

# 博士學位論文

ラット変形性関節症モデルの関節軟骨における  
c-fos, c-jun 発現の免疫組織学的研究

近畿大学医学部  
整形外科学教室  
宮崎 浩

# 博士學位論文

ラット変形性関節症モデルの関節軟骨における  
c-fos, c-jun 発現の免疫組織学的研究

平成 9 年 11 月

近畿大学医学部 整形外科学教室

(指導：田中清介教授)

宮崎 浩

# ラット変形性関節症モデルの関節軟骨における c-fos, c-jun 発現の免疫組織学的研究

近畿大学医学部整形外科学教室

宮 崎 浩

(指導 : 田中 清介 教授)

Immunohistochemical study of c-Fos, c-Jun protein in  
articular chondrocytes of rat osteoarthritis model

Hiroshi Miyazaki

Department of Orthopaedic Surgery,

Kinki University School of Medicine

(Director : Prof. Seisuke Tanaka)

## 抄 録

c-fos, c-jun 遺伝子は細胞増殖遺伝子として胎生期の関節や関節軟骨の発生に重要な役割を果たしている。また最近 c-fos 遺伝子が過剰発現すると関節軟骨の変性・破壊につながる可能性も報告されている。今回、ラット変形性関節症 (OA) モデルを作成し、関節軟骨の変性過程における c-fos, c-jun 蛋白の発現を免疫組織学的に検索した。その結果、c-fos, c-jun 蛋白は、ともに OA 誘発の 3 日目で全層に、1 週目で浅層から中間層に、2 週目で中間層の軟骨細胞核内および細胞質に発現し、4 週目では消失することがわかった。またサフラニン O (S-O) 染色による軟骨基質の染色性は、c-fos, c-jun の発現にともなって低下した。c-fos, c-jun 蛋白の発現がメカニカルストレスの異常に対応して OA 発症の初期に軟骨変性に先立ち強く認められたことは、c-fos, c-jun によって誘導された軟骨細胞の分裂増殖および幼若化が基質破壊につながる可能性を示唆する。

また、OA における protein kinase C (PKC) の役割と c-fos との関係を検討するために、PKC 活性化型ホルボールエステルである phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) を関節内に注入し、同様に c-fos 蛋白の発現を観察した。その結果、PMA 注入群では c-fos の発現が抑制され、S-O 染色性の低下は認められず、また OA の進行も明らかに抑制された。これは secondary messenger である PKC の活性化が tertiary messenger である c-fos の発現に抑制的に作用したこと、それにより結果的に軟骨基質が破壊から守られたことを示唆し、OA の発症と進行のメカニズムの一端が明らかにされたと考えられる。

Key Words : Chondrocyte, c-fos, c-jun, Osteoarthritis (OA), Articular cartilage,  
Immunohistochemistry

## 緒 言

関節軟骨は低摩耗性の組織で、関節運動を円滑に行い、また衝撃を吸収して骨への伝導を低減する作用がある。軟骨細胞は、軟骨基質の主たる構成成分である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、軟骨基質を合成するとともに分解にも関与している<sup>1</sup>。したがって、軟骨代謝に異常が生じると軟骨基質の合成も障害され、基質は変性し破壊される<sup>2</sup>。

OA は関節軟骨の破壊と修復が混在し、退行性変化と増殖性変化を特徴とする非炎症性の関節疾患である。従来、OA の発症機序は荷重関節における力学的負荷による軟骨の wear and tear と考えられてきた。近年、分子生物学の飛躍により、OA の研究分野では、プロテオグリカンやコラーゲンの構造解明に始まり、基質分解における各種酵素およびインターロイキンなどをはじめとする chemical mediators の作用も明らかにされつつある。しかし、それら様々の mediators が軟骨細胞内でどのような messenger system に働き影響を及ぼすかについては不明な点が多く残されていた。そこで今回、実験的 OA モデルを用い、まず核内最終 messenger である c-fos, c-jun 遺伝子の発現と関節軟骨変性との関連を、c-fos, c-jun 蛋白の軟骨組織内発現と S-O による基質染色性を比較し検討した。ついで、secondary messenger である PKC を活性化し、c-fos 蛋白発現および関節軟骨変性との関連と関節破壊への関与を検討した。

## 材料および方法

### 実験動物

生後 6 - 8 週齢 (体重 130-180g) の Wistar 系雄ラット (日本クレア株式会社, 大阪) を、1 週間以上予備飼育し、順調に発育したもの 40 匹を実験に供した。予備飼育期間、実験期間を通して室温  $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$  の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。

### OA モデルおよび組織標本の作製

#### OA 側

実験群のラットは、sodium pentobarbital (ネプタール<sup>®</sup>, ダイナボット, 大阪) 30-40mg/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, 大阪) およびポピドンヨード (イソジン<sup>®</sup>, 明治製菓, 東京) にて消毒後、膝蓋骨内側傍切開を行った。まず、内側側副靭帯を 3-4 mm 切除し、次いで内側半月板摘出と、前・後十字靭帯の切離を加えて動揺関節を作製した<sup>3, 4, 5</sup>。生理食塩水で関節内を洗浄後、5-0 ナイロンにて皮膚を縫合した。これを OA 側とした。

#### 対照側

左膝関節には、皮膚切開のみを加えたものを作成し、これを対照側とした<sup>6</sup>。

## PMA 注入側

強力な非特異的 PKC 賦活剤である phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma, St.Louis, MO) 1 mg を 1.6 ml の dimethyl sulfoxide (DMSO, 和光純薬) に溶解し, 1 mM の TPA stock solution を作成した. その 0.8  $\mu$ l を 500  $\mu$ l の生理的食塩水に溶解し, 20 匹のラットの手術側の膝関節腔内に術前 3 日, 術後 3 日, 10 日, 17 日, 24 日に注入した. そして何も注入していない関節の手術のみを行ったものを対照とした.

術後 3 日, 1, 2, 4 週に PMA 注入群, 非注入群の各々 5 匹ずつを, 0.2M リン酸 (pH7.4) 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) で灌流固定した後, 両膝関節をそれぞれ一塊として採取し, 膝関節を中心に肉眼的観察および組織学的検討を行った.

## 組織学的および組織化学的検討

### 組織学的検討

灌流固定後, 右膝関節の脛骨内側部の荷重部で最も圧迫を受けていた軟骨全層を含むように採取した軟骨小片を, 灌流固定に用いたのと同じ固定液で 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. そして, 5% EDTA-2 Na (和光純薬) で 4°C・1 週間脱灰した. 試料をクリオモールド 2 号 (ティシューテック®, Miles Inc, Elkhart, U. S) に O. C. T コンパウンド (Miles Inc) を満たした中に包埋し凍結させ, クリオスタットにて約 6  $\mu$ m 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 (H-E) 染色で, 軟骨基質におけるグリコサミノグリカンを S-O 染色で, 光学顕微鏡により観察した.

### 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<sup>7</sup>. そこで, H-E 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. Mankin<sup>8</sup>ら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薩摩ら<sup>9</sup>に従い, 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, 各側間の値の差は, student's t-test にて検定した.

### 免疫組織学的検討 (Avidin-biotin-peroxidase complex method, ABC 法)

作製した 6  $\mu$ m 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 X-100 (ナカライテスク, 大阪) を含む 0.01M phosphate-buffered saline (0.01M PBS-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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に室温・30分間浸漬し、0.01 M PBS-T で洗浄した。そして1.5%正常ウサギ血清と室温・20分間反応させた。第1抗体として c-fos および c-jun に対するモノクローナル抗体 (ONCOGENE SCIENCE, INC, NY, U. S) を200倍希釈し、これと室温・1時間反応させ、さらに0.01M PBS-T で10分間洗浄後、500倍希釈ビオチン化マウス抗ウサギ IgG 血清と室温・1時間反応させた。0.01MPBS-T で同様に洗浄した後、ELITE ABC 試薬 (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, U. S) で30分間反応させ0.01MPBS-T で洗浄した。これを DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tris buffer [3, 3' diaminobenzidine · 4 HCl (和光純薬) 20mg, 0.05M Tris 緩衝液75ml, 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>15 μl/100ml] で室温・5分間反応させ、蒸留水で洗浄後、エタノールで脱水、キシレンで透徹し、EUKITT® (O.Kinder GmbH & Co, Freiburg, Germany) にて封入した後、光学顕微鏡で観察した。対照としては、1次抗体に非免疫血清 (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標本を用いた。

## 結 果

### 肉眼的観察

#### 対照側

術後3日、1週、2週、4週ともに、対照側は何れの個体でも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。

#### OA 側

術後3日では、軟骨表面に変化は見られず、色調も正常であった。術後1週では、軟骨表面の光沢がやや失われていた。術後2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、滑膜は充血し浮腫状を呈し、関節面の光沢は失われていた。術後4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で著明に認められた。

### 組織学的所見

#### H-E 染色所見

##### 対照側

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。対照側では荷重部において術後4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 1-A).

#### OA 側

術後 3 日

対照側と比較して、組織学的には著明な変化を認めなかった (図 1-B).

術後 1 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認められた。また、表層では基質に対する細胞密度の増加が認められた (図 1-C).

術後 2 週

表層軟骨の剥離がみられるようになり、細胞数の減少と細胞の集簇傾向も認められた。また軟骨が軟骨下骨層にまで陥没している部分も認められた (図 1-D).

術後 4 週

浅層は消失し中間層の一部は減少した。また、タイドマークは不整であった。術後 2 週と同様に、軟骨が軟骨下骨層にまで陥没している部分も認められた (図 1-E).

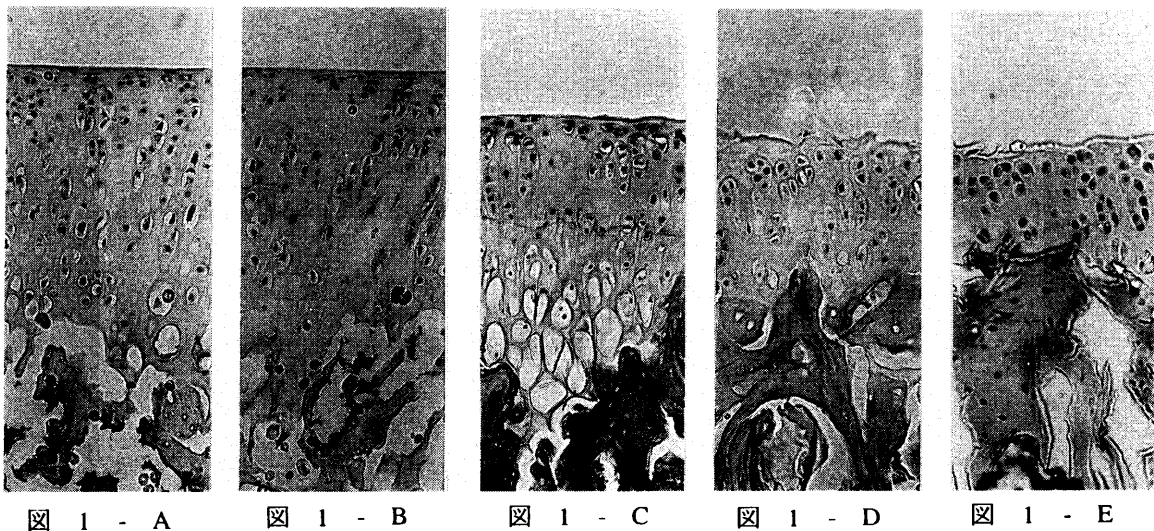


図 1 脛骨関節面荷重部の組織像 (H-E 染色×50)

図 1-A : 対照側 (術後 3 日)

図 1-B : 術後 3 日

図 1-C : 術後 1 週

図 1-D : 術後 2 週

図 1-E : 術後 4 週

## PMA 注入軟骨

### 術後 3 日

組織学的には著明な変化を認めなかった (図 2 -A).

### 術後 1 週

術後 3 日と同様に, 組織学的には著明な変化を認めなかった (図 2 -B).

### 術後 2 週

最表層は不整であり, 表層に近い部位では基質に対する細胞密度の増加が認められた (図 2 -C).

### 術後 4 週

最表層はさらに不整となり, 一部の細胞に集簇化が認められた (図 2 -D).

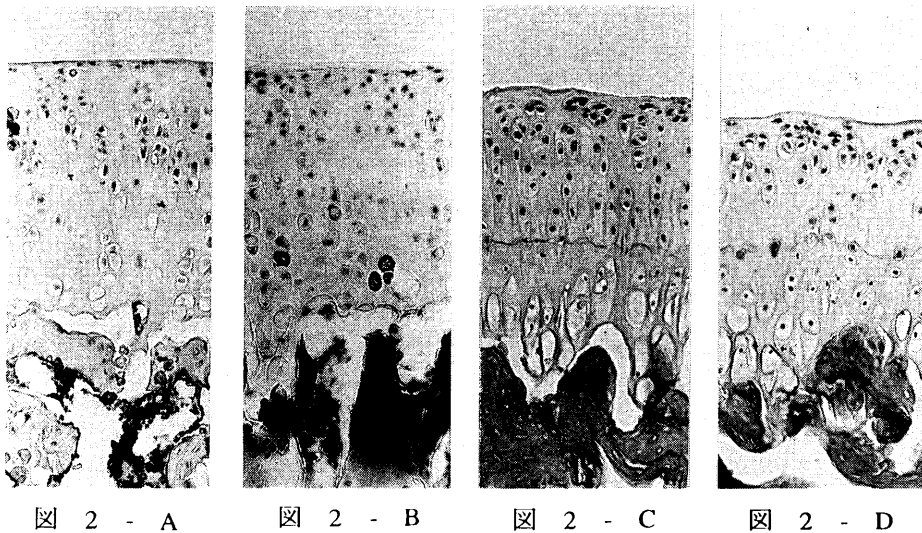


図 2 PMA 注入軟骨の脛骨関節面荷重部の組織像 (H-E染色×50)

図 2 -A : 術後 3 日

図 2 -B : 術後 1 週

図 2 -C : 術後 2 週

図 2 -D : 術後 4 週

## S-O 染色所見

### 対照側

S-O 染色標本において染色性は浅層, 中間層および深層で均一であり, 特に深層の細胞周囲・細胞外基質に強い染色性が認められた. また, 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 4 週に至るまで, これらの所見に変化は認められなかった.



OA 側

術後 3 日

表層の染色性が低下していた (図 3-B).

術後 1 週

表層から浅層における細胞数の増加にともなって、細胞外基質の染色性は不均一となり低下していた。また、深層におけるタイドマーク周辺部の細胞周囲・細胞外基質の染色性も低下していた (図 3-C)。

術後 2 週

中間層から深層で染色性の低下は抑えられたが、石灰化層での染色性の低下は一層著明となった (図 3-D)。

術後 4 週

浅層は消失して、軟骨の厚さは著明に減少した。しかし、深層における細胞周囲基質の染色性は強く認められた。石灰化層の幅は減少しつつあり、細胞周囲・細胞外基質の染色性も低下していた (図 3-E)。

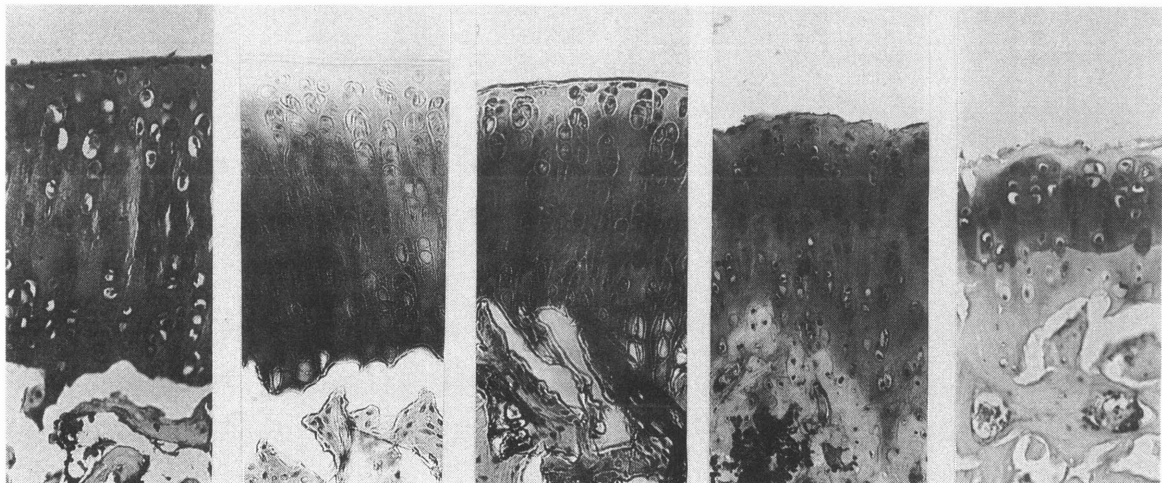


図 3 - A

図 3 - B

図 3 - C

図 3 - D

図 3 - E

図 3 脛骨関節面荷重部の組織像 (S-O 染色×50)

図 3-A : 対照側 (術後 3 日)

図 3-B : 術後 3 日

図 3-C : 術後 1 週

図 3-D : 術後 2 週

図 3-E : 術後 4 週

## PMA 注入軟骨

### 術後 3 日

染色性は浅層，中間層および深層まで均一であった（図 4-A）。

### 術後 1 週

術後 3 日と同様に，染色性は浅層，中間層および深層まで均一であった（図 4-B）。

### 術後 2 週

染色性は浅層で低下していた（図 4-C）。

### 術後 4 週

中間層では染色性は減少し，深層では細胞外基質の染色性も低下していた（図 4-D）。



図 4 - A

図 4 - B

図 4 - C

図 4 - D

図 4 PMA 注入軟骨の脛骨関節面荷重部の組織像（S-O染色×50）

図 4-A：術後 3 日

図 4-B：術後 1 週

図 4-C：術後 2 週

図 4-D：術後 4 週

## 関節軟骨変化の数値的評価

術後 3 日では，OA 側 $1.1 \pm 0.3$ （ $n=5$ ）であったが，PMA 注入側 $0.1 \pm 0.3$ 点（ $p < 0.01$ ）であった。1 週には，OA 側は $3.4 \pm 0.5$ 点と増加したが，PMA 注入側は $0.5 \pm 0.5$ 点（ $p < 0.01$ ）であった。術後 2 週になると，OA 側は $4.4 \pm 0.4$ 点であったが，PMA 注入側は $3.4 \pm 0.5$ 点（ $p < 0.01$ ）となり，4 週では OA 側は $7.8 \pm 0.7$ 点，PMA 注入側は $4.3 \pm 0.4$ 点（ $p < 0.01$ ）となり，各段階で OA の進行は PMA 注入によって有意に抑制された。（図 5）

表1 簡略化した組織学的・組織化学的評価基準

評価		評価	
<b>I. 構造</b>		<b>III. サフラニンOの基質染色性</b>	
a. 正常	0	a. 正常	0
b. 表面不整	1	b. 軽度減少	1
c. b+パンヌス	2	c. 中等度減少	2
d. 亀裂形成	3	d. 高度減少	3
e. 完全破壊	4	e. 消失	4
<b>II. 細胞</b>		<b>IV. タイドマーク</b>	
a. 正常	0	a. 正常	0
b. 瀰慢性細胞数増加	1	b. 血管交差	1
c. クローニング	2		
d. 細胞数減少	3		

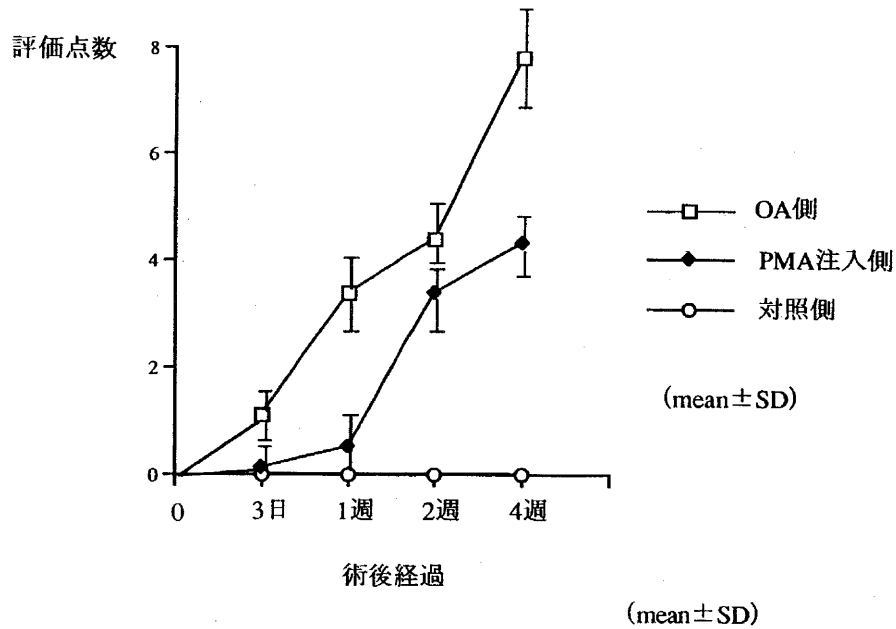


図5 簡略化した組織学的評価基準による関節軟骨変化の経時的点数評価

免疫組織染色所見

c-fos免疫染色

対照側

正常, 術後3日, 1週, 2週, 4週ともに, 全く c-fos 蛋白陽性細胞は認められなかった (図6-A).

OA側

術後3日

全層の軟骨細胞核内および細胞質に c-fos 蛋白の発現が認められた (図6-B).

術後1週

浅層から中間層まで発現を認めたが、特に分裂集簇傾向のある細胞に強く認めた (図6-C).

術後2週

浅層は消失し、残存する中間層の軟骨細胞に c-fos 蛋白の発現が認められた (図6-D).

術後4週

中間層の軟骨細胞もほぼ消失し、残存する深層軟骨細胞には c-fos 蛋白陽性細胞を認めなかった (図6-E).

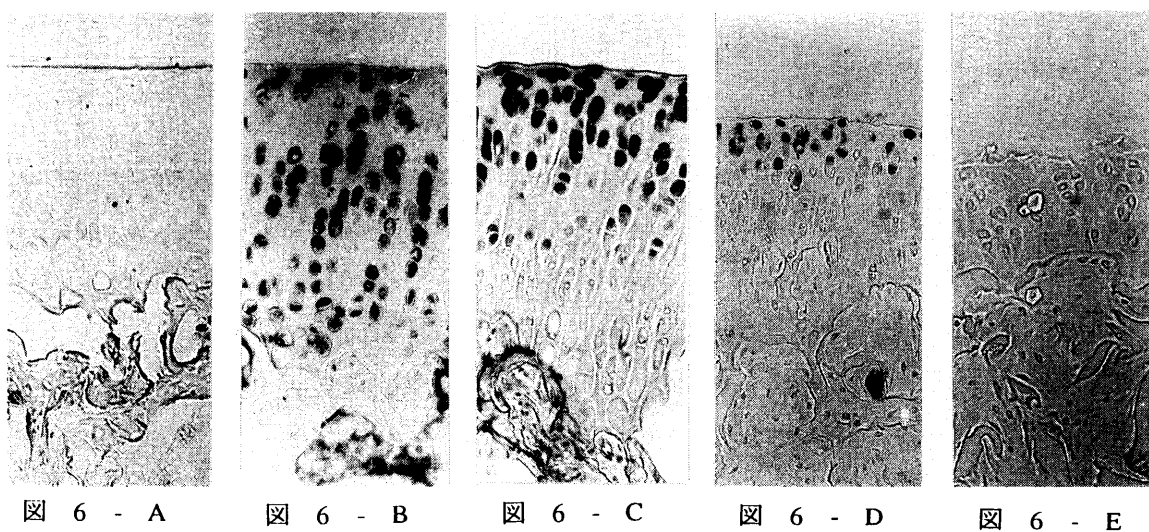


図6 c-fos 免疫組織染色所見 (ABC 染色×50)

図6-A : 対照側 (術後3日)

図6-B : 術後3日

図6-C : 術後1週

図6-D : 術後2週

図6-E : 術後4週

## PMA 注入軟骨

術後3日

浅層～中間層にかけて c-fos 蛋白の染色性を認めた (図7-A).

術後1週

浅層のみ c-fos 蛋白の染色性を認めた (図7-B).

術後2週

c-fos 蛋白の染色性は認められなかった (図7-C).

術後4週

術後2週と同様に c-fos 蛋白の染色性は認められなかった (図7-D).

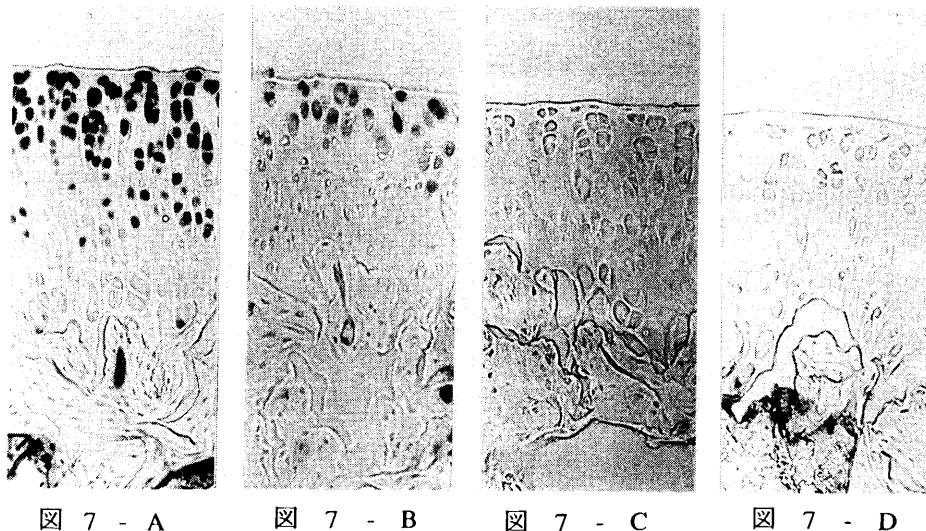


図7 PMA 注入軟骨の c-fos 免疫組織染色所見 (ABC 染色×50)

図7-A: 術後3日

図7-B: 術後1週

図7-C: 術後2週

図7-D: 術後4週

c-jun 免疫染色

対照側

正常, 術後3日, 1週, 2週, 4週ともに, 全く c-jun 染色陽性細胞を認めなかった (図8-A).

OA 側

術後3日

全層の軟骨細胞核内および細胞質に c-jun 蛋白の発現を認めた (図8-B).

術後1週

浅層から中間層まで c-jun 蛋白の発現を認めたが, 特に分裂集簇傾向のある細胞に強く認めた (図8-C).

術後2週

浅層は消失し、残存する中間層の軟骨細胞に c-jun 蛋白の発現を認めた。(図8-D).

術後4週

組織学的に術後4週では中間層もほぼ消失し、残存する深層軟骨細胞に c-jun 蛋白陽性細胞を認めなかった(図8-E).

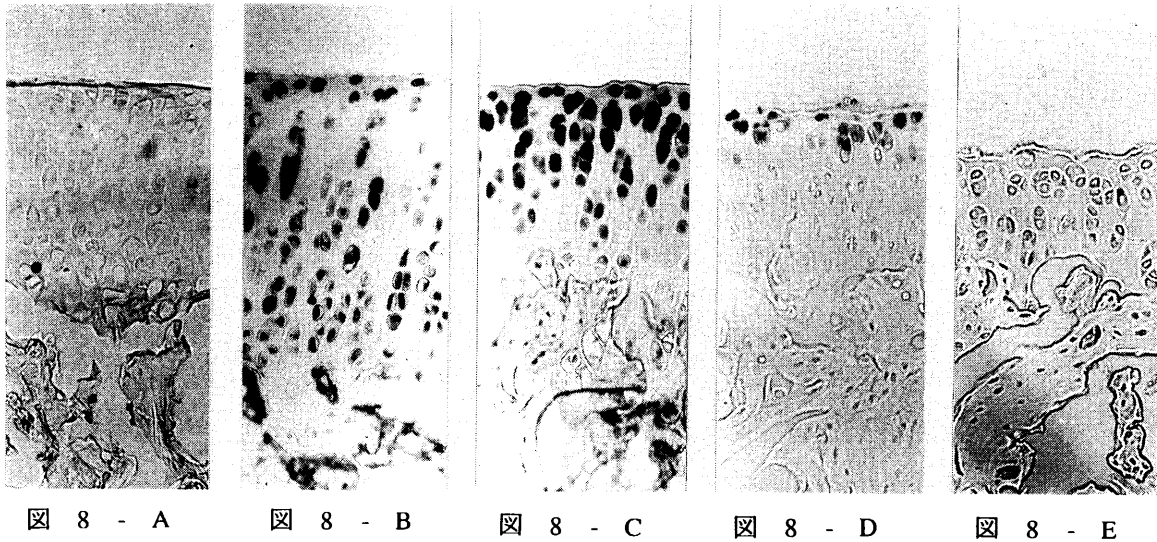


図8 c-jun 免疫組織染色所見 (ABC 染色×50)

図8-A : 対照側 (術後3日)

図8-B : 術後3日

図8-C : 術後1週

図8-D : 術後2週

図8-E : 術後4週

## 考 察

多細胞生物において、個々の細胞はその微小環境や外界の変化に応答して細胞内に遺伝子発現をきたす。そのひとつとして、細胞の増殖や分化を誘導する tumor promoting agents の刺激により、細胞はただちに超初期遺伝子群 (immediate early genes) と呼ばれる遺伝子群の一過性の発現をきたす<sup>10</sup>。今回検討した c-fos や c-jun は超初期遺伝子群に含まれており、これらの発現はエンハンサーである SRE (serum response element) を介して生じることが知られている<sup>11</sup>。c-fos および c-jun は、それぞれマウスに骨肉腫を起こす FBJ-MuSV、ならびにニワトリに線維肉種を起こす ASV17 のゲノム中に見出されたがん遺伝子、v-fos と v-jun の細胞染色体上の対応遺伝子として単離され、現在どちらの遺伝子もそれぞれ別の遺伝子ファミリーに属していることがわかっている<sup>12</sup>。また、c-fos, c-jun 遺伝子は細胞増殖遺伝子として胎生期の骨軟骨組織の分化発生に関与し<sup>13, 14</sup>、外的刺激に反応して最初に発現が誘導される

遺伝子群の代表と考えられている<sup>15, 16</sup>。c-fos, c-jun 遺伝子の産物である c-fos 蛋白, c-jun 蛋白は、ヘテロ 2 量体をつくり、DNA に結合し、転写活性因子 AP-1 として転写制御に関わっており<sup>17</sup>、これまでこれらの遺伝子は細胞増殖と関連すると考えられてきた。

当教室の西岡らは骨芽細胞 (HT-3 cell) にメカニカルストレスとして周期的牽引力を加え、その増殖および分化能の亢進が起こることを<sup>18</sup>、また斎藤らはこの際 c-fos が発現することを報告した<sup>19</sup>。戸谷らはウサギとラットの仮骨延長を行い仮骨形成モデルを作成し、c-fos の発現を mRNA レベルで検索した。仮骨形成部に伸長というメカニカルストレスを加えることにより、未熟骨へ移行する未分化間葉系細胞に c-fos が発現し、骨芽細胞への分化のみならず軟骨細胞の分化も惹起されると報告した<sup>20</sup>。これらのことから、本研究では、動揺関節による異常なメカニカルストレスが軟骨組織に c-fos, c-jun 蛋白の発現をもたらしたといえよう。

最近 c-fos 遺伝子が過剰発現すると関節軟骨の破壊につながる可能性が報告され、その発現が OA における軟骨変性になんらかの形で関与するのではないかという可能性が示唆された<sup>21, 22</sup>。すなわち、c-fos 発現が未熟軟骨細胞の増殖を促し基質の未熟さから関節破壊につながるという可能性<sup>21</sup>、あるいは c-fos 遺伝子の発現が蛋白分解酵素系の matrix metalloproteinases-3 (MMP-3) を活性化し、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) を不活性化することにより基質破壊を促し、関節破壊につながるという考えなどである<sup>22</sup>。また最近になり、c-fos 蛋白, c-jun 蛋白が肝細胞においてアポトーシス発現にも関与することが報告されており<sup>23</sup>、これが軟骨破壊に関与している可能性も考えられる。

しかし、これらは培養細胞を用いた *in vitro* の研究であり、変形性関節症の根本的な治療につながると期待される *in vivo* における軟骨基質の変性過程の動的変化を c-fos, c-jun 遺伝子の発現と関連させて観察した報告はこれまでなかった。そのため、本研究ではラット実験的関節症モデルを作製し、c-fos, c-jun 蛋白の関節内における経時的局在変化を免疫組織学的に観察した。また、軟骨基質量の指標であるサフラニン O 染色性から GAG の経時的局在変化を比較することにより、c-fos, c-jun 蛋白の軟骨代謝へ及ぼす影響を検討した。

その結果、動揺関節による異常なメカニカルストレスに対応して、c-fos, c-jun 蛋白の発現が軟骨破壊に先立ち強く認められた。また、c-fos, c-jun 蛋白の発現にともない、S-O の染色性が低下した。これらの結果は、c-fos, c-jun が軟骨細胞の分裂増殖を刺激する、また蛋白分解酵素系を介して直接プロテオグリカン (PG) の分解を刺激する、あるいはまた分裂増殖した軟骨細胞の中には散発的に他の細胞と比較して小さく核の濃縮を生じている様な像も認められ、これらがアポトーシスをきたしている可能性を示唆するものである。

軟骨変性の過程において、軟骨基質はその構成要素に動的な変化が生じていると考えられる。当教室の宮城らは、軟骨欠損を生じた場合、その周囲の関節軟骨細胞がメカニカルストレスに対応して欠損後 30 分で多量の nitric oxide (NO) や superoxide (SO) といったガスメディエーターを放出し、これらが関節軟骨の修復を妨げる危険因子として作用していると報告した<sup>24</sup>。宮城の報告と本研究から、PKC や c-fos, c-jun 蛋白発現の前に NO や SO が放出されていることが推測される。したがって、変形性関節症モデルにおけるメカニカルストレスにより、まず NO や SO が産生され、それにより PKC や c-fos,

c-jun が発現したと考えられる。

ついで、secondary messenger である PKC の変形性関節症発症と進行への関与と、PKC の c-fos 遺伝子への働きかけについて検討した。当教室の薩摩らは今回と同じラットを用いた実験的関節症モデルを作製し、PKC サブタイプの出現を観察している<sup>25</sup>。その結果、正常軟骨細胞には存在しない  $\alpha$ -PKC が、変形性関節症の術後 5 日目から浅層から中間層の軟骨細胞に出現し、中期には深層の集簇化した細胞においてその発現が認められた。一方、正常軟骨では浅層と中間層で認められる  $\epsilon$ -PKC は、関節症軟骨ではその発現量が正常軟骨に比し著明に亢進し、軟骨変性の進行とともに  $\alpha$ -PKC と同じように  $\epsilon$ -PKC の染色性も徐々に深層肥大細胞へと移動することを観察した。また、浜西らはウサギ OA モデルを作成し、今回の実験と同じように PMA を関節内に投与することにより、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報告した<sup>26</sup>。各種 PKC の中で変形性関節症の進行を防ぐ役割を主に果たしているものは、正常軟骨に存在し、変形性関節症の初期にその発現量が正常軟骨に比し著明に亢進する  $\epsilon$ -PKC であると考えられる。今回、ラット関節症モデルの膝関節内に PMA を注入して c-fos 蛋白の発現を観察したところ、PMA 注入群では非注入群と比較して c-fos の発現は抑制され、またウサギ関節症モデルと同じく変形性関節症の発症および進行は抑制された。これらは PKC の活性化、おそらく  $\epsilon$ -PKC の活性化と  $\alpha$ -PKC 活性の抑制が、c-fos 蛋白の発現を抑制し、結果的にプロテオグリカンが保たれて軟骨基質が保護され、メカニカルストレスによる軟骨破壊が緩和されたことを示唆している。

以上まとめると、OA の発症と進行のメカニズムとして、異常なメカニカルストレスが軟骨細胞より NO, SO を誘導し、軟骨細胞の PKC, 特に  $\alpha$ -PKC を活性化し、c-fos 蛋白、c-jun 蛋白を発現させ、軟骨組織を変性にいたらしめるものと考えられる。このように、今回の研究により変形性関節症の発症と進行のメカニズムの一端が明らかになった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた田中清介教授、また本研究を遂行するにあたって全般にわたり直接御指導、御助言を頂いた浜西千秋助教授、ならびに御協力いただいた教室の諸先生方に深謝致します。

本研究の要旨は第12回日本整形外科学会基礎学術集会（平成9年10月17日、新潟）において発表した。



## 文 献

1. Ehrlich MG, Houle PA, Vigliani G, Mankin HJ (1978) Correlation between articular cartilage collagenase activity and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 21 : 761-766
2. Dean DD, Pelletier JM, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JrJF (1989) Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 84 : 678-685
3. Hulth A, Lindberg L, Telhag H (1970) Experimental osteoarthritis in rabbits. *Acta orthop Scandinav* 41: 522-530
4. Telhag H, Lindberg L (1972) A method for inducing osteoarthritic changes in rabbits' knees. *Clin Orthop* 86 : 214-223
5. Telhag H (1972) Mitosis of chondrocytes in experimental "Osteoarthritis" in rabbits. *Clin Orthop* 86 : 224-229
6. 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
7. Rosenberg L (1971) Chemical basis the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 53-A : 69-82
8. 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
9. 薩摩 博 (1996) ラット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. *近畿大医誌* 21 : 209-220
10. Herschman HR (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 60 : 281-319
11. 吉田哲郎, 鈴木健之, 伊庭英夫 (1990) 増殖刺激に应答する癌遺伝子. *実験医学* 8 : 191-198
12. 伊庭英夫, 亀田隆, 村上政男 (1994) 細胞のトランスフォーメーションにおける AP-1 の機能. *実験医学* 12 : 822-828
13. Sandberg M, Vuorio T, Hirvonen H, Alitalo K, Vuorio E (1988) Enhanced expression of TGF- $\beta$  and c-fos mRNA in the growth plate of developing human long bones. *Development* 102 : 461-470
14. Sandberg M, Autio-Harmainen H, Vuorio E (1988) Localization of the expression of type I, III, and IV collagen, TGF- $\beta$  1 and c-fos genes in developing human calvarial bones. *Development Bio* 130 : 324-334
15. Greenberg ME, Ziff EB (1984) Stimulation of 3 T 3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311 : 433-438

16. Kruijer W, Cooper JA, Hunter T, Verma Im. (1984) Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature* 312 : 711-716
17. Chiu R (1988) Fos-associated cellular p39 is related nuclear transcription factor AP-1 • *Cell* 54 : 541-552
18. 西岡栄恵 (1993) 骨芽細胞における ALP 活性とその細胞内調節機構 : プロテインキナーゼ C の関与および周期的牽引の影響. *近畿大医誌* 18 : 149-161
19. 斎藤政克, 福田寛二, 西岡栄恵, 田中清介 (1993) 骨芽細胞に対する周期的牽引力の c-Fos 発現に対する影響. *日整会誌* 67 : 1614
20. 戸谷由樹 (1994) 仮骨延長における骨基質蛋白の遺伝子発現. *近畿大医誌* 19 : 553-572
21. Wroblewski J, Edwall-Arvidsson C (1995) Inhibitory effects of basic fibroblast growth factor on chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res* 10 : 735-742
22. Tsuji M, Funahashi S, Takigawa M, Seiki M, Fujii K, Yoshida T (1996) Expression of c-fos gene inhibits proteoglycan synthesis in transfected chondrocyte. *FEBS Letters* 381 : 222-226
23. Hu L, Hatano M, Ruether U, Tokuhisa T (1996) Overexpression of c-Fos induces apoptosis of CD43<sup>+</sup> pro-B cells. *J Immunol* 3804-3811
24. 宮城 一郎 (1996) ウサギ関節軟骨欠損とフリーラジカル. *近畿大医誌* 21 : 249-262
25. Satsuma H, Saito N, Hamanishi C, Hashima M, Tanaka S (1996) Alpha and epsilon isozymes of protein kinase C in the chondrocytes in normal and early osteoarthritic articular cartilage. *Calcif Tissue Int* 58 : 192-194
26. Hamanishi C, Hashima M, Satsuma H, Tanaka S (1996) Protein kinase C-activator inhibits progression of osteoarthritis induced in rabbit knee joints. *J Clin Lab Med* 127 : 540-544