



ウシ関節軟骨細胞の一酸化窒素（NO）産生に及ぼす トロンビンの影響

良原，久浩

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-07-02

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2510

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002510>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【105】

氏 名・(本 籍) 良原 久浩 (韓国)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1427号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

ウシ関節軟骨細胞の一酸化窒素 (NO) 産生に
及ぼすトロンビンの影響

審 査 委 員

主査 教授 伊東 宏

教授 黒坂 昌弘

教授 熊谷 俊一

【緒言】

トロンピンは凝固以外にも様々な生理的作用を示すが、慢性関節リウマチ（RA）患者の関節液中に高濃度のトロンピンが存在することから、トロンピンが慢性関節炎の関節破壊に関与している可能性がある。この機序には、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）を中心とする軟骨基質の酵素的破壊と、活性酸素や一酸化窒素（NO）による軟骨基質の力学的特性の劣化、あるいは軟骨細胞の直接的な障害を介した非酵素的破壊がある。

さて、トロンピンはセリン系蛋白分解酵素であり、*in vitro* において関節軟骨の細胞外基質を分解することから、酵素的破壊に関与している可能性がある。また、トロンピンは神経膠細胞に作用し NO 産生を促進することから、NO を介した非酵素的破壊に関与している可能性が大きい。

そこで、慢性炎症下での関節軟骨の破壊機序を解明する目的で、NO 産生細胞のひとつである関節軟骨細胞からの NO 産生に対するトロンピンの作用を検討した。

【材料と方法】

1. ウシ関節軟骨細胞の培養

ウシより採取した関節軟骨片からコラゲナーゼ処理にて得られた軟骨細胞を単層培養した。12 時間から 24 時間静置後、以下の実験に供した。

2. ウシ関節軟骨細胞の NO 産生に及ぼすトロンピンおよびトロンピン受容体アゴニストの作用の検討

産生された NO は培養液中で瞬時亜硝酸イオン（nitrite）に酸化される。そこで Griess 法を用いて培養液中の nitrite 濃度を測定し、NO 産生の指標とした。

24 穴培養プレートに播種した軟骨細胞に種々の濃度のトロンピンあるいはトロンピン受容体アゴニスト（TRA）を添加し 48 時間培養後、培養液中の nitrite 濃度を測定した。また、この nitrite が軟骨細胞から産生されることを確認する目的で、NO 産生酵素のひとつである誘導型 NO 産生酵素（iNOS）の阻害剤、N^G-モノメチル-L-アルギニン（L-NMMA）を添加し nitrite 濃度を測定した。

さらに、トロンピン刺激による軟骨細胞の NO 産生過程における核内転写因子の役割を検討する目的で、核内転写因子のひとつである nuclear factor- κ B（NF- κ B）の活性化阻害作用を示す pyrrolidine dithiocarbamate（PDTC）をトロンピンと同時に添加し、NO 産生の変化を検討した。

3. RT-PCR 法を用いた関節軟骨細胞の iNOS mRNA 発現の検討

RT-PCR 法を用いて NO 産生過程における iNOS mRNA の発現の有無を検討した。

6 穴培養プレートに播種した軟骨細胞に種々の濃度のトロンピンを添加し 6 時間培養後、細胞から total RNA を分離した。また、同様に PDTC 存在下にトロンピン刺激を行い 6 時間培養後、total RNA を分離した。この total RNA から逆転写された cDNA を鋳型に、各遺伝子に特異的なプライマーを用いて 3-step PCR 法を行った。

GAPDH mRNA 由来 cDNA の蛍光強度を内部コントロールとし、各条件下における iNOS mRNA 由来 cDNA の蛍光強度を比較検討した。

4. 統計学的解析

NO 産生量は独立した 6 検体の平均値を unpaired Student's t-test を用いて検定し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

【結果】

1. ウシ関節軟骨細胞の NO 産生に及ぼすトロンピンの影響

トロンピン濃度に依存して培養液中の nitrite 濃度は増加し、1U/ml 以上のトロンピン添加により有意な nitrite 濃度の上昇を認めた。

トロンピン刺激による nitrite 濃度の上昇は、1mM の L-NMMA を添加により完全に阻害された。すなわち、トロンピン刺激による nitrite 濃度の上昇は、iNOS に依存することが明らかとなった。

さて、トロンピンは複数のトロンピン受容体を介して細胞内にシグナルを伝達している。そこで、受容体のひとつである protease-activated receptor-1（PAR-1）のアゴニストである TRA を添加した。TRA を最大 100 μ M まで添加しても、nitrite 濃度は非添加群と比較してほとんど変化しなかった。すなわち、トロンピンは軟骨細胞の NO 産生を増強させるが、その過程に PAR-1 は関与していない可能性が大きい。

2. 関節軟骨細胞の iNOS mRNA 誘導に及ぼすトロンピンの影響

GAPDH mRNA は最大 10U/ml のトロンピンを添加してもその発現量に大きな変化は認めなかったが、iNOS mRNA の発現量はトロンピンの濃度に依存して明らかに増強した。

すなわち、トロンピン刺激による軟骨細胞からの NO 産生は、iNOS mRNA の発現調節を受けた iNOS に依存している可能性が示された。

3. トロンピンによる関節軟骨細胞からの NO 産生における核内転写因子 NF- κ B の役割

IL-1 などのサイトカインの細胞内へのシグナル伝達機構において NF- κ B などの様々な核内転写因子が同定されている。IL-1 刺激下における軟骨細胞の iNOS mRNA 発現調節には NF- κ B が重要な役割を演じていることから、トロンピン刺激による軟骨細胞からの NO 産生増加にも NF- κ B の関与が考えられる。

100 μ M PDTC の添加により、nitrite 濃度の上昇は完全に抑制された。また、1U/ml あるいは 10U/ml のトロンピン刺激による iNOS mRNA 発現は、100 μ M PDTC の同時に添加により明らかに抑制された。

すなわち、トロンピン刺激による軟骨細胞の iNOS mRNA の発現増強および iNOS に依存する NO 産生の促進は、NF- κ B の活性化を介している可能性が示された。

【考察】

トロンピンは血液凝固カスケード反応において重要な役割を演じている。さらに血管内皮細胞や

平滑筋細胞、神経細胞などを活性化し血圧調節や器官形成、組織修復、炎症、発癌、アルツハイマー病など様々な生理学的あるいは病理学的な現象に関与している。

さて、RA は滑膜増殖を特徴とする慢性肉芽腫性炎症であるが、健康人や変形性関節症患者と比べ RA 患者の関節液中で高濃度のトロンビンを確認することから、RA の病態形成に対するトロンビンの関与が考えられる。

トロンビンは血管透過性を亢進させたり、炎症細胞の血管内皮細胞への接着や局所への遊走を促進する。また、トロンビンが滑膜細胞の IL-6 産生を促進することや、滑膜細胞の増殖を刺激することから、RA の病態形成にトロンビンが重要な役割を演じている可能性が大きい。さらに、トロンビンは軟骨基質の分解を促進したり、軟骨細胞に作用し MMP の合成を促進することにより、関節軟骨の酵素的破壊に関与していると考えられる。

さて、炎症下での関節軟骨の破壊機序には、NO による軟骨細胞の直接的な障害も重要である。NO は軟骨細胞の細胞外基質産生を抑制したり、細胞死を誘導する結果、関節軟骨の力学的機能を劣化させる。一方、実験関節炎モデルに iNOS 阻害剤を投与すると、NO 産生抑制の結果、関節軟骨の破壊が抑制される。トロンビンも種々の細胞において NO 産生を調節することが報告されており、炎症下における関節軟骨の NO を介した非酵素的破壊にもトロンビンが関与している可能性が大きい。

我々はトロンビンが軟骨細胞に作用し iNOS mRNA の発現調節を介して NO 産生の亢進を引き起こすことを示した。また、NO 産生調節は、核内転写因子 NF- κ B の活性化を介している可能性を示した。

トロンビンによる NO 産生調節機構には、トロンビン受容体を介した直接的な血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の NO 産生抑制と、トロンビンによるこれらの細胞のエンドセリン産生促進を介した間接的な単球からの NO 産生促進がある。一方、神経膠細胞は炎症性サイトカインやプロスタノイドを産生しその病態に重要な役割を演じているが、トロンビンはこの神経膠細胞にも作用し、NO 産生を促進することが報告されている。

トロンビンの受容体は 7 回膜貫通型 G 蛋白供役受容体に属し、蛋白分解酵素により活性化されるため protease-activated receptor (PAR) と呼ばれる。PAR のうちトロンビン受容体である PAR-1、-3、-4 は様々な細胞膜上に発現しているが、滑膜細胞や軟骨細胞上に PAR が発現しているか否か明らかでない。しかし、同じ間葉系細胞である線維芽細胞や単球などには PAR-1 が発現しており、滑膜細胞や軟骨細胞表面にも PAR-1 が発現している可能性はある。

トロンビンによる神経膠細胞からの NO 産生促進については、細胞内情報伝達機構として蛋白リシン酸化酵素 C (PKC)、MAPK、NF- κ B の活性化が同定されている。また、神経膠細胞表面には PAR-1 の存在が報告されているが、PAR-1 を選択的に活性化する TRA を用いた検討から、トロンビンによる神経膠細胞の NO 産生促進には PAR-1 ではなく、近年、筋芽細胞や線維芽細胞において同定

された non-PAR トロンビン受容体の関与も示唆されている。

今回の結果より、トロンビン刺激による軟骨細胞の NO 産生には NF- κ B の活性化が重要であると考えられた。しかし、TRA を用いても NO 産生は促進されなかったことより、軟骨細胞でも神経膠細胞と同様に non-PAR トロンビン受容体が存在している可能性がある。

本研究では、PKC や MAPK の関与については検討を行っておらず、また軟骨細胞表面の PAR-1 や non-PAR トロンビン受容体の存在も不明であり、今後詳細な検討が必要である。しかし今回の検討では、トロンビンが軟骨細胞の NO 産生を促進することから、慢性炎症下における関節軟骨の破壊において酵素的破壊ばかりでなく非酵素的破壊においても重要な役割を演じていることが示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1415 号	氏名	良原久浩
論文題目	ウシ関節軟骨細胞の一酸化窒素（NO）産生に及ぼす トロンビンの影響		
審査委員	主査 伊東 竜 副査 熊谷 俊一 副査 黒坂 昌弘		
審査終了日	平成 14 年 3 月 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

【緒言】

トロンピンは凝固以外にも様々な生理的作用を示すが、慢性関節リウマチ（RA）患者の関節液中に高濃度のトロンピンが存在することから、トロンピンが慢性関節炎の関節破壊に関与している可能性がある。この機序には、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）を中心とする軟骨基質の酵素的破壊と、活性酸素や一酸化窒素（NO）による軟骨基質の力学的特性の劣化、あるいは軟骨細胞の直接的な障害を介した非酵素的破壊がある。

さて、トロンピンはセリン系蛋白分解酵素であり、in vitro において関節軟骨の細胞外基質を分解することから、酵素的破壊に関与している可能性がある。また、トロンピンは神経膠細胞に作用し NO 産生を促進することから、NO を介した非酵素的破壊に関与している可能性が大きい。

そこで、慢性炎症下での関節軟骨の破壊機序を解明する目的で、NO 産生細胞のひとつである関節軟骨細胞からの NO 産生に対するトロンピンの作用を検討した。

【材料と方法】

1. ウシ関節軟骨細胞の培養

ウシより採取した関節軟骨片からコラゲナーゼ処理にて得られた軟骨細胞を単層培養した。12時間から24時間静置後、以下の実験に供した。

2. ウシ関節軟骨細胞の NO 産生に及ぼすトロンピンおよびトロンピン受容体アゴニストの作用の検討

産生された NO は培養液中で瞬時亜硝酸イオン（nitrite）に酸化される。そこで Griess 法を用いて培養液中の nitrite 濃度を測定し、NO 産生の指標とした。

24 穴培養プレートに播種した軟骨細胞に種々の濃度のトロンピンあるいはトロンピン受容体アゴニスト（TRA）を添加し 48 時間培養後、培養液中の nitrite 濃度を測定した。また、この nitrite が軟骨細胞から産生されることを確認する目的で、NO 産生酵素のひとつである誘導型 NO 産生酵素（iNOS）の阻害剤、N^G-モノメチル-L-アルギニン（L-NMMA）を添加し nitrite 濃度を測定した。

【結果】

1. ウシ関節軟骨細胞の NO 産生に及ぼすトロンピンの影響

トロンピン濃度に依存して培養液中の nitrite 濃度は増加し、1U/ml 以上のトロンピン添加により有意な nitrite 濃度の上昇を認めた。

トロンピン刺激による nitrite 濃度の上昇は、1mM の L-NMMA を添加により

完全に阻害された。すなわち、トロンビン刺激による nitrite 濃度の上昇は、iNOS に依存することが明らかとなった。

さて、トロンビンは複数のトロンビン受容体を介して細胞内にシグナルを伝達している。そこで、受容体のひとつである protease-activated receptor-1 (PAR-1) のアゴニストである TRA を添加した。TRA を最大 100 μ M まで添加しても、nitrite 濃度は非添加群と比較してほとんど変化しなかった。すなわち、トロンビンは軟骨細胞の NO 産生を増強させるが、その過程に PAR-1 は関与していない可能性が大きい。

2. 関節軟骨細胞の iNOS mRNA 誘導に及ぼすトロンビンの影響

GAPDH mRNA は最大 10U/ml のトロンビンを添加してもその発現量に大きな変化は認めなかったが、iNOS mRNA の発現量はトロンビンの濃度に依存して明らかに増強した。

すなわち、トロンビン刺激による軟骨細胞からの NO 産生は、iNOS mRNA の発現調節を受けた iNOS に依存している可能性が示された。

3. トロンビンによる関節軟骨細胞からの NO 産生における核内転写因子 NF- κ B の役割

IL-1 などのサイトカインの細胞内へのシグナル伝達機構において NF- κ B などの様々な核内転写因子が同定されている。IL-1 刺激下における軟骨細胞の iNOS mRNA 発現調節には NF- κ B が重要な役割を演じていることから、トロンビン刺激による軟骨細胞からの NO 産生増加にも NF- κ B の関与が考えられる。

100 μ M PDTC の添加により、nitrite 濃度の上昇は完全に抑制された。また、1U/ml あるいは 10U/ml のトロンビン刺激による iNOS mRNA 発現は、100 μ M PDTC の同時に添加により明らかに抑制された。

すなわち、トロンビン刺激による軟骨細胞の iNOS mRNA の発現増強および iNOS に依存する NO 産生の促進は、NF- κ B の活性化を介している可能性が示された。