

## 変形性膝関節症における痛みの分子細胞学的解析

加納良男 堀江 登\* 平上二九三\*\*  
元田弘敏\*\* 井上茂樹\*\*\* 松田 勇 河村顕治\*\*

Molecular and cellular biology of pain in osteoarthritis of the knee

Yoshio KANO, Noboru HORIE\*, Fukimi HIRAGAMI\*\*  
Hirotoshi MOTODA\*\*, Shigeki INOUE\*\*\*, Isamu MATSUDA, Kenji KAWAMURA\*\*

## 要 約

変形性膝関節症患者の関節液には、炎症の化学伝達因子であるケミカルメディエーターが含まれている。ケミカルメディエーターにはブラジキニン、ヒスタミン、インターフェロン、プロスタグランジンなどがあるが、その内、疼痛の原因となることが解っているものがブラジキニンである。我々はPC12細胞からNGFには反応しないが、細胞の中や細胞外のいろいろな物質が神経に作用する効果があるかないかを鋭敏に検出できるPC12m3細胞を開発した。PC12m3細胞にブラジキニン（100 μg/ml）を作用させたところ、アポトーシスを誘導することなく、高い神経突起の形成（神経分化）が観察された。またブラジキニンによる神経突起形成はp38 MAPキナーゼ阻害剤であるSB203580によって大きく抑制された。ブラジキニンによるp38 MAPキナーゼの活性は、PC12親細胞よりはるかに高いものであった。これらの見解からPC12m3細胞では、ブラジキニンはp38 MAPK経路を活性化することで神経分化を誘導するということが示唆された。

キーワード：PC12m3細胞、ブラジキニン、p38 MAPキナーゼ

Key words：PC12m3 cell, bradykinin, p38 MAP kinase

## はじめに

一般の人を対象にした疫学調査では、60歳以上で女性の約40%、男性の約20%がレントゲン上、変形性膝関節症と診断される。さらに、この割合は80歳代では女性で60%以上、男性でも50%近くに達する<sup>1)</sup>。そして、レントゲン上で変形性膝関節症の所見がある人のうち約20%に膝の痛みや腫れなどの自覚症状が見られる。高齢化社会を迎えて、変形性膝関節症等の骨関節疾患はQOLを低下させて健康寿命の延伸を妨げる最も大きな原因となってい

る。変形性膝関節症の治療としてヒアルロン酸などの薬物や種々の運動療法などが行われているが、新しい治療法を開発するのにその最も良い評価指標は痛みの評価である。ところが、診断による患者の疼痛の度合いを客観的に決定する基準は未だ存在しない。そこで今回の研究では、我々が新たに開発した特殊な薬剤高感受性細胞であるPC12m3細胞を用いて変形性膝関節症における痛みの分子細胞学的解析による客観的数値化のための基礎実験を行う。

PC12細胞は1975年にアメリカのグリーンによっ

吉備国際大学保健科学部作業療法学科  
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8  
\*武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科  
〒663-8558 兵庫県西宮市池開町6-46  
\*\*吉備国際大学保健科学部理学療法学科  
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8  
\*\*\*吉備国際大学保健福祉研究所  
716-8508 岡山県高梁市伊賀町8

Department of Occupational Therapy, School of Health Science, Kibi International University  
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, Japan, 716-8508  
\*Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environment Science,  
Mukogawa Women's University  
6-46, Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo, Japan 663-8558  
\*\*Department of Physical Therapy, School of Health Science, Kibi International University  
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, Japan, 716-8508  
\*\*\*Department of Cell Biology, Research Institute of Health and Welfare, Kibi International  
University  
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, 716-8508, Japan

てラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された細胞であり、神経成長因子である NGF の投与によって MAP キナーゼが活性化し、神経細胞に分化する<sup>2)</sup>。我々はこの PC12 細胞から異なった形質を示す新しい PC12 変異細胞である PC12m3 細胞を樹立した<sup>3)</sup>。この PC12m3 細胞は NGF 刺激によって正常な持続した MAP キナーゼ活性を示すにもかかわらず神経突起の形成がわずかにしか起こらない。しかし、PC12m3 細胞に NGF と同時にカルシウムイオノホア<sup>3)</sup> や免疫抑制剤 FK506<sup>4)</sup> それに抗がん剤<sup>5)</sup> 等の薬剤を投与するか、あるいは熱ショック<sup>6)</sup>、高浸透圧<sup>7)</sup> あるいは電磁波刺激<sup>8)</sup> を与えると高い神経突起の形成が見られた。

変形性膝関節症患者の関節液には、炎症の化学伝達因子であるケミカルメディエーターが含まれている。ケミカルメディエーターにはブラジキニン、ヒスタミン、インターフェロン、プロスタグランジン、一酸化窒素 (NO) などがあるが、その内、疼痛の原因となることが解っているものがブラジキニンである。そこで本研究ではブラジキニンを PC12m3 細胞に投与して PC12m3 細胞の変化を調べることで、変形性膝関節症における痛みの分子細胞学的解析による客観的数値化のための基礎実験を行う。

## 方 法

### 1. 細胞と培養

実験に使用した PC12 細胞は、グリーンらによってラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された神経分化能を有する細胞である<sup>2)</sup>。この細胞は、米国 Rockville, ME の American type culture collection より購入した。

細胞は、10% ウマ血清と 5% 牛胎児血清それぞれに 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のカナマイシンを含む高グルコース型 DME 培地を用いて継代し維持した。細胞の培養は、炭酸ガス培養器を用い、5%  $\text{CO}_2$  で 37°C で行ない、培地交換は 3 日おきに行った。継代は、細胞が培養シャーレ一杯になるとピペッティングし、 $1 \sim 3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で新しいシャーレに蒔きなおすという方法により行った。細胞は常時マイコプラズマ感染の有無を Hoechst 33258 で染色して調べ、感染のな

いことを確認して実験を行った。

### 2. 細胞へのブラジキニンの投与

ブラジキニンは水に溶解しニトロセルロースフィルター (ポアサイズ 2  $\mu\text{m}$ ) で濾過することによって作製したものである。ブラジキニンを施した細胞は 7 日間培養後神経突起形成を測定した<sup>4)</sup>。

### 3. p38 MAP キナーゼの検出

活性化した p38 MAP キナーゼの検出は免疫ブロット方によって行った<sup>9)</sup>。方法は、PC12m3 の細胞 100 万個を 25cm<sup>2</sup> のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下でブラジキニン処理を行い酵素活性の計測を行った。測定は細胞から全蛋白質を抽出し 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニールメンブレンにブロットした。ブロットした蛋白質はホスホ p38 抗体を作用させてリン酸化した p38 MAP キナーゼの検出を行った。

## 結 果

### 1. ブラジキニンによる神経突起の形成

PC12m3 の細胞 100 万個を 25cm<sup>2</sup> のフラスコに蒔き、精製された NGF 1  $\mu\text{l}$  とブラジキニン (10 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を作用させて 1 週間培養したところ、PC12m3 細胞において、NGF のみを与えた対象に比べ非常に高い神経突起の形成 (神経分化) が観察された (図 1)。PC12m3 細胞におけるブラジキニンによる神経突起の形成は NGF を与えた PC12 親細胞には及ばないが非常に高い誘導率であった (図 2)。またブラジキニンによる神経突起形成は p38 MAP キナーゼ阻害剤である SB203580 によって大きく抑制された。

### 2. ブラジキニンによる p38 MAPK の活性化

NGF による ERK の活性化は PC12 細胞の神経分化に重要な役割をもっているが p38MAP キナーゼはどうか。

PC12m3 の細胞 100 万個を 25cm<sup>2</sup> のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下でブラジキニン 300  $\mu\text{g}$  を 30 分作用させたところブラジキニンによって高

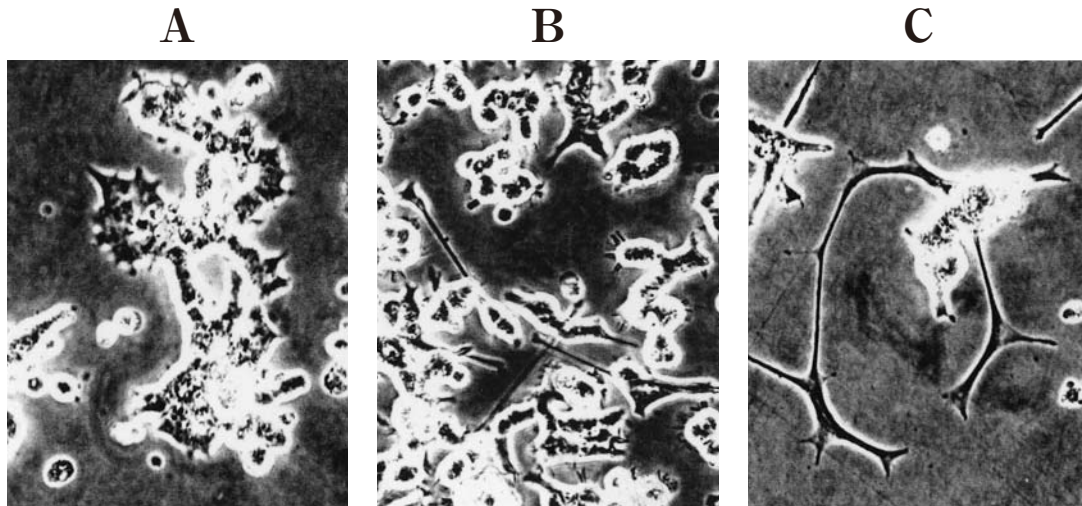


図1 ブラジキニンによる神経突起形成

神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞に NGF 1  $\mu$ l を添加したもの (A)、NGF 1  $\mu$ l とブラジキニンを 70  $\mu$ g/ml 作用させたもの (B)、NGF 1  $\mu$ l とブラジキニンを 270  $\mu$ g/ml 作用させたもの (C) を 1 週間培養し位相差顕微鏡で写真撮影を行った ( $\times 200$ )。

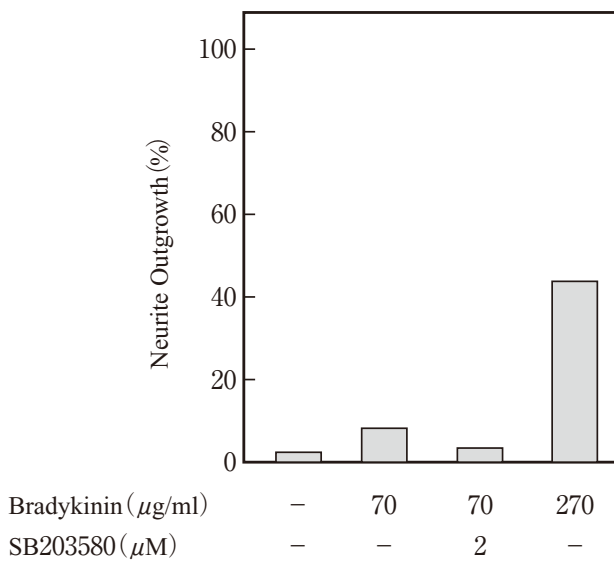


図2 ブラジキニンによる神経突起形成率

神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞に NGF とブラジキニンおよび SB202580 を添加し 1 週間培養後、位相差顕微鏡で写真撮影を行い、おのおの 200 個の細胞について神経突起数を計測した。

い p38 MAP キナーゼの活性が見られた (図3)。神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞のブラジキニンによる p38 MAPK の活性は、p38 MAPK の特異的阻害剤である SB203580 を 10  $\mu$ M 添加することによって失われることから、ブラジキニンによる

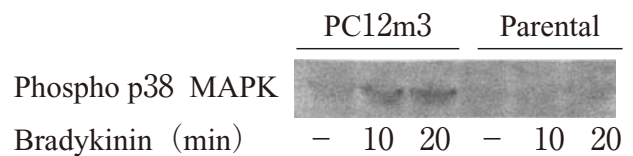


図3 ブラジキニンによる p38 MAPK の活性化

神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞 PC12 親細胞に無血清下でブラジキニン (300  $\mu$ g/ml) 処理を 10 分又は 20 分行い、免疫ブロット法により p38 MAPK の検出を行った。

PC12m3 細胞の神経分化は p38 MAPK 経路の活性化によって引き起こされることが示唆された。

## 討 論

我々が開発した PC12 変異細胞である PC12m3 細胞は、細胞の中や細胞外のいろいろな物質が神経に作用する効果があるかないかを鋭敏に検出できる細胞である。もちろん PC12 の元になった親細胞もそれらの物質に反応するが PC12 変異細胞は PC12 親細胞の 10 ~ 20 倍も感度が高いのである。これらの PC12 変異細胞を用いて、今までに我々は神経を活性化したり神経の活動を止めたりするいろいろな物質を調べてきた。その中で炎症のケミカルメディエーターの 1 つであるインターフェロンは PC12m3

細胞の神経突起の形成を大幅に促進することを見出した。この時インターフェロンは細胞内情報伝達に働く、ERK や MAPK を活性化することで神経の活性の働くことが判明した<sup>10)</sup>。そこで今回炎症のケミカルメディエーターで発痛物質であるブラジキニンでは PC12m3 変異細胞を活性化すると考えられるので、関節症患者の関節液を調べる前にまず最初、精製されたブラジキニンを PC12m3 細胞に投与しその効果を調べてみたのである。

感覚神経終末には、侵害刺激や温度刺激を感知してそれを電気信号に変換するセンサーが存在している。その痛みや温度センサーの作用メカニズムを解明することは、痛みを制御できるようになるのではないかと考えられる。侵害刺激を受容する TRP チャンネルの多くは、温度刺激も受容する共通のチャンネルとなっている。痛みを惹起する侵害刺激は、温度刺激（熱刺激と冷刺激）、化学刺激、それと機械多刺激に大きく分けられる。我々は温度刺激に高感受性を示す細胞（PC12m3）を見つけたが、これはいろいろな化学刺激にも高感受性を示す細胞であった。

トウガラシの主成分であるカプサイシンは辛味と同時に痛みも惹起する。カプサイシンは PC12m3 細胞の分化を誘導する（未発表データ）。カプサイシンの受容体は TRPV1 と呼ばれている<sup>11),12)</sup>。TRPV1 の熱による活性化の温度閾値は約 43℃ で、この温度は生体に痛みを引き起こす温度閾値とほぼ一致する。また、炎症関連メディエーターの存在下では、TRPV1 活性化温度の閾値が約 43℃ から約 30℃ に低下することから、炎症時には TRPV1 が体温によって活性化して痛みと惹起していると考えられる<sup>13)</sup>。具体的には、炎症によって放出されたブラジキニンが正常では 43℃ 以上のみで活性化されていた TRPV1 が体温である 36℃ でも活性化して疼痛を引き起こしたと考えられる。

PC12m3 細胞は熱やブラジキニンによって p38 MAPK を活性化することによって神経誘導に働く（図 2、3）が、そのレセプターは不明であった。しかしブラジキニンは TRPV1 レセプターを活性化することから<sup>14)</sup>、TRPV1 レセプターによって活性化された p38 MAPK の活性が PC12m3 細胞の分化

に働いたことを示唆している。これらの見解から、痛覚神経の場合は、ブラジキニンが p38 MAPK を活性化することで痛覚神経の活性化つまり“いたみ”に働いていると考えられる。

### Abstract

There are several chemical mediators, including bradykinin, histamine, interferon and prostaglandin, in synovial fluid of the knee joint of an osteoarthritic patient. Among these chemical mediators, bradykinin is the cause of pain. We developed a neuronal cell line from PC12 cells, PC12m3, in which NGF-induced neurite outgrowth is impaired and that show neurite outgrowth in response to various chemicals. When cultures of PC12m3 cells were treated with bradykinin at a concentration of 100  $\mu$ g/ml, neuronal differentiation of PC12m3 cells was observed without induction of apoptosis. Bradykinin induced-neuronal differentiation of PC12m3 cells was inhibited by the p38 MAPK inhibitor SB203580. The extent of phosphorylation of p38 MAPK induced by bradykinin in PC12m3 cells was much greater than in PC12 parental cells. These findings suggest that bradykinin-induced activation of p38 MAPK signaling pathway is responsible for the neurite outgrowth of PC12m3 cells.

### 文 献

- 1) 大森 豪 田中正栄 西野勝敏 他 (2007) 変形性膝関節症の痛みと運動の効果. 痛みと臨床 7 : 9 -15
- 2) Greene L A, Tischler A S (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 73 : 2424-2428
- 3) Kano Y, Nohno T, Takahashi R et al (2001) cAMP and calcium ionophore induce outgrowth of neuronal processes in PC12 mutant cells in which nerve growth factor (NGF) -induced outgrowth of neuronal processes is impaired. Neurosci Lett 303 :

21-24

- 4) Kano Y, Nohno T, Hasegawa T et al (2002) Immunosuppressant FK506 induce neurite outgrowth in PC12 mutant cells with impaired NGF-promoted neuritogenesis via a novel MAP kinase signaling pathway, *Neurochem Res* 27 : 1655-1661
- 5) Kano Y, Horie N, Doi S et al (2008) Artepillin C derived from propolis induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via ERK and p38 MAPK pathways. *Neurochem Res.* 33 : 1795-803.
- 6) Kano Y, Nakagiri S, Nohno T et al (2004) Heat shock induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res* 1026 : 302-306
- 7) Kano Y, Nohno T, Shimada K et al (2007) Osmotic shock-induced neurite extension via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and CREB. *Brain Res* 1154 : 1 - 7
- 8) Inoue S, Motoda H, Koike Y et al (2007) Microwave irradiation induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Neurosci Lett* 303 : 21-24
- 9) Sakai T, Furuyama T, Ohoka Y (1999) Mouse semaphoring H induces PC12 cell neurite outgrowth activating ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway via Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem* 274 : 29666-29671
- 10) 三宅勝久 平上二九三 河村顕治 他 (2008) インターフェロンによる PC12 変異細胞の神経分化誘導の解析. 吉備国際大学 保健福祉研究所紀要 9 : 45-49
- 11) Appendino G, Harrison S, De Petrocellis L et al (2003) Halogenation of a capsaicin analogue leads to novel vanilloid TRPV1 reseptor antagonists. *Br J Pharmacol* 139 : 1417-1424
- 12) Amadesi S, Nie J, Vergnolle N et al (2004) Protease-activated reseptor 2 sensitize the capsaicin reseptor transient reseptor potential vanilloid reseptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci* 24 : 4300-4312
- 13) Zimmermann K, Leffler A, Fischer MM et al (2005) The TRPV1/2/3 activator 2-aminoethoxydiphenyl borate sensitizes native nociceptive neurons to heat in wildtype but not TRPV1 deficient mice. *Neuroscience* 135 : 1277-1284
- 14) Vellani V, Zachrisson O, McNaughton PA (2004) Functional bradykinin B1 receptors are expressed in nociceptive neurons and are upregulated by the neurotrophin GDNF. *J Physiol* 560 : 391-401

