

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

油井 直子

専攻分野：スポーツ医学

コース：

指導教授：武者 春樹

主論文の題目：

The DNA Repair Enzyme Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (Apex Nuclease) 2 Has the Potential to Protect against Down-Regulation of Chondrocyte Activity in Osteoarthritis

(核酸修復酵素 Apex2 は、変形性関節症の軟骨細胞活性低下を抑制する能力を有している)

共著者：

Hiroataka Yoshioka, Hiroto Fujiya, Haruki Musha, Moroe Beppu, Rie Karasawa, Kazuo Yudoh

緒言

変形性関節症 (osteoarthritis:OA) は、関節軟骨の変性や物理的摩擦の影響によって引き起こされる二次性滑膜炎、および骨・軟骨の新生増殖性変化にもとづく進行性の関節変性疾患である。近年、多くの研究報告から、加齢にともなう軟骨基質の組成変化に加えて、肥満や荷重などのメカニカルストレスと、それにもなって誘導される酸化ストレス

(活性酸素種) の蓄積が、OA の発症と進行に密接に関与することが明らかとなっている。今回我々は、酸化ストレスの応答機構として DNA 損傷に対する修復酵素 (Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 2 : Apex2) の存在に着目し、変形性関節症の軟骨細胞における Apex2 の発現とその

応答機序について検討した。

方法・対象

(1) 分子生物学的検討：整形外科において、変形性関節症と診断され手術にいたった患者からインフォームドコンセントを得たうえで、人工関節置換術時に採取した関節軟骨から OA 軟骨培養細胞を分離樹立した。コントロール軟骨細胞は、外傷性大腿骨頸部骨折で人工骨頭置換術にいたった患者からインフォームドコンセントを得たうえで、採取した骨頭軟骨から分離樹立した。OA 軟骨細胞またはコントロール軟骨細胞の培養系に軟骨異化誘導因子である IL-1 β (10ng/ml) を経時的に添加したあとの軟骨細胞を回収し、Apex2 活性をウェスタンブロット法にて解析した。さらに、RNA 干渉法を用いて Apex2 機能抑制細胞を作製し、同様の軟骨異化誘導因子を添加して得られた培養上清を用いて、軟骨細胞活性 (プロテオグリカン産生量) を ELISA 法を用いて測定した。

(2) 免疫組織学的検討：自然発症の変形性関節症マウス (STR/ORTCr1j mice) の各週令 (4, 8, 12, 16, 20, 24 週令) ごとに作製された膝関節部の病理組織標本を Safranin-O 染色して、OA 軟骨組織変性度を Mankin 法 (OA 変性度の点数評価法) を用いて評価した。さらに、anti-Apex2 抗体で軟骨細胞の免疫組織染色をおこない、関節軟骨組織変性度と Apex2 陽性細胞発現率との関連について評価した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会臨床試験部会 (承認 1315 号) の承認を得たものである。統計は Student's t 検定または Fisher の検定を用いて、有意水準を $p < 0.05$ とした。

結果

軟骨細胞の培養系に IL-1 β (10ng/ml) を添加すると、Apex2 の発現は、コントロール軟骨細胞ではほとんどみられず、OA 患者由来の軟骨細胞においてのみ認められた。IL-1 β 非添加時の Apex2 発現量を基準とし

て、IL-1 β 添加後の Apex2 発現量の時間的推移を観察すると、添加後約 2 時間後に一旦発現の低下を認めた後、徐々に増加し約 6 時間から 8 時間後に初期の Apex2 発現量へ回復した。

Apex2 機能抑制細胞へ IL-1 β を添加して軟骨細胞の活性指標となるプロテオグリカンの産生量を測定すると、コントロール軟骨細胞は添加の有無にかかわらずプロテオグリカンの産生量に差を認めなかったが、OA 軟骨細胞は IL-1 β の添加により有意にプロテオグリカンの産生量が低下していた ($p < 0.05$)。

変形性関節症マウスの軟骨組織変性度と軟骨組織における Apex2 陽性細胞発現率との関連を検討したところ、軽度から中等度の軟骨変性部位では Apex2 陽性細胞の発現率は低く、変性の程度が進行していくのに従って陽性細胞の出現頻度が増加していた。組織変性度を示す Mankin スコアと関節軟骨における Apex2 陽性細胞発現率との間に正の相関が見られた。

考察

変形性関節症の病因として、加齢による軟骨基質の退行性変化に加えて、肥満や荷重によるメカニカルストレスと、それにともない誘導される酸化ストレスの関与が知られている。細胞のストレス応答の結果、活性酸素種により生じる DNA 損傷が、発癌をはじめ様々な疾患の病因の 1 つとも考えられている。この DNA 損傷修復酵素の 1 つである Apex2 は、筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病の神経細胞において確認されており、神経変性疾患の病態・病因との関連性が示唆されている。

今回我々は、OA 発症にみられる“変性”に着目し、軟骨変性・異化の誘導因子に応答した Apex2 の発現が、正常軟骨細胞では見られず、OA 患者由来の軟骨細胞のみにおいて上昇していることを見いだした。さらに、Apex2 は変形性関節症の軟骨組織変性度と相関して発現することも

明らかとなった。軟骨細胞内の DNA 修復酵素の発現や活性は、ストレスの少ない状態では機能発現を認めないが、メカニカルストレスの程度や、その蓄積に応答して変化するということが示された。また、Apex2 は軟骨細胞の防御機構として恒常性の維持に働くが、外因性ストレスに対抗しきれず機能が低下すると、軟骨細胞の活性低下や細胞死（アポトーシス）等を惹起し、変形性関節症の発症や増悪に関与しうると考えられるため、OA 発症の経路において何らかの制御を受ける可能性が示唆された。

結論

軟骨細胞代謝における DNA 損傷修復酵素 Apex2 は、変形性関節症の軟骨細胞において発現が認められ、軟骨細胞異化作用に対して活性低下を抑制する能力を有していると考えられた。