

博士學位論文

Zymosan 誘発関節炎モデルおよび自然飼育加齢モデルマウスにおけるレクチン様酸化 LDL 受容体 - 1 (Lectin-like Oxidized LDL receptor-1, LOX-1) の役割：ノックアウトマウスを用いた研究

近畿大学大学院
医学研究科医学系専攻
小田豊

博士學位論文

Zymosan 誘発関節炎モデルおよび自然飼育加齢
モデルマウスにおけるレクチン様酸化 LDL 受容体 - 1
(Lectin-like Oxidized LDL receptor-1, LOX-1) の
役割：ノックアウトマウスを用いた研究

平成 25 年 12 月

近畿大学大学院医学研究科
医学系専攻(指導:赤木将男 教授)

小 田 豊

Zymosan 誘発関節炎モデルおよび自然飼育加齢モデルマウスにおける レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (Lectin-like Oxidized LDL receptor-1, LOX-1) の役割：ノックアウトマウスを用いた研究

近畿大学医学部整形外科学教室

小 田 豊

(指導：赤木 将男 教授)

Roles of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in zymosan-induced arthritis and cartilage degeneration with aging: A study using LOX-1 knockout mice

Yutaka Oda

Department of Orthopaedic Surgery,

Kinki University School of Medicine

(Director : Prof. Masao Akagi)

抄 録

血管内皮の酸化低比重リポ蛋白 (LDL) 受容体として同定されたレクチン様酸化 LDL 受容体-1 (Lectin-like Oxidized LDL receptor-1, LOX-1) が軟骨細胞にも発現することが示され, LOX-1/酸化 LDL 系と関節症の関連が示唆されている. しかし, LOX-1 ノックアウト (KO) マウスを用いてこれを *in vivo* で証明した報告はない. KO および C57BL 野生型 (WT) マウスに Zymosan 誘発関節炎を作製し, 炎症細胞浸潤, 滑膜過形成, 軟骨変性を組織学的に評価した. また同様のマウスを長期自然飼育し, 9 週, 6, 12, 18 ヶ月で膝関節を摘出し加齢に伴う組織学的変化を評価した. 炎症細胞浸潤は Zymosan 投与 1 日後, 滑膜過形成は 3, 7 日後, 軟骨変性は 7 日後において KO で抑制が認められた. 免疫染色では WT マウスの滑膜細胞, 軟骨細胞において LOX-1 の発現, 酸化 LDL の局在が認められた. 長期自然飼育加齢モデルでは 12, 18 ヶ月において KO で軟骨変性は抑制されており, WT マウスにおいて LOX-1, 酸化 LDL の陽性細胞率は軟骨変性の進行と共に増加し, これらの間には有意な正の相関を認めた. 本研究により LOX-1 および酸化 LDL が滑膜への炎症細胞浸潤, それに引き続く滑膜過形成および軟骨変性, そして軟骨の加齢変性に関与している可能性が示された.

Keywords : oxidized LDL (Ox-LDL), lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1), Zymosan-induced arthritis, synovitis, cartilage degeneration, aging

諸 言

血管内皮細胞における酸化低比重リポ蛋白 (LDL) の受容体としてクローニングされたレクチン様酸化低比重リポ蛋白受容体-1 (lectin-like oxidized-low density lipoprotein receptor-1, 以下 LOX-1) が軟骨細胞にも発現していることが示され, LOX-1/酸化 LDL 系と軟骨変性との関連が示唆されてきた¹⁻⁵. LOX-1 は IL-1 β , IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインや機械的ストレス, リガンドである酸化 LDL 自身によって発現が亢進し, 酸化 LDL とともに動脈硬化症の発症および進展に関与していることが示されている受容体である⁶⁻⁹.

Nakagawa らは, ラット実験的関節炎モデルの軟骨細胞組織において LOX-1 が発現し酸化 LDL が局在していること, 抗 LOX-1 モノクローナル抗体の投与により滑膜炎および軟骨変性が抑制されることを示した². さらに, LOX-1 と酸化 LDL の結合はラット培養軟骨細胞において PI3 kinase (PI3k) /Akt 経路の抑制により細胞活性を低下させ非アポトーシス細胞死を誘導することを示した¹⁰. 当教室では, ウシ培養軟骨細胞において, 酸化 LDL と LOX-1 の結合が細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species, 以下 ROS) を発生させ NF- κ B を活性化すること, ヒト OA 軟骨において LOX-1 が発現し酸化 LDL が局在すること, これらの局在と軟骨変性度が良く相関することを示した. さらに, 血管内皮増殖因子 (VEGF) や単球走化性因子蛋白-1 (MCP-1) 発現を亢進させること, 軟骨細胞の分化を促進し肥大軟骨細胞様形質を誘導することを示してきた^{4, 11-14}. さらに, ウシ培養軟骨細胞系を用いて LOX-1 と酸化 LDL の結合はテロメラーゼ活性を抑制し細胞老化を促進すること, ストレス誘発性細胞老化を生じることを報告し, 加齢による軟骨細胞の老化変性にも LOX-1/酸化 LDL 系が関与する可能性を示した¹⁵. 近年, ヒト関節リウマチ (RA) の軟骨細胞において LOX-1 の発現が認められ, 酸化 LDL 刺激によりマトリックスメタロプロテアーゼ-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3) 発現が亢進すること, ヒト RA 滑膜細胞において LOX-1 の発現が認められ, 酸化 LDL の刺激により MMP-1, 3 の産生が亢進されることが示されている^{3, 16}.

本研究では, LOX-1 ノックアウトマウス (KO) を用いて, 亜急性関節炎における LOX-1 の役割を in-vivo で検討した. すなわち, KO が関節内への炎症細胞浸潤, 滑膜過形成, 軟骨変性を抑制できるかどうかを, Zymosan 誘発関節炎を用いて検討した. Zymosan は酵母菌の細胞壁から抽出した β -グルカンであり, 補体副経路を活性化し, Zymosan を貪食したマクロファージは活性化する. 活性化したマクロファージは IL-1 を産生し, ライソソーム酵素や活性酸素 (ROS) を放出し, 血管透過性亢進, 白血球浸潤を引き起こすとされている^{17, 18}. Zymosan を関節内投与すると, 上記のような機序にて亜急性の滑膜炎, 滑膜過形成, 軟骨変性を引き起こし, これらの変化は RA 関節症変化と類似している¹⁷. LOX-1 は血管内皮細胞に発現し, 白血球のローリング, 接着, 血管内皮細胞下への浸潤に重要な作用があることが示されている¹⁹. また, 前述の如く LOX-1 は炎症性サイトカインや酸化 LDL により軟骨細胞での発現が亢進し, 関節炎および軟骨変性を促進する可能性が示されている. 我々は RA に類似した亜急性関節炎における LOX-1 の役割を検討するため, Zymosan 誘発関節炎を用いた. さらに, マウスは通常環境で長期飼育を行うことにより膝関節に変形性関節症 (OA) 様変化を生じることが知られている^{20, 21}. そこで, 加齢性軟骨変性を基盤とする OA における LOX-1 の役割を in-vivo で検討する目的で, KO の長期自然飼育を行ない, KO と野生型 (WT) マウスとで軟骨組織を比較した. また, 野生型マウスにおいて軟骨変性と酸化 LDL の局在および LOX-1 発現の関連を組織学的に検討した.

本研究は, LOX-1 KO マウスを用いて LOX-1/酸化 LDL 系の関節炎における滑膜炎, 軟骨変性への関与,

および、加齢による軟骨変性への関与を検討した最初の報告である。

方 法

1) 実験動物

実験動物として雄の野生型 C57BL6/Jcl マウス（日本クレア社，東京，WT マウス）と雄の LOX-1 遺伝子欠損マウス（遺伝的背景は C57BL6，KO マウス）を使用した。KO マウスはリガンド結合に必須であるレクチン様ドメインをコードするエクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換するターゲティングベクターを設計し作製された²²。Zymosan 誘発関節炎モデルには上記マウス 9 週齢のものを使用した。KO マウスは国立循環器センター沢村達也先生のご好意により提供されたものを近畿大学医学部実験動物施設で繁殖して用いた（ホモ同士の交配，兄妹交配）。全ての実験は近畿大学医学部実験動物取扱規約を遵守して行われた。

2) Zymosan 誘発関節炎モデルマウス

WT マウス 9 週齢 雄および KO マウス 9 週齢 雄をソムノペンチル（シェリング・プラウ アニマルヘルス社 ペントバルビタールナトリウム 16.2mg/0.25ml）腹腔内投与による全身麻酔を行った。尖刃刀にて右膝蓋骨傍切開にて皮切を加えた。膝蓋腱外側から 30 ゲージ針，10 μ l シリンジを用いて Zymosan（Sigma, St. Louis, MO, 180 μ g/6 μ l）を関節内注射後，皮膚を 7-0 ナイロンにて縫合した。対照として同様の方法にて左膝関節に生理食塩水（6 μ l）を関節内注射した。

関節内注射後 1 日後，3 日後，7 日後に屠殺，両膝関節を採取した（各 n =10）。

3) 自然飼育マウス

WT マウスおよび KO マウスを一定条件下（同一ケージ内，室温 22 \pm 1 $^{\circ}$ C 湿度 50 \pm 10% 飼料 日本クレア社 CE-2）にて長期飼育を行い，9 週齢，6 ヶ月，12 ヶ月，18 ヶ月で屠殺し膝関節を採取した（各 n=10）。

4) 組織学的検討

両側膝関節は 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を用いて固定した（4 $^{\circ}$ C，24 時間）。組織標本は 10%EDTA（pH7.4）にて脱灰（4 $^{\circ}$ C，2 週間）した後，高濃度エタノールにて脱水した。パラフィンブロックとした標本をパラフィン用滑走式マイクロームにて約 4 μ m の連続切片として切り出した。切り出しは大腿骨内側顆荷重部矢状方向とした。切片は脱パラフィン後，HE 染色，サフラニン O 染色を行い，滑膜炎細胞浸潤，滑膜過形成，軟骨変性程度を評価した。

Zymosan 誘発関節炎モデルにおけるスコアリングは以下の如く行った。中川らのスコアリング方法²に従って評価した。

滑膜炎細胞浸潤

- 0= 正常
- 1= 微増
- 2= 軽度
- 3= 中等度
- 4= 重度

滑膜過形成（表層細胞の重層化）

- 0= 正常滑膜
- 1= 微弱，滑膜表層重層化，わずかな層構造を呈するもの
- 2= 軽度，滑膜表層重層化，いくらかの層構造を呈するもの
- 3= 中等度，滑膜表層重層化，不明瞭な層構造を呈するもの
- 4= 重度，滑膜表層重層化，完全に不明瞭な層構造を呈するもの

軟骨変性度

- 1= 正常
- 2= 表層のみサフラニン O 染色低下
- 3= 深層までサフラニン O 染色低下
- 4= サフラニン O 染色が完全に失われたもの

軟骨変性のスコアリングについては，内側大腿骨および脛骨関節面の点数を合計した。

自然飼育マウスにおけるスコアリングは国際関節症学会（OARSI）の定めたマウス軟骨組織変性評価スコアを用いた²³。本評価法は平均変性スコアと最大変性スコアからなり，平均変性スコアとは最大変性部位と最少変性部位との平均値をとったものである。スコア法は以下に示す。

- 0 = 正常
- 0.5 = 構造上の変化はなく，サフラニン O 染色の低下のみ
- 1 = 軟骨欠損がなく，軟骨表面のわずかな線維化のみ
- 2 = 縦方向への浅層下への亀裂と微細な表層の欠損
- 3 = 石灰化軟骨層への縦方向の亀裂，びらんが関節表層の 25% 未満
- 4 = 石灰化軟骨層への縦方向の亀裂，びらんが関節表層の 25% 以上 50% 未満
- 5 = 石灰化軟骨層への縦方向の亀裂，びらんが関節表層の 50% 以上 75% 未満
- 6 = 石灰化軟骨層への縦方向の亀裂，びらんが関節表層の 75% 以上

5) 免疫組織学的検討

Vectastain ABC kits (Vector, Burlingame, USA) のプロトコールに従い免疫染色を行った。脱パラフィン後のマウス膝切片を用いて、LOX-1 および酸化 LDL の免疫染色を行った。3% 過酸化水素による前処理 10 分の後、2% 正常ヤギ血清を用いてブロッキングを行った (室温, 40 分)。一次抗体は抗 LOX-1 ラビット・ポリクローナル抗体 (abcam 社, 濃度 1 : 500, 1 % BSA 含有 PBS に溶解) および酸化 LDL (MILLIPORE 社, 濃度 1 : 500, 1 % BSA 含有 PBS に溶解) を 4℃, 24 時間反応させた。PBS 洗浄後 (5 分 × 3 回), 二次抗体 (Vector, ビオチン標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体, 室温 30 分) を反応させ, PBS 洗浄後 (5 分 × 3 回), アビジン / ビオチン標識ペルオキシダーゼ混合液 (Vector, 室温, 30 分) を反応させた。PBS 洗浄後 (5 分 × 3 回), DAB (Vector) にて発色, 続いてヘマトキシリン液 (和光純薬工業, 大阪) にて核染色を行った。

6) 軟骨細胞における LOX-1, 酸化 LDL の陽性細胞数

最も変性の進んだ部位の軟骨組織 (内側大腿骨, 脛骨顆部) において一定領域内 (顕微鏡拡大率 400 倍画像内の大腿骨関節面および脛骨関節面軟骨組織における軟骨細胞) の LOX-1 および酸化 LDL の陽性細胞数をカウントし, 軟骨変性度と相関するかを検討した。

7) 統計解析

各データは平均値 ± 標準偏差 (平均 ± 標準偏差) で表記し, 平均値の有意差検定には Student's t-test (unpaired) を用いた。LOX-1 および酸化 LDL の陽性細胞率と OARSI スコアによる軟骨変性度との相関はピアソンの相関係数を用いて検討した (Excel 2010, 日本マイクロソフト, 東京)。

結 果

1. Zymosan 誘発関節炎モデルにおける関節炎スコア

HE 染色およびサフラニン O 染色を各実験群において行った。顆間部滑膜において炎症細胞浸潤および滑膜過形成を, 大腿骨および脛骨の内側顆部関節軟骨において軟骨変性を組織学的に評価した。WT マウス, KO マウス共に Zymosan 投与 1 日後において滑膜への炎症細胞浸潤が最も顕著であったが, KO マウスにおいて抑制される傾向があった (図 1A, B)。Zymosan 投与 1 日後の炎症細胞浸潤スコア (平均 ± 標準偏差) は, WT マウス 3.5 ± 0.97 に対し KO マウス 2.5 ± 0.97 で, KO マウスにおいて有意に低値であった (図 1C, * $p < 0.05$, $n=10$)。Zymosan 投与 3 日, 7 日後において炎症細胞浸潤は軽減傾向にあり, WT マウスと KO マウスに差は無かった (図 1C)。コントロールの生食投与群では WT マウス, KO マウスともに炎症細胞浸潤は認められなかった (図 1D ~ F)。滑膜過形成については WT マウス, KO マウスともに経時的に増悪の傾向があり, KO マウスにて抑制される傾向があった (図 2A-D)。滑膜過形成スコア (平均 ± 標準偏差) は, 関節内注射 3 日後において WT マウス 2.9 ± 0.74 に対して KO マウス 2.1 ± 0.87 であり (図 2E, * $p < 0.05$, $n=10$), 7 日後において WT マウス 3.4 ± 0.70 に対して KO マウス 2.3 ± 1.15 で, KO マウスにおいて有意に低値であった (図 2E, ** $p < 0.02$, $n=10$)。コントロールの生食群では WT マウス, KO マウスともに滑膜過形成は認められなかった (図 2F ~ J)。軟骨変性については WT マウスにおいて経時的にサフラニン O の染色性の低下が

進行する傾向があったが、KO マウスでは染色性の低下に大きな変化はなかった (図 3A, B). 軟骨変性スコア (平均 ± 標準偏差) は7日後において WT マウス 2.4 ± 0.94 に対して KO マウス 1.6 ± 0.59 であり, KO マウスにおいて有意に低値であった (図 3C, * $p < 0.003$, $n=10$). コントロールの生食投与群では WT マウス, KO マウスともにサフラニン O の染色性の低下は認められなかった (図 3D ~ F).

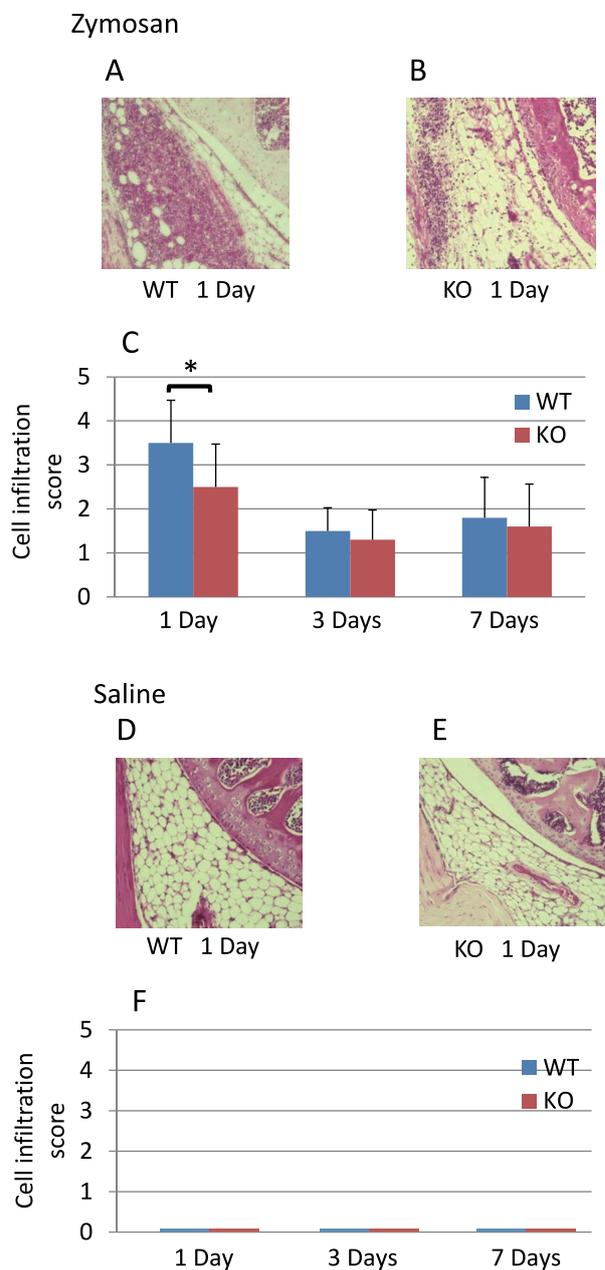


図 1. HE 染色による滑膜炎細胞浸潤の組織学的評価.

(A), (B) それぞれ WT マウス, KO マウスの Zymosan 投与 1 日後の HE 染色を示す (×200). KO マウスにおいて滑膜炎細胞浸潤は抑制されている.

(C) Zymosan 投与 1, 3, 7 日後の炎症細胞浸潤スコアを WT マウスと KO マウスで比較した. Zymosan 投与 1 日後における KO マウスのスコアは有意に低値であった (エラーバーは標準偏差を示す. $n = 10$, Student's t-test, * $p < 0.01$).

(D), (E) それぞれ WT マウス, KO マウスの生食投与 1 日後の HE 染色を示す (×200). 滑膜炎細胞浸潤は認められない.

(F) コントロールとして生食投与 1 日後, 3 日後, 7 日後の WT マウス, KO マウススコアを評価した. スコアは全例 0 点であった.

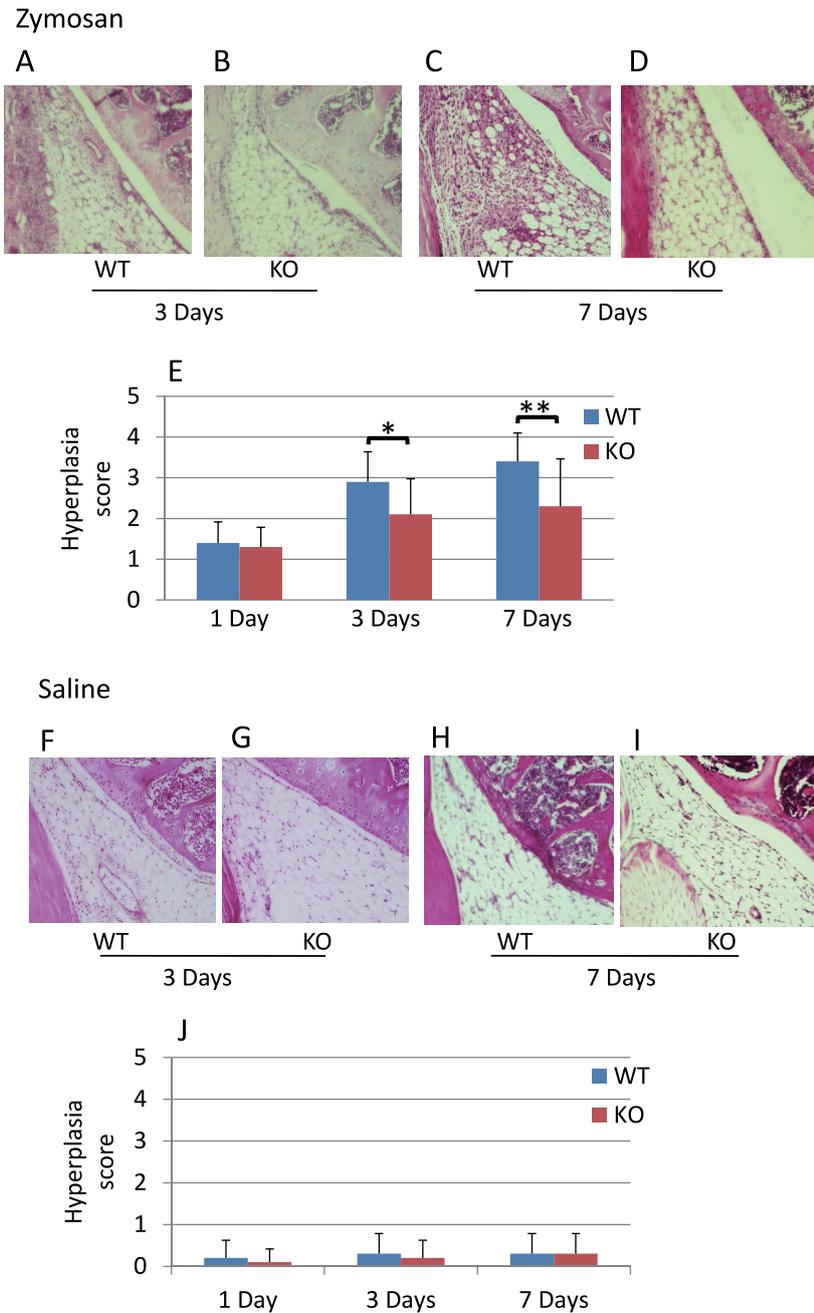


図2. HE染色による滑膜過形成（表層細胞の重層化）の組織学的評価.

(A) ~ (D) それぞれ WT マウス, KO マウスの Zymosan 投与 3, 7 日後の HE 染色を示す ($\times 200$). KO マウスでは滑膜の過形成が抑制されている.

(E) Zymosan 投与 1, 3, 7 日後のスコアを WT マウス, KO マウスで比較した. Zymosan 投与 3, 7 日後において KO マウスのスコアが有意に低値であった (エラーバーは標準偏差を示す. $n = 10$, Student's t-test, $*p < 0.04$, $**p < 0.02$).

(F) ~ (I) それぞれ WT マウス, KO マウスの生食投与 3, 7 日後の HE 染色を示す ($\times 200$). 滑膜過形成はほとんど認められない.

(F) コントロールとして生食投与 1 日後, 3 日後, 7 日後の WT マウス, KO マウススコアを評価した. スコアはいずれも低値で有意差を認めない.

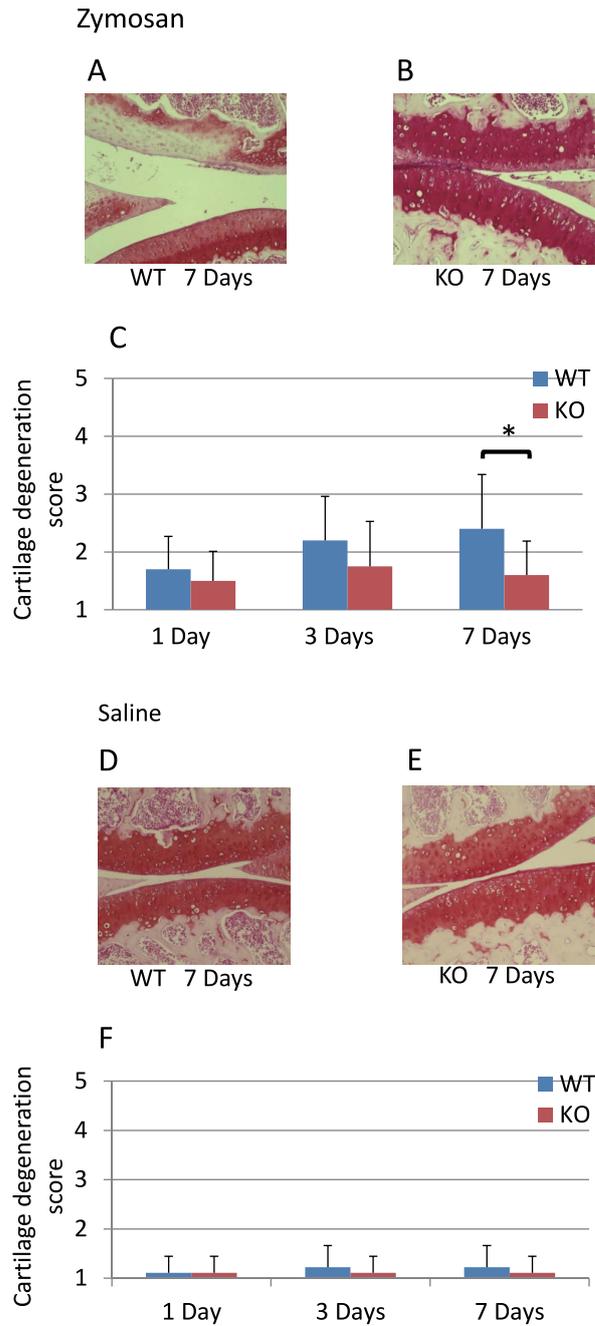


図3. サフラニンO染色による軟骨変性の組織学的評価.

(A), (B) それぞれ WT マウス, KO マウスの Zymosan 投与 7 日後のサフラニンO染色を示す (×200). KO マウスにおいては軟骨変性 (サフラニンOによる染色性の低下) が抑制されている.

(C) Zymosan 投与 1, 3, 7 日後のスコアを WT マウス, KO マウスで比較した. Zymosan 投与 7 日後において KO マウスのスコアが有意に低値であった (エラーバーは標準偏差を示す. n = 10, Student's t-test, *p<0.02)

(D), (E) それぞれ WT マウス, KO マウスの生食投与 7 日後のサフラニンO染色を示す (×200). 特にサフラニンOの染色性に变化を認めない.

(F) コントロールとして生食投与 1, 3, 7 日後の WT マウス, KO マウススコアを評価した. スコアはいずれも低値で有意差を認めない.

2. Zymosan 誘発関節炎モデルにおける LOX-1 の発現および酸化 LDL の局在と軟骨変性スコアの関連

軟骨細胞, 滑膜細胞, 滑膜血管内皮細胞における LOX-1 の発現, 酸化 LDL の局在を免疫染色により評価した。

軟骨細胞: WT マウスにおいては, Zymosan 投与群の軟骨細胞において Zymosan 関節内注射 1 日後より LOX-1, 酸化 LDL の染色性が認められ, 3 日後, 7 日後と軟骨変性の増悪と共に陽性細胞数は増加していた。また, LOX-1, 酸化 LDL の染色性は肥大分化した軟骨細胞に多く認められる傾向があった (図 4A, B 上段)。WT マウス生食群では LOX-1, 酸化 LDL ともに染色性は認められなかった (図 4A, B 下段)。KO マウスの Zymosan 群および生食群においては LOX-1, 酸化 LDL 共に染色性は認められなかった (図 4C, D)。

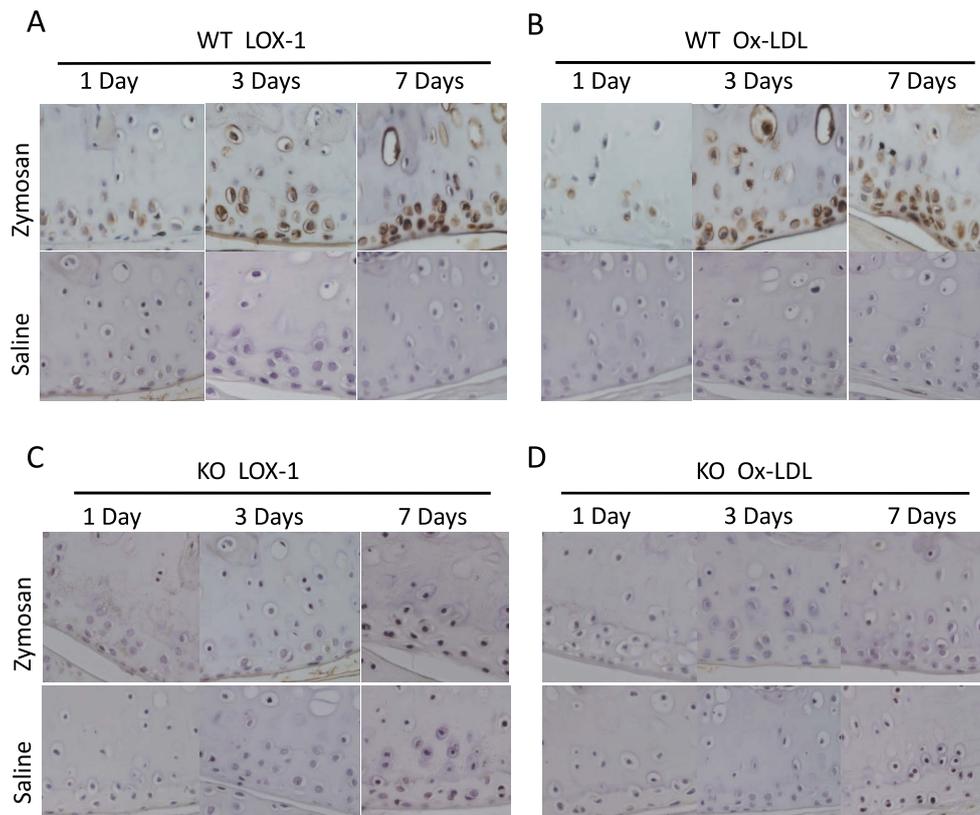


図 4. 関節軟骨変性部分における LOX-1, 酸化 LDL の免疫染色.

(A), (B) WT マウスの軟骨細胞における LOX-1 および酸化 LDL の免疫染色. 上段: Zymosan 投与群, 下段: 生食投与群 ($\times 400$). Zymosan 投与 1 日後より, わずかに LOX-1 の発現, 酸化 LDL の存在が認められ, 3, 7 日後と軟骨変性が進行するとともに陽性細胞は増加する傾向にあった. コントロールの生食投与群では陽性細胞は認められなかった.

(C), (D) KO マウスの軟骨細胞における LOX-1 および 酸化 LDL の免疫染色, 上段: Zymosan 投与群, 下段: 生食投与群を示す ($\times 400$). KO マウスでは染色性は認められなかった.

滑膜細胞：WT マウスにおいては，Zyosan 関節内注射 1 日後より滑膜細胞の LOX-1，酸化 LDL 染色性が認められ，3 日後，7 日後も同様に認められた（図 5A，B 上段）．生食投与群では LOX-1，酸化 LDL 染色性は認められなかった（図 5A，B 下段）．KO マウスにおいては Zyosan および生食投与群のいずれにおいても LOX-1，酸化 LDL の染色性は認められなかった（図 5C，D）．

滑膜血管内皮細胞：WT マウス Zyosan 投与群 1 日後の滑膜血管内皮細胞において LOX-1 発現の亢進が認められ，3，7 日後も同様に認められた．（図 6A 上段）．WT マウス 生食投与群，KO マウス群では滑膜血管内皮細胞の LOX-1 発現を認めなかった（図 6A 下段，図 6B）．

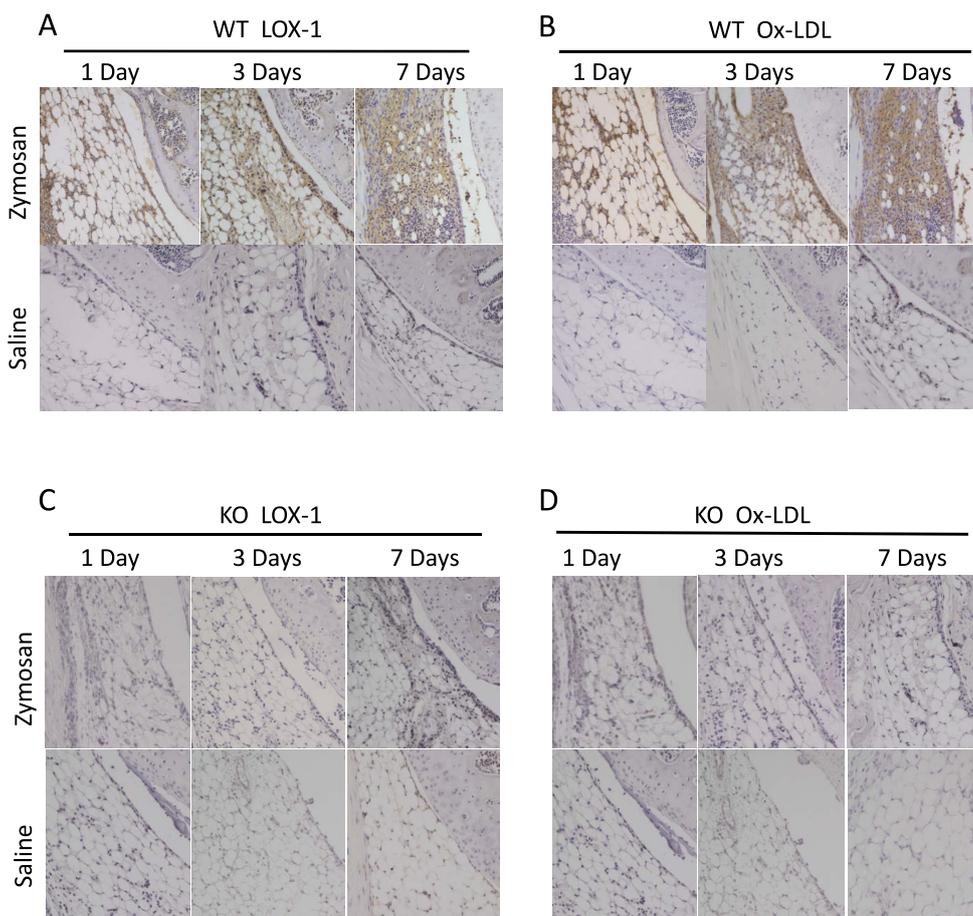


図 5. 滑膜表層細胞における LOX-1 および酸化 LDL の免疫染色.

(A)，(B) WT マウスの滑膜細胞における LOX-1 および酸化 LDL の免疫染色．上段：Zyosan 投与群，下段：生食群（ $\times 200$ ）．Zyosan 投与 1 日後より，LOX-1 の発現，酸化 LDL の存在が認められ，3，7 日後も同様に認められた．コントロールの生食投与群では陽性細胞は認められなかった．

(C)，(D) KO マウスの滑膜細胞における LOX-1 および酸化 LDL の免疫染色．上段：Zyosan 投与群，下段：生食群を示す（ $\times 200$ ）．KO マウスでは染色性は認められなかった．

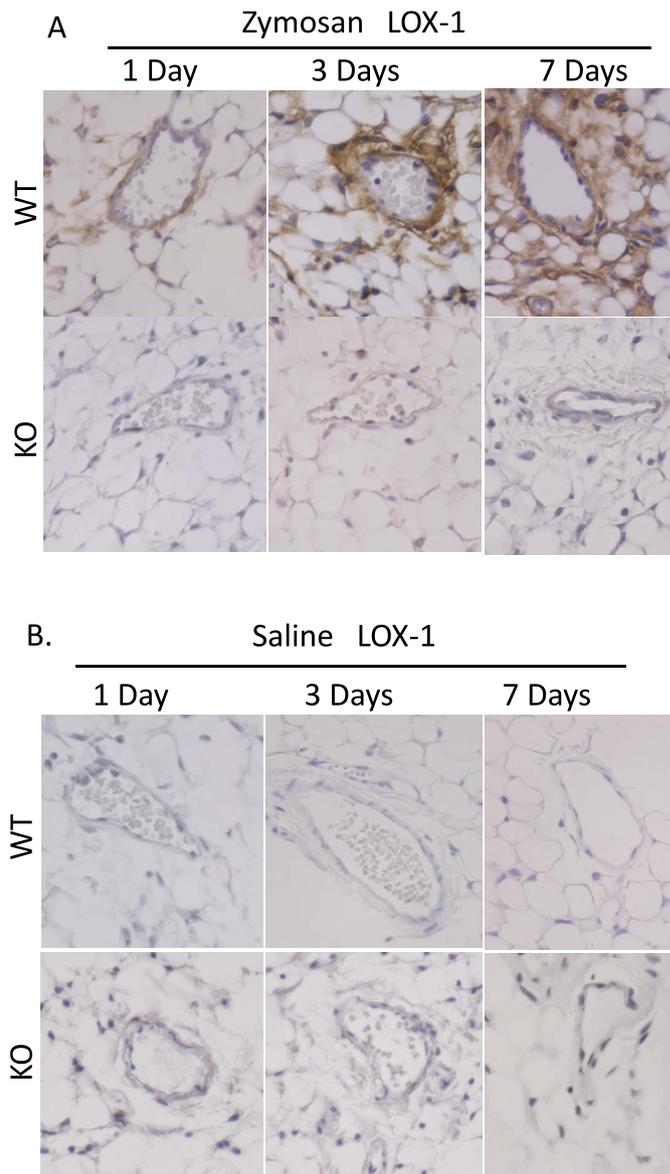


図6. 血管内皮細胞における LOX-1 の免疫染色.

(A) Zymosan 投与群, 上段: WT マウス, 下段: KO マウスの免疫染色を示す. WT マウスの Zymosan 投与群では LOX-1 の発現は亢進していた. KO マウスにおいて染色性は認められなかった.

(B) 生食投与群, 上段: WT マウス, 下段: KO マウスの免疫染色を示す ($\times 400$). WT マウス, KO マウスのいずれにおいても LOX-1 の染色性は認められなかった.

3. 長期自然飼育における LOX-1 ノックアウトの軟骨変性に与える影響の検討

1) 体重

自然飼育におけるマウス体重 (グラム, 平均 \pm 標準偏差) の変化を調べた. 自然飼育により体重の増加を認めしたが, 9 週齢, 6 ヶ月, 12 ヶ月, 18 ヶ月齢のすべての時期において, WT マウスおよび KO マウスの間に有意な差を認められなかった (図7).

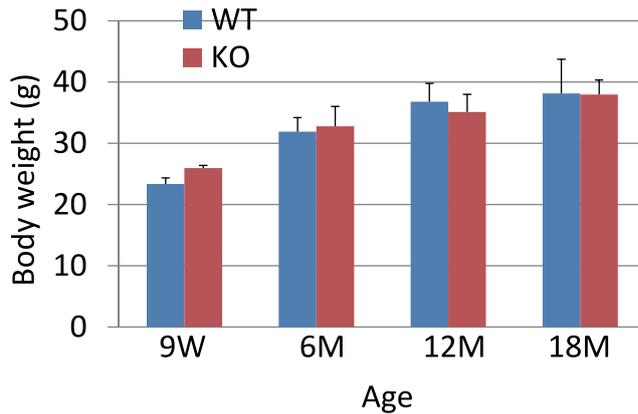


図7. 長期自然飼育におけるマウス体重の変化.

9W, 6, 12, 18ヶ月のWTマウス, KOマウスの体重の平均値を示す. エラーバーは標準偏差を示す (各群 n=10, Student's t-test). すべての時期においてWTマウスとKOマウスの間に有意な差は認められなかった.

2) OARSI 評価スコアによる関節軟骨変性評価

大腿骨内側顆, 脛骨平原の関節軟骨変性の程度をサフラニンO染色により評価した. WTマウス, KOマウスは両者共に長期自然経過と共に軟骨変性は進行していたが, WTマウスに比較してKOマウスでは軟骨変性は抑制される傾向が認められた (図8A-DおよびE-H). そこで, OARSIのマウス軟骨変性評価法 (平均および最大スコア) に従い変性度を点数化した. 9週齢, 6ヶ月では平均, 最大スコアは共にWTマウスとKOマウスの間で有意な差を認めなかった. 12ヶ月での平均スコア (平均 ± 標準偏差) はWTマウス 0.84 ± 0.70 , KOマウス 0.49 ± 0.58 で, KOマウスにおいてスコアは有意に小さかった (図8I, $p < 0.001$, $n=10$). 最大スコアもWTマウス 1.14 ± 0.77 , KOマウス 0.60 ± 0.67 でKOマウスにおいてスコアは有意に小さかった (図8J, $p < 0.002$, $n=10$). 同様に, 18ヶ月での平均スコアは, WTマウス 1.24 ± 1.32 , KOマウス 0.77 ± 0.69 でKOマウスにおいてスコアが有意に小さかった (図8I, $p < 0.006$, $n=10$). 最大スコアもWTマウス 1.61 ± 1.40 , KOマウス 1.02 ± 0.78 でKOマウスにおいてスコアが有意に小さかった (図8J, $p < 0.03$, $n=10$).

3) 軟骨細胞における LOX-1, 酸化 LDL の免疫染色

9週令ではWTマウス, KOマウス共に軟骨組織にLOX-1, 酸化LDLの染色性は認められなかった. 自然飼育6ヶ月のWTマウスの荷重部関節軟骨組織の軟骨細胞にはLOX-1の発現, 酸化LDLの存在が軽度ながら確認された. 自然飼育12ヶ月, 18ヶ月のWTマウスでは, 軟骨変性部分の軟骨細胞にLOX-1 (図9A), 酸化LDL (図9B) の染色性の亢進が認められた. LOX-1, 酸化LDLの染色性は軟骨変性部分の軟骨組織浅層と肥大軟骨細胞に亢進が認められた (図9A, B, 矢印).

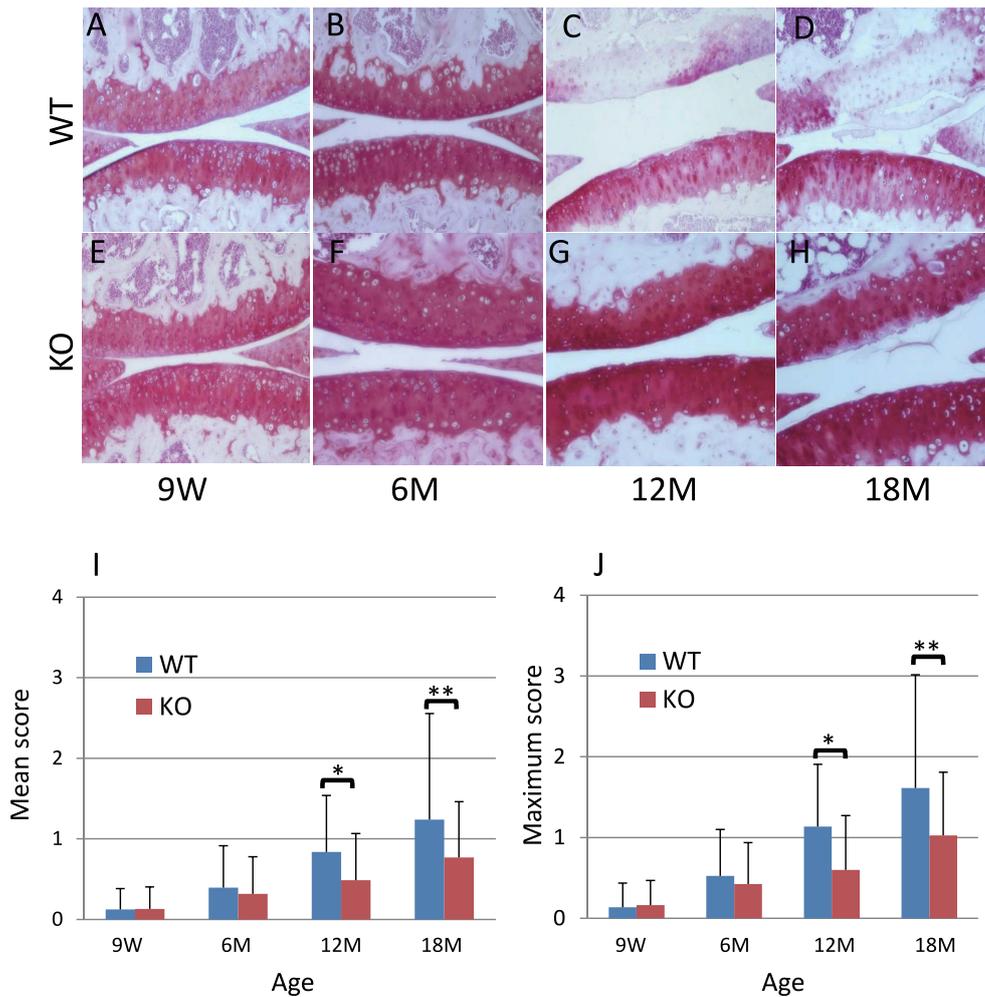


図8. OARSI 評価スコアによる関節軟骨変性の平均および最大スコア。

(A ~ D) WT マウスの 9W, 6, 12, 18 ヶ月のサフラニン O 染色を示す ($\times 200$)。加齢とともに軟骨変性が進行している。

(E ~ H) KO マウスの 9W, 6, 12, 18 ヶ月のサフラニン O 染色を示す ($\times 200$)。加齢とともに軟骨の変性があるが、WT と比較して程度は低い。

(I) 自然飼育 9W, 6, 12, 18 ヶ月の OARSI 平均スコアを WT マウス, KO マウスで比較した。9W, 6 ヶ月では有意差は認めなかった。12 ヶ月, 18 ヶ月において KO マウスで有意に低値であった (エラーバーは標準偏差を示す。n = 10, Student's t-test, 12 ヶ月: *p < 0.0001, 18 ヶ月: **p < 0.006)。

(J) 自然飼育 9W, 6, 12, 18 ヶ月の OARSI 最大スコアを WT マウス, KO マウスで比較した。9W, 6 ヶ月では有意差は認めなかった。12, 18 ヶ月では KO マウスで有意に低値であった (エラーバーは標準偏差を示す。n = 10, Student's t-test, 12 ヶ月: *p < 0.002, 18 ヶ月: **p < 0.03)。

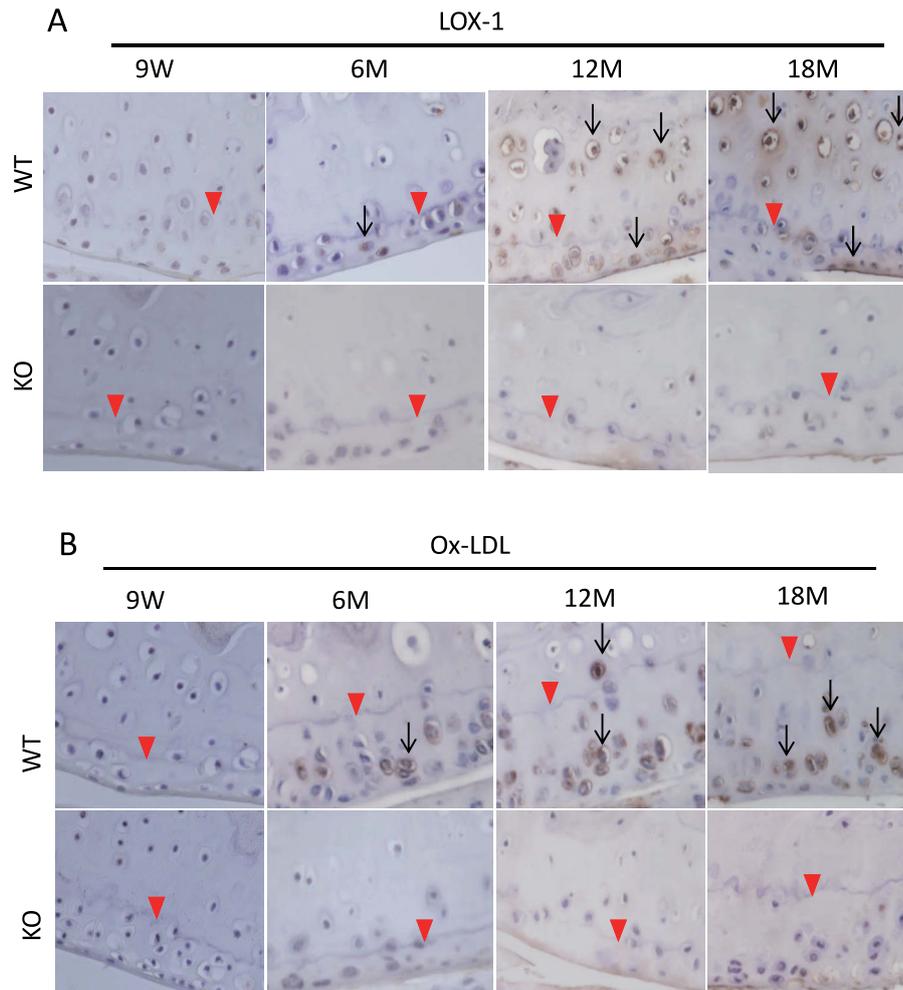


図9. 自然飼育における軟骨細胞での LOX-1, 酸化 LDL の免疫染色.

(A) LOX-1 の免疫染色. 上段: WT マウス, 下段: KO マウス ($\times 400$). 6 ヶ月 WT マウスの軟骨細胞には LOX-1 の発現, 酸化 LDL の存在が軽度ながら認められる. 12 ヶ月, 18 ヶ月の WT マウスでは, 軟骨変性部分の軟骨細胞に LOX-1 の染色性の亢進が認められた. また, 陽性細胞は軟骨変性部の軟骨浅層, 肥大軟骨細胞に目立っていた (矢印). KO マウスではすべての時期において染色性は認められなかった.

(B) 酸化 LDL の免疫染色. 上段: WT マウス, 下段: KO マウス ($\times 400$). 6 ヶ月 WT マウスの軟骨細胞には酸化 LDL の存在が軽度ながら認められる. 12 ヶ月, 18 ヶ月の WT マウスでは, 酸化 LDL の陽性細胞は増加傾向にあった. また, 陽性細胞は軟骨変性部の軟骨浅層, 肥大軟骨細胞に目立っていた (矢印). KO マウスではすべての時期において染色性は認められなかった. タイドマークは矢頭(▼)で示す. タイドマークより深層が石灰化軟骨層, 浅層が軟骨表層である.

4) 軟骨変性程度と LOX-1, 酸化 LDL の免疫反応陽性細胞割合との関連

WT マウスにおける自然飼育 6 ヶ月 ($n=10$), 12 ヶ月 ($n=10$), 18 ヶ月 ($n=10$) の大腿骨, 脛骨荷重部軟骨組織における LOX-1, 酸化 LDL の免疫反応陽性細胞数をカウントした. 軟骨変性の進行とともに LOX-1 陽性細胞割合が増加しており, 軟骨変性スコアと陽性細胞割合との間に有意な相関を認めた (図 10A, $r^2=0.61$, $n=30$, $p<0.0001$, 陽性細胞総数 / 細胞総数: 889/4833). また, 軟骨変性スコアと酸化 LDL 陽性細胞割合との間にも有意な相関を認めた (図 10B, $r^2=0.49$, $n=30$, $p<0.0001$, 陽性細胞総数 / 細胞総数: 578/4660).

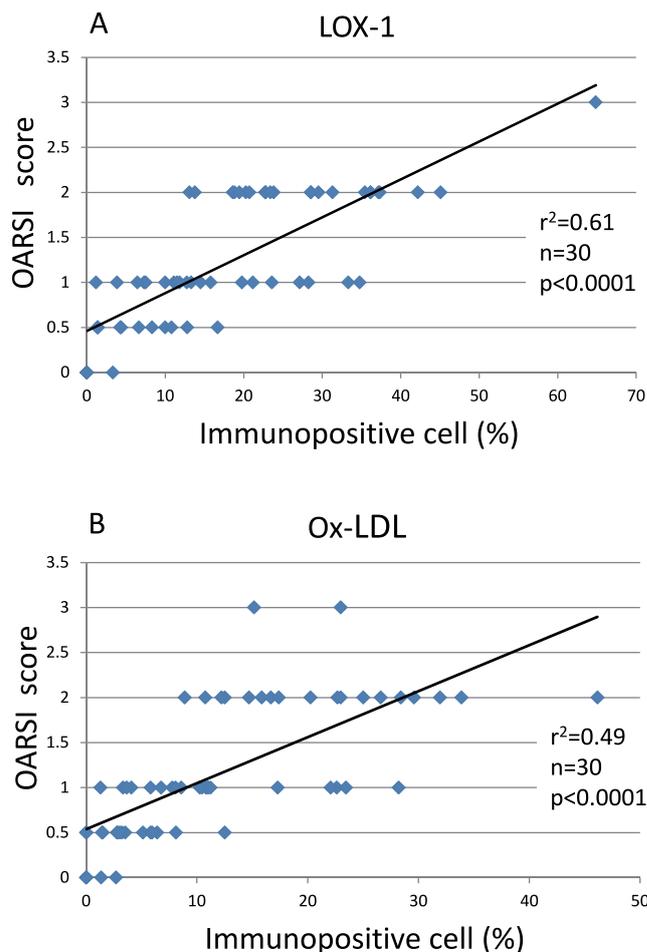


図10. 軟骨変性程度と LOX-1 および酸化 LDL の免疫反応陽性細胞割合との相関. LOX-1 および酸化 LDL 陽性細胞数は, 軟骨変性の進行とともに増加しており軟骨変性と正の相関を認めた.
 (A) OARSI スコアと LOX-1 陽性細胞率との相関関係 ($r^2=0.61$, $n=30$, $p<0.0001$).
 (B) OARSI スコアと酸化 LDL 陽性細胞率との相関関係 ($r^2=0.49$, $n=30$, $p<0.0001$).

考 察

本研究では LOX-1 KO マウスを用いて, Zymosan 誘発関節炎モデルマウス, 長期自然飼育マウスにおける LOX-1 の役割を検討した. すなわち, Zymosan 誘発関節炎は亜急性の関節炎を生じるため RA のモデルとして, 長期自然飼育は加齢による OA のモデルとして, 滑膜炎および軟骨変性における LOX-1 の果たす役割を検討した. 滑膜炎および軟骨変性は両モデルにおいて LOX-1 ノックアウトにより有意に抑制され, LOX-1 の亜急性関節炎および加齢による軟骨変性への関与が *in vivo* で明確に示すことが出来た.

In vitro の研究では, 血管内皮細胞において LOX-1 とそのリガンドが結合すると血管内皮は ICAM-1, VCAM-1 などの細胞接着分子やマクロファージの遊走因子である MCP-1 を発現し, 白血球の血管内皮細胞への接着, 浸潤を促進するとされている^{24, 25}. また, 好中球が LOX-1 に直接結合すること, LOX-1 を介して好中球が血管内皮下に浸潤することが示されている¹⁹. これらの LOX-1 の機能は動脈硬化巣形成の初期において重要とされている. ラットの Zymosan 誘発関節炎モデルを使用し, 抗 LOX-1 中和抗体による関節炎治療効果を検討した報告では, 滑膜血管内皮に発現する LOX-1 が関節内への白血球浸潤過程に重要な役割があることを示唆している². 今回の研究でも, KO マウスにおいては Zymosan 関節内投与 1 日後の炎症細胞浸潤は

WT マウスに比較して有意に抑制されていた。Zymosan はマクロファージや好中球から IL-1 β の産生を亢進するとされているが¹⁸, IL-1 β は LOX-1 の発現を亢進することが知られている^{6,7}。Zymosan による炎症誘発により滑膜血管内皮細胞での LOX-1 の発現が増加し, 炎症細胞が LOX-1 を介して血管内皮にローリング, 接着, 浸潤することにより滑膜炎を促進すると考えられる。よって Zymosan 誘発関節炎モデルマウスにおいて血管内皮に発現する LOX-1 が炎症細胞浸潤過程に重要な役割を果たす可能性が示された。

滑膜表層細胞はマクロファージ系の 1 型細胞と線維芽細胞様の 2 型細胞により構成されており, RA の滑膜炎において特徴的に見られる滑膜過形成は 1 型細胞の浸潤と線維芽細胞様細胞の増殖により生じると考えられている²⁶。本研究では, Zymosan 投与 3 日後, 7 日後において, WT マウスに比較して KO マウスにおいて滑膜過形成は抑制されていた。LOX-1 ノックアウトではマクロファージを含む炎症細胞浸潤が抑制されることより, 滑膜過形成が二次的に抑制されると考えられる。WT マウスの滑膜表層細胞では Zymosan 投与 1 日後以降に LOX-1, 酸化 LDL 陽性細胞が認められ, その後も同様の染色性が認められた。活性化したマクロファージにも LOX-1 の発現が認められることが報告されている²⁷。さらに近年, Ishikawa らは重層化したヒト RA 滑膜表層細胞での 1 型および 2 型細胞での LOX-1 発現, 酸化 LDL の存在を報告しており, RA における病的滑膜過形成に LOX-1/酸化 LDL 系の関与を示唆している¹⁶。LOX-1 ノックアウトマウスを用いた本研究においても Zymosan 誘発関節炎の滑膜過形成 (重層化) に LOX-1 は重要な役割を果たすことが示された。

また, WT マウス軟骨組織の免疫染色では Zymosan 投与 1 日後から軽度の LOX-1 の発現, 酸化 LDL の存在が認められ, 経時的に LOX-1, 酸化 LDL 陽性細胞数が増加していた。さらに, 軟骨変性が強い部分の軟骨表層細胞に多くの陽性細胞が認められた。LOX-1 はヒト RA 軟骨においても発現していることが示されている³。また, RA の関節液には酸化 LDL が存在することも示されている²⁸⁻³⁰。従って, 炎症刺激により発現が亢進した軟骨細胞の LOX-1 は, 酸化ストレスの亢進した関節内環境において形成された酸化 LDL と結合する可能性は高いと考えられる。培養軟骨細胞を用いた *in vitro* の研究において, LOX-1 と酸化 LDL の結合は, ROS の発生や NF- κ B の活性化, MMP-3 産生亢進, PI3kinase/Akt 経路抑制による非アポトーシス細胞死を引き起こすことが示されている^{3,10,11}。本研究では, WT マウスにおいて軟骨変性の進行と共に LOX-1 および酸化 LDL 陽性細胞数が増加していたことや, 軟骨変性が強かった軟骨表層に染色性が高かったこと, LOX-1 ノックアウトにより軟骨変性が抑制されたことより, LOX-1/酸化 LDL 系は亜急性関節炎における軟骨変性に重要な役割を果たしている可能性が示されたと考える。WT マウスではより強い滑膜過形成が持続していることより, 炎症滑膜から産生されるサイトカインにより軟骨変性が進行すること, さらに軟骨に発現する LOX-1 に酸化 LDL が結合することにより軟骨変性が進行し, Zymosan 投与後 7 日後に WT マウスと KO マウスの間に有意な差が認められたものと考えられる。

我々はヒト膝 OA 軟骨細胞において LOX-1 の発現および酸化 LDL の蓄積が増加していること, 両者が共局在していること, LOX-1, 酸化 LDL の陽性細胞数が Mankin スコアと正の相関を示していることを報告した⁴。すなわち, LOX-1/酸化 LDL 系が軟骨組織の加齢変性に重要な役割を有する可能性を示してきた。そこで, 本研究では LOX-1 ノックアウトマウスを長期自然飼育し, これらの分子がマウス膝関節軟骨組織の加齢変性に関与するかを検討した。従来, 関節に加わる力学的負荷が軟骨変性に関与することは明らかにされている。本研究では, WT マウスおよび KO マウスは同じケージにおいて同様に飼育を行い, 両群の体重はすべ

での時期において両者に差はなかったことを第一に確認した。すなわち、膝関節の力学環境は両群において差は無かったと考えられる。WT マウスの免疫染色において、9 週齢の軟骨細胞における LOX-1 の発現、酸化 LDL の局在は認められなかったが、6 ヶ月でわずかに染色性が認められた。また、12 ヶ月、18 ヶ月と加齢が進むにつれて軟骨変性は進行し、陽性細胞数が増加していた。OARSI の軟骨変性スコアリング²³では、平均スコア、最大スコアにおいて9 週、6 ヶ月では WT マウス、KO マウス両者に有意差はなかったが、12 ヶ月、18 ヶ月で KO マウスの方が抑制されていた。また、WT マウスにおいて、軟骨変性スコアと LOX-1 および酸化 LDL の陽性細胞率には有意な正の相関が認められ、これらの結果は加齢に伴う軟骨変性に LOX-1/酸化 LDL 系が関与することを強く示唆するものである。我々はウシ培養軟骨細胞系を用いて LOX-1 と酸化 LDL の結合はテロメラーゼ活性を抑制し細胞老化を促進すること、ストレス誘発性細胞老化を生じることを報告した¹⁵。本研究では LOX-1 ノックアウトが加齢による軟骨変性を抑制することを *in vivo* で示すことが出来たものとする。

興味深いことに、12 ヶ月、18 ヶ月において LOX-1、酸化 LDL の陽性細胞は石灰化軟骨層における肥大軟骨様細胞に多く認められた。近年、OA 発症に重要なシグナルの一つとして軟骨細胞の肥大分化およびアポトーシス、つまり軟骨内骨化シグナルが注目されている^{31, 32}。このような軟骨細胞の肥大分化過程は生理的に成長板軟骨において観察されるが、膝関節軟骨に力学負荷を加える実験的 OA マウスモデルにおいても軟骨変性初期に軟骨細胞の肥大分化が認められ、この肥大軟骨様細胞から分泌される MMP-13 や ADAMTS-5 などの蛋白分解酵素は軟骨基質の変性を引き起こすことが示されている^{33, 34}。また肥大軟骨細胞は Vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生を介して血管侵入を誘導して基質を石灰化し、最終的にはアポトーシスを生じることが示されている^{34, 35}。よって OA 発症、進行に軟骨細胞の肥大分化、アポトーシスなどの軟骨内骨化シグナルが重要であることが示されている^{31, 32, 36}。我々は、ウシ培養軟骨細胞を用いて LOX-1 と酸化 LDL の結合は肥大軟骨様細胞への分化を誘導することを示し、肥大軟骨細胞への分化に重要な転写因子である Runx2 の発現が亢進することを示した¹⁴。本研究においては、WT マウスの 12 ヶ月、18 ヶ月齢マウスの変性関節軟骨には肥大軟骨様細胞が KO マウスに比較して数多く認められ、それらには LOX-1 の発現、酸化 LDL の局在が認められた。すなわち、本研究結果は LOX-1/酸化 LDL 系が肥大軟骨様細胞への分化を介して関節軟骨組織の加齢変性に関与している可能性を示すものとする。

結 語

Zymosan 誘発関節炎における滑膜炎と軟骨変性、および、長期自然飼育による加齢性軟骨変性に LOX-1/酸化 LDL 系が関与することを、LOX-1 ノックアウトマウスを用いて示した。本研究は LOX-1/酸化 LDL 系が RA や OA などの関節症の病態形成に重要な役割を果たすことを *in vivo* において示した最初の報告である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を頂いた赤木将男教授に深く謝意を表します。また、本研究にあたりご協力いただいた近畿大学医学部ライフサイエンス研究所の奥本勝美先生、近畿大学医学部実験動物共同研究室の水口信行先生、並びにご協力頂いた教室員の皆様、実験助手の皆様から感謝申し上げます。

文 献

1. Sawamura T, et al (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386:73-77
2. Nakagawa T, et al (2002) Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 46:2486-2494
3. Kakinuma T, et al (2004) Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates matrix metalloproteinase 3 synthesis enhanced by oxidized low density lipoprotein in rheumatoid arthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 50:3495-3503
4. Akagi M, et al (2007) **Possible involvement of the oxidized low density lipoprotein / lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 15:281-290
5. Simopoulou T, Malizos KN, Tsezou A. (2007) Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression in human articular chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol* 25:605-611
6. Kume N, et al (1998) **Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells.** *Circ Res* 83:322-327
7. Hofnagel O, et al (2004) Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1789-1795
8. Aoyama T, Fujiwara H, Masaki T, Sawamura T (1999) **Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells** 31:2101-2114
9. Chen M, et al (2001) Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium 287:962-968
10. Nakagawa T, et al (2002) LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death-possible role of dephosphorylation of Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 229:91-97
11. Nishimura S, et al (2004) Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) binding to lectin-like ox-LDL receptor 1 (LOX-1) in cultured bovine articular chondrocytes increases production of intracellular reactive oxygen species (ROS) resulting in the activation of NF-kappa B. *Osteoarthritis Cartilage* 12:568-576
12. Kanata S, et al (2006) Oxidized LDL binding to LOX-1 upregulates VEGF expression in cultured bovine chondrocytes through activation of PPAR- α . *Biochem Biophys Res Commun* 348:1003-1010
13. Akagi M, et al (2009) Oxidized LDL binding to LOX-1 enhances MCP-1 expression in cultured human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 17:271-275

14. Kishimoto H, et al (2010) Induction of hypertrophic chondrocyte-like phenotypes by oxidized LDL in cultured bovine articular chondrocytes through increase in oxidative stress. *Osteoarthritis Cartilage* 18:1284-1290
15. Zushi S, et al (2009) Induction of bovine articular chondrocyte senescence with oxidized low-density lipoprotein through lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Arthritis Rheum* 60:3007-3016
16. Ishikawa M, et al (2012) **Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 signal is a potent biomarker and therapeutic target for human rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 64:1024-1034
17. Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC (1977) Zymosan-induced arthritis:a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 20:1396-1401
18. Gegout P, et al (1994) Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat:effects on joints inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci* 55:L321-326
19. Honjo M, et al (2003) Lectin-like oxidized LDL receptor 1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1274-1279
20. Silberberg, M. & Silberberg, R (1941) Age changes of bones and joints in various strains of mice. *Am. J. Anat.* 68:69-95
21. 福井 正宏 (1998) ヒト変形性膝関節症の動物実験モデルとしての変形性膝関節症自然発症型C57ブランクマウスに関する研究. *昭和会誌* 58:116-125
22. Mehta JL, et al (2007) Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ Res.* 100:1634-42
23. S.S.Glasson, M.G.Chambers, W.B.Van Den Berg, C.B.Little (2010) **The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse.** *Osteoarthritis Cartilage* 18:17-23
24. Wang GP, Deng ZD, Ni J, Qu ZL, (1997) **Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit peritoneal exudate macrophages.** *Atherosclerosis* 133:31-36
25. Li D, Mehta JL (2000) **Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL –mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells.** *Circulation* 101:2889-2895
26. Ulf Müller-Ladner, Renate E. Gay, Steffen Gay (1997) Structure and function of synoviocytes, In:William J.Koopman:Arthritis and Allied Conditions:a textbook of rheumatology 13th Baltimore, MD:Williams & Wilkins, pp243-251

27. Moriwaki H, Kume N Miyamoto S (1998) **Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1** in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF- α . FEBS Lett 440:29-32
28. James MJ, et al (1998) Low density lipoprotein of synovial fluid in inflammatory joint disease is mildly oxidized. Lipid 33:1115-1121
29. Dai L, et al (1997) A modified form of low-density lipoprotein in with increased electronegative charge is present in rheumatoid arthritis synovial fluid. Free Radic Biol Med. 22:705-710
30. Dai L, et al (2000) Evidence for oxidized low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. Free Radic Res. 32:479-486
31. Kawaguchi H (2008) Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. Mol cells. 25:1-6
32. Kuhn K, D' Lima DD, Hashimoto S, Lotz M (2004) Cell death in cartilage. Osteoarthritis Cartilage 12:1-16
33. Kamekura S, et al (2005) Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. Osteoarthritis cartilage 13:632-641
34. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R (1996) Bone biology. II :Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. Instr Course Lect 45:387-399
35. Gerber HP, et al (1999) **VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis** during endochondral bone formation. Nat Med. 5:623-628
36. 川口 浩 (2009) 遺伝子変異マウスによる変形性関節症の分子背景へのアプローチ. THE BONE 23:35-40