

主論文の要旨

**4-Methylumbelliferone suppresses catabolic activation
in anterior cruciate ligament-derived cells via a
mechanism independent of hyaluronan inhibition**

〔4-メチルウンベリフェロンはヒアルロン酸阻害とは独立した
メカニズムで前十字靭帯由来細胞の異化作用を抑制する〕

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：今釜 史郎 教授)

井戸田 大

【緒言】

変形性関節症(OA)は高齢化社会である本邦において最も一般的な関節障害であり、今後も患者数が増加することが予想される。膝 OA においては軟骨、半月板だけでなく前十字靭帯(ACL)も OA 関連サイトカインや酵素による炎症性変化の影響を受け変性・断裂を来すと考えられている。ACL の変性断裂は生体力学的変化を介して膝 OA の進行に寄与すると考えられる。近年、単顆型人工膝関節置換術、骨切り術などの ACL を温存した膝 OA に対する外科的治療選択の増加に伴い、保存的治療においては関節内靭帯に対する抗炎症作用も必要であると考えられる。

これまでに炎症性サイトカイン(Interleukin [IL]-1 β 、IL-6、Tumor Necrosis Factor [TNF]- α)や酵素(matrix metalloproteinase [MMP]-1、MMP-3、MMP-13)など、軟骨の変性や膝 OA の発症に関与する様々な経路やメディエーターが報告されている。これらの OA 関連分子は、軟骨の変性だけでなく、変性靭帯の断裂にも重要な役割を果たしている。しかし、靭帯の変性の原因となる病態は十分に解明されていない。靭帯は様々なコラーゲン繊維で構成されているため、コラゲナーゼとして知られる MMP は、靭帯の主要成分を分解する上で重要な役割を果たしている。したがって、変性靭帯の断裂を防ぐためには、MMP の発現とその上流のメディエーターを抑制することが重要な治療法となり得る。

我々は OA 軟骨におけるヒアルロン酸(HA)合成阻害剤である 4-methylumbelliferone (4-MU)の抗炎症作用を過去に報告している。一方で、靭帯細胞の炎症に着目した研究は少なく、4-MU が靭帯細胞に対して抗炎症作用を持つか否かを評価したものはない。本研究の目的は、ACL 由来の細胞における IL-1 β による MMP-1、MMP-3、IL-6 の発現亢進に 4-MU が影響を与えるか否かを調べることである。

【対象及び方法】

ヒト OA-ACL 由来細胞は人工膝関節全置換術時に採取した ACL から細胞を単離、培養した。培養細胞での炎症性変化の誘導は IL-1 β 0.1ng/ml を用いた。4-MU は IL-1 β と同時に投与し、12 時間培養した。ACL 組織片培養での炎症性変化の誘導は IL-1 β 2.0ng/ml を用い、4-MU 1.0 mM の存在下または非存在下で 1 週間培養した。その後、ACL 組織を切片化し、免疫組織染色を行い解析した。取得した画像は、ImageJ Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>)を用い、核及び細胞質の mean gray values を測定して定量化した。MMP-1、MMP-3、IL-6 の mRNA 発現量は real-time RT-PCR 法により測定した。MMP-1、MMP-3、IL-6 のタンパク発現量は capillary western immunoassay (Protein Simple, a Bio-Techne Brand)により定量した。培養細胞の HA 産生は、培養上清液を回収し、酵素結合サンドイッチアッセイ(Hyaluronan DuoSet ELISA, R&D Systems)により定量した。培養上清液中の乳酸濃度は、L-Lactate Assay Kit I (Eton Bioscience, Research Triangle)を用いて測定した。細胞内代謝は Seahorse Flux analyzer (Agilent Technologies)を用い、嫌気性解糖系、好気性解糖系の状態を評価した。

【結果】

IL-1 β 刺激により ACL 由来細胞における MMP-1、-3、IL-6 の mRNA およびタンパクの発現が亢進した。それらの mRNA およびタンパクの発現亢進は 4-MU により抑制された(図 1)。免疫組織化学染色にて組織片においても IL-1 β 刺激により MMP-1、-3、IL-6 の染色性が増強し、4-MU 存在下ではその染色性が抑制された(図 2)。

ACL 由来細胞において、IL-1 β 刺激により HA 合成は亢進し、4-MU により HA 合成の亢進が抑制された(図 3)。4-MU による MMP-1、-3 および IL-6 発現の抑制に HA 合成の変化が必要であるか否かを調べるため、4-MU による HA 合成の減少を補うように、外因性 HA (1.0 mg/ml) を培養液に添加した。外因性 HA 添加を行っても 4-MU による抑制効果はキャンセルされなかった(図 3)。細胞内代謝はコントロールでは好気性解糖系優位の ATP 産生であったが、IL-1 β 刺激により嫌気性解糖系優位の ATP 産生となった。IL-1 β 刺激により亢進した嫌気性解糖系優位の ATP 産生は 4-MU の投与により抑制された。培養液中の乳酸に関して、IL-1 β の刺激によりコントロールに比べて培養液中の乳酸放出が促進され、4-MU で有意に抑制された(図 4)。

【考察】

膝 OA の関節液中に放出された MMP は軟骨だけでなく、半月板や靭帯などの関節内組織にも拡散し、さらなる変性を引き起こすと考えられる。いくつかの研究では、MMP レベルの上昇と半月板の変性との間に関連性があると報告されている。しかし、膝の靭帯細胞に対するサイトカインや酵素の炎症作用を報告した研究は少ない。本研究では、ACL 由来細胞において、IL-1 β によって誘導される MMP 発現亢進に対する 4-MU の抑制効果を示した。また、ACL 由来細胞では、IL-1 β 刺激によって IL-6 の発現が亢進されることがわかった。IL-6 は軟骨変性の原因となる主要な炎症性サイトカインの一つである。IL-6 は ACL 損傷を受けた膝関節液や OA の膝関節液で上昇し、軟骨細胞に様々な異化因子を誘導することが報告されている。IL-6 の阻害がヒト OA 軟骨細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 および MMP-13 の発現を抑制する報告もある。ACL の変性は、少なくとも部分的には靭帯細胞における IL-6 の発現によって引き起こされている可能性があり、4-MU は靭帯細胞における炎症性メディエーターの発現を抑制することができると考えられた。

4-MU は HA 合成阻害剤として多くの研究に用いられてきた。4-MU による HA 合成阻害の機序には、4-MU-グルクロン酸(GlcUA)糖鎖の形成が関与しており、その結果、細胞内の UDP-GlcUA が減少することになる。以前、我々は軟骨細胞における 4-MU の抗炎症作用を報告したが、これは HA 合成阻害とは独立して作用するものであった。本研究では、ACL 由来細胞において HA が合成され、その合成量は IL-1 β 刺激によって亢進し、4-MU により HA 合成の亢進は阻害された。4-MU による MMP と IL-6 の発現抑制効果が HA 合成阻害依存的かどうかを調べるため、4-MU 投与と同時に 1.0mg/ml の外因性 HA を添加した。しかし、HA の添加は 4-MU によるターゲット遺伝子の抑制効果を減弱させなかった。これらの結果から、ACL 由来細胞の炎症反応に

対する 4-MU の抑制効果は、HA 合成阻害非依存的に作用することが明らかになった。

近年、OA を含むいくつかの慢性疾患において、細胞の代謝変化が起こることが示唆されている。OA の病因には、嫌気性解糖系亢進への代謝変化が関与していることが報告されており、嫌気性解糖系の亢進は炎症性疾患の新たな治療標的となり得る。そこで、4-MU の効果のメカニズムを解明するために、ACL 由来細胞において細胞内代謝に着目し、IL-1 β にて嫌気性解糖系への依存性が亢進した代謝を 4-MU が効果的に抑制することを確認した。また、嫌気性解糖系の代謝産物である L-乳酸を培養液中で評価したところ、IL-1 β によってその産生が亢進し、4-MU によって抑制されることを確認した。嫌気性解糖系を抑制すると、ミトコンドリア呼吸が二次的に促進されることが明らかになった。このような嫌気性解糖系抑制のような細胞代謝の変化は、4-MU によって細胞内の UDP-GlcUA が減少することに起因すると考えられる。

この研究の Limitation として ACL 由来の細胞が均質な集団であることが確認できなかった点が挙げられる。この細胞集団には滑膜細胞と靭帯細胞の両方が含まれている可能性がある。しかし、ACL 由来の細胞を用いた先行研究のほとんどは、今回使用した方法と同様の方法で細胞を分離している。また、OA 環境下での 4-MU 効果を検討するため、ACL 由来細胞と ACL 組織は OA 膝から採取した。したがって、観察された 4-MU 効果は、OA の ACL 由来細胞に限定される可能性がある。

【結論】

本研究では、4-MU が OA-ACL 由来細胞において、IL-1 β による MMP-1、MMP-3、IL-6 の発現亢進を抑制することを明らかにした。4-MU は軟骨細胞だけでなく、膝の靭帯に対しても抗炎症作用を示すことから、膝 OA の治療に有効である。