

主論文の要旨

**Geranylgeranylacetone suppresses hydrogen
peroxide-induced apoptosis of osteoarthritic chondrocytes**

〔 Geranylgeranylacetone による OA 軟骨細胞のアポトーシス抑制 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：石黒 直樹 教授)

與田 正樹

【目的】

変形性関節症(OA)は疼痛や関節機能低下によって、日常生活に不都合を来す運動器領域の代表的疾患であるが、未だその自然経過を変えうる有効な治療法は確立されていない。胃粘膜防御因子増強剤である Geranylgeranylacetone (GGA)が示す抗アポトーシス作用は胃粘膜上皮細胞において報告された後、脳や肝臓などの様々な臓器や細胞にて報告されている。しかしながら GGA の軟骨細胞に対する効果の報告はない。GGA は heat shock protein(HSP)を誘導して、抗アポトーシス作用を発揮すると考えられており、臨床応用にむけて HSP inducer としての役割が注目されている。HSP はストレスによって傷害されたタンパク質の修復および分解促進を担っており、あらゆる生物や細胞に存在している生存のために必須の蛋白質である。また HSP はアポトーシスやネクローシスといった細胞死の過程を直接抑制する役割も担っている。本研究の目的は GGA の投与によってOA軟骨細胞にHSPが誘導され、アポトーシスが抑制されるかどうかを検討することである。

【方法】

Kellgren-Lawrence 分類の gradeⅢまたはⅣに相当する変形性膝関節症患者(女性7名、男性3名、平均年齢74.1歳)の人工膝関節置換術時に得た組織をコラゲナーゼ処理して、OA軟骨細胞を単離した。全て患者において、手術前1年におけるステロイドおよびGGAの投与歴は認めなかった。OA軟骨細胞の培養液中に各種濃度のGGAを添加し、その12時間後にOAの進行機序に関与する活性酸素種のひとつである過酸化水素(H_2O_2)を負荷してアポトーシスを誘導した。培養液は抗アポトーシス作用を持つとされるグルタミンの含まれていないものを使用した。 H_2O_2 添加後2時間にて各種 assayを行なった。CellTiter-Blue Cell Viability Assay を用いて、OA軟骨細胞の cell viability を比較検討した。Hoechst 33342 染色と TUNEL 染色を用いて OA 軟骨細胞のアポトーシスを形態学的に評価した。Caspase-Glo Assay を用いて、アポトーシスの最終実行因子である caspase-3 とアポトーシスのミトコンドリア経路の因子である caspase-9 の活性を測定した。caspase 活性の測定値は同時に行なった CellTiter-Blue Cell Viability Assay の測定値にて補正した。GGA によって発現が増加するとされている HSP70 の mRNA 発現量変化を real-time RT-PCR 法、蛋白産生量変化を Western blot 法を用いて解析した。インターナルコントロールとして、それぞれ GAPDH、 β -アクチンを使用した。

【結果】

OA軟骨細胞の cell viability は H_2O_2 の添加により、濃度依存性に低下した(Fig1A)。 H_2O_2 による OA 軟骨細胞の cell viability の低下は、GGA の添加により濃度依存性に抑制された(Fig1B)。Hoechst 33342 染色においては、GGA を添加した群では、 H_2O_2 のみ添加した群に比べ、アポトーシスの特徴である細胞の縮小と核の濃染およびクロマチンの凝縮を示す細胞が有意に少なかった(Fig2A・2C)。蛍光の TUNEL 染色においてもアポトーシスの指標となる高輝度の細胞は、GGA を添加した群では H_2O_2 のみ添加した群より有

意に少なかった(Fig2B・2D)。caspase-3 の活性値は、H₂O₂ の添加により濃度依存性に増加した(Fig3A)。caspase-3 の活性値は GGA の添加により、濃度依存性に低下した(Fig3B)。caspase-9 の活性値も GGA の添加により、濃度依存性に低下した(Fig3C)。HSP70 の mRNA 発現量と蛋白産生量変化はコントロールと比較して、H₂O₂ のみ添加した時に増加し、GGA を添加することでさらに増加した(Fig4A・4B)。

【考察】

アポトーシスは癌・自己免疫疾患・神経変性疾患等への関与が認められているが、軟骨細胞でもその関与が報告されており、OA の重要な病因として考えられている。そのため軟骨細胞のアポトーシスを抑制することで、OA の進行を抑えることができる可能性があると考えられている。今回の研究において、GGA 投与による OA 軟骨細胞の形態学的変化と caspase-3 の活性値低下より、GGA が OA 軟骨細胞の H₂O₂ によるアポトーシスを抑制したと考えた。GGA 投与にて HSP70 の産生量が増加したので、OA 軟骨細胞においても報告されている他の細胞と同様に、GGA によって誘導された HSP がアポトーシス抑制効果の要因であるという可能性が示唆された。また GGA の添加によって caspase-9 の活性も抑制されたため、GGA および HSP70 がアポトーシスのミトコンドリア経路に作用している可能性が示唆された。今回の研究は、GGA の軟骨細胞に対する効果についての初めての報告である。GGA は胃薬として広く使われている安全性の高い薬剤であるが、軟骨細胞においても HSP を誘導し、抗アポトーシス作用を発揮する薬剤となりうる可能性が示唆された。

【結論】

OA 軟骨細胞を用いた in vitro の検討において、GGA は HSP70 を誘導し、H₂O₂ による OA 軟骨細胞のアポトーシスを抑制した。GGA が OA に対する薬剤に発展していく可能性があることが示唆された。