

主論文の要旨

**Simvastatin inhibits CD44 fragmentation in
chondrocytes**

〔 シンバスタチンは軟骨細胞における CD44 断片化を阻害する 〕

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

(指導：西田 佳弘 准教授)

寺部 健哉

【目的】

CD44 は様々な細胞で発現が確認されている一回膜貫通型タンパク質でヒアルロン酸 (HA) の主要なレセプターである。関節軟骨において HA とプロテオグリカンに富む細胞外マトリックスは HA と CD44 の結合によって細胞膜と連結しており軟骨細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしている。これまでに腫瘍細胞においてこの CD44 が酵素的断片化されることが報告されているが、以前の我々の報告でこの断片化が軟骨細胞においても認められることを示した。特に変形性関節症由来の軟骨細胞は正常軟骨由来のものと比較して顕著に断片化が発生していることから我々は CD44 の断片化は軟骨変性変化の重要な所見の一つであり断片化の抑制によって細胞外マトリックス保持、軟骨変性予防へとつながるものと考えた。この CD44 の断片化は細胞外領域における膜型 MMPs によって切断され ecto-domain と C-terminal truncation fragment (EXT) となった後さらに C 末端側の断片が γ セクレターゼで切断され intracellular domain (ICD) を生じる (Fig. 1A)。またこの断片化は CD44 が細胞膜上の lipid raft に移行することによって切断されることが報告されておりコレステロールキラーを用いて lipid raft を除去すると CD44 断片化も抑制される。以上より我々はコレステロールを低下させて CD44 断片化を阻害する可能性がある薬物として HMG-CoA 阻害剤であるスタチンに注目した。近年 HMG-CoA 阻害剤であるスタチンはその作用部位であるメバロン酸経路の特徴によりコレステロール低下作用に加えて様々な分野で多面的な効果があることが多数報告されており、関節軟骨においても軟骨変性保護作用、抗炎症作用等が報告されている。一方で CD44 を介した細胞外マトリックスへの効果についての報告は我々が渉猟した限りない。今回の研究の目的はスタチンが CD44 断片化を抑制し細胞外マトリックスを保持する効果の有無について検討することである。

【方法】

軟骨細胞様細胞株である HCS-2/8 細胞と牛関節軟骨細胞に加え変形性膝関節症に対して行った人工膝関節置換術患者から採取したヒト関節軟骨細胞にシンバスタチンを 48 時間前処置後 IL-1 β とオンコスタチン M (OSM) で 24 時間刺激した。Western blotting 法でスタチンの CD44 断片化抑制効果の有無について検討した。シンバスタチンによる細胞外マトリックスの保護効果を見るために赤血球による exclusion coat assay を施行した。シンバスタチンの作用機序解析目的にメバロン酸経路の中間代謝物をシンバスタチンに加えてその効果を検討した。またシンバスタチンによる lipid raft への作用を明らかにする目的でショ糖勾配法を用いてその動態を検討した。最後に siRNA 法を用いて CD44 の断片化に関与する膜型 MMP の特定を行い、CD44 との相互作用を検討した。

【結果】

IL-1 β と OSM 刺激により牛軟骨細胞において CD44 の断片化を示す EXT と ICD

の発現を Western blotting 法を用いて確認した (Fig. 1B)。シンバスタチンはいずれの軟骨細胞群においてもこの IL-1 β と OSM 刺激による CD44 断片化を濃度依存的に抑制した (Fig. 1C-F)。またシンバスタチンは牛軟骨細胞を用いた exclusion coat assay において IL-1 β と OSM 刺激による細胞外マトリックスの減少を有意に抑制した (Fig. 2A-G)。このシンバスタチンの効果がメバロン酸経路のどの経路を介しているかを確認するために中間代謝産物を各種加えて CD44 の断片化を評価した (Fig. 3A)。まずメバロン酸を加えた結果シンバスタチンの断片化抑制作用は消失したことよりこの効果はメバロン酸経路を阻害した結果であることを確認した (Fig. 3B)。更に下流産物であるコレステロール、ファルネシルピロリン酸 (FPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) の検討ではコレステロールと FPP を加えることでシンバスタチンの CD44 断片化抑制作用が消失した (Fig. 3C-E)。またファルネシル化、ゲラニルゲラニル化トランスフェラーゼ阻害剤を用いた検討でもファルネシル化阻害剤のみ軽度の断片化抑制を認めた (Fig. 3F, 3G)。これより本実験系においてシンバスタチンの効果発現にはコレステロール経路とファルネシル化経路の関与があることを示した。次にシヨ糖勾配法を用いて lipid raft 分画の抽出を行い、lipid raft マーカーである flotillin-1 を検討したところシンバスタチンは flotillin-1 の raft 分画における割合を相対的に減少させ CD44 の lipid raft への移行を抑制する結果を示した (Fig. 4A-H)。最後に siRNA 法を用いて CD44 を切断する膜型 MMP の特定を試みた結果 HCS-2/8 細胞、牛軟骨細胞共に ADAM10 のノックダウンのみ断片化を抑制した (Fig. 5A, 5B)。またシンバスタチンは活性型 ADAM10 の発現を抑制し ADAM10 阻害剤は CD44 断片化を抑制することを確認した (Fig. 5C-F)。共免疫沈降法で CD44 と ADAM10 の相互作用を検討した結果 IL-1 β と OSM 刺激によって相互作用を認め、シンバスタチンはこれを抑制した (Fig. 5G)。

【考察】

今回の我々の検討から軟骨細胞においてシンバスタチンが細胞外マトリックスの保持と CD44 の断片化を抑制する新たな効果があることを示した。このシンバスタチンの CD44 断片化抑制効果のメカニズムについて検討した結果シンバスタチンは CD44 を切断する活性型 ADAM10 の発現を抑制し、且つ断片化の場となる lipid raft を減少させ ADAM10 と CD44 の相互作用を抑制していた。CD44 の断片化はレセプターとしての機能を喪失し細胞外マトリックスの減少、消失に至るがシンバスタチンはこれらを安全かつ効果的に抑制し軟骨の修復、再生に適した環境を形成できることを示唆した。シンバスタチンの効果発現メカニズムの検討においてこれまでにスタチンが炎症性サイトカインによって亢進する MMP-13 発現を抑制しその効果はゲラニルゲラニル化経路を介するとの報告があるが今回の我々の検討ではゲラニルゲラニル化経路は関与せずコレステロール経路とファルネシル化経路の関与を示した。一方で今回の検討から CD44 の lipid raft への移行を阻害したのはシンバスタチンのコレステロール低下作用によるものを示唆する結果であった。これに加えメバロン酸経路の

特徴から FPP はコレステロールの前駆物質であること、ファルネシル化阻害剤の CD44 断片化抑制が軽度であった点を考慮すると今回の CD44 断片化の検討においてはシンバスタチンのコレステロール低下作用が最も主要なメカニズムである可能性が高いと考えた。経口薬としてのスタチンはコレステロール低下薬として広く使用され高い効果を得られるのは自明であるが変形性関節症に対する治療効果については明確なエビデンスを確立するには至っていない。一方で OA モデルに対するスタチンの関節注射が関節軟骨変性を抑制したという報告がありスタチンの投与方法が重要であることを示唆した。

【結論】

シンバスタチンは関節軟骨細胞の炎症性サイトカインによる CD44 断片化を阻害し細胞外マトリックスの保護作用を認めた。シンバスタチンは切断酵素である ADAM10 の発現を抑制するとともに lipid raft を低下させ断片化を抑制した。