

学位論文
Doctor's Thesis

細胞外基質蛋白分子が家兎椎間板細胞のプロテオグリカン合成能に
与える影響に関する実験的研究
(Effect of Extracellular Matrix Protein on the Rate of Proteoglycan
Synthesis in Rabbit Intervertebral Disc Cells)

井上 哲二
Tetsuji Inoue

指導教官
高木 克公 前教授
熊本大学医学部整形外科学

紹介教授
二塚 信 教授
熊本大学医学部公衆衛生医療科学

2004 年度

目次

要旨	4
Abstract	6
発表論文リスト	7
謝辞	8
略語一覧	9
第一章研究の背景と目的	10
第一節 椎間板変性と臨床について	10
第二節 椎間板の構造と構成成分	11
第三節 椎間板の機能と生体力学的特性	13
第四節 細胞外基質について	14
第二章実験材料および方法	15
第一節 椎間板細胞の抽出	15
第二節 細胞培養	16
第三節 細胞外基質蛋白塗布細胞培養プレートの作成	17
第四節 DNA 量の計測	18
第五節 ^{35}S -proteoglycan 合成率の計測	18
第六節 統計処理	18
第三章実験結果	19
第一節 細胞抽出	19
第二節 細胞外基質蛋白の DNA 合成に対する影響	19
第三節 細胞外基質蛋白の proteoglycan 合成率に対する影響	19
第四節 細胞外基質蛋白濃度変化による proteoglycan 合成率に対する影響	22

第五節 細胞形態	25
第四章考察	27
第五章結語	31
参考文献	32

要旨

脊椎の変性に伴いさまざまな脊椎疾患を起こすようになるが、脊椎の変性は椎間板から始まるといわれている。加齢とともに特に髄核内の proteoglycan の含有量が減少することが椎間板の変性に大きく影響しているのは事実である。従って、椎間板細胞のプロテオグリカンの合成のメカニズムが明らかになれば、変性の予防、治療につながることを期待される。そこで椎間板に豊富に存在し基本的細胞活動に非常に重要である細胞外基質蛋白が椎間板細胞の細胞増殖及び代謝にいかなる影響があるのか明らかにすることを目的とした。

髄核細胞と線維輪細胞を若年の家兎椎間板より抽出し、細胞外基質蛋白存在下もしくは非存在下にて培養するとともに細胞外基質蛋白濃度を変えて4日から6日間培養した。³⁵S 硫酸塩のプロテオグリカンへの取り込み量を細胞周囲に形成される cell-associated matrix (CM)とラベル培地中の further removed matrix (FRM)についてそれぞれ計測し DNA の含有量で標準化した。

髄核細胞をタイプ I コラーゲンもしくはタイプ II コラーゲンをコートしたプレート上で培養したものは CM および FRM のいずれにおいても何もコートしないもの及びファイブロネクチンをコートしたものより有意にプロテオグリカン合成率が増加していた。しかしながら、線維輪細胞においては細胞外基質蛋白の有無によるプロテオグリカン合成率に有意の差はなかった。髄核細胞におけるプロテオグリカン合成率はタイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンの濃度上昇とともに有意に合成率増強効果が低下していった。

髄核細胞のプロテオグリカン合成制御に細胞外基質蛋白が何らかの関わりを持っている可能性が示唆された。また髄核細胞が組織の恒常性を維持するために十分なプロテオグリカンを合成するためには細胞外基質蛋白の至適濃度を保つことが重要である可能性が示唆された。

従ってタイプ II コラーゲンは椎間板髄核内の主要コラーゲンであるため、その至適濃度を保つことが椎間板変性予防に重要である可能性が示唆された。

Abstract

ECM is very important for fundamental cellular processes. However, the effects of ECM proteins on intervertebral disc cells proliferation and metabolism have not been clarified.

To verify the effects of ECM proteins on DNA and proteoglycan synthesis of intervertebral disc cells, the rates of proteoglycan synthesis were measured in intervertebral disc cells cultured in monolayer with or without extracellular matrix (ECM) protein.

Nucleus pulposus (NP) cells and anulus fibrosus (AF) cells isolated from adolescent rabbits were cultured in monolayer with or without ECM protein and at different concentrations of ECM protein for 4 to 6 days. ³⁵S-sulfate incorporation into proteoglycan concerning the cell-associated matrix (CM) formed around cells and the further removed matrix (FRM) in labeling medium was measured and standardized to DNA content

NP cells in type I collagen or type II collagen coated plates significantly increased the rate of proteoglycan synthesis in both the CM and the FRM compared to those in non-coated plates and in fibronectin coated plates; however, AF cells with ECM proteins did not increase the rate significantly. The rate of proteoglycan synthesis of nucleus cells was contra-dose dependent on both type I and type II collagen.

The present study indicates that regulation of proteoglycan synthesis of NP is modulated by ECM proteins and that preserving an appropriate concentration of ECM proteins is necessary for NP cells to synthesize sufficient PG to maintain tissue integrity.

発表論文リスト

Inoue, T., Nakamura, T., Ikeda, T., and Takagi, K.

Effect of Extracellular Matrix Protein on the Rate of Proteoglycan Synthesis in Rabbit Intervertebral Disc Cells. *J. Spinal Disord. Tech.* 2005; 18: 52-57.

謝辞

研究の機会を提供され、御指導いただきました高木克公教授ならびに中村孝文講師には心より感謝申し上げます。

研究を実施するに当たり熊本大学アイソトープ科学研究センター島崎達也先生におかれましては同施設の提供並びに心よりの御指導まことに感謝いたしております。

また細胞培養に関して多大なる御助言いただきました宮本健史先生には厚く御礼申し上げます。

略語一覽

AF : anulus fibrosus

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

FBS : fetal bovine serum

ECM : extracellular matrix

IGF-1 ; insulin-like growth factor-1

IL-1 ; interleukin-1

IVDs : intervertebral discs

MMP ; matrix metalloproteinase

NP : nucleus pulposus

PBS : phosphate buffered saline

PG : proteoglycan

TGF- β 1 : transforming growth factor- β 1

TIMP ; tissue inhibitor of metalloproteinase

TNF- α ; tumor necrosis factor

第一章 研究の背景と目的

第一節 椎間板変性と臨床について

椎間板の変性は脊椎疾患、例えば腰痛またはそれに付随した神経脱層症状を引き起こす重要な因子の一つである (Nachemson., 1976)。脊柱前方要素である椎体は椎間板により終板を介して滑膜を有しない半関節 (amphiarthrodial joint) を形作る。また脊柱後方要素の一部である左右一対の滑膜を有する椎間関節が存在し、以上の三関節複合体によって脊柱機能単位を形成する。これらに加えて脊柱周囲の靭帯、筋などにより一定の運動性と支持性がもたらされる。

椎間板変性の正確なメカニズムに関しては完全には解明されていない。しかしながら、加齢とともに proteoglycan の含有量が減少することにより椎間板の変性及び椎間板の load bearing 機能の減少に大きく影響しているのは事実である (Buckwalter., 1995; Butler et al., 1990; Pearce et al., 1987)。それにより三関節複合体による脊柱機能単位の運動性と支持性のバランスが破綻し異常な動きや負荷が加わるために様々な脊椎疾患 (腰痛や椎間板ヘルニア等) を起こすとともに脊柱の変性を助長し、それが更なる脊椎疾患 (変性迂り症や脊柱管狭窄症等) を誘発すると考えられる。Butler らは腰痛症の患者 68 例に対して、椎間板の変性の有無を MRI で、椎間関節の変性の有無を CT で評価したところ 144 の変性椎間板と 41 の変性椎間関節が見つかり、椎間関節変性を伴わない変性椎間板を 108 のレベルに認めたのに対し、41 変性椎間関節の内 1 例を除き全ての変性椎間関節レベルに椎間板の変性を認めた。残りの 1 例は進行した Paget 病の患者であったと報告し、脊柱変性は椎間板から始まるとしている (Butler et al., 1990)。

椎間板は変性に伴い髄核内のプロテオグリカンの含有量が低下することにより髄核内の水分量も減少し、その内圧が低下する。椎間板内の細胞外基質であるプロテオグリカン量の減少はプロテオグリカンの合成と分解のバランス機構の破綻による。椎間板細胞による基質代謝はさまざまな物理的・化学的因子によって影響を受ける。大島らによれば椎間板への荷重負荷が生理的内圧（約 2～3 気圧）の際にプロテオグリカン合成能は最も高く、低荷重や過度の荷重においては基質合成は抑制されたとしている（Ohshima et al., 1995）。また椎間板髄核の最大基質合成能は pH 6.9～7.2 域に存在し、pH 6.8 以下では基質合成能は急激に低下する（Ohshima et al., 1992; Urban JPG ET AL., 1995）。さらに種々のサイトカインが椎間板細胞の基質合成あるいは分解の亢進にかかわっており、そのうち insulin-like growth factor(IGF)-1 や transforming growth factor(TGF)- β は合成を促進する代表的なサイトカインである。一方、interleukin(IL)-1 や tumor necrosis factor(TNF)- α は基質分解を亢進させることが知られている。こうしたサイトカインは基質分解酵素である matrix metalloproteinase(MMP)やその阻害因子 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)の活性を亢進あるいは抑制することで、その作用の一部が発現することが明らかとなっている（波呂ら., 2000）。椎間板の変性予防と治療の試みとして、TGF- β の遺伝子を組み込んだ Adeno virus を家兎椎間板に注射し、椎間板内の TGF- β 含量およびプロテオグリカン合成能が促進したとの報告がある（Nishida et al., 1999）。

第二節 椎間板の構造と構成成分

椎間板は、髄核、線維輪、軟骨終板の 3 つの異なる組織がそれぞれ固有の特性を生かし一つの機能を発揮する複合体である。線維輪は外層を取り巻くコラ

ーゲン線維からなる密な層状構造の外層線維輪とその内側に線維軟骨様の内層線維輪から成る。椎間板中心部の髄核はムコ多糖蛋白複合体と水分、少量の細胞を含み、コラーゲン線維が不規則に配列するゲル状物質で粘弾性の性質を持つ。その上下をさらに軟骨終板で挟むような構造になっている。軟骨終板は初期には硝子様軟骨であるが成長とともに石灰化し骨へと変わる。上下の椎体と椎間板を連結する役目を担っていると同時に椎体内血管を介した物資の出納をつかさどる。軟骨終板細胞は他の硝子様軟骨に存在する軟骨細胞に似ている。外層線維輪には線維芽細胞様の細胞が存在しているが内層線維輪には軟骨細胞様の細胞が存在している。髄核には初期には脊索細胞が存在しているが、成人して早期に消失し軟骨様細胞だけになってしまう（酒井ら、2004）。

椎間板を構成する主要高分子はコラーゲンとプロテオグリカンである。外層線維輪ではその乾燥重量の約 70%はコラーゲンであるが、若年者の髄核では乾燥重量の 20%以下である。逆にプロテオグリカンの含有量は外層線維輪ではその乾燥重量の数%に過ぎないが、小児の髄核ではその乾燥重量の 50%以上にも達する。

椎間板の基質を構成する高分子であるコラーゲンにはいくつかのタイプが存在するが、外層線維輪では組織内のコラーゲンの約 80%をタイプ I コラーゲンで占める。ここから椎間板の中心に向かっていくにつれてタイプ II コラーゲンとプロテオグリカンの濃度が飛躍的に増加するとともにタイプ I コラーゲンの濃度は急激に低下する。髄核内においてはタイプ II コラーゲンは 80%に達し、タイプ I コラーゲンは全く存在しなくなる（Buckwalter., 1995）。

髄核は髄核細胞とそれが産生する細胞外基質及び水で構成される。その大部分（70～80%）は水分であり、髄核細胞が産生する抱水性に優れたプロテオグリカンがタイプ II コラーゲンを主とした粗で不均一なコラーゲンネットワークに包まれて存在する。プロテオグリカンの抱水性はムコ多糖であるヒアルロン

酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸などのカルボキシル基（ COO^- ）や硫酸基（ SO_3^- ）が持つ陰性荷電に水が引きつけられるために起こる。これにより一定の浸透圧が生まれ椎間板の内圧を形成する。

第三節 椎間板の機能と生体力学的特性

椎間板は隣り合う椎体同士を連結固定することにより脊柱に運動性を与えるとともにそれと相反する支持性を与え、同時に衝撃吸収器官としての重要な役割を担っている。椎間板に垂直荷重が加わると、髄核の圧が上昇し、その圧力は全ての方向に伝達される。上下方向では終板を押し、外周では線維輪を押し膨張させようとする。この圧力に対し線維輪は緊張して張力が上昇する。この線維輪の張力が髄核の圧に抵抗して力の平行が得られる（山元, 1996）。大島は椎間板組織中のプロテオグリカンの陰性荷電量から部位別に荷重に対する内圧変化を測定し、髄核と内層線維輪でのみ有意に外的荷重ストレスに抗する内圧を発生することを報告しており、椎間板の抗压負荷作用は主に髄核と内層線維輪が担っていることを明らかにした（大島, 2000）。また主に髄核の持つ粘性と線維輪の持つ弾性の二つを合わせ持つことが椎間板特有の粘弾性特性を構築しているとしている。すなわち粘性は、外部の負荷に対して時間をかけて応答する性質であるが、椎間板に一定の圧負荷を与えたときにその変位が時間とともに指数関数的に一定値に至る creep 特性を示す。また変位を一定に保つ応力を時間とともに指数関数的に低下させる応力緩和特性を発揮する。弾性は椎間板に定速荷重負荷を加えた際の加重-変位曲線は直線的関係が成立し、工学的にバネのような弾性体としての特性も備えている。直線の傾きより椎間板の硬さとしての弾性率が求められるが、荷重速度が速いほど弾性率が高くなって椎間板

の硬性が高まる特性がある (Ohshima et al., 1989; 大島ら., 1997)。

第四節 細胞外基質について

Integrins を介しての細胞外基質への細胞接着は細胞の固定、移動、成長、分化といった基本的な細胞活動にとって非常に重要であると考えられている (Hynes., 1992; Rouslhti., 1991; Yamada., 1991)。従って関節軟骨細胞が種々の細胞外基質蛋白に対して Integrins によってなされる接着を評価するための細胞接着に関する研究は多くなされてきた (Dürr et al., 1993; Enomoto et al., 1993, 1997; Kuritis et al., 2001; Loeser., 1993; Loeser et al., 1995; Reid et al., 2000; Salter et al., 1992)。しかしながらコラーゲンやファイブロネクチンといった細胞外基質蛋白への軟骨細胞の接着が軟骨細胞の増殖や細胞外基質分子の合成を含む代謝調節に如何なる影響があるのか調べられた研究はごく一部に過ぎない (Lee et al., 2002; Qi et al., 1997, 1998; Scully et al., 2001)。Ramdi らはタイプ I コラーゲン、タイプ IV コラーゲン、及びファイブロネクチンがウサギ軟骨細胞の増殖と細胞外基質の合成の両方について如何なる影響があるのか単層及び三次元培養で実験を行っている (Ramdi et al., 1993)。Qi と Scully はタイプ II コラーゲンが軟骨細胞の DNA およびプロテオグリカン合成に与える影響について調べ濃度依存性にそれらを増加させることを報告している (Qi et al., 1997, 1998)。Scully は β 1-integrin を介するタイプ II コラーゲンの軟骨細胞への接着をブロックすることにより TGF- β 1による細胞増殖とプロテオグリカン合成の正の影響を有意に抑制した (Scully et al., 2001)。これらの結果は関節軟骨内に最も豊富に存在するタイプ II コラーゲンは軟骨細胞の代謝調節に深く関わっていることを示唆する。

従って関節軟骨同様に人体最大の無血管野であり大量の細胞外基質を有する椎間板内で細胞外基質と椎間板細胞間での相互作用が細胞増殖および代謝に非常に重要であることが予測される。

しかしながら、細胞外基質蛋白が椎間板細胞の増殖と代謝に如何なる影響を与えているか未だ明らかではない。今回の研究では細胞外基質蛋白が椎間板細胞の DNA およびプロテオグリカン合成にに対する影響を明らかにするために線維輪、髄核でそれぞれ最も多く存在するコラーゲンであるタイプ I コラーゲン、タイプ II コラーゲンと多くの組織で豊富に存在するファイブロネクチン (Eyre et al., 1976) について実験を行った。

第二章 実験材料および方法

第一節 椎間板細胞の抽出

L1/2 から L6/7 までの連続する 6 つの椎間板を若年の(3.0 – 3.5 kg)日本白色家兎より取り出し今回の実験に使用した。無菌下にメスにて椎間板を椎体より分離し、摂子にて鈍的に髄核と線維輪に分け Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) にそれぞれ浸した。

髄核はまず 0.2% pronase (Calbiochem, Darmstadt, Germany) を含む無血清 DMEM 培地で 1 時間消化した後、0.025% collagenase (Clostridium histolyticum: Sigma, Kyoto, Japan) を含む 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, Utah, USA) 入り DMEM/Ham's F12 (Gibco BRL) (50/50)培地で 1 時間から 2 時間 37

従って関節軟骨同様に人体最大の無血管野であり大量の細胞外基質を有する椎間板内で細胞外基質と椎間板細胞間での相互作用が細胞増殖および代謝に非常に重要であることが予測される。

しかしながら、細胞外基質蛋白が椎間板細胞の増殖と代謝に如何なる影響を与えているか未だ明らかではない。今回の研究では細胞外基質蛋白が椎間板細胞の DNA およびプロテオグリカン合成にに対する影響を明らかにするために線維輪、髄核でそれぞれ最も多く存在するコラーゲンであるタイプ I コラーゲン、タイプ II コラーゲンと多くの組織で豊富に存在するファイブロネクチン (Eyre et al., 1976) について実験を行った。

第二章 実験材料および方法

第一節 椎間板細胞の抽出

L1/2 から L6/7 までの連続する 6 つの椎間板を若年の(3.0 – 3.5 kg)日本白色家兎より取り出し今回の実験に使用した。無菌下にメスにて椎間板を椎体より切離し、摂子にて鈍的に髄核と線維輪に分け Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) にそれぞれ浸した。

髄核はまず 0.2% pronase (Calbiochem, Darmstadt, Germany) を含む無血清 DMEM 培地で 1 時間消化した後、0.025% collagenase (Clostridium histolyticum: Sigma, Kyoto, Japan) を含む 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, Utah, USA) 入り DMEM/Ham's F12 (Gibco BRL) (50/50)培地で 1 時間から 2 時間 37

°C で愛護的に撈拌した。

遠沈分離しペレットとして分離した髓核細胞は nonenzymatic cell dissociation solution (Sigma) で三回濯ぎ細胞同士が集塊を形成しないようにした。線維輪は第一消化は髓核と同様に行い、続く第二消化は髓核と同じ培地内で8時間行い分離した線維輪細胞は DMEM で三回濯いだ。

細胞数及び生細胞率は trypan blue dye exclusion method を用いて行った。

第二節 細胞培養

抽出した細胞は 10% FBS と抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン、ネオマイシン)を含む DMEM/Ham's F12 (50/50)培地に播種し、96 穴培養プレートで単層培養した。細胞濃度は 5×10^4 個/ml とし 1 穴に 100 μ l ずつ分注した。

まず、タイプ I コラーゲン、タイプ II コラーゲン、ファイブロネクチンの内どの細胞外基質蛋白質が椎間板細胞のプロテオグリカン合成により影響をもたらすのか評価するために、髓核細胞と線維輪細胞のそれぞれについて細胞外基質蛋白質を培養プレート表面に塗布したものとしていないものとの培養した。

次に椎間板細胞のプロテオグリカン合成に細胞外基質蛋白質の濃度の違いによる影響を評価するため異なる濃度のタイプ I コラーゲンとタイプ II コラーゲンを塗布した培養プレートで培養を行った。培養は 37°C で 5 % CO₂ を含む湿润環境下で 4 日から 6 日間施行した。培養期間中の培地交換は 2 日に 1 回行い、接着していない細胞や剥がれてしまった細胞を取り去ってしまわないように培地の表層より半量を愛護的にパイペットで交換した。

4 日から 6 日間の前培養の後、培地を半量 ³⁵S 硫酸塩を含む DMEM/Ham's F12 (50/50)培地に交換し最終濃度が 20 μ Ci/ml となるようにした。ラベリング培

養は 8 時間から 24 時間行った。

第三節 細胞外基質蛋白塗布細胞培養プレートの作成

ファイブロネクチンを塗布した培養プレートは Becton Dickinson 社より購入した。組織培養プレート (non-treated, Falcon, New Jersey, USA) にペプシンにより抽出したタイプ I コラーゲン、タイプ II コラーゲン溶液 (Nitta, gelatin, Osaka, Japan) を塗布した。

細胞外基質蛋白に対する椎間板細胞の反応をみる一つ目の実験ではタイプ I コラーゲン、タイプ II コラーゲン溶液を 10^{-3} M HCl 溶液で希釈し最終濃度が 0.3 mg/ml となるようにした。これを培養プレートに塗布し室温で 1 時間放置した後、プレート表面上の余分な溶液を除去し DMEM で 2 回濯いだ。

二つ目の実験である椎間板細胞が細胞外基質蛋白の濃度に依存して反応性を示すか確かめる実験では、タイプ I コラーゲン、タイプ II コラーゲン溶液を 10^{-3} M HCl 溶液で希釈し最終濃度が 0.01, 0.1, and 1.0 mg/ml となるようにした。各々の well に 50 μ l ずつ分注し室温の元、クリーンベンチ内でカバーを外した状態で一晩放置し乾燥させ、DMEM にて 2 回濯いだ。椎間板細胞と細胞外基質蛋白間の非特異的な結合を防ぐために細胞外基質蛋白をコートした培養プレートは 2% bovine serum albumin を各 well に分注し 37°C で 1 時間インキュベーションし PBS で 2 回濯いだ。

第四節 DNA 含有量の測定

^{35}S 塩酸塩にてラベリングのための培養を施行した後の細胞数を評価するため各 well の DNA 含有量を bisbenzimidazole 蛍光染色法 (Hoechst 33258: Sigma) を用いて計測した (Kim et al., 1988)。

第五節 ^{35}S -proteoglycan 合成率の計測

プロテオグリカンの合成量は細胞周囲に形成される cell-associated matrix (CM) とラベリング培地内の further removed matrix (FRM) への ^{35}S の取り込み量によって評価し、rapid filtration assay を用いて計測した (Masuda et al., 1994)。 ^{35}S 塩酸塩取り込みのための培養を行った後、各々の well 内容物を細胞と培地に分けた。接着せずに培地内に浮遊している細胞は遠沈によりペレットとして回収し well 上に接着した細胞と一緒に合わせ、protease inhibitor を加えた 4 M guanidine-HCl solution で 24 時間、4 °C で溶解させた。 ^{35}S 塩酸塩の取り込みは liquid scintillation counting により定量し、DNA 量で標準化した。

第六節 統計処理

Nonparametric Mann-Whitney U 検定を用い $P < 0.05$ を統計学的有意と判定した。

第三章 結果

第一節 細胞抽出

細胞抽出後に速やかに行った生細胞率は全例 95%以上であった。

第二節 細胞外基質蛋白の DNA 合成に対する影響

タイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンを底面にコートした well で培養したものはコントロールと比較し DNA 量が多い傾向にあったが、髓核細胞及び線維輪細胞ともに有意な差はみられなかった。

第三節 細胞外基質蛋白の proteoglycan 合成率に対する影響

タイプ I コラーゲンもしくはタイプ II コラーゲンをコートしたプレートで培養した髓核細胞は何もコートしていないプレートで培養した髓核細胞と比較すると CM, FRM のいずれにおいてもプロテオグリカンの合成率が有意に増加していた。更にタイプ I コラーゲンもしくはタイプ II コラーゲンをコートしたプレートで培養した髓核細胞はファイブロネクチンをコートしたプレートで培養した髓核細胞と比較しても CM, FRM のいずれにおいてもプロテオグリカンの合成率が有意に増加していた。ファイブロネクチンをコートしたプレートで培養した髓核細胞では何もコートしていないプレートで培養した髓核細胞と比較

すると CM においてのみ有意にプロテオグリカン合成率が増加した (Figure 1)。線維輪細胞では細胞外基質蛋白の有無によるプロテオグリカン合成率の有意の差は CM, FRM のいずれにおいても無かった。しかしながら、線維輪細胞のプロテオグリカン合成率は細胞外基質蛋白の存在の有無によらず、CM, FRM のいずれにおいても細胞外基質蛋白存在下に培養した髓核細胞のプロテオグリカン合成率より遙かに高かった (data not shown)。髓核細胞のプロテオグリカン合成率は FRM が CM の 2 倍から 5 倍高かった。線維輪細胞ではプロテオグリカン合成率は FRM が CM の約 2 倍であった (Figure 1)。

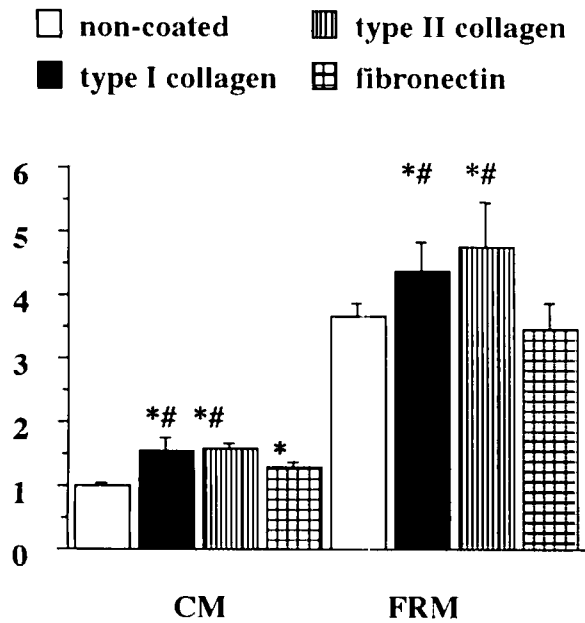


Figure 1. Rate of proteoglycan synthesis of NP cells in non-coated plate or extracellular matrix protein coated plate in CM and FRM. Data are normalized to rate of proteoglycan synthesis for non-coated in CM (mean \pm SD, n = 6 each). *P < 0.05 compared to non-treated. #P < 0.05 compared to fibronectin.

以上の結果を踏まえて、髓核細胞のみタイプ I コラーゲンもしくはタイプ II コラーゲンの濃度を変化させ実験を行った。

第四節 細胞外基質蛋白濃度変化による proteoglycan 合成率に対する影響

タイプ I コラーゲンを最も高濃度である 1.0 mg/ml よりも比較的低濃度である 0.01, 0.1 mg/ml でコートしたプレートで髓核細胞を培養した方が CM, FRM のいずれにおいてもプロテオグリカン合成率は高かった。タイプ II コラーゲンをコートしたプレートで培養した髓核細胞においても FRM に関しては最も高濃度である 1.0 mg/ml よりも比較的低濃度である 0.01, 0.1 mg/ml でコートした方がプロテオグリカン合成率は高かった。CM に関しては、0.01 mg/ml の低濃度でコートしたものが 0.1 mg/ml でコートしたものより有意にプロテオグリカン合成率は高かったが、1.0 mg/ml でコートしたものとのあいだには有意差はなかった (data not shown)。しかしながら、CM と FRM を合わせたものではタイプ I コラーゲンだけでなくタイプ II コラーゲンにおいても最も高濃度である 1.0 mg/ml よりも比較的低濃度である 0.01, 0.1 mg/ml でコートした方がプロテオグリカン合成率は高かった (Figure 2 and 3)。タイプ I およびタイプ II コラーゲンの髓核細胞に対するプロテオグリカン合成の正の増強効果はコラーゲン濃度が増加するのに伴い減少していた。タイプ II コラーゲンを 1.0 mg/ml の濃度でコートしたプレートで髓核細胞を培養したものでは、何もコートしていないものと比較しプロテオグリカン合成率で FRM に関しては全く有意差が出なくなってしまった。

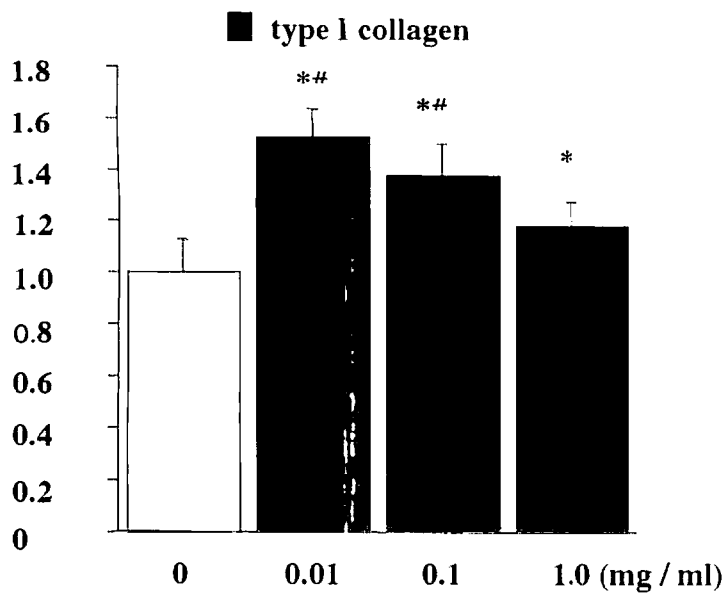


Figure 2. Total rate (CM + FRM) of proteoglycan synthesis by NP cells in type I collagen coated plate at concentration of 0, 0.01, 0.1, and 1.0 mg / ml. Data are normalized to the rate of proteoglycan synthesis for 0 mg / ml (mean \pm SD, n = 6 each). *P < 0.05 compared to 0 mg / ml. #P < 0.05 compared to 1.0 mg / ml.

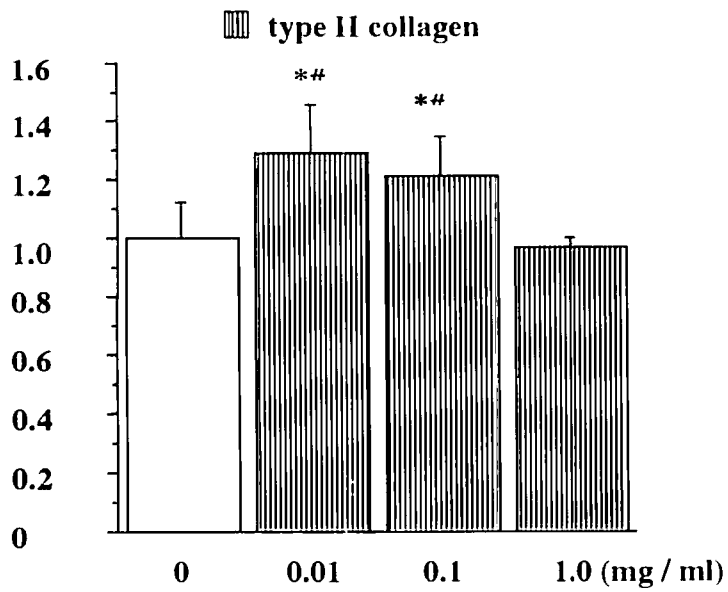


Figure 3. Total rate (CM + FRM) of proteoglycan synthesis by NP cells in type II collagen coated plate at concentration of 0, 0.01, 0.1, and 1.0 mg / ml.

Data are normalized to the rate of proteoglycan synthesis for 0 mg / ml

(mean \pm SD, n = 6 each). *P < 0.05 compared to 0 mg / ml. #P < 0.05 compared to 1.0 mg / ml.

第五節 細胞形態

培養 1 日目の髓核細胞は細胞外基質蛋白の有無によらず全て円形ないし球形を呈していた。何もコートしていないプレートで培養した髓核細胞は培養 5 日目までに細胞同士で集塊を形成するものもあるが各々の細胞は元の円形を保っていた。培養 5 日目では何もコートしていないプレートで培養した髓核細胞ではプレート底面に接着し平坦に伸びたものは殆ど無かったが、タイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンをコートしたプレートで培養した髓核細胞は接着し平坦になり多角形を呈するものまであった (Figure 3)。

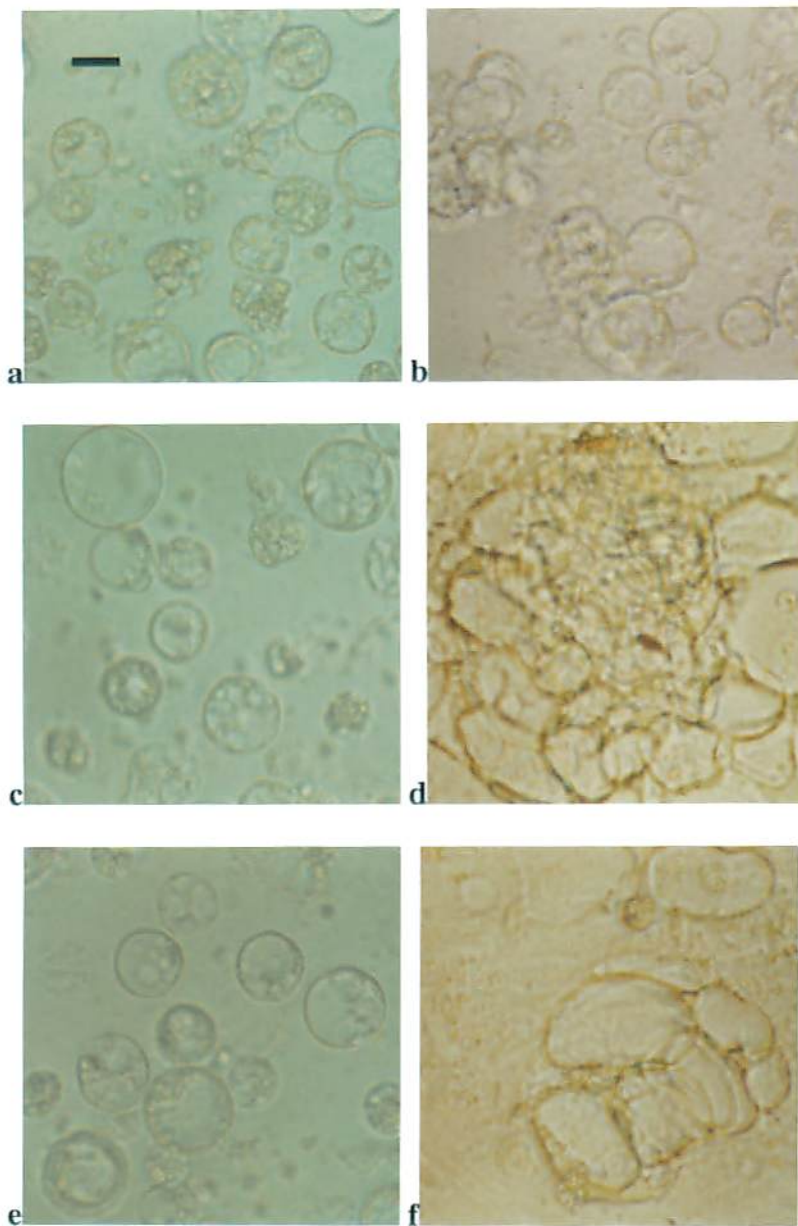


Figure 3. Morphology of rabbit NP cells in culture on day 1 and 5. On day 1 non-coated **a**, type I collagen **c**, and type II collagen **e**. On day 5 non-coated **b**, type I collagen **d**, and type II collagen **f**. Bar = 25 μ m.

第三章 結果

第一節 細胞抽出

細胞抽出後に速やかに行った生細胞率は全例 95%以上であった。

第二節 細胞外基質蛋白の DNA 合成に対する影響

タイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンを底面にコートした well で培養したものはコントロールと比較し DNA 量が多い傾向にあったが、髓核細胞及び線維輪細胞ともに有意な差はみられなかった。

第三節 細胞外基質蛋白の proteoglycan 合成率に対する影響

タイプ I コラーゲンもしくはタイプ II コラーゲンをコートしたプレートで培養した髓核細胞は何もコートしていないプレートで培養した髓核細胞と比較すると CM, FRM のいずれにおいてもプロテオグリカンの合成率が有意に増加していた。更にタイプ I コラーゲンもしくはタイプ II コラーゲンをコートしたプレートで培養した髓核細胞はファイブロネクチンをコートしたプレートで培養した髓核細胞と比較しても CM, FRM のいずれにおいてもプロテオグリカンの合成率が有意に増加していた。ファイブロネクチンをコートしたプレートで培養した髓核細胞では何もコートしていないプレートで培養した髓核細胞と比較

すると CM においてのみ有意にプロテオグリカン合成率が増加した (Figure 1)。線維輪細胞では細胞外基質蛋白の有無によるプロテオグリカン合成率の有意の差は CM, FRM のいずれにおいても無かった。しかしながら、線維輪細胞のプロテオグリカン合成率は細胞外基質蛋白の存在の有無によらず、CM, FRM のいずれにおいても細胞外基質蛋白存在下に培養した髓核細胞のプロテオグリカン合成率より遙かに高かった (data not shown)。髓核細胞のプロテオグリカン合成率は FRM が CM の 2 倍から 5 倍高かった。線維輪細胞ではプロテオグリカン合成率は FRM が CM の約 2 倍であった (Figure 1)。

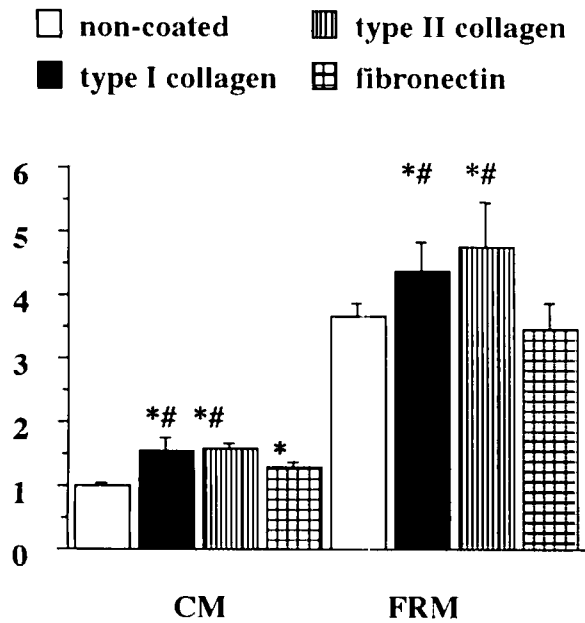


Figure 1. Rate of proteoglycan synthesis of NP cells in non-coated plate or extracellular matrix protein coated plate in CM and FRM. Data are normalized to rate of proteoglycan synthesis for non-coated in CM (mean \pm SD, n = 6 each). *P < 0.05 compared to non-treated. #P < 0.05 compared to fibronectin.

以上の結果を踏まえて、髄核細胞のみタイプ I コラーゲンもしくはタイプ II コラーゲンの濃度を変化させ実験を行った。

第四節 細胞外基質蛋白濃度変化による proteoglycan 合成率に対する影響

タイプ I コラーゲンを最も高濃度である 1.0 mg/ml よりも比較的低濃度である 0.01, 0.1 mg/ml でコートしたプレートで髄核細胞を培養した方が CM, FRM のいずれにおいてもプロテオグリカン合成率は高かった。タイプ II コラーゲンをコートしたプレートで培養した髄核細胞においても FRM に関しては最も高濃度である 1.0 mg/ml よりも比較的低濃度である 0.01, 0.1 mg/ml でコートした方がプロテオグリカン合成率は高かった。CM に関しては、0.01 mg/ml の低濃度でコートしたものが 0.1 mg/ml でコートしたものより有意にプロテオグリカン合成率は高かったが、1.0 mg/ml でコートしたものとのあいだには有意差はなかった (data not shown)。しかしながら、CM と FRM を合わせたものではタイプ I コラーゲンだけでなくタイプ II コラーゲンにおいても最も高濃度である 1.0 mg/ml よりも比較的低濃度である 0.01, 0.1 mg/ml でコートした方がプロテオグリカン合成率は高かった (Figure 2 and 3)。タイプ I およびタイプ II コラーゲンの髄核細胞に対するプロテオグリカン合成の正の増強効果はコラーゲン濃度が増加するのに伴い減少していた。タイプ II コラーゲンを 1.0 mg/ml の濃度でコートしたプレートで髄核細胞を培養したものでは、何もコートしていないものと比較しプロテオグリカン合成率で FRM に関しては全く有意差が出なくなってしまった。

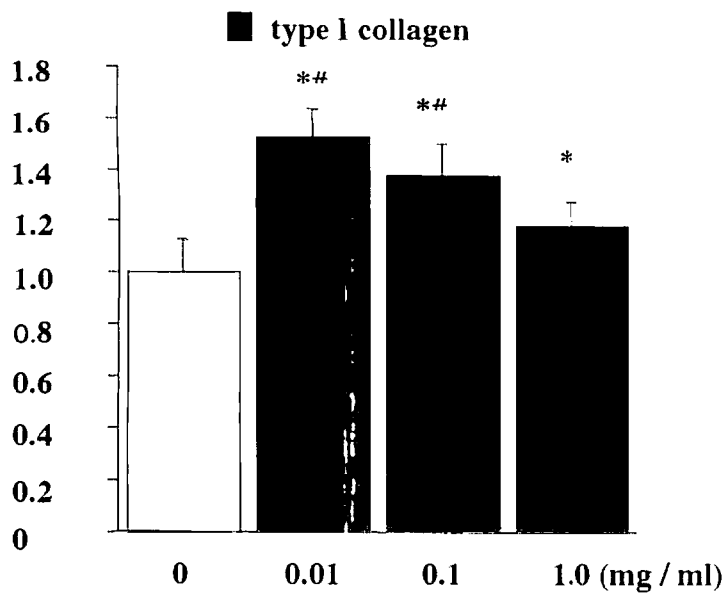


Figure 2. Total rate (CM + FRM) of proteoglycan synthesis by NP cells in type I collagen coated plate at concentration of 0, 0.01, 0.1, and 1.0 mg / ml. Data are normalized to the rate of proteoglycan synthesis for 0 mg / ml (mean \pm SD, n = 6 each). *P < 0.05 compared to 0 mg / ml. #P < 0.05 compared to 1.0 mg / ml.

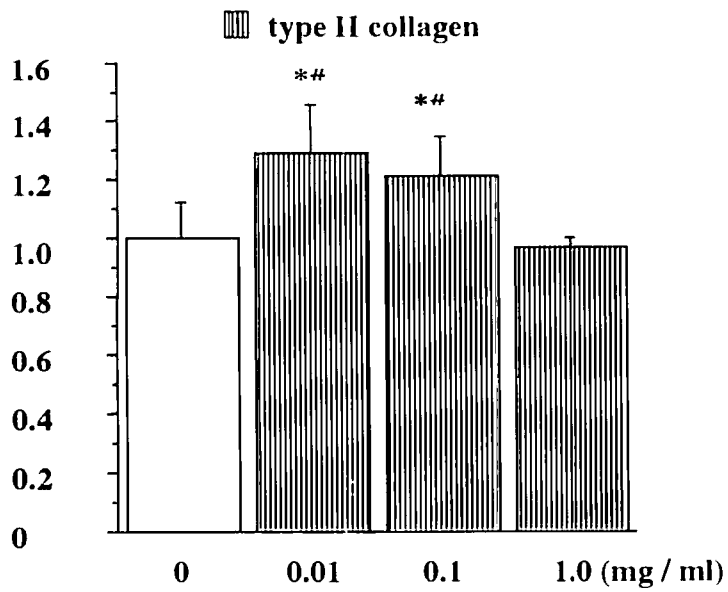


Figure 3. Total rate (CM + FRM) of proteoglycan synthesis by NP cells in type II collagen coated plate at concentration of 0, 0.01, 0.1, and 1.0 mg / ml.

Data are normalized to the rate of proteoglycan synthesis for 0 mg / ml

(mean \pm SD, n = 6 each). *P < 0.05 compared to 0 mg / ml. #P < 0.05 compared to 1.0 mg / ml.

第五節 細胞形態

培養 1 日目の髓核細胞は細胞外基質蛋白の有無によらず全て円形ないし球形を呈していた。何もコートしていないプレートで培養した髓核細胞は培養 5 日目までに細胞同士で集塊を形成するものもあるが各々の細胞は元の円形を保っていた。培養 5 日目では何もコートしていないプレートで培養した髓核細胞ではプレート底面に接着し平坦に伸びたものは殆ど無かったが、タイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンをコートしたプレートで培養した髓核細胞は接着し平坦になり多角形を呈するものまであった (Figure 3)。

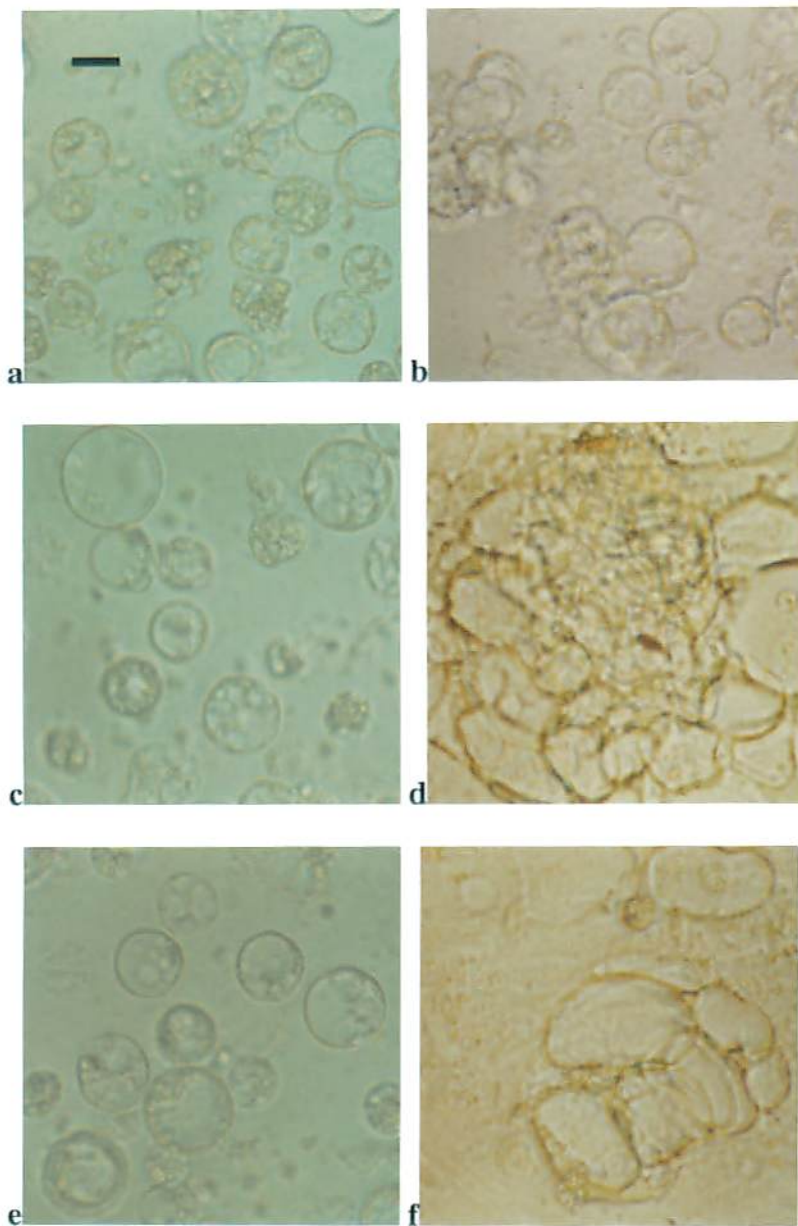


Figure 3. Morphology of rabbit NP cells in culture on day 1 and 5. On day 1 non-coated **a**, type I collagen **c**, and type II collagen **e**. On day 5 non-coated **b**, type I collagen **d**, and type II collagen **f**. Bar = 25 μ m.

第四章 考察

今回我々は椎間板細胞のプロテオグリカン合成に対する細胞外基質蛋白の影響をプロテオグリカン合成率を測定することによって明らかにした。細胞外基質蛋白をコートしたプレートで培養された髓核細胞では何もコートしなかったプレートで培養された髓核細胞と比較し有意にプロテオグリカン合成率が増加した。しかしながら、同様に細胞外基質蛋白をコートしたプレートで培養された線維輪細胞ではコントロールに対してプロテオグリカン合成率の有意な増加はみられなかった。このことは椎間板組織の主な構成成分の一つであるコラーゲンを含む細胞外基質蛋白はプロテオグリカンを新しく合成するに当たっては線維輪細胞より髓核細胞にとってより重要であることが示唆される。線維輪細胞と比較すると髓核細胞はプロテオグリカン合成に関して周囲を取り巻く細胞外基質蛋白の影響を受け易いといえた。

おもしろいことに髓核細胞のプロテオグリカン合成率はタイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンともにその濃度を増加させるのに従って低下した。このことは髓核細胞におけるプロテオグリカン合成の調節をこれらのタイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンのうちいずれかもしくはその両方によって修飾されうることを示唆する。今回我々のタイプ II コラーゲンをコートしたプレートで培養した髓核細胞のプロテオグリカンの合成率に関する結果は Qi と Scully の実験結果と似たような結果となった。彼らの実験では FBS もしくは TGF- β 1 含有培地で牛関節軟骨細胞をタイプ II コラーゲンを含むアルジネートビーズ内に封入して培養することによってコントロール群と比較しプロテオグリカン合成率を有意に増加させた (Qi et al., 1997, 1998)。しかしながら我々の

タイプ I コラーゲンをコートしたプレートで培養した髄核細胞のプロテオグリカンの合成率に関する結果は彼らの結果と異なっており、彼らの結果では TGF- β 1 含有培地で牛関節軟骨細胞をタイプ I コラーゲンを含むアルジネートビーズ内に封入して培養することによってコントロール群と比較しプロテオグリカン合成率が濃度依存性に有意に抑制された (Qi et al., 1997)。この結果の相違は細胞とコラーゲン間の接着率の違いによるものかもしれない。まず一つ目の理由として細胞とコラーゲン間の接着率の違いは、培養プレート上に固着したタイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンに対する細胞の接着率とビーズ内の細胞に対する浮遊タイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンの接着率との相違によることが考えられる。Reid らはペプシン抽出によるタイプ I コラーゲン及びタイプ II コラーゲンをコートした培養プレートに対する牛関節軟骨細胞の接着率はタイプ I コラーゲン及びタイプ II コラーゲン間で殆ど無かったとしている (Reid et al., 2000)。それに対し、ラジオアイソトープで標識したタイプ I コラーゲン及びタイプ II コラーゲンをを用いた関節軟骨細胞に対する結合実験ではタイプ I コラーゲンに対してタイプ II コラーゲンが有意に結合力が勝っていたとしている (Reid et al., 2000)。Enomoto らは関節軟骨細胞がタイプ II コラーゲンをコートしたプレートに接着するのと同様の接着率でタイプ I コラーゲンをコートしたプレートに接着することを示した (Enomoto et al., 1993, 1997)。これらの結果より軟骨細胞のプロテオグリカン合成に関するアルジネートビーズ内のタイプ I コラーゲンに対する反応と、プレート上に固着されたタイプ I コラーゲンに対する反応の違いはアルジネートビーズ内の軟骨細胞に対するタイプ I コラーゲンの接着率と単層培養時のプレート上のタイプ I コラーゲンに対する軟骨細胞の接着率の違いによることが示唆される。接着率が異なる理由の二つ目としては培養条件の違いが挙げられる。Loeser らは細胞外基質蛋白へのレセプターとしてのインテグリンの発現が増殖因子や培養期間等の

培養条件によって影響されることを示した (Loeser et al., 1995; Loeser., 1997)。Loeser らの結果より今回の我々の実験において Qi と Scully らの培養条件との違いから細胞表現形とインテグリンの発現が変化したことにより細胞接着率及びタイプ I コラーゲンに対する髄核細胞の代謝反応に違いがでたことが示唆される。接着率の相違に関して他に考えられる理由としては FBS に含まれるファイブロネクチン等、他の細胞外基質蛋白の存在が考えられる。人軟骨肉腫細胞は熱変性させたタイプ II コラーゲンに対して $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとファイブロネクチンとの架橋形成を利用して結合することが可能である (Tuckwell et al., 1994)。このことより FBS に含まれる細胞外基質蛋白によって髄核細胞がタイプ I コラーゲンに接着するのをサポートした可能性も否定はできない。軟骨肉腫細胞は正常なタイプ II コラーゲンでも熱変性したタイプ II コラーゲンのどちらに対しても同様に濃度依存性に接着したが、接着後の細胞伸延の仕方は正常タイプ II コラーゲンに接着したものの方が熱変性タイプ II コラーゲンに接着したものより高率に細胞伸延を起こしていた (Tuckwell et al., 1994)。これらの結果より細胞の形態変化は細胞接着率ばかりでなくインテグリンを介した接着の仕方にも影響されることが示唆されるが、これらの仮説を明らかにするには更なる研究が必要である。

単層培養を行うと、球形の軟骨細胞はその形態を変化させ平板に拡がって線維芽細胞様細胞に変化する。形態変化に伴い軟骨細胞は本来の主要生成物であるプロテオグリカンとタイプ II コラーゲンの合成を減少させると共にタイプ I コラーゲンの合成を増加させる (Benette et al., 1998; Benya et al., 1982)。今回の実験では髄核細胞・線維輪細胞共に細胞外基質蛋白をコートした培養プレートで培養すると細胞形態が球形から接着に伴い平たく拡がり始めた。Zauckeらはタイプ II コラーゲンより遙かに感受性が高く厳密な軟骨細胞形質発現マーカーである cartilage oligometric matrix protein とタイプ IX コラーゲンによる

評価によって、単層培養された軟骨細胞は少なくとも 2 週間は代謝の形質発現を維持し得たと報告されている (Zaucke et al., 2001)。Guo らは軟骨細胞は 6 日間の単層培養では細胞あたりのプロテオグリカン合成量はアルジネートビーズ内で培養されたものと遜色なくまた高分子プロテオグリカンと低分子プロテオグリカンの合成比率も類似していたとしている (Guo et al., 1989)。単層培養とした髓核細胞はアルジネートビーズ内で培養した場合と比較しプロテオグリカン合成率に違いがみられるとした報告があるものの (Horner et al., 2002; Ichimura et al., 1991; Poiraudau et al., 1999; Wang et al., 2001)、比較的短期間かもしくは数世代の培養期間であれば、単層培養であっても髓核細胞及び軟骨細胞はプロテオグリカンとタイプ II コラーゲンの合成を維持し続けると考えられる。今回の実験においては髓核細胞の単層培養期間は 1 週間以内であり、それ故に単層培養にて髓核細胞の代謝に関する実験を行い、結果を評価したことは充分妥当であったと言える。

我々の結果では髓核細胞はタイプ I コラーゲン、タイプ II コラーゲンいずれをコートした場合においてもコラーゲンが低濃度 (0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$) の方が高濃度 (50 $\mu\text{g}/\text{well}$) で培養した場合よりもより CM, FRM トータルでのプロテオグリカン合成率が高かった。Lee らはタイプ II コラーゲンの濃度を 0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$ から 2.0 $\mu\text{g}/\text{well}$ まで濃度を変えて濃度による軟骨細胞の接着率を計測した結果、0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ で接着率が最も高かったと報告している (Lee et al., 2002)。コラーゲン濃度によって接着率が異なるとするならば、今回の結果より髓核細胞のタイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンに対する接着率がプロテオグリカンの合成率に影響を与えていることが示唆される。髓核細胞のプロテオグリカン合成率がタイプ I コラーゲンおよびタイプ II コラーゲンの濃度を上げるのに従って減少した。且つ低濃度においては何もコートしていないコントロールより有意にプロテオグリカン合成率が増加したことより、椎間板

組織の恒常性を保つために十分なプロテオグリカンを合成するには髄核細胞周囲を取り巻くタイプ II コラーゲンの至適濃度を維持することが必要であることが示唆される。従ってダメージを受けて椎間板内のプロテオグリカン含有量が減少してしまうと結果として椎間板内のコラーゲン濃度が上昇しプロテオグリカンの合成率が減少してしまうかもしれない。その結果、一度椎間板髄核の変性が始まるとこの悪循環により変性が加速されてしまうのかもしれない。このことは椎間板が他の組織と比較し組織修復能力が弱く、変性をきたしやすいことの原因の一つになり得ると考えられる。

第五章 結語

今回の研究により細胞外基質蛋白であるタイプ II コラーゲンが髄核細胞のプロテオグリカン合成調節に関与することが示唆された。髄核細胞が細胞外基質タンパクと結合することが重要であると考えられるが、細胞外基質蛋白が髄核細胞のプロテオグリカン合成にレセプターを介して、もしくは間接的に autocrine と paracrine にサイトカインを用いて刺激しているのかは詳細については不明である。

髄核細胞の細胞外基質タンパクとの結合と代謝のメカニズムを解明することにより、椎間板変性の予防と治療に繋がると考えられる。