

主論文の要約

**Hyaluronan suppresses enhanced cathepsin K expression
via activation of NF- κ B with mechanical stress loading
in a human chondrocytic HCS-2/8 cells**

軟骨様細胞株(HCS2/8)において、メカニカルストレスによる
カテプシン K の発現亢進は高分子ヒアルロン酸により抑制する

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：石黒 直樹 教授)

鈴木 望人

【緒言】

変形性関節症（OA）は年齢、肥満、遺伝、機械的ストレス負荷など様々な因子が関与している。過剰な機械的ストレス負荷は OA 発症の重要な要因であるが、軟骨変性を引き起こすメカニズムは不明である。過去の研究では関節軟骨に対する機械的ストレス負荷による異化作用について報告されている。以前に我々はヒト OA 軟骨細胞におけるヒアルロン酸（HA）レセプターである CD44 断片化、および過剰な機械的ストレス負荷による CD44 断片化について報告した。

高分子量ヒアルロン酸（HMW-HA）の関節内注射は OA 治療として頻用されている。HA は抗炎症、疼痛緩和、関節軟骨維持に重要な役割を果たしている。HA の様々な作用機序や OA 治療に対する臨床的有効性は報告されているが、その機序は完全には解明されていない。軟骨変性における HA 作用のメカニズムを解明するため、軟骨細胞におけるカテプシン K 発現を調べる必要があると考えた。システインプロテアーゼであるカテプシン K は、I 型/II 型コラーゲンの骨および軟骨に関与している。この酵素は骨リモデリングおよび関節軟骨分解に関与することが報告されている。我々は以前、ヒト線維芽細胞を用いてリポ多糖（LPS）によって誘導されるカテプシン K 発現の亢進を HA によって抑制したことを報告した。しかし機械的ストレス負荷によるカテプシン K 発現の変化、また軟骨細胞でのカテプシン K 発現に対する HMW-HA の効果についての報告はない。

この研究ではヒト軟骨様細胞株（HCS-2/8）を用いて機械的ストレス負荷によって誘導されるカテプシン K の発現の変化について調べた。またカテプシン K の発現に対する HMW-HA の抑制効果も調べた。私たちの研究結果は OA 治療のための関節内 HA 注射の有効性を支持する新しいエビデンス構築に役立つと考えている。

【対象及び方法】

ヒト軟骨様細胞株 HCS-2/8 (2×10^5 cells) を I 型コラーゲン（Cellmatrix®, Nitta Gelatin、日本）でコーティングしたシリコンチャンバー（STB-CH-10, STREX, Japan）上にて 2 日間培養した。培養後、自動伸展刺激装置 STB-140（STREX、日本）を用いて 24 時間伸展ストレス（CTS）を行った（under cyclic loading 20% elongation, 60cycles/min）。また高分子ヒアルロン酸（Artz®, average 900 kDa）および NF- κ B 阻害剤ヘレナリンによる前処置後（1 mg/mL）に伸展ストレスを行い、カテプシン K 発現および NF- κ B 活性化について検討した。メッセンジャーリボ核酸（mRNA）およびタンパク質発現は、それぞれリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびウエスタンブロッティングによって評価した。

【結果】

ヒト軟骨様細胞株 HCS-2/8 (2×10^5 cells) を I 型コラーゲンでコーティングした 10cm² シリコンチャンバー上で 2 日間培養した後、様々な伸展ストレス（CTS）負荷強度にてカテプシン K 発現を調べた。カテプシン K 発現は 1Hz および 20%での 24 時間 CTS

負荷で有意に亢進した (図 1A)。カテプシン K 発現の時間依存性を調べるため、1Hz および 20%下にて 0-24 時間 CTS 負荷を行った。カテプシン K 発現は、0 時間と比較して、24 時間 CTS 負荷で有意に亢進した (図 1B,C)。

高分子ヒアルロン酸 (HMW-HA) による 1 時間前処理した後、1Hz および 20%の 24 時間 CTS 負荷を行った。HMW-HA (1 mg/mL) 前処理によって、24 時間 CTS 負荷によるカテプシン K 発現を抑制した (図 2A,B)。HMW-HA 効果に關与する HA 受容体を調べるため、HMW-HA 前処理 1 時間前に抗 CD44 抗体および抗 ICAM-1 抗体による前処理を行った。図 2C に示すように、抗 CD44 抗体によって HMW-HA 効果を明らかに阻害した。

1Hz および 20%下にて 120 分間 CTS 負荷を行い、NF- κ B の活性化を調べた。NF- κ Bp65 のリン酸化は CTS 負荷 60 分で明らかに認められた (図 3A)。次いで HMW-HA で 1 時間前処理し、60 分間 CTS 負荷を行った。HMW-HA 前処理によって、CTS 負荷により誘導される NF- κ Bp65 のリン酸化を有意に抑制した (図 3B)。NF- κ B 活性化が CTS 負荷によって誘導されるカテプシン K 発現に關与しているかを調べるために、NF- κ B 阻害剤であるヘレナリンによる前処理を行った。ヘレナリン前処理によって、CTS 負荷によって誘導される NF- κ Bp65 のリン酸化を有意に抑制した (図 4A)。またヘレナリン (1 μ M) による前処理は、カテプシン K 発現を有意に抑制した (図 4B)。

【考察】

本研究ではヒト軟骨様細胞株において、機械的ストレス負荷は NF- κ B 活性化を介してカテプシン K 発現を亢進させることがわかった。HMW-HA 前処理により NF- κ B 活性化の抑制し、カテプシン K 発現を抑制した。システインプロテイナーゼであるカテプシン K は OA の II 型コラーゲンの断片化に關与している。以前の研究ではヒト OA 軟骨におけるカテプシン K 発現亢進が報告されている。またカテプシン K 阻害により、マウス OA モデルの軟骨変性が減少したことが報告されている。これら以前の研究に基づいて、カテプシン K は OA の潜在的な治療標的と考えられている。HMW-HA を用いて過剰な機械的ストレス負荷によるカテプシン K 発現を抑制することは HA 注射の臨床的有効性のメカニズムを解明する可能性がある。

本研究では、1Hz および 20%下でカテプシン K 発現の有意な亢進が認められた。過剰な機械的ストレス負荷は、細胞によって様々なプロトコルで軟骨細胞の異化 (MMP-3、MMP-13) を誘発することが報告されている。従って異化変化を誘発するのに十分な機械的応力負荷の強度を検証する必要がある。本研究では、0.5Hz および 10%下のストレス負荷ではカテプシン K 発現に有意差を認めなかった。この実験条件は機械的応力負荷の生理学的強度であり、1Hz および 20%の強度はいわゆる過剰な機械的応力負荷であると考えた。

HA は関節軟骨の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしている。外因性 HA は、その受容体との結合を介して抗炎症活性を示すことが報告されている。HA はいくつかの表面分子と結合することが知られており、CD44 は最もよく知られている HA 受

容体である。我々は以前、CD44 が LPS 刺激により誘導されるカテプシン K 発現の亢進に対する HA の抑制効果に関与していると報告した。本研究では CD44 が機械的ストレス負荷により誘発されるカテプシン K 発現の亢進に対する HA の抑制効果に関与することがわかった。

NF- κ B の転写は、ADAMTS や MMP などの異化酵素の誘導に重要な役割を果たしている。NF- κ B 経路は、機械的ストレス負荷によって活性化されると報告されている。我々の研究は CTS 負荷がカテプシン K 発現につながる NF- κ B 活性化を誘導したことを実証した。さらに HA による NF- κ B 阻害は、カテプシン K の発現を抑制した。NF- κ B 経路の阻害は OA 治療における HA 作用の分子メカニズムの一部かもしれない。

本研究の **limitation** として、使用した伸展刺激装置は生体内で軟骨細胞が受ける圧縮力を再現できていない。しかし過去の報告で蛋白分解酵素発現を評価する伸展刺激装置の有効性が実証されている。今後の研究では、圧縮、せん断力、静水圧などの様々な種類の機械的応力を調べる必要がある。

【結論】

過剰な機械的ストレス負荷は、ヒト軟骨様細胞株 HCS-2/8 において、NF- κ B 活性化を介してカテプシン K の発現を誘導した。HMW-HA 前処理は、機械的ストレス負荷下で NF- κ B 活性化とカテプシン K 発現の両方を効果的に抑制した。これらの結果は OA につながる過剰な機械的ストレス負荷の異化作用を裏付けるメカニズムを説明し、OA 治療のための関節内 HA 注射の有効性を支持する新しいエビデンスを示した。