

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

膝 (2005.10) 30巻1号:155～158.

ヒアルロン酸ナトリウムの免疫調節能に関する検討

能地仁, 阿部里見, 小林浩, 前田龍智, 松野丈夫

ヒアルロン酸ナトリウムの免疫調節能に関する検討*

能地 仁¹⁾ 阿部 里見¹⁾ 小林 浩¹⁾ 前田 龍智¹⁾
松野 丈夫¹⁾

旭川医科大学整形外科¹⁾

〔要旨〕はじめに：我々はこれまでに、ヒト新生児関節軟骨細胞が *in vitro* においてユニークな免疫調節能を示すことを報告してきた。本研究の目的は、軟骨基質のなかでも種々の抗炎症作用が確認されているヒアルロン酸のリンパ球増殖調節作用を検討することである。

対象および方法：材料：健康人より末梢血単核球 (PBMC) を分離した後、MACS Magnetic cell sorting system を用いて CD4+CD14-Tリンパ球を分離した。PBMC と CD4+CD14-Tリンパ球は CD28 と CD3 を刺激しポリクローナルに活性化させた。リンパ球増殖試験：ポリクローナルに活性化させた PBMC と CD4+CD14-Tリンパ球に分子量80万のヒアルロン酸ナトリウム (以下 HA) を 0-37.5% (1.25-3.75mg/ml) 加え培養した。PBS をネガティブコントロールとし、活性化後2, 3, 4, 5日目の細胞増殖を [3H] サイミジン取り込み試験にて測定した。同時に倒立顕微鏡下に細胞増殖形態を観察した。

結果：HA は1.25-3.75mg/ml の濃度において CD4+CD14-Tリンパ球の増殖を全観察期間において有意に抑制した ($P < 0.001$)。

考察：本研究より、健康軟骨細胞は組織特異的抗原を発現しつつも関節液、関節軟骨中のヒアルロン酸によって免疫サーベイランスから逃れている可能性が示唆された。

膝 30:155～158, 2005

はじめに

我々はこれまでに、ヒト新生児培養関節軟骨細胞のユニークな免疫学的特性、すなわち細胞接触を介してポリクローナルに活性化させた CD4+CD14-Tリンパ球の細胞増殖を抑制するが、この増殖抑制効果は活性化末梢血単核球には影響を与えないことを報告してきた⁶⁾。特に、活性化 CD4+CD14-Tリンパ球に対する増殖抑制機序を明らかにすることは、移植免疫や炎症性関節炎の治療を始めとする臨床的意義も高い。これまでの研究結果より、活性化 CD4+CD14-Tリンパ球に対する増殖抑制はヒト新生児培養関節軟骨細胞の発現・産生する細胞表面分子、細

胞基質もしくは細胞基質結合蛋白などが関与しているものと推測している。なかでも軟骨基質であるヒアルロン酸は、既に製剤化され関節症の治療薬として世界各国で広く臨床応用されており、物理的効果のみならず種々の生物学的抗炎症作用を有していることも次第に明らかとなってきた^{1, 4, 5, 9)}。そこで本研究では、ヒト新生児培養関節軟骨細胞の持つユニークな免疫学的特性がヒアルロン酸によるものと仮説を立て、ヒアルロン酸ナトリウム製剤の活性化リンパ球に対する細胞増殖抑制作用の有無を *in vitro* において検証した。

材料と方法

材料の調整：健康人ボランティアの末梢血 (以下 PBMC) より Histopaque-1077 (Sigma) にて単核球を採取し、MACS Magnetic cell sorting system (Miltenyi Biotec) にて CD14-CD4+Tリンパ球 (以下 CD4 Tリンパ球) を分離した。採取した PBMC と CD4 Tリンパ球は10%子牛血清を加

key words : 関節軟骨 (articular cartilage)
免疫 (immunity)
ヒアルロン酸 (hyaluronic acid)

*Investigation of immune modulatory function of Hyaluronic acid

¹⁾Hitoshi Nochi, Satomi Abe, Hiroshi Kobayashi, Tatsunori Maeda, Takeo Matsuno : Department of Orthopaedic Surgery, Asahikawa medical college

えたRPMI培地に各々 2.5×10^6 , 5×10^5 cell/mlの細胞密度に調整し, $5 \mu\text{g/ml}$ のCD28 cross-linking mAb(BD)と 100ng/ml のCD3 cross-linking mAb(BD)を加え培養器にて2時間刺激し活性化させた。

リンパ球増殖抑制試験: 活性化させたPBMCとCD4 Tリンパ球は96穴U字底プレートに各々 2.5×10^5 , 5×10^4 cell/wellで播種し, 分子量80万のヒアルロン酸ナトリウム(アルツ: 科研, 以下HA)を0%, 12.5% (1.25mg/ml), 25% (2.5mg/ml), 37.5% (3.75mg/ml) 加え5日間培養を行った。コントロール群としてHA製剤の溶媒であるリン酸緩衝液(以下PBS)を12.5-37.5%加えた。細胞の増殖は, 培養開始2, 3, 4, 5日後の最終18時間における $[^3\text{H}]$ -thymidine ($1 \mu\text{Ci/well}$; Amersham) 取り込み試験でcounter per minute (c.p.m)を測定した。細胞の増殖形態を倒立顕微鏡下に観察を行った。各実験はTriplicateで行った。

統計処理: データは平均値 \pm SDで示し, one-way ANOVA Fisher PLSD post hoc testにて検定を行った。

結 果

本研究で用いたCD4 Tリンパ球は, 予備実験において98%以上がCD4陽性でかつCD14が陰性であることをflow cytometric analysisで確認した。更に, phytohemagglutinin刺激に対して増殖能を有することを $[^3\text{H}]$ -thymidine 取り込み試験にて確認した。

活性化したCD4 Tリンパ球の増殖は, HAを12.5-37.5%加えることによってコントロールPBS群と比較して有意 ($P < 0.001$) な抑制を受け, その抑制効果は全観察期間を通して認められた。コントロールPBS群の細胞増殖は経時的に亢進し最終観察時に最大値を示した (Fig. 1)。顕微鏡下に観察すると, 培養二日後のPBS群では増殖したCD4 Tリンパ球が巨大な細胞塊を形成しているのに対し (Fig. 2A), HA群では小さな細胞塊がわずかに散見されるのみであった (Fig. 2B)。HA濃度の変化による増殖抑制率は, [%抑制] $\geq 100 - (\text{HA群 (c.p.m.)} / \text{PBS群 (c.p.m.)}) \times 100$ で示した。[%抑制]

はHA濃度とは相関を示さず, HA25%群で最大抑制値を示した (60-90%抑制)。また, [%抑制] は経時的に減弱する傾向を示し, 特にHA37.5%群では培養5日目に50%以下と減弱した (Fig. 3)。一方, 活性化したPBMCはHAを12.5-37.5%加えてもコントロールPBS群に比して有意な細胞の増殖抑制は認められず, 逆にHA25%群では第3日目以降に有意な細胞増殖の亢進を認めた ($P < 0.01$)。活性化PBMCの細胞増殖は第3日をピークに減少傾向を示した (Fig. 4)

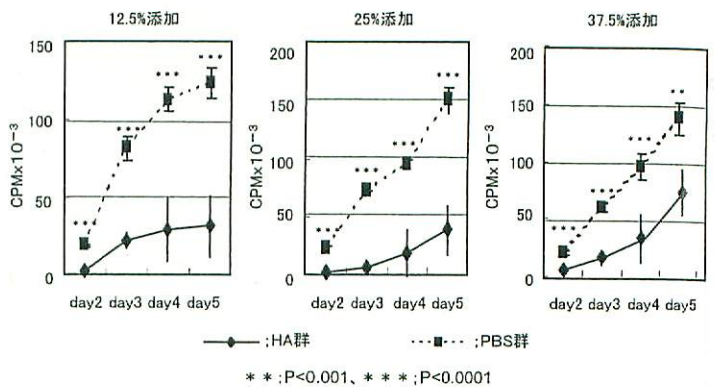


Fig. 1

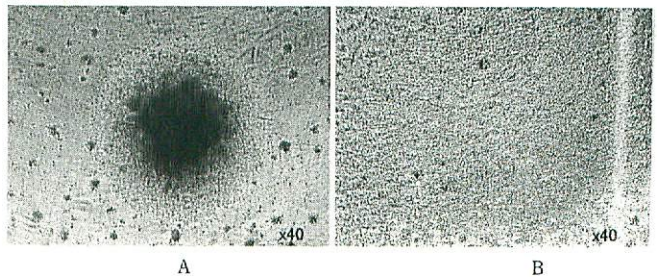


Fig. 2

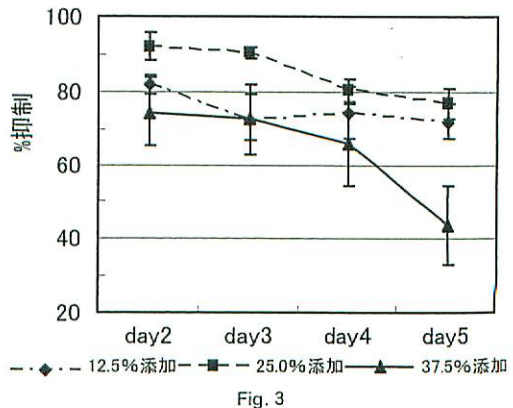


Fig. 3

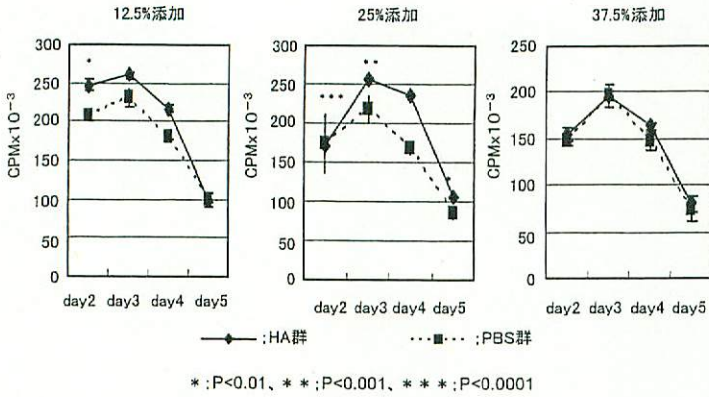


Fig. 4

考 察

HAは関節軟骨の主要な構成成分を成しているばかりか、健常関節液中には2-4mg/mlの濃度で存在している²⁾。臨床応用されているHA製剤は関節内に投与すると軟骨基質に浸潤し⁹⁾物理的に軟骨保護作用を示すほか、抗炎症作用として、滑膜細胞からのPGE2産生抑制⁴⁾、軟骨基質からのプロテオグリカン遊離抑制¹⁾、培養軟骨細胞のMMP-1, -3, -13産生抑制⁵⁾を示すなど多数報告されている。本研究ではHA濃度を1.25-3.75mg/mlと生体関節腔内の環境を想定して実験を行った結果、HA製剤が活性化CD4 Tリンパ球に対する増殖抑制能を有することを認めた。HAの主要受容体はCD44であり、関節軟骨ではこのリガント-受容体系を介してMMPの産生が抑制されることが報告されている⁹⁾。本研究で認められた細胞増殖抑制がCD44を介した反応であるのか、もしくは別の受容体を介するのかの検討は今後の課題である。

本研究では、細胞採取時のCD4 Tリンパ球がPBMCの約20%であり、D28とCD3のcross-linking mAbで活性化される細胞の殆どがCD4 Tリンパ球であることから、CD4 Tリンパ球とPBMCを1対5の割合で播種し比較検討を行った。興味深いことに、HAは活性化PBMC(活性化したCD4 Tリンパ球を含むPBMC)には細胞増殖抑制を示さず、ヒト新生児培養関節軟骨細胞と類似の免疫調節能を示した⁶⁾。本研究の結果は、我々の仮説を積極的に支持するものであり、ヒト新生児培養関節軟骨細胞の持つ免疫調節能にHAが重要な役割を担っているものと考えられる。近年、ヒト骨髄間葉系細胞にもマイトジェンにて

活性化したTリンパ球の増殖抑制能があることが報告されており³⁾、この特殊な免疫調節能が間葉系細胞に保存された機能であるのか、幼若な細胞にのみ認められるものなのか、興味深い検討課題である。Setoguchiら⁷⁾は、軟骨細胞産生蛋白であるchondromodulin Iがポリクローナルに活性化したTリンパ球の細胞増殖を抑制すると報告しており、我々同様軟骨細胞がユニークな免疫学的性質を有していることを指摘している。しかし一方では、軟骨基質

は組織特異的抗原性を有するとされており、炎症性関節炎のみならず変形性関節症でも軟骨基質に対する抗体が産生されているとの報告もある⁸⁾。これ等の知見を総合すると、関節軟骨は免疫学的に抗原性と免疫調節性の二面性を持ち合わせ、高齢者や関節症においてはこのバランスが破綻し病状悪化に拍車をかけているものと推測される。

関節軟骨細胞の免疫調節能に関しては、Class I拘束性免疫応答を始め検討項目が山積しているが、本研究の結果よりHAがヒト新生児培養関節軟骨細胞のユニークな免疫調節能に関与している可能性が強く示唆され、臨床に広く普及しているHA製剤の新たな生物学的作用が確認された。今後、HAの分子量による免疫調節能の変化、責任受容体の検索、細胞増殖抑制経路のシグナル伝達について更なる検討が必要と考えている。

文 献

- 1) Aibe K., Ryu J., Sano S.: Effect of hyaluronic acid on cartilage metabolism in free chondrocytes. *J Orthop Sci*, 1: 268-276, 1996.
- 2) Balazs E.A., Denlinger J.L.: Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *J. Rheumatol*, 39[suppl.]: 3-9, 1993.
- 3) Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., et al.: Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli. *Blood*, 15: 3838-3843, 2002.
- 4) Goto M., Hanyu T., Yoshio T., et al.: Intra-articular injection of hyaluronate (SI-6601D) improves joint pain and synovial fluid prostaglandin E2 levels in rheumatoid arthritis: a multicenter clinical trial. *Clin*

- Exp Rheumatol, 19: 377-383, 2001.
- 5) Jolvi S.M., Yasuda T., Shimizu M., et al.: Inhibition of interleukin-1beta-stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 50: 516-525, 2004.
 - 6) 能地 仁, 阿部 里見, 前田 龍智ほか: ヒト新生児関節軟骨細胞の有する免疫調節能の検討. *日整会誌*, 78: S861, 2004.
 - 7) Setoguchi K., Misaki Y., Kawahata K., et al.: Suppression of T cell Responses by Chondromodulin I, a Cartilage-Derived angiogenesis Inhibitory Factor. *Arthritis Rheum*, 50: 828-839, 2004.
 - 8) Xiang Y., Sikine T., Nakamura H., et al.: Proteomic Surveillance of Autoimmunity in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 50: 1151-1521, 2004.
 - 9) Williams J.M., Plaza V., Hui F., et al.: Hyaluronic acid suppress fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis: II. In vivo. *Osteoarthritis Cartilage*, 5: 235-240, 1997.