

血管野で生じることより、少なくとも部分的には細胞の自律的制御によるものと考えられている。さらに、肥大軟骨細胞は血管内皮成長因子 (VEGF) を発現し、骨化方向へ向かう軟骨組織に血管を誘導する¹⁵。軟骨周囲の間葉系細胞は骨芽細胞へと分化し、分解されつつある軟骨基質の中に骨基質を形成する。このように長管骨の長軸方向への成長には、軟骨細胞の増殖と肥大分化を伴う内軟骨性骨化が極めて重要で、軟骨細胞肥大化障害は骨格の成長異常、すなわち、小人症を生じることが知られている¹⁷⁻¹⁹。

成長軟骨板は骨端側より、静止細胞層、増殖細胞層、肥大細胞層に分けられる。静止細胞層には小型の軟骨細胞が認められ、骨端側より走る血管がこの層まで認められる。増殖細胞層では、細胞が分裂増殖して扁平な細胞が柱状に配列し、骨幹端側では基質産生が行われる。肥大細胞層は成熟層、予備石灰層、石灰化層の三層に分かれる²⁰。我々が検討した RAS の 4 つのコンポーネント、ACE, Ang, AT1R, AR2R は増殖層から肥大細胞層の成熟層・予備石灰層にかけて発現が認められる。このことは、RAS が成長軟骨板軟骨細胞の増殖と肥大分化に重要な役割を果たしている可能性がある。Garcia¹³らは骨折仮骨における骨芽細胞と肥大軟骨細胞には AT1R および AR2R, ACE が発現しており、ACE 阻害薬の投与が骨折治癒に対して促進的に働くことを示した。これは、ACE 阻害薬が RAS を抑制することにより、軟骨細胞の分化、アポトーシスを抑制したため、仮骨の増大が生じたと考えられる。すなわち、この結果は RAS が軟骨細胞の分化を促進すると考える我々の仮説を支持するものと考えられる。

さらに、我々は今後の軟骨組織における RAS の機能解析のため、ウシ培養軟骨細胞における RAS の各コンポーネントの発現を検討した。軟骨細胞培養では FBS 添加の条件下で、軟骨細胞は増殖しコンフルエンスに達する。細胞増殖が停止した条件下での Real-time PCR の結果において、検討した 4 つの RAS コンポーネントのうち、AT1R および AT2R の発現が確認された。一方 ACE および Ang の発現は認められなかった。さらに、細胞免疫染色、western blot のいずれにおいても AT1R と AT2R の発現が認められた。この培養系は、生体では RAS コンポーネントの発現が認められない関節軟骨細胞を培養系に移したもので、FBS 添加により増殖させ、コンフルエンスに達した状態での観察であり、成長軟骨板を模倣する系とは言えない。しかし、real-time PCR, 細胞免疫染色, western blot のいずれにおいても、Ang II の受容体である AT1R と AT2R の発現が認められたことは、特殊な条件下で

は軟骨細胞が RAS コンポーネントを発現しうることを示唆する。すなわち、炎症を伴う修復過程や、増殖因子添加に伴う組織増殖過程において、RAS が機能することを示唆する結果と考えられる。今後は、サブコンフルエントの培養軟骨細胞において RAS コンポーネント発現状態を観察し、RAS の組織増殖機能についてさらに検討が必要と考える。分化への検討については、成長軟骨板における軟骨細胞の骨化方向への分化を模倣する培養系として ATDC5 細胞株が樹立されており²¹。今後は培養系での RAS の機能解析に ATDC5 を用いることを計画している。さらに、IL-1 β や TNF- α の添加により、AT1R および AT2R の発現は亢進した。これらの結果は炎症性サイトカインや酸化ストレスにより RAS の活性化が生じること示しており、心血管系培養細胞と同様の反応を示すことが確認された²²⁻²⁴。血管内皮や平滑筋細胞では局所性 RAS の存在と機能に関するエビデンスが動脈硬化症との関連において確立されており²⁵、本研究結果は軟骨組織においても RAS が機能的または病的意義を有することが示唆される所見と考える。すなわち、変形性関節症 (OA) では機械的ストレスや炎症性サイトカイン、活性酸素種による軟骨細胞の増殖と肥大分化、続いて生じるアポトーシスが軟骨組織の機能障害および変性に強く関与することが知られており、局所性 RAS は OA における炎症や、軟骨細胞増殖を促進し、軟骨細胞の肥大分化に対して作用する可能性がある。今後、局所性 RAS と OA との関連についても検討する必要性がある。

我々は本研究で、マウスにおける様々な軟骨組織において RAS コンポーネントの発現状況を免疫染色により検討した。その結果、増殖し、骨への分化を示す軟骨細胞に局所性 RAS のコンポーネントが発現することを示した。さらに、ウシ軟骨細胞培養系においても局所性 RAS のコンポーネントが発現すること、また炎症性サイトカインによるこれらコンポーネントの発現亢進を示した。この結果は成長軟骨板軟骨や OA 軟骨における生理的機能や病的機能に RAS が関与することを示唆する。長管骨や脊椎骨の成長制御や OA の病態解明・治療に新たな展開をもたらす可能性のある結果であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を頂いた浜西千秋教授に深く謝意を表します。また、本研究にあたり終始御助言を頂いた高度先端総合医療センター再生部門の寺村岳士先生、竹原俊幸先生、小野寺勇太先生、ライフサイエンス研究所の奥本勝美先生、並びにご協力頂いた整形外科学教室員の皆様、実験助手の皆様から感謝申し上げます。

文 献

1. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006) Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86: 747-803
2. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009) Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th edn. *Br J Pharmacol* 158 (Suppl. 1): S1-S254
3. Haulica I, Bild W, Serban DN (2005) Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 6: 121-131
4. Nakagami H, Osako MK, Shimizu H, Hanayama R, Morishita R (2007) Potential contribution of action of renin-angiotensin system to bone metabolism. *Curr Hypertens Rev* 3: 129-132
5. Sernia C, Huang H, Nguyuen K, Li Y-H, Hsu S, Chen M et al (2008) Bone Homeostasis: An Emerging Role for the Renin-Angiotensin System. Springer: Dordrecht, The Netherlands.
6. Hatton R, Stimpel M, Chambers TJ (1997) Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J Endocrinol* 152: 5-10
7. Hiruma Y, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H (1997) Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 176-178
8. Lzu Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K et al (2009) Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. *J Biol Chem* 284: 4857-4864
9. Price A, Lockhart JC, Ferrell WR, Gsell W, McLean S, Sturrock RD. (2007) Angiotensin II type 1 receptor as a novel therapeutic target in rheumatoid arthritis: in vivo analyses in rodent models of arthritis and ex vivo analyses in human inflammatory synovitis. *Arthritis Rheum* 56: 441-447
10. Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, Sugito H, Young B, Yuasa T, Okabe T, Ochiai T, Kamiya N, Rountree RB, Kingsley DM, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Pacifici M (2008) A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Dev Biol* 316: 62-73
11. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T (2006) In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* 97: 84-97
12. Kishimoto H, Akagi M, Zushi S, Teramura T, Onodera Y, Sawamura T, Hamanishi C (2010) Induction of hypertrophic chondrocyte-like phenotypes by oxidized LDL in cultured bovine articular chondrocytes through increase in oxidative stress Osteoarthritis and Cartilage OARS 18: 1284-1290
13. Garcia P, Schwenzer S, Slotta JE, Scheuer C, Tami AE, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Pohlenmann T, Menger MD (2010) Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation-role of a local renin-angiotensin system. *Br J Pharmacol* 159: 1672-1680
14. Kronenberg HM (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423: 332-336
15. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97: 33-44
16. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z (2004) Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14: 86-93
17. Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G (2001) Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 15: 467-481
18. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T (2001) Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol* 153: 87-100
19. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN (2004) Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119: 555-566
20. van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM (2003) Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev* 24: 782-801
21. Morita K, Miyamoto T, Fujita N, Kubota Y, Ito K, Takubo K, Miyamoto K, Ninomiya K, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Takaishi H, Toyama Y, Suda T (2007) Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. *J Exp Med* 204: 1613-1623
22. Han C, Liu J, Liu X, Li M (2010) Angiotensin II induces C-reactive protein expression through ERK1/2 and JNK signaling in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 212: 206-212
23. Gurantz D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH (2005) IL-1 beta and TNF-alpha upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. *J Mol Cell Cardiol* 38: 505-515
24. Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH (2002) Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ Res* 91: 1119-1126
25. Diet F, Pratt RF, Berry GJ, et al (1996) Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94: 2756-2767

