家兎滑膜細胞由来の軟骨細胞活性化因子に関する実験的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡辺, 省二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7955

家兎滑膜細胞由来の軟骨細胞活性化因子に関する実験的研究

金沢大学医学部整形外科学講座（主任：野村　進教授）
渡　辺　省　二

（昭和62年5月6日受付）

家兎滑膜細胞由来の軟骨細胞活性化因子（カタボリン）の滑膜細胞における起源と軟骨細胞への作用を生化学的に検索するとともに，この因子を部分精製した．初代培養家兎滑膜細胞および樹立家兎滑膜線維芽細胞（HIG-82株）を，0.1 μg/ml の phorbol myristate acetate（PMA）処理する事により順化培地を作製した．この順化培地を4倍稀釈した培養液で初代培養家兎関節軟骨細胞を培養すると，軟骨細胞は活性化され，その培養液中の中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼおよび中性コラゲナーゼの各活性とプロスタグランジン E_2（PGE_2）量は著しく増加した．その増加は，HIG-82株細胞順化培地による刺激で，それぞれコントロールの86.4倍（$p<0.001$），60.3倍（$p<0.01$），51.7倍（$p<0.05$），21.9倍（$p<0.05$）であり，初代滑膜細胞順化培地による刺激で，それぞれコントロールの75.2倍（$p<0.001$），65.6倍（$p<0.01$），54.3倍，23.1倍（$p<0.05$）であった．しかし，酸性カゼイナーゼ，酸性ゼラチナーゼおよびβ-グルクロニダーゼ活性は上昇しなかった．PMA処理を受けない場合，滑膜細胞順化培地には軟骨細胞活性化能は全く認められなかった．次に，HIG-82株順化培地からアミコン社製フィルターを用いた遠心法により分離された第II分画（分子量10～25 KD）も軟骨細胞を活性化し，その培養液中の中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼおよび中性コラゲナーゼの各活性と PGE_2 量は，それぞれコントロールの70.9倍（$p<0.01$），155.0倍，102.4倍，27.8倍（$p<0.001$）に増加した．PGE_2（10^{-5}～10^{-8} M）やPMA（5～25 ng/ml）それ自体には軟骨細胞の活性化能は見られなかった．以上の結果から，本実験での軟骨細胞活性化因子は従来より報告されているカタボリンと考えられた．また，カタボリンはPMAによって刺激された滑膜線維芽細胞（B型細胞）から分泌される事が明らかとなった．さらにカタボリンは軟骨細胞を活性化し，中性蛋白分解酵素を分泌させ，これらの酵素の作用によって軟骨の細胞間マトリックスの分解が生ずるものと考えられた．

Key words chondrocyte activation, synovial factor (catabolin), synovial fibroblast (HIG-82), neutral proteinase, prostaglandin E_2

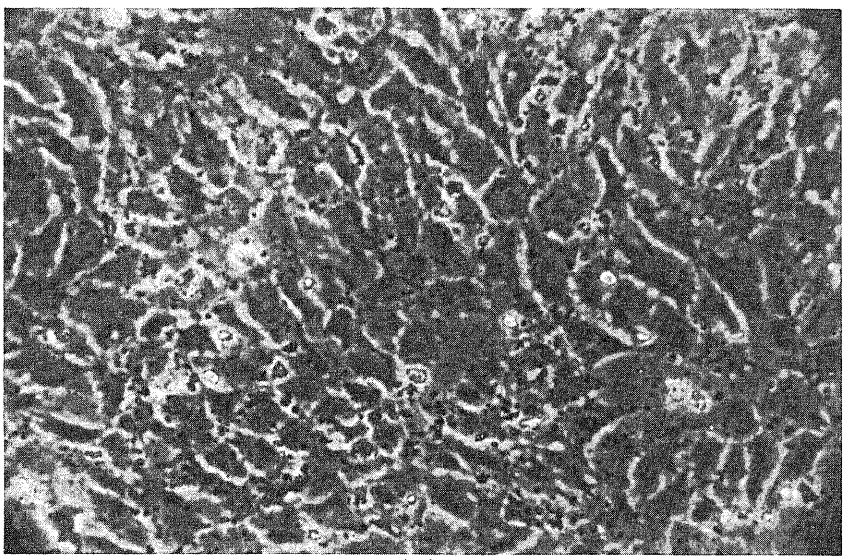
慢性関節リウマチや変形性関節症をはじめとする種々の関節疾患の関節軟骨破壊機序に関しては，滑膜や軟骨組織由来の蛋白分解酵素，荷重による機械的負荷，加令に伴う軟骨代謝の低下などが提唱されてきた[1]．しかし，軟骨の破壊はその細胞間マトリックスの分解によって進行することから，種々の蛋白分解酵素が軟骨破壊に重要な役割を果たすと考えられる．これらの蛋白分解酵素には軟骨細胞や滑膜細胞および滑膜に浸潤した炎症細胞に由来するものがあげられる．これらのうち軟骨細胞に由来する蛋白分解酵素は，滑膜炎の強くない変形性関節症初期や慢性関節リウマチにおいても軟骨細胞周辺部で，関節軟骨破壊に重要な役割を果たすと考えられている[1)2)]．

軟骨細胞に作用することによって軟骨のプロテオグ

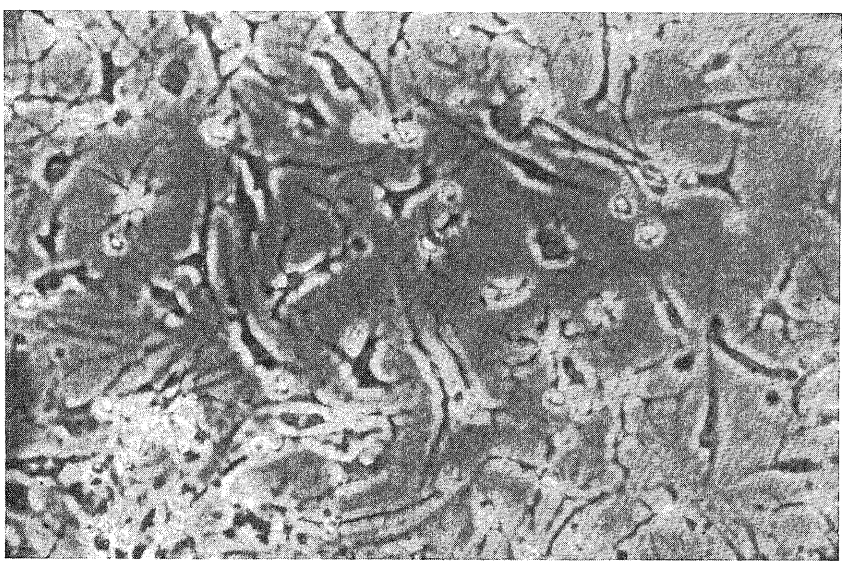
Abbreviations: APMA, aminophenylmercuric acetate; D, dalton; EGTA, Ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N,N'-tetra acetic acid; IL-1, interleukin 1; KD, kilodalton; PGA, prostaglandin A; PGE_1, prostaglandin E_1; PGE_2, prostaglandin E_2; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; RIA, radioimmunoassay; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase.

リカンを分解させるカタボリンという物質が知られている．カタボリンは，ブタ滑膜が軟骨片からプロテオグリカンを放出させる作用を有することから，1979年，Dingle ら[3]によって名づけられた因子である．1982年には，Saklatvala らはブタ白血球にも同じ作用を持つ因子があることを見出し[4]，翌年，この白血球由来カタボリンを精製している[5]．しかし，滑膜組織由来のカタボリンについては，未だ均質な物質にまで精製されていない．これらのカタボリンの作用は，軟骨片からのプロテオグリカンの分解放出をみるバイオアッセイによって検討されており，カタボリンにより活性化された軟骨細胞がどのような機序によってその細胞間マトリックスを分解するのかについては，検討されていない．また，滑膜由来のカタボリンが，A 型の滑膜大食細胞と B 型の滑膜線維芽細胞のうちのどちらの細胞から分泌されているのかも明らかにはされていない．

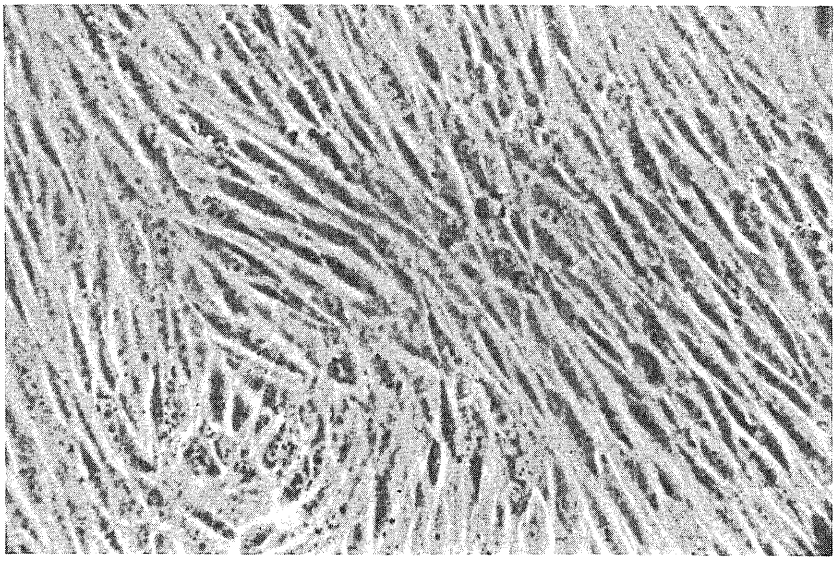
本研究では，初代培養家兎滑膜細胞と樹立家兎滑膜



(a)



(b)



(c)

Fig. 1. (a) Confluent culture of lapin articular chondrocytes. ×200. (b) Primary culture of lapin synovial cells, which is showing heterogeniety. ×200. (c) Established line of lapin synovial fibroblast (HIG-82), which is showing homogeniety. ×200.

線維芽細胞（HIG-82株）を，phorbol myristate acetate（PMA）で刺激することにより得られた順化培地（conditioned medium）を初代培養家兎軟骨細胞に作用させ，種々の蛋白分解酵素やプロスタグランジンE_2（PGE_2）を測定することにより，軟骨細胞による軟骨基質分解吸収機構と滑膜カタボリンの起源について検討した．さらに，HIG-82株の順化培地より軟骨細胞活性化因子を部分精製し，その性状を検討した．

材料および方法

I．細胞培養法

1．初代培養家兎関節軟骨細胞（図1a）

Greenの方法[6]に準じ，成熟家兎の肩関節および膝関節より関節軟骨を無菌的に採取し，0.2%のトリプシン（GIBCO Lab., U.S.A.）処理と0.2%のクロストリジウム菌コラゲナーゼ（GIBCO Lab., U.S.A.）処理により軟骨細胞を分離し，10^5個/皿の割合で，組織培養多皿プレート（Corning社, U.S.A.）で培養した．この際，細胞数は，血球計算板で計測した．

2．初代培養家兎滑膜細胞（図1b）

軟骨細胞の場合と同様に，Greenの方法に準じて行なった．分離した滑膜細胞は，10^6個の割合で25 cm^2組織培養フラスコ（Corning社，U.S.A.）で培養した．

3．樹立家兎滑膜細胞（HIG-82株，図1c）

本株は，1982年に，第10代培養家兎滑膜細胞の自発的形質転換により確立されたもので，倍加時間が約24時間の線維芽細胞である．本実験には，組織培養フラスコにて継代した85から105世代株を使用した．各々の細胞数は，0.25%のトリプシンで15分間処理した後，自動血球アナライザー（Coulter Electronics, U.S.A.）で測定した．

以上のいずれの細胞においても，培養液には，10%の牛胎児血清，100単位/mlのペニシリン，100 μg/mlのストレプトマイシン（GIBCO Lab., U.S.A.）を含むHam's F-12（GIBCO Lab., U.S.A.）を用い，37°Cで，5%のCO_2を含む空気中で単層培養した．軟骨細胞は8～10日間の培養で，滑膜細胞は5～7日間の培養でコンフルエントになった．本実験では，すべてコンフルエントになった細胞を使用した．

II．実験方法

1．滑膜細胞のPMAによる刺激

初代培養滑膜細胞またはHIG-82株の単層培養細胞を，Gey's平衡塩類溶液で洗浄後，無血清培養液で置き換えた．最終濃度が0.1 μg/mlのPMA（Sigma Chem. Co., U.S.A.）を含む無血清培養液中でこれらの細胞を3日間培養し，得られた滑膜細胞培養液を滑膜細胞順化培地とした．同時にこれらの培養液中の中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼおよび中性コラゲ

ナーゼ活性と PGE_2 量を測定した．

2．滑膜細胞順化培地による軟骨細胞の活性化

滑膜細胞順化培地を無血清培養液で，2，4，10倍稀釈し，初代培養軟骨細胞を培養した．この予備実験において，4倍稀釈のものが軟骨細胞を最も活性化したので，以下の実験はこの稀釈倍率で行なった．また，対照として上述の滑膜細胞順化培地のみで，軟骨細胞の存在しない標本を並行して作製し，これをno chondrocyte controlと名付けた（図2）．3日間培養後，各軟骨細胞培養液中の，中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼ，中性コラゲナーゼ，酸性カゼイナーゼ，酸性ゼラチナーゼ，β-グルクロニダーゼの各活性と，PGE_2 量を測定した．軟骨細胞より産生されたこれらの酵素活性と PGE_2 量は，軟骨細胞培養液中の活性から，no chondrocyte control 培養液の活性を差し引くことにより算出した．

以上の実験方法を模式図にすると，図3の如くとなる．

3．ヒトインターロイキン1（IL-1）による軟骨細胞の活性化

市販のヒト白血球IL-1（10^{-2}, 10^{-1}, 1, 10, 25単位/ml, Cistron, U.S.A.）を直接，初代培養軟骨細胞培養液に添加し，3日後の培養液中の上述の中性プロティナーゼ活性と PGE_2 量を測定した．

Ⅲ．酵素活性，PGE_2 量の測定

1．コラゲナーゼアッセイ

Nagaiら[7]の方法に準じるミクロフィブリルアッセイを用いた．牛皮コラーゲンを，Gisslowら[8]の方法に準じ^{3}H-acetic anhydride（New England Nuclear, U.S.A.）で標識し放射性コラーゲンを作製した．この放射性コラーゲンの比放射活性は非放射性コラーゲン添加により1000 cpm/μgに調節した．アッセイには，25 μl（75 μg）の放射性コラーゲンを基質とし，20 μlの標本培養液と30 μlの緩衝液を混合し，最終濃度1 mMのaminophenylmercuric acetate（APMA）の存在，非存在下で，37°C，4時間反応させた．反応後，50 μlのEthyleneglycol bis（β-aminoethyl ether)-N, N,N,N'-tetra-acetic acid（EGTA, Sigma Chem. Co., U.S.A.）にて反応を止め，12000 g, 10分間遠心し，上清50 μlの放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した．

2．中性ゼラチナーゼアッセイ

60°C, 30分間加温処理により牛皮コラーゲンからゼラチンを作製し，^{3}H-acetic anhydrideで標識した．放射性ゼラチンの比放射活性は，1000 cpm/μgに調節した．25 μl（75 μg）の放射性ゼラチンを基質として用い，コラゲナーゼアッセイと同様の方法で，37°C，4時間反応させた．未消化ゼラチンを16%トリクロール酢酸で沈殿させ，遠心分離後，上清50 μlの放射活性を測定した．

3．中性カゼイナーゼアッセイ

アルファカゼイン（Sigma Chem. Co., U.S.A.）に^{3}H-acetic anhydrideを加え標識し，比放射活性を10000 cpm/gに調節後アッセイに用いた．20 μlのカゼイン（30 μg）を基質として用い，コラゲナーゼおよびゼラチナーゼアッセイと同様の方法で反応させた．3.5%のトリクロール酢酸，50 μlの冷却カゼイン（75 μg）の添加により反応を停止し，遠心分離後，上清100 μlの放射活性を測定した．

1単位のコラゲナーゼ，ゼラチナーゼおよびカゼイ

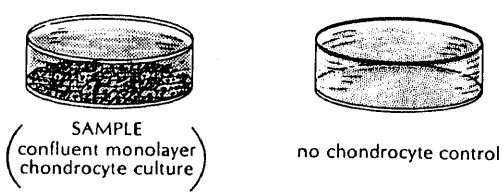


Fig. 2. "No chondrocyte control" which contained diluted synovial conditioned medium without chondrocytes was set up in parallel. By subtracting the enzymic activities of the "No chondrocyte control" from those of the sample, the enzymes secreted by chondrocytes were estimated.

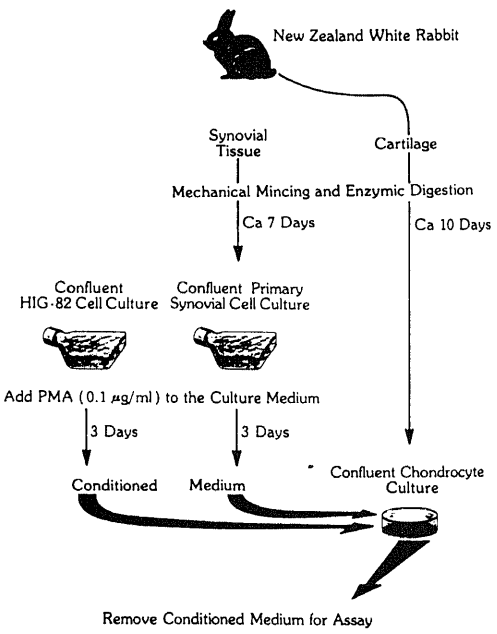


Fig. 3. Scheme of material and method.

ナーゼ活性とは，それぞれの基質を1分間に1μg分解する事を意味する．

4．酸性ゼラチナーゼ，酸性カゼイナーゼアッセイ

中性プロティナーゼのアッセイで使用したpH 7.2の緩衝液の代わりにpH 4.9の酢酸緩衝液（0.2 M）を使用した以外，中性ゼラチナーゼ，中性カゼイナーゼアッセイと同様の方法で行なった．

5．β-グルクロニダーゼアッセイ

市販キット（Sigma Chem. Co., U.S.A.）を使用し，フェノールフタレンとグルクロン酸結合解離に基づく分光計測法により測定した[9]．

6．PGE_2 アッセイ

プロスタグランジンE_2[^{125}I]RIAキット（New England Nuclear社，U.S.A.）を使用し，ラジオイムノアッセイにより測定した．

Ⅳ．HIG-82株由来軟骨細胞活性化因子の部分精製

1．HIG-82株滑膜細胞順化培地を，Centriflo Membrane Cone Type CF 25（アミコン社，U.S.A.）を用い，1000 gで25分間遠心分離した．膜を通過しなかった分子量25 KD以上の物質を回収し，無血清培養液で元の量にまで稀釈し第Ⅰ分画とした．次に，この膜を通過した分子量25 KD以下の物質を回収し，Centricon-10 Microconcentrator（アミコン社，U.S.A.）を用い，5000 g，1時間の遠心分離により，第Ⅱ分画（分子量10～25 KD）と第Ⅲ分画（分子量10 KD以下）に分けた．この方法により第Ⅱ分画は25倍に濃縮された．粗順化培地による軟骨細胞活性化実験と同条件にするために，無血清培養液で，第Ⅰ分画と第Ⅲ分画は4倍，第Ⅱ分画は100倍稀釈し軟骨細胞培地に添加した．培養3日後，各々の軟骨細胞培養液中に分泌された酵素活性とPGE_2量を測定した．

2．部分精製された軟骨細胞活性化因子の耐熱性

軟骨細胞活性化能を有する第Ⅱ分画およびHIG-82株順化培地を，70°Cで30分間加温した後室温に戻し，軟骨細胞活性化能を調べた．

Ⅴ．統計学的検定法

Table 1. Synoviocyte activation by PMA

	HIG-82		Primary	
	Control	PMA	Control	PMA
Caseinase (U)	0.00±0.00	0.92± 0.04**	0.045±0.030	1.96± 0.06***
Gelatinase (U)	0.00±0.00	37.28± 6.65**	0.000±0.000	56.23± 8.82**
Collagenase (U)	0.36±0.18	30.96±11.24*	0.000±0.000	49.52± 6.39***
PGE_2 (ng)	N.A.	14.90± 1.40	N.A.	71.88±11.97

Confluent monolayers of HIG-82 or primary synoviocytes were maintained for three days under serumless conditions in the presence or absence of 0.1μg/ml PMA. Their conditioned media were then assayed for neutral proteinases and PGE_2. Each value represents mean±S.D. per 10^6 synoviocytes from six replicates. N.A.=data not available. Caseinase=Activity of neutral caseinase. Gelatinase=Activity of neutral gelatinase. Collagenase=Activity of neutral collagenase. U=Unit. mU=milli Unit. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ vs control (Cochran-Cox test).

Table 2. Chondrocyte activation by synovial conditioned media

Substance	Production by articular chondrocytes		
	Control	HIG-82 CM	Primary CM
Neutral caseinase (mU)	6.80±4.30 (n=12)	587.40±61.50***(n=6)	513.60±51.90***(n=6)
Neutral gelatinase (U)	0.14±0.10 (n=12)	8.44± 1.31** (n=6)	9.18± 1.41** (n=6)
Neutral collagenase (U)	0.18±0.12 (n=10)	9.30± 1.56* (n=4)	9.78± 1.83 (n=2)
PGE_2 (ng)	5.88±1.26 (n=10)	129.00±31.00* (n=6)	135.60±29.20* (n=4)
Acid caseinase (mU)	9.08±5.91 (n= 8)	7.59± 3.62 (n=4)	8.53± 3.61 (n=4)
Acid gelatinase (U)	0.00±0.00 (n= 6)	0.00± 0.00 (n=4)	0.00± 0.00 (n=4)
β-glucuronidase (mU)	14.83±7.21 (n= 8)	25.23±10.31 (n=4)	22.36± 9.81 (n=4)

Values±S.D. are given per 10^6 chondrocytes in response to a 1:4 dilution of medium conditioned by 2×10^6 synovial cells for 3 days. Abbreviations and symbols are the same as those of Table 1.

Cochran-Cox test により行なった．

成 績

Ⅰ．PMA による培養滑膜細胞の刺激

表1に示す様に，0.1 μg/ml の PMA 刺激により家兎滑膜細胞由来の，中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼおよび中性コラゲナーゼの各活性はコントロールと比べ，HIG-82 株細胞の場合それぞれ $p<0.01$，$p<0.01$，$p<0.05$ の有意差で，初代培養滑膜細胞の場合それぞれ $p<0.001$，$p<0.01$，$p<0.001$ の有意差で著しく増加した．PMA 刺激のない場合，培養滑膜細胞からはほとんど中性プロティナーゼ，PGE_2 は分泌されなかった．また，初代培養滑膜細胞は，PMA 刺激によって HIG-82 株細胞よりもより多量に中性蛋白分解酵素，PGE_2 を産生し，特に中性カゼイナーゼと PGE_2 でその産生量の差が大きかった．

Ⅱ．PMA 刺激滑膜細胞順化培地添加による軟骨細胞の活性化

PMA 刺激によって得られた家兎滑膜細胞順化培地を無血清培養液で4倍に稀釈し，初代培養家兎軟骨細胞に作用させたところ，軟骨細胞によって分泌された中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼおよび中性コラゲナーゼの各活性と PGE_2 量はコントロールと比較し，HIG-82 株細胞順化培地による刺激の場合でそれぞれ，86.4倍（$p<0.001$），60.3倍（$p<0.01$），51.7倍（$p<0.05$），21.9倍（$p<0.05$）に，また，初代培養家兎滑膜細胞順化培地による刺激の場合でそれぞれ，75.2倍（$p<0.001$），65.6倍（$p<0.01$），54.3倍，23.1倍（$p<0.05$）に著しく増加した（表2）．一方，HIG-82 株細胞や初代培養家兎滑膜細胞を PMA 処理しなかった順化培地で，軟骨細胞を刺激しても，中性プロティナーゼや PGE_2 量の増加は見られなかった．すなわち，PMA により刺激された HIG-82 株滑膜細胞と初代培養家兎滑膜細胞は，中性プロティナーゼ，PGE_2 を産生するとともに，軟骨細胞を活性化する物質を分泌すると考えられた．なお，表2に示す値は，滑膜細胞由来の酵素活性，PGE_2 量を差し引いた後のものである．軟骨細胞によって分泌されたこれらの中性プロティナーゼはいずれも潜在型であり，APMA 処理によりはじめてその活性が検出された．表2に示す軟骨細胞由来の酵素活性と PGE_2 量から判断すると，HIG-82 株細胞と初代培養家兎滑膜細胞由来の順化培地処理によって，軟骨細胞は，同程度に活性化されると考えられた．軟骨細胞由来の酸性カゼイナーゼ，酸性ゼラチナーゼ，および β-グルクロニダーゼ活性はコントロールと比べ増加はなく，活性化された軟骨細胞がこれらの酸性酵素を反応性に分泌するとは考えられなかった．

中性プロティナーゼ活性と PGE_2 量を経時的に観察すると図4の如くとなる．すなわち，PGE_2 の最大分泌は，軟骨細胞が滑膜細胞順化培地に接触後24時間以内であるが，中性プロティナーゼ活性は24時間から48時間の間に最大増加を示し，48時間から72時間の間での増加は少なかった．

Ⅲ．軟骨細胞に対する PGE_2，PMA および IL-1 の直接効果

1．PGE_2 と PMA の直接効果

本実験で用いた HIG-82 株順化培地には，PGE_2（2.7×10^{-6} M），PMA（100 ng/ml）が含まれていることから，これらの PGE_2 と PMA による軟骨細胞活性化の有無を検討した．PGE_2（10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} M）または，PMA（5，10，25 ng/ml）の存在下で軟骨細胞を培養したが，上述の中性プロティナーゼ活性や PGE_2 量の増加は認められなかった．

2．IL-1 の直接効果

市販の精製ヒト白血球 IL-1（10^{-2}, 10^{-1}, 1, 10, 25 単位/ml, Cistron U.S.A.）を用い，家兎軟骨細胞に対する直接効果を観察した．10^{-2}, 10^{-1} 単位/ml の濃度では，明確な軟骨細胞の活性化は得られなかったが，1，10，25 単位/ml の濃度の IL-1 ではコントロールと比較し，すべての中性プロティナーゼ，PGE_2 の有意の増加が見られた（表3）．なお，1単位の IL-1 活性は，phytohemagglutinin（1 μg/ml）に対し，ネズミ胸腺細胞の増殖速度を倍増する量を意味する．

Ⅳ．HIG-82 株順化培地からの軟骨細胞活性化因子の部分精製

1．軟骨細胞活性化因子の部分精製

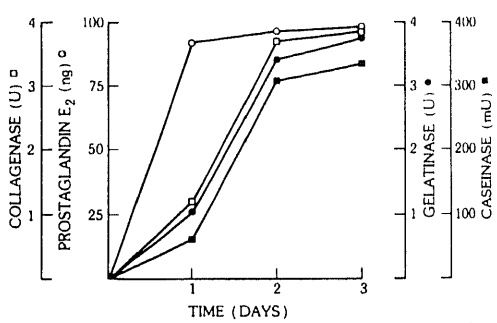


Fig. 4. Confluent monolayer cultures of articular chondrocytes were treated with a 1 : 4 dilution of synovial-conditioned media in the serumless conditions. Daily samples were withdrawn and assayed for caseinase (■), gelatinase (●), collagenase (□) activities and PGE_2 (○). Each datum point represents the mean of two duplicates.

HIG-82株細胞順化培地を，分子量25 KD以上（分画I），10～25 KD（分画II），10 KD以下（分画III）の3分画に分け，各分画に含まれる中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼ，中性コラゲナーゼの各活性とPGE_2量を測定した．表4に示す様に，第I分画中にこれらの酵素は，それぞれ，23.3%，42.2%，45.4%の率で回収された．しかし，第II分画には，中性プロティナーゼやPGE_2はほとんど検出されなかった．また，分子量が352 DのPGE_2は，67.9%の高率で第III分画に回収された．中性プロティナーゼの回収率が低い原因

Table 3. Chondrocyte activation by human IL-1

Human IL-1	Neutral caseinase	Neutral gelatinase	Neutral collagenase	PGE_2
Control	9.8± 2.0	0.00±0.00	0.00±0.00	15.4± 1.1
0.01 U/ml	37.7± 0.0	2.41±0.33	1.02±0.10	N.A.
0.10 U/ml	62.6± 2.7	0.65±0.16	0.00±0.00	96.9± 15.6
1.00 U/ml	1562.6±132.6**	14.11±2.04**	6.05±0.65**	489.6± 24.8***
10.00 U/ml	1718.0± 99.6***	15.95±3.74*	10.91±1.77**	685.4± 27.2***
25.00 U/ml	1742.2± 59.2***	15.61±2.72**	10.81±1.22**	853.1±129.5***

Values±S.D. are given per 10^6 chondrocytes in response to human mononuclear leucocyte IL-1. One unit of human IL-1 is defined as the amount which doubles the proliferative response of thymocytes to mitogen (1 μg/ml phytohemagglutinin). Abbreviations and symbols are the same as those of Table 1.

Table 4. Residual PGE_2 and neutral proteolytic activity present in fractions of synovial conditioned medium

	Caseinase (mU)	Gelatinase (U)	Collagenase (U)	PGE_2 (ng)
Crude synovial medium	300.8±50.0	7.92±1.81	3.88±0.52	38.0±4.6
Fraction I (Mr.>25000)	70.0± 0.5	3.34±0.49	1.76±0.34	4.6±0.9
Fraction II (Mr.10000－25000)	4.9± 1.1	0.26±0.04	0.10±0.09	3.4±2.6
Fraction III (Mr.<10000)	2.2± 1.1	0.10±0.07	0.09±0.10	25.8±9.0

Media conditioned by HIG-82 synovial cells in the presence of 0.1 μg/ml PMA was fractionated according to size into 3 fractions of Mr.>25000, 10000－25000 and<10000. Each fraction was then diluted with fresh serumless medium and incubated for three days at 37℃ in the manner described in the Method section for the "no chondrocyte control". Following this procedure, the neutral proteinases and PGE_2 content were determined to provide measure of the "carry over" of synovial products to the chondrocyte cultures during assays of chondrocyte activation. Values given are means of four replicates±S.D. and, in view of the different initial volumes employed,they have been standardized to 250 μl of crude synovial medium. Abbreviations and symbols are the same as those of Table 1.

Table 5. Partial purification of the chondrocyte activating principle of synovial conditioned media

	Caseinase (mU)	Gelatinase (U)	Collagenase (U)	PGE_2 (ng)
Control	18.1± 3.2	0.07±0.05	0.17±0.07	36.8± 5.2
Fraction I	6.2± 1.9	0.20±0.11	0.08±0.02	6.0± 1.1
Fraction II	1284.0±128.0**	10.85±4.60	17.40±6.10	801.0±51.9***
Fraction III	6.4± 1.5	0.00±0.00	0.07±0.01	21.1± 4.3

Medium conditioned by synovial HIG-82 cells was fractionated by size using Amicon membranes. Aliquots of each fraction was added to chondrocyte cultures, and the resulting products of neutral proteinases and PGE_2 by the chondrocytes were measured. Values given are the means of four experiments±S.D.. For the purpose of comparison with Table 2, an equivalent 1:4 dilution has been calculated. Abbreviations and symbols are the same as those of Table 4.

としては，これらの酵素がアミコン膜に付着したためと想像される．

2．各分画の軟骨細胞活性化能

表5に示す様に，第II分画（分子量10～25 KD）のみが，軟骨細胞を活性化し，中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼおよび中性コラゲナーゼの各活性とPGE_2量において，コントロールと比較しそれぞれ，70.9倍（$p<0.01$），155.0倍，102.4倍，27.8倍（$p<0.001$）の著しい分泌増大を示した．

3．軟骨細胞活性化因子の耐熱性

滑膜細胞順化培地を30分間，70°Cの温度で熱処理した場合，軟骨細胞活性化能はおよそ半減した（低下率：49.3±20.5%，n=7）．しかし，部分精製された第II分画中の軟骨細胞活性化因子は，30分間，70°Cの熱処理では全く影響を受けなかった．

考　　察

1977年，Fellら[10]は，従来より提唱されている滑膜組織から分泌される蛋白分解酵素による軟骨破壊[11][12]のほかに，滑膜組織由来の物質により軟骨細胞が活性化し，その結果，軟骨細胞間マトリックス分解が生ずることを報告した．以来，軟骨細胞間マトリックス分解吸収に関して，軟骨細胞の役割が注目されるようになった[13][14]．1979年に，Dingleら[3]はこの滑膜由来の軟骨細胞活性化因子をカタボリンと命名した．現在まで報告されているカタボリンは，常に軟骨片から分解放出されたプロテオグリカンを測定するバイオアッセイにより検出されてきた．しかし，滑膜由来のこのカタボリンが滑膜のどの細胞に由来するのか，またカタボリンにより活性化された軟骨細胞がどのような機序で軟骨細胞間マトリックスを分解するのか，さらには，滑膜カタボリンは未だ均質な状態にまで精製されておらず，その生化学的特性に関しても十分解明されていない．

滑膜組織には血管やリンパ管が多く，一旦炎症がおこると著しい白血球，リンパ球，マクロファージなどの炎症細胞の浸潤が生ずる．初代培養滑膜細胞の場合には，たとえ正常滑膜組織を用いたとしても，これらの炎症細胞や脈管由来の細胞が混在している可能性が考えられる．さらに，滑膜細胞は，A型の滑膜大食細胞とB型の滑膜線維芽細胞の二種類の細胞から構成されており[15]，軟骨細胞を活性化するカタボリンがどの滑膜細胞から分泌されるのかに関してはこれまで十分明らかにされていない．Vaesら[16]は，モノサイトーマクロファージ系細胞が軟骨細胞活性化因子であるIL-1やカケクチンを分泌する[17]ことから，A型滑膜細胞がカタボリンを分泌すると示唆したが，Pilsworthら[18]は，7世代のブタ滑膜線維芽細胞がカタボリンを分泌したことから，B型滑膜細胞がカタボリンを分泌すると報告している．本実験では，90世代以上継代した均質な樹立家兎滑膜線維芽細胞（HIG-82株）が，初代培養家兎滑膜細胞と同程度に軟骨細胞を活性化したので，B型の滑膜線維芽細胞がカタボリンを分泌するものと考えられた．

これまで，軟骨の細胞間マトリックス分解に関与する酵素としては中性プロティナーゼ[1][19][20]のほか，カテプシンB[21]やD[19]などの酸性水解酵素が報告されている．本実験では，滑膜細胞順化培地やその部分精製した第II分画中のカタボリンにより活性化された軟骨細胞がコントロールと比べ，大量の中性蛋白分解酵素とPGE_2を培養液中に産生したのに対し，酸性水解酵素活性の増加は認められなかった．この結果は，カタボリンに蛋白分解酵素としての機能がないことから，Dingleにより示されたカタボリンによる軟骨細胞間マトリックス分解は，カタボリンに反応した軟骨細胞が産生する中性プロティナーゼによるものである事を強く示唆している．このことは，軟骨基質のpHが中性であるという事実によっても支持される．

生体内においては，活性型カゼイナーゼ，ゼラチナーゼおよびコラゲナーゼなどの金属依存性蛋白分解酵素は，血清由来のα_2-マクログロブリン[22]，β_1-グロブリン[23]などの酵素インヒビターや組織由来のインヒビター（Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP）[24][25]によってその活性が調節されている．したがって，滑膜細胞由来の酵素においては，これらのインヒビター活性を上回る量が分泌された時のみ，その酵素の効果が表われると考えられる．一方，軟骨細胞由来の酵素はその局所で直接軟骨の細胞間マトリックス分解に関与する[26]ことが可能であり，この点で，軟骨の破壊には軟骨由来の酵素は重要であると考えられる．しかしながら，現在まで報告されているこれらの中性プロティナーゼは全て潜在型であり，本実験においても最終濃度1 mMのAPMAを添加した時においてのみ酵素活性が得られた．生体内において，これらの潜在型酵素を活性型に転換し得る物質としては，トリプシン[27]，プラスミン[28]などの蛋白分解酵素や，活性酸素[29]，angiogenesis factor[30]などが報告されているが，実際に生体内においてこれらの物質が作用しているのかどうかは不明であり，これらの潜在型プロティナーゼが活性型に転換される機序の解明が今後の重要な課題である．カタボリンと接触後の軟骨細胞由来の各中性プロティナーゼとPGE_2産生を経時的に観察すると，PGE_2は24時間で最大増加を示したが，中性プロティナーゼ活性は24時間から48時間で最大増加を

示した．本結果は，PGE_2 と中性蛋白分解酵素の細胞内生合成機構の相違によるものと考えられる．すなわち，PGE_2 は前駆物質のアラキドン酸より生成されるのに対し，中性プロティナーゼの場合は，遺伝子の脱抑制から始まって転写，翻訳を経て細胞外に放出される[31]と推定され，結果として，PGE_2 よりも刺激に対する反応が遅れたのであろうと考えられる．

本実験では，軟骨細胞活性化に用いた滑膜細胞順化培地中に，少量の PGE_2，PMA を含んでおり，特に PGE_2 は軟骨細胞を活性化する事を示唆する報告もある[32][33]ことから，これらの PGE_2，PMA が軟骨細胞活性化能を有するかどうかを検討した．しかし，PGE_2 や PMA それ自身には軟骨細胞活性化能は見られなかった．本結果は，PGE_2 や PMA を含む第III分画がなんら軟骨細胞を活性化しなかった事実とも一致する．また，PGA，PGE_1，PGE_2 は，牛関節軟骨片からのグリコサミノグリカン放出に影響を与えなかったという Jones ら[34]の報告や，プロスタグランジン生合成を抑制する作用を持つインドメサシンが，軟骨片からのプロテオグリカンの放出を抑制し得なかったという Steinberg ら[35]や Lipiello ら[36]の報告を考え合わせると，プロスタグランジンには，軟骨細胞を活性化する能力がないと考えられた．滑膜細胞を効果的に活性化し得る PMA が，軟骨細胞を，直接には活性化しなかったのは興味ある事実である．このことは，滑膜細胞と軟骨細胞の活性化は異なる機序によって行なわれる可能性を示唆している．

滑膜由来のカタボリンは，未だ精製されていないが，ブタ白血球由来のそれは，分子量が 22 KD で，等電点が，4.8～5.0 の蛋白質として精製され，IL-1 の一型と報告されている[37]．本実験においては，滑膜細胞由来の軟骨細胞活性化因子が，分子量 10 から 25 KD 間の第II分画にみられた事や，今まで報告されているカタボリンや IL-1[38]の作用と同じく軟骨細胞活性化能を有する点から，この因子はカタボリンと考えられた．実際，本実験でも，精製ヒト白血球 IL-1 も効果的に初代培養家兎軟骨細胞を活性化する事が確かめられた．カタボリンの熱安定性に関しては，今までのところ定説はない．Dingle ら[3]は，カタボリンは熱に不安定であると述べている．一方，Saklatvala[39]は培養液中のカタボリンは熱に安定であるが，濃縮された場合には熱に不安定となり，これは，混入している酵素によりカタボリンが分解されるためであろうと述べている．今回の実験では，粗 HIG-82 株細胞順化培地中の軟骨細胞活性化因子は，熱処理によりその活性が半減したが，部分精製された第II分画は，同様の熱処理ではその軟骨細胞活性化能の低下はなかった．これは，おそらく，第II分画中には分子量の大きい種々の酵素が除去されていたためと考えられ，上記の Saklatvala の説を支持している．

滑膜線維芽細胞由来のカタボリンをはじめ，種々の軟骨細胞活性化因子を研究する事により，変形性関節症などの種々の関節疾患における関節軟骨破壊機序の解明やその防止への道を開く事ができると考えられる．

結　　論

家兎滑膜細胞由来の軟骨細胞活性化因子（カタボリン）の滑膜細胞における起源とこのカタボリンによる軟骨細胞活性化の機序を検索するとともに，この因子を部分精製しその性状を検討した．

1．初代培養家兎滑膜細胞および樹立家兎滑膜線維芽細胞株（HIG-82 株）はともに，0.1 μg/ml の PMA 刺激により軟骨細胞活性化因子（カタボリン）を分泌した．さらに，HIG-82 株細胞順化培地が初代培養家兎滑膜細胞とほぼ同等に培養軟骨細胞を活性化したことにより，滑膜線維芽細胞（B 型滑膜細胞）がカタボリンを分泌すると考えられた．

2．カタボリンを含む上記の 2 種類の順化培地の刺激により軟骨細胞は活性化され，その培養液中の中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼおよび中性コラゲナーゼの各活性と PGE_2 量は著しく増加した．その増加は，HIG-82 株順化培地による刺激で，それぞれコントロールの 86.4 倍（$p<0.001$），60.3 倍（$p<0.01$），51.7 倍（$p<0.05$），21.9 倍（$p<0.05$）であり，初代滑膜細胞順化培地による刺激で，それぞれコントロールの 75.2 倍（$p<0.001$），65.6 倍（$p<0.01$），54.3 倍，23.1 倍（$p<0.05$）であった．しかし，酸性カゼイナーゼ，酸性ゼラチナーゼおよび β-グルクロニダーゼの各酸性水解酵素活性の増加は見られなかった．この結果から，カタボリンによる軟骨基質分解吸収は酸性水解酵素ではなく，中性蛋白分解酵素によると考えられた．

3．PGE_2 産生は，HIG-82 株順化培地による刺激後 24 時間で最大増加を示し，中性プロティナーゼ活性は 24 時間から 48 時間の間で最大増加を示した．

4．PGE_2（10^{-5}～10^{-8} M）および PMA（5～25 ng/ml）は，軟骨細胞を活性化しなかったが，1，10，25 単位/ml の濃度のヒト白血球 IL-1 は初代培養軟骨細胞を活性化し，その培養液中の中性カゼイナーゼ，中性ゼラチナーゼおよび中性コラゲナーゼの各活性と PGE_2 量はそれぞれ $p<0.01$，$p<0.05$，$p<0.01$，$p<0.001$ の有意差をもって著しく増加した．

5．本実験でのカタボリンは，PGE_2，PMA や中性プロティナーゼとは異なる分画（分子量，10 KD から

25 KD) に存在し，70°C，30 分間の熱処理にも安定であった．

謝 辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました恩師野村進教授に衷心より深甚なる謝意を表します．また，本研究に際し御指導，御援助を戴きました Pittsburgh 大学整形外科 Albert B. Ferguson 教授，Christopher H.Evans 助教授に深甚なる謝意を表します．さらに，御校閲を戴きました金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助教授に深謝します．

なお，本論文の要旨は，第 32 回アメリカ整形外科基礎学会，第 18 回日本結合組織学会総会，第 1 回日本整形外科基礎学術集会において発表した．

文 献

1) **Evans, C. H.**: Recent progress in basic osteoarthritis reseach. Orthopaedic survery, **5**, 55-63 (1981).

2) **Mitchel, N. & Shepard, N.**: Changes in proteoglycan and collagen in cartilage in rheumatoid arthritis. J. Bone Joint Surg., **60A**, 349-354 (1978).

3) **Dingle, J. T., Saklatvala, J., Hembry, R. & Tyler, J.**: A cartilage catabolic factor from synovium. Biochem. J., **184**, 177-180 (1979).

4) **Saklatvala, J. & Sarsfield, S. J.**: Lymphocytes induce resorption of cartilage by producing catabolin. Biochem. J., **202**, 275-278 (1982).

5) **Saklatvala, J., Curry, V. A. & Sarsfield, S. J.**: Purification to homogeneity of pig leucocyte catabolin, a protein that causes cartilage resorption in vitro. Biochem. J., **215**, 385-392 (1983).

6) **Green, W. J.**: Behavior of articular chondrocytes in cell culture. Clin. Orthop., **75**, 248-260 (1971).

7) **Nagai, Y., Lapiere, C. M. & Gross, J.**: Tadpole collagenase. Preparation and purification. Biochemistry, **5**, 3123-3131 (1966).

8) **Gisslow, M. T. & McBride, B. C.**: A rapid sensitive collagenase assay. Anal. Biochem., **68**, 70-78 (1975).

9) **Fishman, W. H., Kato, K., Anstiss, C. L. & Green, S.**: Human serum β-glucuronidase; Its measurement and some of its properties. Clin. Chim. Acta., **15**, 435-447 (1967).

10) **Fell, H. B. & Jubb, R. W.**: The effect of synovial tissue on the breakdown of articular cartilage in organ culture. Arthritis Rheum., **20**, 1359-1371 (1977).

11) **Hamerman, D., Janis, R. & Smith, C.**: Cartilage matrix depletion by rheumatoid synovial cells in tissue culture. J. Exp. Med., **126**, 1005-1012 (1967).

12) **Panagides, J. P., Landes, M. J. & Sloboda, A. E.**: Destruction of articular cartilage by arthritic synovium in vitro: Mechanism of breakdown and effect of indomethacin and prednisolone. Agents Actions, **10**, 22-30 (1980).

13) **Phadke, K.**: Regulation of metabolism of the chondrocytes in articular cartilage-An hypothesis. J. Rheum., **10**, 852-860 (1983).

14) **Jasin, H. E.**: Factors controlling articular cartilage degradation by activation of chondrocytes. In G. Weissmann (ed), Advances in inflammation research. Vol.5, p.87-105, Raven Press, New York, 1983.

15) **Okada, Y., Nakanishi, I. & Kajikawa, K.**: Ultrastructure of the mouse synovial membrane. Development and organization of the extracellular matrix. Arthritis Rheum., **24**, 835-843 (1981).

16) **Vaes, G.**: Cellular secretion and tissue breakdown. Agents Actions, **10**, 474-485 (1980).

17) **Dayer, J. M., Beutler, B. & Cerami, A.**: Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E_2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts.: J. Exp. Med., **162**, 2163-2168 (1985).

18) **Pilsworth, L. M. C. & Saklatvala, J.**: The cartilage resorbing protein catabolin is made by synovial fibroblasts and its production is increased by phorbol myristate acetate. Biochem. J., **216**, 481-489 (1983).

19) **Sapolky, A. I., Keiser, H., Howell, D. S. & Woesner, J. F.**: Metalloproteases of human articular cartilage that digest cartilage proteoglycan at neutral and acid pH. J. Clin. Invest., **58**, 1030-1041 (1976).

20) **Ali, S. Y.**: The degradation of cartilage matrix by an intercellular protease. Biochem. J., **93**, 611-618 (1964).

21) **Bayliss, M. T. & Ali, S. Y.**: Studies on cathepsin B in human articular cartilage. Biochem. J., **171**, 149-154 (1978).

22) **Harpel, P. C.**: Studies on human plasma α_2 macroglobulin-enzyme interactions. J. Exp. Med., **138**, 508-521 (1973).

23) **Wooley, D. E., Roberts, D. R. & Evanson, J. M.**: Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. Biochem. Biophys. Res. Commun., **66**, 747-754 (1975).

24) **Cambray, G. J., Murphy, G., Page-Thomas, D. P. & Raynold, J. J.**: The production in culture of metalloproteinases and an inhibitor by joint tissues from normal rabbits, and from rabbits with a model arthritis. Rheumatol. Int., **1**, 11-16 (1981).

25) **Murphy, G. M., McGuire, M. B., Russel, R. G. G. & Reynolds, J. J.**: Characterization of collagenase, other metalloproteases and an inhibitor (TIMP) produced by human synovium and cartilage in culture. Clinical Science, **61**, 711-716 (1981).

26) **Dingle, J. T. & Dingle, T. T.**: The site of cartilage degradation. Biochem. J., **190**, 431-438 (1980).

27) **Vaes, G.**: Multiple steps in the activation of the inactive precursor of bone collagenase by trypsin. FEBS Lett., 28, 198-200 (1972).

28) **Eeckhout, Y. & Vaes, G.**: Activation of inactive precursor of collagenase by kallikrein and plasmin. Arch. Int. Physiol. Biochim., 82, 786 (1974).

29) **Weiss, S. T., Peppin, G., Ortiz, X., Ragsdale, C. & Test, S. T.**: Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. Science, **227**, 747-749 (1985).

30) **Weiss, J. B., Hill, C. R., Davis, R. J., McLaughlin, B., Sedowofia, K. A. & Brown, R. A.**: Activation of a procollagenase by low-molecular-weight angiogenesis factor. Bioscience Rep., 3, 171-177 (1983).

31) **Brinckerhof, C. E., Gross, R. H., Nagase, H., Sheldon, L., Jackson, R. C. & Harris, E. D.**: Increased level of translatable collagenase messenger ribonucleic acid in rabbit synovial fibroblasts treated with phorbol myristate acetate or crystals of monosodium urate monohydrate. Biochemistry, **21**, 2674-2679 (1982).

32) **Fulkerson, J. P., Ladenbauer-Bellis, I. & Chrisman, O. D.**: In vitro hexosamine depletion of intact articular cartilage by E-prostaglandins. Arthritis Rheum., **22**, 1117-1121 (1979).

33) **Malemud, C. J., Moskowitz, R. W. & Papay, R. S.**: Correlation of the biosynthesis of prostaglandin and cyclic AMP in monolayer culture of rabbit articular chondrocytes. Biochim. Biophys. Acta. **715**, 70-79 (1982).

34) **Jones, I. L., McGuire, M. B. & Klamfelt, A.**: Enhanced breakdown of bovine articular cartilage proteoglycans by conditioned synovial medium in vitro: a possible role for prostaglandins. Scand. J. Rheum., **11**, 177-183 (1982).

35) **Steinberg, J., Tsukamoto, S. & Sledge, C. B.**: A tissue culture model of cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., **22**, 877-885 (1979).

36) **Lippiello, L., Yamamoto, K., Robinson, D. & Mankin, H. J.**: Involvement of prostaglandins from rheumatoid synovium in inhibition of articular cartilage metabolism. Arthritis Rheum., **22**, 909-917 (1978).

37) **Saklatvala, J., Pilsworth, L. M. C., Sarsfield, S. J., Gavrilovic, J. & Heath, J. K.**: Pig catabolin is a form of interleukin 1. Biochem. J., **224**, 461-466 (1984).

38) **Krakauer, T., Oppenheim, J. J. & Jasin, H. E.**: Human interleukin 1 mediates cartilage matrix degradation. Cell. Immunol., **91**, 92-99 (1985).

39) **Saklatvala, J.**: Characterization of catabolin, the major product of pig synovial tissue that induces resorption of cartilage proteoglycan in vitro. Biochem. J., **199**, 705-714 (1981).

Chondrocyte Activation in Response to Factor Produced by Lapin Synovial Cells

Shoji Watanabe, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med. Soc., **96**, 587－598 (1987)

Key words: chondrocyte activation, synovial factor (catabolin), synovial fibroblast (HIG-82), neutral proteinase, prostaglandin E_2

Abstract

The present study was performed to investigate the source of chondrocyte activating factor (catabolin) of lapin synovial cells and the biochemical mechanism of chondrocyte activation by the factor, which was then partially purified. Synovial conditioned media were prepared by stimulating a primary culture of lapin synovial cells or an established line of lapin synovial fibroblasts (HIG-82) with 0.1 μg/ml phorbol myristate acetate (PMA). The synovial conditioned media were diluted at a 1 : 4 ratio with fresh serumless medium, and added to the confluent primary culture of lapin chondrocytes. Under stimulation by the HIG-82 conditioned medium, the increase in production of neutral caseinase, gelatinase, collagenase and PGE_2 by the chondrocytes was 86.4 fold ($p<0.001$), 60.3 fold ($p<0.01$), 51.7 fold ($p<0.05$), 21.9 fold ($p<0.05$) greater than that of the control, respectively. Under stimulation by primary synovial cells, the production of neutral caseinase, gelatinase, collagenase and PGE_2 increased 75.2 fold ($p<0.001$), 65.6 fold ($p<0.01$), 54.3 fold, 23.1 fold ($p<0.05$), respectively. But, the secretion of acid caseinase, gelatinase, and β-glucuronidase by the activated chondrocytes did not increase. Without the PMA treatment, the synovial cells did not acquire the ability to activate the chondrocytes. Partially purified catabolin from the HIG-82 conditioned medium by centrifugation with two types of Amicon membranes could also activate chondrocytes, and the production of neutral caseinase, gelatinase, collagenase and PGE_2 by the activated chondrocytes increased 70.9 fold ($p<0.01$), 155.0 fold, 102.4 fold, 27.8 fold ($p<0.001$) over the control, respectively. Neither PGE_2 (10^{-5}～10^{-8} M) nor PMA (5～25 ng/ml) activated the chondrocytes. These data clearly indicate that the catabolin was secreted by synovial fibroblasts (type B cells) with the stimulation of PMA, and that the neutral proteinases produced by the catabolin-activated chondrocytes are involved in the degradation of extracellular matrix components of cartilage.