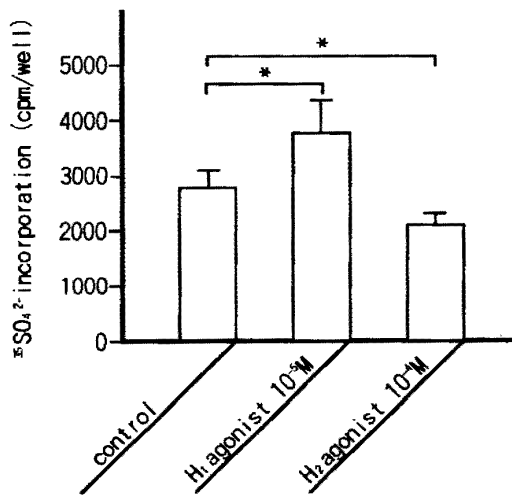
**Fig. 7** Effect of histamine H<sub>2</sub>-receptor specific antagonist on the release of keratan sulfate inhibited by histamine H<sub>2</sub>-receptor specific agonist

Chondrocytes were cultured in the absence or presence of 100 μM dimaprit (H<sub>2</sub> agonist) at 37°C for 48hr. Co-administration of ranitidine (H<sub>2</sub> antagonist) increased the release of keratan sulfate inhibited by dimaprit. Results are expressed as percentage of basal control value. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of four determinations, using different cell preparations. \*\*p < 0.01.

タン硫酸量は対照に比べ有意に濃度依存性に減少した (Fig. 6). この作用はヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストの同時添加により抑制された (Fig. 7).

### 3. ヒスタミン受容体刺激によるプロテオグリカン産生の変動

ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体アゴニストの 2-methylhistamine 添加により, 48時間後までに合成されたグリコサミノグリカンへの <sup>35</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 取り込み量は, 無添加のものと比較し有意に増加していた. また, ヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体アゴニストの dimaprit 添加では, 有意に低下していた (Fig. 8).



**Fig. 8** Effects of histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>-receptor specific agonists on [<sup>35</sup>S]-sulfate incorporation into proteoglycans synthesized by rabbit chondrocyte cultures. Chondrocytes were cultured with 4 μCi/ml [<sup>35</sup>S]-sulfate in the presence or absence of 2-methylhistamine (H<sub>1</sub> agonist) or dimaprit (H<sub>2</sub> agonist) at 37 °C for 48hr. [<sup>35</sup>S]-sulfate incorporation into proteoglycans present in the cell layer and those released into the medium were measured. Results are expressed as cpm/well. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of four determinations, using different cell preparations. \*p<0.05.

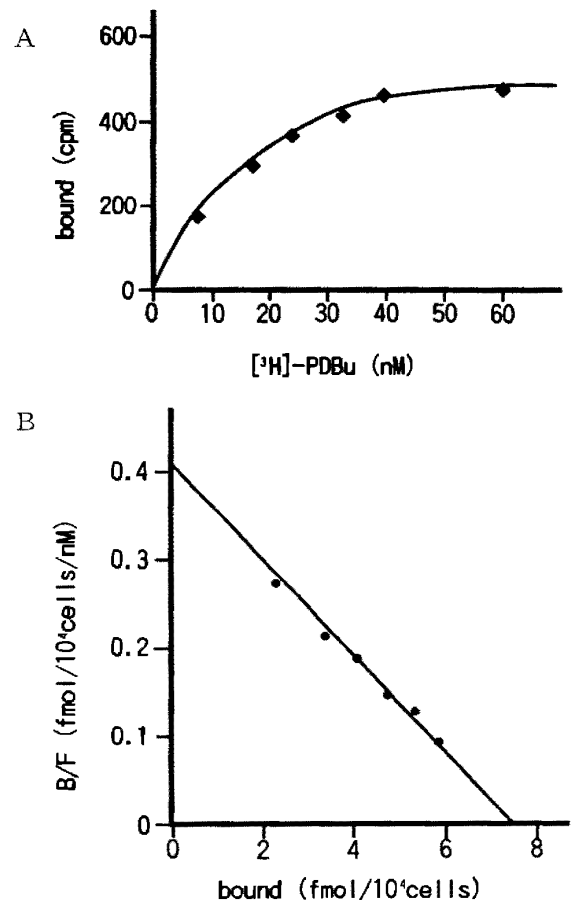
#### 4. 軟骨細胞内情報伝達機構

##### 4.1. ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体

[<sup>3</sup>H]-PDBu を用いた結合実験では、種々の濃度の [<sup>3</sup>H]-PDBu を作用させ得られた濃度-結合曲線を Scatchard 解析すると負の傾きをもつ直線が得られた (Fig. 9 A, B).

次に、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体刺激によるケラタン硫酸放出増加におけるプロテインキナーゼ C の関与について検討した。ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体アゴニストの 2-methylhistamine 添加により増加した培養液中のケラタン硫酸量は、プロテインキナーゼ C 抑制物質の sphingosine を同時添加することにより抑制された (Fig. 10).

さらに、プロテインキナーゼ C を直接活性化させる PDBu 添加による培養液中のケラタン硫酸量の変化を検討した。培養液中のケラタン硫



**Fig. 9** A: Concentration dependency of [<sup>3</sup>H]-PDBu binding

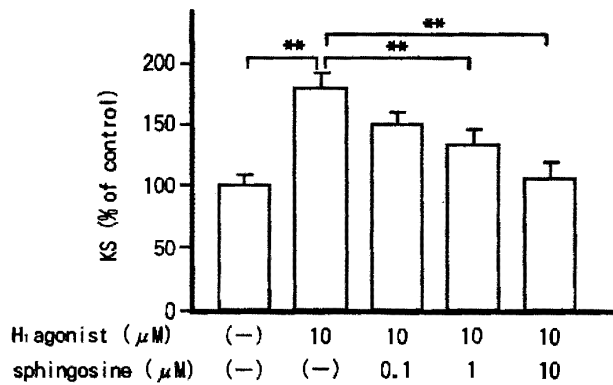
Chondrocytes were incubated with 0-60 nM [<sup>3</sup>H]-PDBu in the presence or absence of 60 μM nonradioactive PDBu at 4 °C for 60 min. The specific binding (◆) was plotted at each concentration by subtracting nonspecific binding from total binding. The figure depicts one representative experiment out of three. Each point is the average of three experiments.

B: Scatchard plot of [<sup>3</sup>H]-PDBu binding to the rabbit chondrocytes

The K<sub>D</sub> of binding was 18 nM, the maximum binding was 7.4 fmol/10<sup>4</sup> cells.

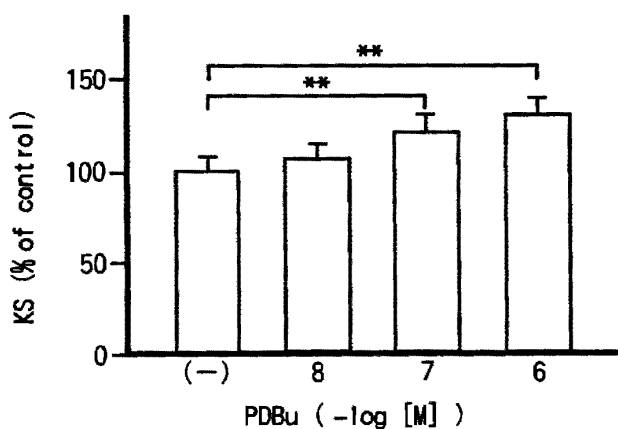
酸量は PDBu 添加により濃度依存性に増加した (Fig. 11). プロテインキナーゼ C を活性化しないホルボールエステル, 4α-PDD を 100 nM 添加してもケラタン硫酸量の変化は認められなかった。PDBu 添加によるケラタン硫酸量の増加は sphingosine を同時添加することにより抑制された (Fig. 12).

100 nM PDBu の 6 時間前処理により PDBu によるケラタン硫酸量の増加は完全に抑制され



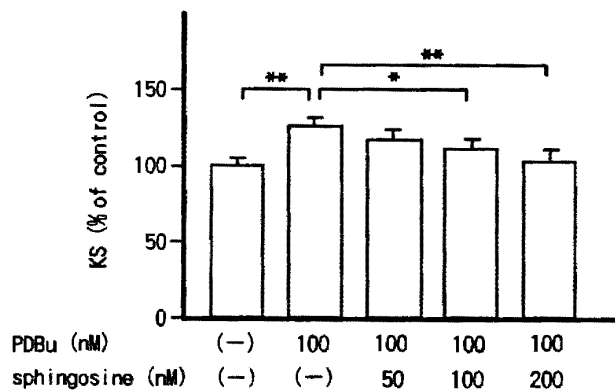
**Fig. 10** Effect of sphingosine (PKC inhibitor) on the release of keratan sulfate stimulated by 2-methylhistamine ( $H_1$  agonist)

Chondrocytes were cultured in the absence or presence of  $10\mu\text{M}$  2-methylhistamine at  $37^\circ\text{C}$  for 48hr. Co-administration of sphingosine inhibited the release of keratan sulfate stimulated by 2-methylhistamine. Results are expressed as percentage of basal control value. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of six determinations, using different cell preparations.  $**p < 0.01$ .



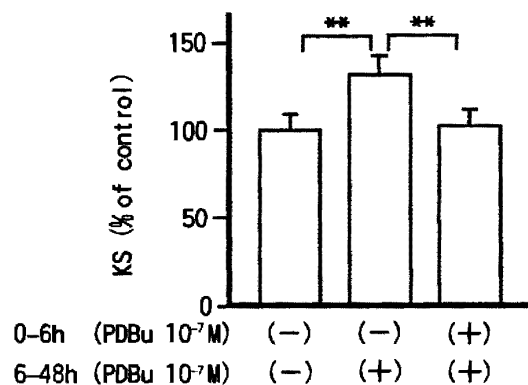
**Fig. 11** Effect of PDBu (PKC activator) on the release of keratan sulfate from the chondrocytes

Chondrocytes were cultured in the absence or presence of different concentrations of PDBu at  $37^\circ\text{C}$  for 48 hr. The culture medium was collected for KS assay. Results are expressed as percentage of basal control value. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of six determinations, using different cell preparations.  $**p < 0.01$ .



**Fig. 12** Effect of sphingosine (PKC inhibitor) on the release of keratan sulfate stimulated by PDBu (PKC activator)

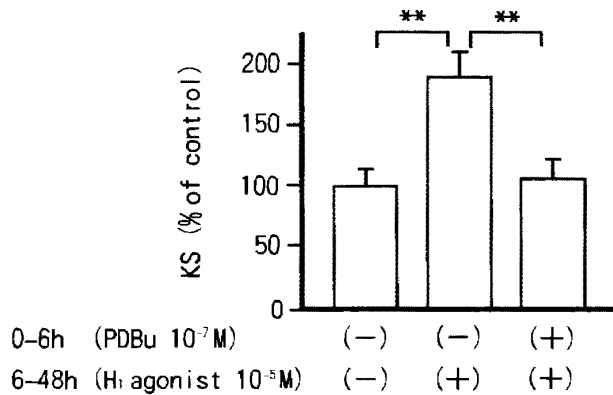
Chondrocytes were cultured in the absence or presence of  $100\text{nM}$  PDBu at  $37^\circ\text{C}$  for 48hr. Co-administration of sphingosine inhibited the release of keratan sulfate stimulated by PDBu. Results are expressed as percentage of basal control value. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of six determinations, using different cell preparations.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ .



**Fig. 13** Effect of the preincubation with PDBu on the release of keratan sulfate stimulated by PDBu

Chondrocytes were incubated in the presence or absence of  $100\text{nM}$  PDBu at  $37^\circ\text{C}$ . After 6 hours the cell layer was washed 3 times with PBS and further incubated until the 48th hour in the presence or absence of  $100\text{nM}$  PDBu. Results are expressed as percentage of basal control value. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of five determinations, using different cell preparations.  $**p < 0.01$ .





**Fig. 14** Effect of the preincubation with PDBu on the release of keratan sulfate stimulated by 2-methylhistamine (H<sub>1</sub> agonist)

Chondrocytes were incubated in the presence or absence of 100 nM PDBu at 37°C. After 6 hours the cell layer was washed 3 times with PBS and further incubated until the 48th hour in the presence or absence of 10 μM 2-methylhistamine. Results are expressed as percentage of basal control value. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of five determinations, using different cell preparations. \*\* $p < 0.01$ .

(Fig. 13), ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 アゴニストの 2-methylhistamine によるケラタン硫酸量の増加も完全に抑制された (Fig. 14).

#### 4.2. ヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体

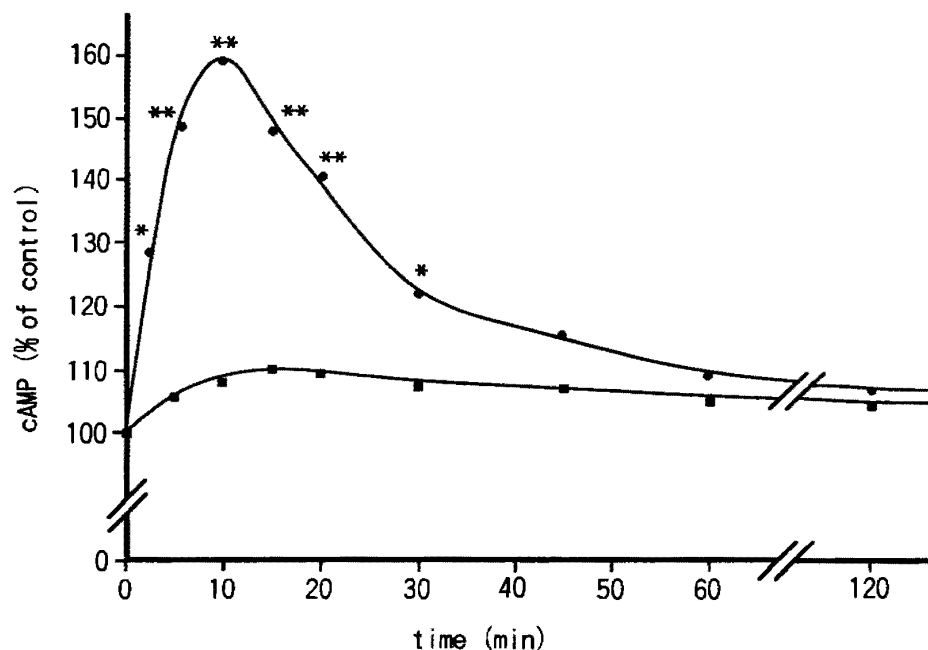
ヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体 アゴニストの dimaprit  $10^{-4}$  M と IBMX  $5 \times 10^{-4}$  M を添加した時の細胞内 cAMP 量は, IBMX  $5 \times 10^{-4}$  M のみ単独添加した時と比べ早期に有意な増加を示した (Fig. 15).

細胞内 cAMP 量の増加がケラタン硫酸放出を抑制するか否か検討した. 細胞内 cAMP 量を増加させる薬剤によるケラタン硫酸放出量の変化は, 一定していなかった (Fig. 16).

### 考 察

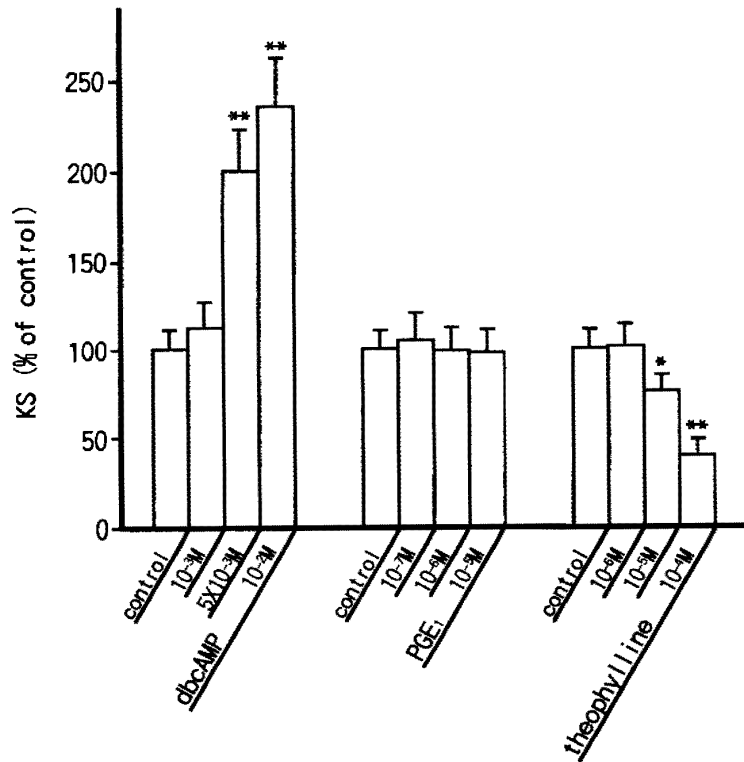
#### 1. 軟骨細胞におけるヒスタミン受容体の存在

ヒスタミンが炎症の調節因子であることはよく知られている. しかし軟骨細胞におけるヒスタミンの作用についてはほとんど解明されていない. Taylor ら<sup>18</sup> は, [<sup>3</sup>H]-mepyramine (H<sub>1</sub>



**Fig. 15** Effect of histamine H<sub>2</sub>-receptor specific agonist on the intracellular concentration of cAMP

Chondrocytes were incubated with 500 μM IBMX in the presence (●) or absence (■) of 100 μM dimaprit (H<sub>2</sub> agonist), and cAMP was extracted at the times indicated after their addition. Results are expressed as percentage of basal control value. Plotted are the means of three determinations, using different cell preparations. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. 16** Effect of agents which increase intracellular cAMP on the release of keratan sulfate from the chondrocytes

Chondrocytes were cultured in the absence or presence of different concentrations of dbcAMP, prostaglandin E<sub>1</sub> or theophylline at 37 °C for 48 hr. The culture medium was collected for KS assay. Results are expressed as percentage of basal control value. Plotted are the means and standard deviations (vertical lines) of six determinations, using different cell preparations. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

antagonist) を用いた置換曲線からヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の存在を示したため、その結合親和性 (K<sub>D</sub> 値) および最大結合量 (B<sub>max</sub>) を直接検討することができず、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の性質を十分に把握することができなかつた。また、ヒスタミン刺激による細胞内 cAMP 量の増加が ranitidine あるいは cimetidine (H<sub>2</sub> antagonist) で抑制されることからヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体の存在を示したが、結合実験での確認は行っていなかつた。今回の研究で、[<sup>3</sup>H]-pyrilamine, [<sup>3</sup>H]-tiotidine の特異的結合が可逆性であることから、これらの結合が細胞表面受容体に対する結合であることがわかつた。

さらに濃度-結合曲線の Scatchard 解析で負の傾きを持つ直線が得られたことから、軟骨細胞表面にシングルクラスのヒスタミン H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> 受容体がそれぞれ存在することが証明

された。またそれらの結合親和性 (K<sub>D</sub> 値) と最大結合量 (B<sub>max</sub>) も求められた。これらの値は他の細胞を用いた報告とほぼ一致していた<sup>14, 17, 30</sup>。これらのことから、ヒスタミンは軟骨細胞表面にあるヒスタミン H<sub>1</sub> あるいは H<sub>2</sub> 受容体を介して、軟骨細胞に何等かの作用を及ぼしていると考えられた。

## 2. ケラタン硫酸とヒスタミン受容体

正常軟骨細胞は、一定の速度 ( $t_{1/2} = 14$  days) でプロテオグリカンを合成・分解している<sup>31</sup>。我々の教室では、関節炎患者における関節軟骨細胞のプロテオグリカン代謝に異常が起こっていることを、患者血清ケラタン硫酸値を測定することにより報告してきた<sup>22, 23</sup>。そこで本研究では、ヒスタミン H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> 受容体機能を、培養軟骨細胞が培養液中に放出するケラタン硫酸量を指標として検討した。それぞれ

のアゴニストを用いた実験から、ヒスタミン  $H_1$  受容体はケラタン硫酸放出を促進させ、ヒスタミン  $H_2$  受容体は抑制することがわかった。さらに、これらの作用がそれぞれのアンタゴニストにより抑制されたことから、軟骨細胞表面受容体を介して行われていると考えられた。

培養液中に放出されたケラタン硫酸量が軟骨細胞におけるプロテオグリカン産生能を反映していることを確認するために、グリコサミノグリカンへの  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  取り込み量を測定した。ケラタン硫酸放出量とグリコサミノグリカンへの  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  取り込み量の変化は一致した。このことから培養液中へのケラタン硫酸放出量の変化はプロテオグリカン産生能の変化を反映していると考えられた。

### 3. ヒスタミン受容体と軟骨細胞の細胞内情報伝達機構

以上、軟骨細胞のケラタン硫酸あるいはプロテオグリカン産生に、細胞表面のヒスタミン  $H_1$  および  $H_2$  受容体の関与が明らかとなった。そこでこれらの受容体による作用が、どのような細胞内情報伝達機構を介して行われているかを検討した。Taylor ら<sup>32</sup> は、軟骨細胞におけるヒスタミン  $H_2$  受容体の細胞内情報伝達機構に cAMP がセカンドメッセンジャーとして関与していることを、ヒト、イヌ、ウシから採取した培養軟骨細胞を用いて報告した。しかし、軟骨細胞におけるヒスタミン  $H_1$  受容体の細胞内情報伝達機構についての報告はない。

今回の研究でウサギ培養軟骨細胞のヒスタミン  $H_2$  受容体にも、cAMP が関与していることを確認した。しかし、軟骨細胞におけるプロテオグリカン合成に対する cAMP の作用には一定した見解がなく、合成を抑制、不変あるいは促進するといったさまざまな報告がある<sup>33-35</sup>。今回の研究でも、細胞内 cAMP を増加させる薬剤の作用は一定していなかった。したがって、ヒスタミン  $H_2$  受容体によるケラタン硫酸放出抑制に cAMP が関与しているものの、他のなんらかの細胞内メカニズムも関与している

と思われた。

軟骨以外の系では、ヒスタミン  $H_1$  受容体刺激は、イノシトールリン脂質代謝の亢進と細胞内カルシウムイオンの増加をひき起こすことが報告されている<sup>13,36-39</sup>。この細胞内情報伝達機構は、イノシトールリン脂質代謝の結果生ずるジアシルグリセロールとイノシトール 1,4,5-三リン酸がセカンドメッセンジャーとなり細胞への刺激をそれぞれプロテインキナーゼ C とカルシウムイオンに変換し、蛋白リン酸化を介して細胞内に伝達していると考えられている<sup>40,41</sup>。今回の研究における  $[^3\text{H}]\text{-PDBu}$  を用いた結合実験から、軟骨細胞にプロテインキナーゼ C が実際に存在することを確認した。さらにヒスタミン  $H_1$  受容体アゴニストによる軟骨細胞のケラタン硫酸放出増加が、プロテインキナーゼ C 抑制物質の sphingosine で抑制されたことや、プロテインキナーゼ C を直接活性化する PDBu でヒスタミン  $H_1$  受容体アゴニストと同様ケラタン硫酸放出増加が起こり、この作用は sphingosine で抑制されたことから、軟骨細胞のヒスタミン  $H_1$  受容体にプロテインキナーゼ C が関与していることがわかった。PDBu によるケラタン硫酸放出増加は最高29%しか認められなかったにもかかわらず、ヒスタミン  $H_1$  受容体アゴニストでは約2倍まで増加した。これは、ヒスタミン  $H_1$  受容体アゴニストのケラタン硫酸放出増加にはカルシウムイオンなどの他の細胞内メカニズムも関与しているためと思われた。

いろいろな細胞を用いた研究から、プロテインキナーゼ C を介した細胞機能は、PDBu の前処置によりダウンレギュレーションをきたすことが報告されている<sup>36,40</sup>。軟骨細胞においても PDBu やヒスタミン  $H_1$  受容体アゴニストによるケラタン硫酸放出増加は、PDBu の前処置によりダウンレギュレーションがみられ、これらのことからヒスタミン  $H_1$  受容体によるケラタン硫酸放出増加にプロテインキナーゼ C が関与していることが明らかとなった。

以上今回の研究で、軟骨細胞表面にヒスタミン H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> 受容体が存在し、これらの受容体がケラタン硫酸あるいはプロテオグリカン産生におよぼす影響、さらには受容体を介した軟骨細胞の細胞内情報伝達機構が明らかになった。しかし、炎症や関節軟骨破壊には種々のサイトカインや成長因子さらに蛋白分解酵素など多数の物質が関与しており、それらの役割あるいはヒスタミン受容体との相互関係を解明していくことにより、その病態がより明らかとなり、さらに治療の進歩に結びつくものと思われる。

### 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34回日本リウマチ学会（平成2年5月29日、大阪）、第35回日本リウマチ学会（平成3年4月26日、東京）、第30回近畿大学医学部学術講演会（平成3年7月6日、大阪）において発表した。

### 文 献

1. Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM. Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 845-851.
2. Godfrey HP, Ilardi C, Engber W, Graziano FM. Quantitation of human synovial mast cell in rheumatoid arthritides and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 852-856.
3. Malon DG, Irani AM, Schwartz LB, Barrett KE, Metcalfe DD. Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritides. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 956-963.
4. Poubelle P, Damon M, Blotman F, Dayer JM. Production of mononuclear cell factor by mononuclear phagocytes from rheumatoid synovial fluid. *J Rheumatol* 1985; 12: 412-417.
5. Hopkins SJ, Humphreys M, Jayson MIV. Cytokines in synovial fluid. I. the presence of biologically active and immunoreactive IL-1. *Clin Exp Immunol* 1988; 72: 422-427.
6. Westacott CI, Whicher JT, Barnes IC, Thompson D, Swan AJ, Dieppe PA. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 676-681.
7. Ikebe T, Hirata M, Koga T. Human recombinant interleukin 1 $\alpha$ -mediated suppression of glycosaminoglycan synthesis in cultured rat costal chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140: 386-391.
8. Benton HP, Tyler JA. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154: 421-428.
9. Nietfeld JJ, Wilbrink B, Helle M, Roy JLAM. Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1695-1701.
10. Ash ASF, Schild HO. Receptor mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol* 1966; 27: 427-439.
11. Chand N, Dhawan BN, Srimal RC, Rahmani NH, Shukla RK, Altura BM. Reactivity of trachea, bronchi, and lung strips to histamine and carbachol in rhesus monkeys. *J Appl Physiol* 1980; 49: 729-734.
12. Siegel JN, Schwartz A, Askenase PW, Gershon RK. T-cell suppression and contrasuppression induced by histamine H<sub>2</sub> and H<sub>1</sub> receptor agonists, respectively. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 5052-5056.
13. Arbones L, Picatoste F, Garcia A. Histamine H<sub>1</sub>-receptors mediate phosphoinositide hydrolysis in astrocyte-enriched primary cultures. *Brain Research* 1988; 450: 144-152.
14. Mitsuhashi M, Payan DG. Characterization of functional histamine H<sub>1</sub>-receptors on a cultured smooth muscle cell line. *J Cellul Physiol* 1988; 134: 367-375.
15. 山根敏彦. コラーゲン関節炎マウスにおけるヒスタミン受容体保有リンパ球の免疫統御機構. *近大医誌* 1990; 15: 119-129.
16. 神谷正人. 骨髄移植とコラーゲン関節炎マウスにおける抑制効果. *近大医誌* 1991; 16: 75-88.
17. 永田行男. ヒト培養滑膜細胞におけるヒスタミンの役割. *近大医誌* 1991; 16: 127-138.
18. Taylor DJ, Woolley DE. Evidence for both histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>-receptors on human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 431-435.

19. Caterson B, Christner J, Baker S. Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratan sulfate. *J Biol Chem* 1983 ; 258 : 8848-8854.
20. Motoyoshi H, Tanaka S, Nagata Y, Yamasaki H, Fukuda K, Kita H. Age related alteration in levels of keratan sulfate in sera of orthopaedic patients. *J Jpn Orthop Assoc* 1989 ; 63 : 1464-1468.
21. Thonar EJ, Lenz ME, Klintworth GK et al. Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis Rheum* 1985 ; 28 : 1367-1376.
22. Fukuda K, Tanaka S, Motoyoshi H, et al. Serum keratan sulfate in rheumatoid arthritis. *Med Sci Res* 1990 ; 18 : 255-256.
23. 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. 柏崎慎夫監, 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.
24. Benya P, Padilla S, Nimni M. The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen type I III and type I trimer, but not type II. *Biochemistry* 1977 ; 16 : 865-872.
25. Kaibuchi K, Fukumoto Y, Oku N, et al. Activation of the Serum Response Element and 12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate Response Element by the Activated c-raf-1 Protein in a Manner Independent of Protein Kinase C. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 20855-20858.
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 ; 193 : 265-275.
27. Kato Y, Nomura Y, Daikuhara Y. et al. Cartilage-derived factor (CDF). *Exp Cell Res* 1980 ; 130 : 73-81.
28. Steiner AL, Kipnis DM, Utiger R, Parker C. Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate. *Proc Natl Acad Sci* 1969 ; 64 : 367-373.
29. Honma M, Satoh T, Takezawa J, Ui M. An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue. *Biochem Med* 1977 ; 18 : 257-273.
30. Khan MM, Wilson AL, Melmon KL. Characterization of histamine type 1 receptors on natural suppressor lymphoid cells. *Biochem Pharmacol* 1987 ; 22 : 3867-3871.
31. 加藤幸夫. 関節軟骨細胞. *関節外科* 1990 ; 9 : 増刊号 : 11-31.
32. Taylor DJ, Yoffe JR, Brown DM, Woolly DE. Histamine H<sub>2</sub>-receptors on chondrocytes derived from human, canine and bovine articular cartilage. *Biochem J* 1984 ; 225 : 315-319.
33. Kato Y, Koike T, Iwamoto M, et al. Effects of limited exposure of rabbit chondrocyte cultures to parathyroid hormone and dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate on cartilage-characteristic proteoglycan synthesis. *Endocrinology* 1988 ; 122 : 1991-1997.
34. Drezner MK, Neelon FA, Lebovitz HE. Stimulation of cartilage macromolecule synthesis by adenosine 3',5'-monophosphate. *Biochim Biophys Acta* 1976 ; 425 : 521-531.
35. 木下正彦. 軟骨細胞のサイクリック AMP 代謝, 細胞増殖および分化機能におよぼすプロスタグランジンの影響. *阪大歯学雑誌* 1985 ; 30 : 267-283.
36. Mitsuhashi M, Payan DG. Phorbol ester-mediated desensitization of histamine H<sub>1</sub>-receptors on a cultured smooth muscle cell line. *Life Sci* 1988 ; 43 : 1433-1440.
37. Nakahata N, Harden TK. Regulation of inositoltrisphosphate accumulation by muscarinic cholinergic and H<sub>1</sub>-histamine receptors on human astrocytoma cells. *Biochem J* 1987 ; 241 : 337-344.
38. Brown RD, Prendiville P, Cain C.  $\alpha_1$ -adrenergic and H<sub>1</sub>-histamine receptor control of intracellular Ca<sup>2+</sup> in a muscle cell line: The influence of prior agonist exposure on receptor responsiveness. *Mol Pharmacol* 1986 ; 29 : 531-539.
39. Subramanian N, Whitmore WL, Seidler FJ, Slotkin TA. Histamine stimulates brain phospholipid turnover through a direct, H-1 receptor-mediated mechanism. *Life Sci* 1980 ; 27 : 1315-1319.
40. Nishizuka Y. Studies and perspective of protein kinase C. *Science* 1986 ; 233 : 305-312.
41. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate. *Nature* 1983 ; 306 : 67-68.