

主論文の要旨

**Mechanical stress loading induces CD44 cleavage
in human chondrocytic HCS-2/8 cells**

（メカニカルストレスは軟骨様細胞株において
CD44 の断片化を引き起こす）

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：西田 佳弘 准教授）

小早川 知範

【緒言】

主要なヒアルロン酸 (HA) 受容体である CD44 は、1 回膜貫通型タンパク質であり関節軟骨の恒常性の維持に重要である。この HA と CD44 の結合は軟骨細胞の細胞外マトリックスにプロテオグリカンを保持するために必須である。CD44 は酵素的断片化によりレセプターとしての機能を消失することが報告されている。その機序は膜型 MMPs である ADAM10、ADAM17、MT1-MMP によって細胞外領域において切断され CD44-EXT となり、さらに γ -セクレターゼによって切断され intra cellular domain(ICD) を生じる。

変形性関節症(OA)における変性軟骨では CD44 の断片化が亢進している事、CD44-ICD を強制発現させる事で、細胞外マトリックスが消失する事から、CD44 の断片化と OA の発症には関連性があると考えられる。

OA の発生には、遺伝、年齢、肥満、機械的ストレスなど多くの因子が関与している。特に機械的ストレスは重要であり、軟骨細胞において過剰な力学的負荷が軟骨変性を引き起こすことが知られているが、負荷から変性に至るメカニズムは未だに明らかでない。

そこで、軟骨様細胞株(HCS-2/8 細胞)に機械的ストレスをかけ、CD44 の断片化の有無を調査した。さらに変性メカニズムを解明するため、断片化に影響を与える MMPs の変化についても調査した。また、近年メカノレセプターである TRPV-4 が注目されており、TRPV-4 刺激と CD44 の断片化の有無、MMPs の変化についても調査した。

【方法】

ヒト軟骨肉腫由来軟骨様細胞株である HCS-2/8 細胞を使用した。シリコンチャンバー上にて単層培養した HCS-2/8 細胞に STB140(STREX 社) を用い、伸展ストレスを強度や時間を変化させて加えた。その後、細胞を回収し、CD44 の断片化を Western blotting 法、ADAM10/17、MT1-MMP の発現量を Western blotting および Real-time PCR 法にて経時的に調査した。

また、full-confluence となった HCS-2/8 細胞に TRPV-4 agonist である GSK1016790A(GSK101)を濃度別に添加し、CD44 の断片化の有無、MMPs の変化についても調査した。

さらに ADAM10 阻害薬である GI254023、TRPV-4 阻害薬である GSK205 添加処理後に機械的ストレスを加え CD44 の断片化の有無を調査した。

【結果】

HCS-2/8 細胞に機械的ストレスを負荷した所、CD44 の断片化を認めた。(Figure1A) ストレス強度が強ければ強いほど、ストレス時間が長ければ長いほど CD44 の断片化は亢進する傾向にあった(Figure1B、C)。また、HCS-2/8 細胞に 48 時間より長時間のストレスをかけると、細胞がチャンバーから剥れたり、死んでしまった。よって、HCS-2/8 細胞に 20% elongation、60 cycles/min を 48 時間かける事で最も断片化の亢進を認めた。

膜型 MMPs では機械的ストレスにて ADAM10 の mRNA の発現量が亢進したが、ADAM17 と MT1-MMP は変化を認めなかった (Figure2A)。Western blotting 法にても ADAM10 の活性型である ADAM10-active form の発現が亢進した(Figure2B)。しかしながら、ADAM17、MT1-MMP の亢進は認めなかった(Figure2B)。また、HCS-2/8 細胞に ADAM10 阻害薬である GI254023 を濃度別に添加後機械的ストレスをかけた所、濃度依存性に CD44 の断片化が抑制された (Figure2C)。

また、HCS-2/8 細胞に GSK101 を添加し、Real-time PCR、Western blotting 法を行った。GSK101 添加にて ADAM10 の mRNA が濃度依存性に亢進した (Figure3A)。しかしながら、ADAM17 や MT1-MMP には有意な差を認めなかった。また、500nM、1000nM の GSK101 刺激にて ADAM10 の発現亢進 (Figure3B) と CD44 の断片 (Figure3C) を認めた。

次に TRPV-4 阻害薬である GSK205 をそれぞれ添加 24hrs 後に機械的ストレスを加えた。その後、細胞を回収し、Real-time PCR 法と Western blotting 法を行った所、GSK205 投与により ADAM10 発現の抑制 (Figure4A、B) と CD44 の断片化が抑制された(Figure4C)。

【考察】

我々は、HCS-2/8 細胞に機械的ストレスをかけることで CD44 の断片化が亢進する事を発見した。書家の報告では弱い機械ストレスはプロテオグリカンや type-II コラーゲンの産生を促進し軟骨細胞に良い影響を与えるとの報告があり、また、過度な機械的ストレスは OA を引き起こすとの報告がある。しかしながら、機械的ストレスと CD44 の断片化を調査した報告はいままでにはない。本研究では、機械的ストレスによる CD44 の断片化には ADAM10 が関与しており、他の MMPs は影響していない事が分かった。また、ADAM10 阻害薬を使用する事で断片化は抑制された。

Christopher らは、軟骨細胞におけるメカノレセプターが TRPV-4 であることを報告し、機械的ストレスにおける重要な役割を果たしている事を報告している。本研究においても、TRPV-4 刺激にて機械的ストレス同様に ADAM10 の発現が亢進し、CD44 の断片化が生じた。また、TRPV-4 阻害薬を HCS-2/8 細胞に添加すると、機械的ストレスによる ADAM10 の発現、CD44 の断片化も抑制された。

また、長野らは、Ca イオンの細胞内流入が ADAM10 を介して CD44 断片化を引き起こす事を報告しており、今回の結果と合わせると、①過剰な機械的ストレス、② TRPV-4 からの Ca イオン流入、③ADAM10 発現亢進、④CD44 断片化というメカニズムが想定される。このプロセスに介入して、CD44 断片化を阻害することが出来れば、CD44-ICD 産生による細胞外マトリックス喪失の抑制、ひいては軟骨変性の抑制が期待できると考える。

【結論】

HCS-2/8 細胞において機械的ストレスは ADAM10 を介し CD44 を断片化する。また、

TRPV-4 刺激にても機械的ストレス同様 CD44 の断片化を亢進させた。ADAM10 阻害薬、TRPV-4 阻害薬にて機械的ストレスによる CD44 の断片化が抑制された。