

抗スルファチド抗体については、一定した見解は得られていないが、明らかな抗体価高値を示すのは、IgM 蛋白質を伴う例が多い。ニューロパチーに伴う IgM 蛋白質は、MAG/SGPG に対する抗体活性をもつものが多く、同じ硫酸基をもつスルファチドにも交差反応することが推測される。今回の検討で示したように SGPG に対する抗体活性とスルファチドに対するものとで IgM の軽鎖は一致していたことは、同じ抗体が SGPG とスルファチドに反応していることを支持するデータである。CIDP における抗スルファチド IgM 抗体高値群では、運動失調の頻度が有意に高く、遠位優位の障害が多くみられる点や伝導ブロックが有意に少ない点で、抗 MAG/SGPG 抗体活性をもつ IgM 蛋白質陽性のニューロパチーと似た特徴を有することがわかった。低力価の抗スルファチド抗体は、それだけで発症因子となるものではないが、CIDP において末梢神経の炎症機転がはたらき血液神経関門が疎になるなどの条件のもとで、同じく硫酸基を持つ複合糖質を認識する抗 MAG/SGPG 抗体と同様に末梢神経に作用することにより、CIDP の病態を修飾する因子として働く可能性がある。今後は他の硫酸基をもつ複合糖質に対する抗体活性も検討することが必要と考えられる。

審査委員は論文内容の審査並びに公聴会（平成 22 年 2 月 8 日）での審査を行った結果、本論文を博士（医学）学位論文に値するものと認めた。

氏名	岸 <sup>まし</sup> 本 <sup>もと</sup> 英 <sup>ひで</sup> 樹 <sup>き</sup>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	医第 1019 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	酸化低比重リポ蛋白によるウシ培養関節軟骨細胞における肥大軟骨細胞様形質の誘導
論文審査委員（主査）	教授 濱 西 千 秋
（副主査）	教授 磯 貝 典 孝
（副主査）	教授 松 尾 理

論文内容の要旨

【目的】

変形性関節症における軟骨組織の病理学的所見として、軟骨組織は細線維化し、その際に見られる軟骨細胞は増殖してクラスターを形成し、細胞の肥大化を認める。これらの変性軟骨細胞は、内軟骨骨化における骨形成の際に見られる軟骨細胞の最終分化状態である肥大軟骨細胞に類似の形質を呈することが知られている。本研究では、動脈硬化の主要な危険因子である酸化低比重リポ蛋白（酸化 LDL）がウシ培養軟骨細胞における肥大軟骨細胞様の形質発現を誘導することについて検討した。さらに、この誘導が酸化 LDL の受容体であるレクチン様酸化低比重リポ蛋白受容体-1（LOX-1）との結合を介するか、また、これらの現象について酸化ストレスの亢進が関与するかを検討した。

【方法】

本研究には、培養ウシ軟骨細胞を用いた。培養は 37℃、O<sub>2</sub> 5%、CO<sub>2</sub> 5% にて行った。培養ウシ軟骨細胞を観察し、酸化 LDL 存在下における細胞凝集塊（軟骨結節）の形成を計数した。また、酸化 LDL 存在下におけるアルカリホスファターゼ活性を酵素呈色反応を用いて検討した。Real-time PCR および western blot、免疫蛍光染色を行い、酸化 LDL 存在下での X 型コラーゲンの発現について検討した。さらに siRNA を用いて LOX-1 をノックダウンし、酸化 LDL が LOX-1 を介するかについて検討した。また、酸化ストレスが X 型コラーゲン発現に与える影響を Real-time PCR および western blot を用いて検討した。肥大軟骨細胞への分化において重要な転写因子である runt related transcription factor 2（Runx2）について、酸化 LDL、酸化ストレスの及ぼす影響について検討した。

【結果】

酸化 LDL の存在下では、培養ウシ軟骨細胞の形成する軟骨結節は増加し、アルカリホスファターゼ活性は亢進した。Real-time PCR および western blot、免疫蛍光染色では肥大軟骨細胞に特異的なマーカーである X 型コラーゲンの発現亢進を認めた。LOX-1 を siRNA でノックダウンすると、酸化 LDL 添加による X 型コラーゲンの発現亢進は抑制された。抗酸化剤である N-acetylcysteine（NAC）による前処理を行うと、酸化 LDL による X 型コラーゲンの発現亢進は抑制された。また、Runx2 は酸化 LDL、過酸化水素により発現が亢進し、NAC による前処理でこの発現亢進はいずれも抑制された。

【考察】

酸化 LDL は酸化ストレス亢進を介して、関節軟骨細胞の肥大軟骨細胞様細胞への分化抑制制御を障害し、軟骨変性に関与する可能性があることを示した。本研究を通じて、酸化 LDL は変形性関節症の病態形成において重要な意義を持つ可能性があると考えられた。

【結果】

酸化 LDL はウシ培養関節軟骨細胞において、肥大軟骨細胞様形質を誘導した。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成 21 年 12 月 日 公表予定	出版物名 近畿大学医学雑誌 第 34 巻 第 4 号
	公 表 内 容	平成 21 年 12 月 日 発行予定
	全 文	

変形性関節症(OA)は日常生活動作を障害し、生活機能病の一つとして位置付けられ、高齢化による患者増加に伴い社会福祉に及ぼす影響は拡大しつつある。OAの発症要因として軟骨組織に加わる過度の機械的ストレス、加齢や性別(女性優位)などが知られているが、軟骨組織の物理的磨耗や破壊のみならず、軟骨細胞レベルでの表現形の変化や機能的変化、あるいは加齢による組織修復機能の低下を含めた分子生物学的な制御機構の破綻も考えられている。また生活習慣病とOAとの間には共通の病因、病態が存在する可能性が示唆されてきた。

酸化低比重リポ蛋白(酸化LDL)は受容体LOX-1に結合すると、細胞内に活性酸素種(ROS)を発生し、細胞の酸化ストレスを亢進する。そして動脈硬化の発症・進展に関わる重要な因子であると考えられている。

そして軟骨組織においても酸化LDLの存在と軟骨細胞におけるLOX-1の発現が認められ、ヒトOA関節軟骨でもLOX-1の発現が報告されている。

そこで、我々は生活習慣病と生活機能病とを結びつける分子として、酸化LDLとLOX-1に着目し、研究を行ってきた。そしてウシ培養関節軟骨細胞において、酸化LDLとLOX-1との結合による細胞内ROSの産生亢進、血管内皮細胞と同様にNF- $\kappa$ Bの活性化、テロメラーゼ活性を抑制し軟骨細胞老化を早めている可能性などを示してきた。

早期のOAにおける特徴的な組織学的変化の一つとして、活性化した軟骨細胞の増殖およびクラスター形成などがあるが、それらの軟骨細胞は肥大軟骨細胞様の形質を示している。さらに、骨端軟骨板において軟骨細胞は肥大軟骨細胞に分化するが、近年この過程でROSが重要な役割を果たすことが示されている。

そこで関節軟骨の変性においても、軟骨細胞における酸化ストレスが大きく関与している可能性が示唆され、本研究では、酸化LDLが培養軟骨細胞の分化を促進し、肥大軟骨細胞様の各種形質を発現するにいたるかどうかを、培養関節軟骨細胞の形態変化、肥大軟骨細胞マーカーであるX型コラーゲンの発現、その細胞内転写因子であるRunx2の発現、そして骨化マーカーのひとつであるアルカリフォスファターゼの発現などによって検討した。

## 結果

### 細胞形質とALP活性

実験には生後10ヶ月のウシ前足部MP関節より採取した関節軟骨を酸素5%の低酸素分圧下に培養し用いた。まずコンフルエントに達した軟骨細胞には酸化LDLの存在下でPBSよりサイズの大きい軟骨結節が、より多く形成された。酸化LDL添加によりALP活性はコントロール群の2.00倍に上昇が認められた。

### X型コラーゲンの発現

酸化LDL添加24時間後、48時間後にX型コラーゲンmRNA発現は、それぞれ1.78倍、2.48倍となった。また添加48時間後におけるX型コラーゲンmRNA発現の用量反応では、用量依存的にmRNA発現の増加を認めた。免疫蛍光染色および位相差顕微鏡像では、酸化LDL添加群では細胞外基質に網目状のTexas Redの発色パターンを認め、X型コラーゲンの産生亢進を認めた。Western blotで酸化LDLの添加濃度依存性にX型コラーゲン産生の増加が認められた。

### 酸化ストレスの影響

酸化LDLおよび陽性コントロールとして過酸化水素にて処理したものはX型コラーゲンmRNA、蛋白発現ともに発現亢進を認めた。これに対し、抗酸化薬N-acetylcysteine(NAC)にて前処理した群はいずれにおいても有意な発現亢進は認めなかった

### siRNA LOX-1 knockdown cell におけるX型コラーゲン発現の抑制

siRNAにより、LOX-1 mRNAの発現は12.3%に抑制された。このcellを用いると、酸化LDL添加48時間後のX型コラーゲンmRNA発現は31.3%に抑制された。

### Runx2の遺伝子発現の解析

X型コラーゲンの細胞内転写因子であるRunx2は、まず酸化LDL10 $\mu$ g/ml添加群ではReal-time PCRによりコントロールに比較して2.53倍のRunx2 mRNAの発現亢進が認められた。また、過酸化水素10 $\mu$ Mを含む培地にて30分間処理した群でも2.60倍のRunx2 mRNA発現の亢進を認めたが、抗酸化剤であるNACにて前処理を行うと、両群ともにRunx2発現の亢進は認められなかった。Western blotによる蛋白発現の検討においても同様であった。

考察

今回の研究結果では、まずウシ関節軟骨細胞培養系に酸化 LDL を添加すると、軟骨結節の数、大きさがともに増大した。これは酸化 LDL が OA 軟骨にみられる肥大軟骨細胞様の形質獲得に関連している可能性を示しており、さらには軟骨組織の変性・骨化に関与する可能性を示している。X 型コラーゲンは、骨端軟骨板組織における肥大軟骨細胞への分化を示す特異的な分子マーカーである。今回の研究結果では、酸化 LDL の添加により、ウシ培養関節軟骨細胞における X 型コラーゲンの発現は遺伝子、蛋白レベルともに亢進が認められた。また酸化 LDL の添加後、さらに培養を継続すると、軟骨組織の石灰化・骨化に関連する ALP 活性の亢進も認められた。酸化 LDL 受容体である LOX-1 の knockdown 細胞においては、酸化 LDL により誘導される X 型コラーゲンの発現は有意に抑制された。

関節軟骨では肥大軟骨細胞への分化は抑制されており、静止軟骨細胞層を維持することによって永久軟骨としての機能を維持している。早期 OA の軟骨組織に肥大軟骨様細胞が見られることは、この軟骨細胞分化の抑制メカニズムに何らかの障害が生じ、軟骨細胞に内在する骨化へと向かわせる一連の遺伝子群が発現している可能性が示されているが、本論文では酸化 LDL が LOX-1 を介して細胞内 ROS を誘導し、それが軟骨細胞の肥大化および X 型コラーゲン発現亢進に関わる転写因子 Runx2 の発現を亢進することにより、永久軟骨化を阻止し、変性に向かわせる可能性を示したものである。

このように酸化 LDL から始まる一連のカスケードが軟骨変性の進展に関わる重要な経路の一つであることを示した本論文は、今後の高齢社会において増加する生活機能病としての変形性関節症と動脈硬化をはじめとする生活習慣病に基本的な共通因子が存在することを細胞レベルで証明したものであり、変形性関節症の病態の理解と治療に新たな局面を提示したといえることができる。

以上をふまえ、主査と副主査は規定の各種審査試験、ならびに博士学位論文公聴会（平成 22 年 1 月 29 日）を実施し、慎重に審査した結果、本論文は博士（医学）学位論文に十分値すると判断された。

氏名	亀井敬子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	医第 1020 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) in experimental severe acute pancreatitis (重症急性膵炎動物モデルにおける TREM-1 の動態)
論文審査委員 (主査)	教授 塩 崎 均
(副主査)	教授 工 藤 正 俊
(副主査)	教授 宮 澤 正 顯