

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19592328

研究課題名 (和文) 三次元培養軟骨細胞を用いた軟骨破壊に関する検討

研究課題名 (英文) An in vitro model of cartilage degradation by chondrocytes  
in a three-dimensional culture system

研究代表者

栗田 賢一 (KURITA KENICHI)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40133483

研究成果の概要 (和文)：本研究によって、関節軟骨破壊の初期には TIMP-1 が破壊抑制の役割を担っているが、時間経過とともに TIMP-3 が破壊抑制の主体をなしていく可能性が示唆された。また、TGF- $\beta$  によってこれらの TIMP が調節されており、関節軟骨破壊に抑制的に働くことが明らかとなった。これらの結果より、OA などの関節疾患では、TIMP-1 および TIMP-3 が疾患の進行抑制に強く関与すると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：The results of this study suggest that TIMP-1 plays a primary role in the prevention of articular cartilage destruction in its early stage but that TIMP-3 gradually takes over this role. Also, TGF- $\beta$  was shown to regulate these TIMPs and act as a suppressor of articular cartilage destruction. These results suggest that TIMP-1 and TIMP-3 are closely involved in preventing the progression of joint disorders such as OA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：薬剤反応性、細胞・組織

キーワード：軟骨、TIMP、CAM、Alginate beads、ECM、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、OA

## 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は、軟骨細胞とそれを取り巻く豊富な細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM) から構成される。ECM の主要構成成分はアグリカンと呼ばれるプロテオグリカンと線維を形成する II 型コラーゲンである。軟骨の機能の多くは ECM によって維持されているが、変形性関節症 (Osteoarthritis ; OA) などの関節疾患ではこの ECM 成分の分解が亢進し、機能障害を引き起こしている。ECM 成分の分解には MMP (Matrix Metalloproteinase) や ADAMTS-4, -5 (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs ; 別名 Aggrecanase-1, -2) が重要な役割を果たしていることが知られており、これらの酵素は IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) に代表される炎症性サイトカインによって誘導される。炎症性サイトカインは OA 関節の病態に関与し、軟骨細胞の基質産生を抑制するとともに、タンパク分解酵素の発現を促すことによって軟骨基質の喪失をもたらしている。

軟骨基質の破壊を抑制する要因としては、TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) などのサイトカインや、タンパク分解酵素の阻害因子である TIMP (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases) が挙げられる。TIMP は現在までに 4 種類の存在が知られており、これらの TIMP は 1 : 1 のモル比で MMP と結合し、その酵素活性を阻害する。なかでも TIMP-3 は、4 つの TIMP の中で唯一 ECM 結合型であること、MMP のみならず Aggrecanase の活性も阻害するという点で特徴的である。

これらの動態は未だ不明な点が多く、IL-1 $\beta$  あるいは TGF- $\beta$  を用いて誘導されるタンパク分解酵素および抑制因子に関する

多くの報告がなされている。しかし、単層培養法を用いた研究も多く、単層培養条件下では軟骨細胞は脱分化し、線維芽細胞様細胞に形質転換することから、得られた結果が軟骨細胞本来の形質を反映したものとなっているかどうかは疑問である。

## 2. 研究の目的

このような背景から、軟骨細胞を *in vitro* で研究する上で有利な培養法と考えられている Alginate Beads 三次元培養法を用い、IL-1 $\beta$  により引き起こされる軟骨破壊に対する TGF- $\beta$  の抑制効果におけるこれまでの知見を確認するとともに、軟骨破壊におけるタンパク分解酵素およびその抑制因子の動態を経時的に検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) Alginate Beads を用いた三次元培養

日本白色種幼若家兎を使用し、肩関節および膝関節より関節軟骨組織片を無菌的に採取した。採取した軟骨片を酵素処理後、軟骨細胞を単離した。単離軟骨細胞を 1.2% Alginate 生理食塩水に  $1 \times 10^6$  細胞/ml の濃度で浮遊させ細胞混濁液とし、これをゲル化させて Alginate Beads を作製、三次元培養を行った。

### (2) 薬剤添加および刺激時間

7 日間培養後、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  による単独刺激および共存刺激を行った。これらの刺激時間を 6, 12, 24, 48, 時間に設定して検討した。

### (3) 検討項目

#### ① Alginate Beads 切片の染色による検討

形態的な検討を行うため Alginate Beads の切片を作製し、Toluidine Blue 染色、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 の免疫染色を行い、各実験群、各時間での染色性を比較した。各実験群および各時間での Alginate Beads 切片において観察される軟骨小腔 (Lacunae) のうち、細胞周囲マトリックス (Cell-associated Matrix : CAM) が染色されない Lacunae 数を計測した。

#### ②遺伝子発現による検討

培養後回収した軟骨細胞を用いて、RT-PCR により TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、MMP-3 の遺伝子発現を確認した。

#### ③培養上清による検討

培養上清を回収し、Glycosaminoglyca (GAG) を dimethylmethylene blue assay で測定し、TIMP-1、TIMP-2 および proMMP-3 量をサンドイッチ酵素免疫測定 (ELISA) 法で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 結果

##### ①CAM が染色されない Lacunae の割合

Toluidine Blue 染色の CAM が染色されない Lacunae 数の存在割合は、すべての実験群で経時的な増加傾向を認めた。6 時間での CAM が染色されない Lacunae 数の存在割合はどの実験群もほぼ同じであったが、時間経過とともに、IL-1 $\beta$  刺激群では著明な増加傾向を、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  共存刺激群では、IL-1 $\beta$  による増加に対して抑制傾向を認めた。

##### ②TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 および MMP-3 の mRNA 発現

TIMP-1 の mRNA は、IL-1 $\beta$  刺激群において 6 時間で最大の発現を認め、経時的な減弱傾向を認めたが、TGF- $\beta$  刺激群および IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  共存刺激群では時間に関係なく発現が見られた。TIMP-2 の mRNA は、TGF- $\beta$  刺激

群および IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  共存刺激群ではすべての時間でわずかな発現の増強が見られたが、IL-1 $\beta$  刺激群では 24 時間以降のみ発現が見られた。TIMP-3 の mRNA は、TGF- $\beta$  刺激群および IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  共存刺激群ではすべての時間で発現が見られたが、IL-1 $\beta$  刺激群では 48 時間のみの発現であった。一方、MMP-3 の mRNA については、IL-1 $\beta$  刺激群および IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  共存刺激群のすべての時間で発現が見られた。

##### ③培養上清中の GAG 量、proMMP-3 量および TIMP-1、TIMP-2 量

培養上清中の GAG 量および proMMP-3 量は、ともに経時的に増加傾向を認めた。TGF- $\beta$  刺激群は対照群とほぼ同じであったが、IL-1 $\beta$  刺激群では増加傾向を認めた。一方、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  共存刺激群では、IL-1 $\beta$  刺激による GAG 量および proMMP-3 量の増加を抑制する傾向を認めた。

一方培養上清中の TIMP-1 量は、IL-1 $\beta$  刺激群では 6 時間で最大値を示したが、その後は経時的な減少傾向を認めた。IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  共存刺激群では 6 時間で増加したが、その後の経時的減少はほぼ認めなかった。TIMP-2 量も IL-1 $\beta$  刺激群の 6 時間での増加傾向は認めるものの、有意ではなかった。

#### (2) 考察

IL-1 $\beta$  刺激にて炎症モデルを作製し、経時的検討を行った結果、CAM を欠く Lacunae の割合は IL-1 $\beta$  刺激にて経時的に増加する傾向を示した。培養上清中の GAG 量および proMMP-3 量も同様の傾向を示し、遺伝子発現ではすべての時間に MMP-3 の発現を認めた。これらの結果から、IL-1 $\beta$  刺激により MMP-3 の発現上昇に伴った CAM 分解が経時的に進行する様子が確認された。これに対し、本炎症

モデルに TGF- $\beta$  を共存させた結果、IL-1 $\beta$  刺激により認めた CAM を欠く Lacunae の存在割合、培養上清中の GAG 量および proMMP-3 量の増加は、48 時間で対照群レベルまで抑制された。これらの結果より、TGF- $\beta$  は CAM 破壊に対し防御的に働くことが確認された。しかし、MMP-3 の mRNA レベルは検討したどの時間においても TGF- $\beta$  の影響を受けなかった。この結果は、MMP-3 は IL-1 $\beta$  単独刺激と同様に分泌されているが、TGF- $\beta$  共存によって経時的に TIMP が増加し、これらが MMP-3 を含む活性型 MMP と結合して CAM 破壊を抑制していることを示唆している。

次に、経時的な TIMP の動態を検討した結果では、IL-1 $\beta$  刺激に対する TIMP-1、TIMP-3 の動態に相違が認められた。TIMP-1 については、培養上清中の量が 6 時間で最大値となり、経時的な減少を認めた。mRNA レベルでも同様の傾向を認め、48 時間における発現は減弱していた。これに対し TIMP-3 は、mRNA レベルに関して TIMP-1 と相反する結果を得た。これらの結果は、軟骨細胞は炎症初期に TIMP-1 を多量に産生、分泌しており、主に TIMP-1 が MMP に対する破壊抑制の役割を担っているが、時間とともに TIMP-3 が破壊抑制の主体をなしていく可能性を示唆している。

しかし、TGF- $\beta$  を共存させた結果では、TIMP-1 の発現はこの期間維持されていた。TIMP-3 では、すべての時間で mRNA レベルの発現増強を認め、陽性細胞率においても IL-1 $\beta$  刺激群より増加する傾向を認めた。これらの結果から、TGF- $\beta$  の破壊抑制には、TIMP-1 と TIMP-3 が深く関与しており、TIMP-1 および TIMP-3 の発現を早期から高めることで破壊抑制効果を発揮していると考えられる。

TGF- $\beta$  共存による TIMP-1 の変化は、mRNA レベルのみならず培養上清への放出量にも

反映されているが、この結果から、前述した MMP-3 を含む活性型 MMP と結合している TIMP に関しては、TIMP-1 が主体をなしているのかもしれない。一方 TIMP-3 は MMP のみならず、ECM に対しても一つの主要な分解酵素として考えられている Aggrecanase の酵素活性も阻害することが知られている。OA 軟骨において、Aggrecanase-1 および Aggrecanase-2 がともに発現の増強を認めることから、これらに対する唯一のインヒビターと考えられる TIMP-3 の破壊抑制に対する役割は、TIMP-1 あるいは TIMP-2 より大きいかも知れない。

本研究によって、関節軟骨破壊の初期には TIMP-1 が破壊抑制の役割を担っているが、時間経過とともに TIMP-3 が破壊抑制の主体をなしていく可能性が示唆された。また、TGF- $\beta$  によってこれらの TIMP が調節されており、関節軟骨破壊に抑制的に働くことが明らかとなった。これらの結果より、OA などの関節疾患では、TIMP-1 および TIMP-3 が疾患の進行抑制に強く関与すると考えられ、本研究は関節疾患の治療薬開発の一助となる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 賢一 (KURITA KENICHI)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40133483

(2) 研究分担者

山下 京子 (YAMASHITA KYOKO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：40231659

(3) 研究連携者