



# Titanium-alloy particles induced cyclooxygenase-2 in human macrophage-like cells in vitro

Niikura, Tahahiro

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Date of Publication)

2013-04-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2820

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002820>

※ 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。



【 106 】

氏名・(本籍) 新倉 隆宏 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第1501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15年3月31日

【 学位論文題目 】

Titanium-Alloy Particles Induced Cyclooxygenase-2 in Human  
Macrophage-like cells in vitro  
(チタン合金粒子刺激によるヒトマクロファージ様細胞のシクロオキシゲナーゼ2誘導)

審 査 委 員

主 査 教 授 黒坂 昌弘  
教 授 尾原 秀史  
教 授 前田 盛

人工関節の弛みは、人工関節手術が成績不良となる主な原因の一つで、しばしば再手術を要することとなる。この人工関節の弛みの原因として、人工関節由来の磨耗粉（骨セメント、ポリエチレン、金属等）に対する細胞、組織学的反応が人工関節周囲の骨融解、骨吸収を惹起し、人工関節の弛みへと繋がるということが認識されている。これらの反応において主に作用する細胞はマクロファージであると考えられており、その主なメカニズムは、人工関節由来の磨耗粉を貪食したマクロファージが産生したプロスタグランジン、サイトカイン（tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6等）等のケミカルメディエーターが、破骨細胞性骨吸収を活性化して生じるものと一般的に認識されている。しかし、これらのケミカルメディエーターが実際どのように作用しているのか、あるいはどのメディエーターが最も重要なのかといったことは、未だ明らかではない。

これらのメディエーターの中で、プロスタグランジンE<sub>2</sub>（以下PGE<sub>2</sub>）は、Goldringらが、弛みをきたしたセメント使用人工股関節周囲の膜様組織の培養上清中に、その存在を初めて報告して以来、人工関節周囲の骨吸収に重要な役割を担う一因子として認識されるようになった。また、弛みをきたした人工関節周囲の膜様組織中には、磨耗粉を貪食したマクロファージ様細胞が多数みられることから、*in vitro*において、マクロファージ様細胞に骨セメント、金属（チタン合金等）等のparticleを作用させる実験が数多く行われ、PGE<sub>2</sub>の産生が報告されてきた。これらのことから、磨耗粉を貪食したマクロファージ様細胞が産生するPGE<sub>2</sub>が、人工関節周囲の骨吸収、骨融解に関与していると認識されている。

さて、プロスタグランジンの生合成の経路は、3種類の酵素によって調節されているが、この経路の中で、シクロオキシゲナーゼ（以下COX）が最も重要な律速段階の酵素であることが知られている。このCOXには、構成型酵素であるCOX-1と、誘導型酵素であるCOX-2という2種類のアイソザイムがあることが知られている。一般的に、COX-1はホメオスタシスの維持に重要な役割をしており、これに対し、COX-2は様々な刺激、例えば炎症性サイトカインによって誘導され、種々の炎症反応を制御していると考えられている。しかし、骨代謝におけるこれら2種類のアイソザイムの役割は、これらが骨代謝においてそれぞれ異なった作用をしていることが示唆されているが、いまだ不明確である。

最近の研究で、弛みをきたした人工関節周囲の膜様組織中の、磨耗粉を貪食したマクロファージにCOX-2の存在が免疫組織学的に証明された。よって、COX-2が人工関節の弛みにおいて何らかの作用をしていることが示唆された。しかしながら、過去の研究においては、この病態におけるCOX-1、COX-2の関係、といったことは十分に示されていない。また、particleを貪食したヒトマクロファージ様細胞のPGE<sub>2</sub>産生については、前述した様な報告があるが、その合成酵素であるCOX-1、COX-2の発現についての報告は、みられない。

そこで、本実験では、磨耗粉によって引き起こされる人工関節周囲の骨吸収におけるCOX-1、COX-2の関与について検討することを目的とし、ヒトマクロファージ様細胞にチタン合金粒子を貪食させ、COX-1、COX-2のmRNAの発現について検討した。また、PGE<sub>2</sub>の産生、PGE<sub>2</sub>産生に及ぼすCOX阻害剤の影響についても検討した。

実験にはヒトマクロファージ様細胞として、浮遊細胞であるヒト単球様細胞株U937をPMA 10nMで3日間刺激後、PMA freeとし1日静置して得られた付着細胞を用いた。ヒトマクロファージ様細胞を24穴plateに100万個/mlで播種し、チタン合金粒子0.1mg、0.5mg、1mgを添加し刺激した。また、positive controlとしてリボポリサッカライドを用いた。チタン合金粒子は、ヒトマクロファージ様細胞が貪食可能な径5 $\mu$ m未満のものを用いた。光学顕微鏡で、ヒトマクロファージ様細胞がチタン合金粒子を貪食している様子が観察された。刺激4、12、24時間後に、培養上清を回収し、ELISAでPGE<sub>2</sub>の定量を行った。刺激4時間後ではPGE<sub>2</sub>産生の増強はみられなかったが、刺激12時間後、24時間後をみると、チタン合金粒子刺激によって容量依存性に、また時間依存性にPGE<sub>2</sub>産生の増強が認められた。

また、刺激4時間後に細胞からRNAを抽出し、RT-PCRを行い、COXその他のmRNAの発現について検討した。COX-1 mRNAは刺激の有無にかかわらず恒常的に発現がみられるのに対し、COX-2 mRNAはチタン合金粒子刺激群、特に0.5mg、1mgを与えた群に発現を認めた。

次に、前記培養系のチタン合金粒子刺激群にCOX-2選択的阻害剤とされるNS-398を濃度勾配をつけて添加し、12時間後に培養上清中のPGE<sub>2</sub>をELISAで定量し、その影響について検討した。NS-398添加によって、チタン合金粒子刺激により増強されたPGE<sub>2</sub>産生が濃度依存性に抑制され、1 $\mu$ MのNS-398によってPGE<sub>2</sub>産生の増強は完全に抑制された。

本実験において、ヒトマクロファージ様細胞がチタン合金粒子を貪食することでPGE<sub>2</sub>産生の増強がみられ、過去の報告と合致する結果が得られた。

RT-PCRによる検討では、COX-1 mRNAは刺激の有無にかかわらず恒常的に発現がみられるのに対し、COX-2 mRNAはチタン合金粒子刺激群に発現を認め、また、PGE<sub>2</sub>産生はCOX-2選択的阻害剤とされるNS-398添加によって抑制された。これらのことから、本実験におけるヒトマクロファージ様細胞のPGE<sub>2</sub>産生は、構成型酵素であるCOX-1を介してではなく、チタン合金粒子を貪食することで誘導されたCOX-2を介する経路が考えられた。

本研究により、摩擦粉により誘発される人工関節周囲の骨融解、また、人工関節の弛みにおける、COX-1とは異なった、COX-2の重要な役割が示唆された。また、COX-2誘導を介したPGE<sub>2</sub>が骨融解に関与しているのならば、COX-2阻害剤によって、骨融解を抑制できる可能性も考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

|       |   |    |      |
|-------|---|----|------|
| 受付番号  | 甲第 1488 号   | 氏名 | 新倉隆宏 |
| 論文題目  | Titanium-Alloy Particles Induced Cyclooxygenase-2 in Human Macrophage-Like Cells in Vitro<br>チタン合金粒子刺激によるヒトマクロファージ様細胞のシクロオキシゲナーゼ2誘導 |    |      |
| 審査委員  | 主 査 黒坂昌弘<br>副 査 尾原秀史<br>副 査 新田 盛  |    |      |
| 審査終了日 | 平成 15 年 2 月 26 日  |    |      |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

はじめに

人工関節の弛みは、人工関節手術が成績不良となる主な原因の一つで、しばしば再手術を要することとなる。この人工関節の弛みの主なメカニズムは、人工関節由来の磨耗粉をマクロファージが貪食してプロスタグランジン、サイトカイン等のケミカルメディエーターを産生し、これらが、破骨細胞性骨吸収を活性化して生じるものと一般的に認識されている。これらのメディエーターの中で、プロスタグランジンE<sub>2</sub> (以下PGE<sub>2</sub>) は、人工関節周囲の骨吸収に重要な役割を担う一因子として認識されている。しかし、過去の研究においては、この病態における、プロスタグランジンの生合成における律速段階の酵素であるシクロオキシゲナーゼ (以下COX) の2種類のアイソザイムであるCOX-1、COX-2の関係、といったことは十分に示されていない。本実験では、摩耗粉によって引き起こされる人工関節周囲の骨吸収におけるCOX-1、COX-2の関与について検討することを目的とし、ヒトマクロファージ様細胞にチタン合金粒子を貪食させ、COX-1、COX-2のmRNAの発現について検討した。また、PGE<sub>2</sub>の産生、PGE<sub>2</sub>産生に及ぼすCOX阻害剤の影響についても検討した。

#### 対象と方法

実験にはヒトマクロファージ様細胞として、浮遊細胞であるヒト単球様細胞株U937をPMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 10nMで3日間刺激後、PMA freeとし1日静置して得られた付着細胞を用いた。ヒトマクロファージ様細胞を24穴plateに100万個/mlで播種し、チタン合金粒子 (Ti-6Al-4V) 0.1mg、0.5mg、1mgを添加し刺激した。チタン合金粒子は、ヒトマクロファージ様細胞が貪食可能な径5μm未満のものを用いた。

#### 1) PGE<sub>2</sub>の定量

刺激4、12、24時間後に、培養上清を回収し、ELISAでPGE<sub>2</sub>の定量を行った。

#### 2) COX-1、COX-2のmRNAの発現について

刺激4時間後に細胞からRNAを抽出し、RT-PCRを行い、COXその他のmRNAの発現について検討した。

#### 3) PGE<sub>2</sub>産生に及ぼすCOX阻害剤の影響について

前記培養系のチタン合金粒子刺激群にCOX-2選択的阻害剤とされるNS-398を濃度勾配をつけて添加し、12時間後に培養上清中のPGE<sub>2</sub>をELISAで定量した。

#### 結果

光学顕微鏡で、ヒトマクロファージ様細胞がチタン合金粒子を貪食している様子が

観察された。

1) 刺激4時間後ではPGE<sub>2</sub>産生の増強はみられなかったが、刺激12時間後、24時間後を見ると、チタン合金粒子刺激によって容量依存性に、また時間依存性にPGE<sub>2</sub>産生の増強が認められた。

2) COX-1 mRNAは刺激の有無にかかわらず恒常的に発現がみられるのに対し、COX-2 mRNAはチタン合金粒子刺激群、特に0.5mg、1mgを与えた群に発現を認めた。

3) NS-398添加によって、チタン合金粒子刺激により増強されたPGE<sub>2</sub>産生が濃度依存性に抑制され、1μMのNS-398によってPGE<sub>2</sub>産生の増強は完全に抑制された。

#### 考察ならびに結論

本実験において、ヒトマクロファージ様細胞がチタン合金粒子を貪食することでPGE<sub>2</sub>産生の増強がみられ、過去の報告と合致する結果が得られた。RT-PCRによる検討では、COX-1 mRNAは刺激の有無にかかわらず恒常的に発現がみられるのに対し、COX-2 mRNAはチタン合金粒子刺激群に発現を認め、また、PGE<sub>2</sub>産生はCOX-2選択的阻害剤とされるNS-398添加によって抑制された。これらのことから、本実験におけるヒトマクロファージ様細胞のPGE<sub>2</sub>産生は、構成型酵素であるCOX-1を介してではなく、チタン合金粒子を貪食することで誘導されたCOX-2を介する経路が考えられた。

本研究により、摩耗粉により誘発される人工関節周囲の骨融解、また、人工関節の弛みには、COX-1とは異なった機序で、COX-2が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、COX-2阻害剤によって、骨融解を抑制できる可能性も考えられ、人工関節の弛みを防いで長期成績の向上に繋げる可能性を示唆した価値ある研究であると思われる。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。