

図2 軟骨細胞におけるサイトカインの相互作用
CDMP; cartilage-derived morphogenic proteins, CTGF; connective tissue growth factor
(文献⁶⁾より引用改変)

炎症に対するIL-4の抑制効果

向炎症性サイトカインの産生あるいは活性を抑制する抗炎症性サイトカインにはIL-4, IL-10, IL-13があり, 種々の炎症プロセスにおいてこれを抑制することが知られているが, その効果は細胞種に依存性であるとされる(図2)⁶⁾. OA滑膜においては, IL-4は低容量のデキサメサゾンと同様にTNF-α, IL-1βの産生を抑制する⁷⁾. 軟骨組織においては, IL-4とIL-10はIL-1の産生を抑制し, IL-1Rαの産生を亢進させる一方で軟骨細胞における誘導型NO合成酵素の発現を抑制することで, IL-1を介したプロテオグリカン産生抑制を阻害し, 軟骨破壊抑制的に働く. Yehらは, IL-4はIL-1, IL-1+TNF, あるいはLPSによるプロテオグリカンの変性をMMPやTIMPの発現レベルを変えことなく抑制することから, アグリカナゼ, カルパイン, カテプシン, プラスミノゲンアクチベーターなどの発現抑制を制御する可能性を示唆している⁸⁾が, 軟骨細胞によるMMP-3の産生抑制⁹⁾, pro-MMPの活性化の阻害¹⁰⁾TIMP-1の発現亢進¹¹⁾も報告されている. また, マウス軟骨細胞をIL-4, IL-10で前処理しておくと, IL-1あるいはIL-17による一酸化窒素(NO)を介したプロテオグリカン合成抑制は阻害される¹²⁾. 一方, Lubbertsらはマウスにコラーゲン関節炎を誘導し, IL-4およびIL-10の同時投与が軟骨破壊を有意に抑制することを報告している¹³⁾. また,

IL-4とIL-10の同時投与は軟骨細胞によるIL-1Rαの産生量をかえることなくIL-1およびTNF-αの発現を抑え, 結局IL-1/IL-1Rα比を減少させることにより, 軟骨保護的に作用することも知られている¹⁴⁾.

NOは生体防衛的にも障害性にも働く両刃の剣であるが, 関節炎症においても, 過剰に産生されれば, プロテオグリカン産生抑制, II型コラーゲン産生抑制, MMP活性化, 細胞接着やシグナル伝達阻害, アポトーシスの誘導などを介して軟骨組織障害性に働く¹⁵⁾. 軟骨細胞によるメカニカルストレスに対するNO産生については, *in vitro*の実験系で刺激条件が異なれば亢進するとも, 逆に抑制されるともいわれる. Leeら¹⁶⁾によると, OA軟骨細胞ではshearストレスに応じて負荷および時間依存性にNO産生が亢進する. Shear stressにより産生されたNOあるいはNO供与体(SNP)によるNOはアグリカン, II型コラーゲンのmRNAレベルを下げ, 間欠的圧負荷はSNPによるこの抑制効果をブロックする. 一方, Islamら¹⁷⁾は持続的な静水圧は5 MPa, 4時間, 1 HzでiNOSのmRNAレベルでの発現亢進を認め, 2時間でbcl-2の発現低下を, 4時間ではDNA fragmentation, Caspase-3活性化, PARPの分解による軟骨細胞のアポトーシスを誘導することを報告している. Nishisakaら¹⁸⁾はIL-4がIL-1による細胞内Caイオン濃度の上昇を抑制し, IL-1によるNO誘導およびプロテオグリカン産生を用量

依存性に阻害することを報告している。

メカニカルストレスに対する IL-4の軟骨保護効果

われわれは以上の結果に基づき、OAにおける過剰なメカニカルストレスに対するIL-4の軟骨保護効果を*in vitro*、および*in vivo*で検討中である。生後1週齢のWistar rat膝関節軟骨細胞を5日間培養後、Flexercell strain unit®(Flexcell international Co.)を用いた周期的伸長ストレス(0.5 Hz, 7%伸張)を単独あるいはラットrhIL-4存在下に24時間負荷した。その結果、誘導型NO合成酵素(iNOS)はmRNAレベルでストレス負荷後24時間でその発現が有意に亢進すること、IL-4添加により容量依存性に発現が抑制されること、またNO₂/NO₃ assayにより培養液中のNO_x濃度もIL-4添加により有意に減少することが判明した。一方、6週齢のWistar ratの膝関節において、MCLおよびACL切離および内側半月板切除によるOAモデルを作成した(OA群)。OA群の半数にはラットrhIL-4を連日関節内投与(治療群)、残りのコントロール群はPBSを関節内投与した。術後2週、4週、6週で行った組織化学的肉眼的、組織学的検討によると、IL-4の関節内投与により治療群ではコントロール群に比べて肉眼的スコアは有意に改善しており、組織学的にも軟骨細胞のアポトーシスならびに関節軟骨破壊は有意に抑制されていた。以上より、IL-4は正常軟骨細胞において、メカニカルストレスによって発現が亢進したiNOS遺伝子の発現およびNO産生を*in vitro*で抑制し、その関節内投与はラット実験的OAにおける軟骨破壊をある程度抑制し得ると考えられた¹⁹⁾。

おわりに

われわれはラット正常軟骨細胞に対する周期的伸長ストレス負荷前後の遺伝子発現の変化について、cDNAマイクロアレイ法による網羅的解析を行っているが、検討した1081の遺伝子のうち、メカニカルストレスによって37遺伝子の発現の増強および46遺伝子の発現の低下を確認している。今後さらに解析を進めてIL-4の軟骨保護機構の詳細の解明に迫りたい。

文 献

- 1) Salter DM, Nuki G, Wright MO. IL-4 inhibition of cartilage breakdown in bovine articular explants. *J Rheumatol* 1996; 23: 1314.
- 2) Wright MO, Nishida K, Bavington C, et al. Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: evidence of a role for $\alpha 5 \beta 1$ integrin as a chondrocyte mechanoreceptor. *J Orthop Res* 1997; 15: 742.
- 3) Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, et al. Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. *J Cell Biol* 1999; 145: 183.
- 4) Salter DM, Millward-Sadler SJ, Nuki G, et al. Integrin-interleukin-4 mechanotransduction pathways in human chondrocytes. *Clin Orthop* 2001; 391: 49.
- 5) Millward-Sadler SJ, Wright MO, Davies LW, et al. Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2091.
- 6) van den Berg WB, van den Kran PM, van Beuningen HM. Pathophysiology of Osteoarthritis. In: Reginster JY, editor. *Experimental and Clinical Aspects of Osteoarthritis*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1999. p. 188.
- 7) Bendrup A, Hilton A, Meager A, et al. Reduction of tumor necrosis factor α and interleukin-1 β levels in human synovial tissue by interleukin-4 and glucocorticoid. *Rheumatol Int* 1993; 12: 217.
- 8) Yeh LA, Augustine AJ, Lee P, et al. Interleukin-4, an inhibitor of cartilage breakdown in bovine articular cartilage explants. *J Rheumatol* 1995; 22: 1740.
- 9) Nemoto O, Yamada H, Kikuchi T, et al. Suppression of matrix metalloproteinase-3 synthesis by interleukin-4 in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1997; 24: 1774.
- 10) van Lent PL, Holthuysen AE, Sloetjes A, et al. Local overexpression of adeno-viral IL-4 protects cartilage from metallo proteinase-induced destruction

- during immune complex-mediated arthritis by preventing activation of pro-MMPs. *Osteoarthritis Cartilage* 2002 ; 10 : 234.
- 11) Fernandes JC. The role of cytokines in osteoarthritis pathology. *Biorheology* 2002 ; 39 : 237.
 - 12) Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, et al. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum* 2000 ; 43 : 1300.
 - 13) Lubberts E, Joosten LA, van Den Bersselaar L, et al. Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction. *J Immunol* 1999 ; 163 : 4546.
 - 14) Joosten LA, Lubberts E, Durez P, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 1997 ; 40 : 249.
 - 15) Nishida K, Doi T, Inoue H. The role of nitric oxide in arthritic joint: a therapeutic target? Review. *Modern Rheumatol* 2000 ; 10 : 63.
 - 16) Lee MS, Trindade MC, Ikenoue T, et al. Intermittent hydrostatic pressure inhibits shear stress-induced nitric oxide release in human osteoarthritic chondrocytes *in vitro*. *J Rheumatol* 2003 ; 30 : 326.
 - 17) Islam N, Haqqi TM, Jepsen KJ, et al. Hydrostatic pressure induces apoptosis in human chondrocytes from osteoarthritic cartilage through up-regulation of tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase, p53, c-myc, and bax- α , and suppression of bcl-2. *J Cell Biochem* 2002 ; 87 : 266.
 - 18) Nishisaka F, Sohen S, Fukuoka H, et al. Interleukin-4 reversed the Interleukin-1-inhibited proteoglycan synthesis through the inhibition of NO release : a possible involvement of intracellular calcium ion. *Pathophysiology* 2001 ; 7 : 289.
 - 19) Nishida K, Doi H, Shimizu A, et al. The role of IL-4 in the control of mechanical stress-induced inflammatory mediators by rat chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2003 ; 5 Suppl 3 : 57.

* * *



話題

変形性関節症の発症機序*

—NOからみたOA治療へのアプローチ—

西田圭一郎** 清水 晃*** 依光正則**
土井英之** 相賀礼子** 井上 一**

Key Words : osteoarthritis, aging, mechanical stress, cytokine, nitric oxide

はじめに

20年程前までは、変形性関節症(OA)は関節軟骨の加齢に伴う単なる磨耗と捉えられ、薬物によりその自然経過を変えることは困難と考えられていた。現在ではOAは生物学的なプロセスの結果引き起こされる疾患であることが判明し、種々の薬物治療法の模索が始まっている¹⁾。軟骨細胞は関節軟骨における唯一の基質産生細胞であり、その障害および基質の変性の修復は近年の技術進歩によっても依然困難であるため、OAの有効な治療法開発にはOA初期病態の解明が必須である(表1)。滑膜炎の免疫学的関与については依然議論があるが、一般的には軟骨破壊の結果生じる軟

骨組織の分解産物に対する反応性の炎症であり、その出現はある程度病態が進行してからであると考えられている。本稿では一酸化窒素(NO)からみたOAの初期病変から、変性に至る病態について最近の知見をもとに考察する。

OAにおける真の初期病変はなにか

OAは関節リウマチ(RA)などにみられる軟骨破壊に比べると進行が緩徐な疾患であり、膝関節におけるアライメントの変化は比較的高齢になってからOAを発症するし、股関節における臼蓋形成不全は比較的若年のうちに前期股関節症を呈するようになる。OAを遺伝的側面から捉えようとする試みも始まっているが、いずれにしても

表1 変形性関節症に対する生物学的治療戦略

| |
|--|
| 基質破壊の抑制 |
| 炎症性サイトカイン(IL-1, TNF)の阻害: IL-1Ra, IL-1sR, TNFsR |
| 抗炎症性サイトカイン: IL-4, IL-10, IL-13 |
| 蛋白分解酵素(MMP)の阻害: MMP阻害剤, TIMP |
| 基質産生の亢進 |
| 成長因子: TGF- β , IGFs, FGF, BMPs |
| 炎症性サイトカインの阻害 |
| フリーラジカルなどの炎症メディエーターの阻害: SOD, NOS阻害剤 |
| 軟骨細胞数の維持 |
| アポトーシス阻害: NOS阻害剤, Fas Lの阻害 |
| 軟骨細胞あるいは前駆細胞移植 |

(文献¹⁾より引用改変)

* Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis.

** Keiichiro NISHIDA, M.D., Masanori YORIMITSU, M.D., Hideyuki DOI, M.D., Reiko AIGA, M.D. & Hajime INOUE, M.D.: 岡山大学大学院医歯学総合研究科機能再生・再建科学, 整形外科学(〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1); Department of Orthopaedic Surgery, Science and Functional Recovery and Reconstruction, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama 700-8558, JAPAN

*** Akira SHIMIZU, M.D.: 愛媛大学医学部整形外科



図1 末期OA患者の膝関節
関節破壊が末期に至ると、その治療は、人工関節置換術に頼らざるを得ない。

OA病変は関節の形状や安定性、関節軟骨にかかる負荷や、これらに影響を与える外傷に密接に関係しており、改善されなければ経年的に進行していく。軟骨最表層は関節液を有効にトラップし、関節潤滑に関与すると考えられるが、外傷性関節炎の関節鏡手術の際に、OAとしてはまだ無症状の時期にもかかわらず最表層の膜状の剥離がみられることもしばしばあり、最表層の障害をOAの初期病変と捉える考えもある。一方で、軟骨下骨は軟骨組織以上にショック吸収体として機能しており、この部の微小骨折が軟骨組織にかかる力学的負荷を変化させ、ひいては軟骨代謝に変化をもたらすとの考えもある。軟骨組織の変性が進行すると、軟骨自体もショック吸収体としては働かず、骨端にかかる衝撃はさらに軟骨下骨の微小骨折、これにひき続くリモデリングによる骨硬化を招来し、軟骨下骨の弾性の減少はさらに軟骨破壊を伸展させると考えられる。これらOA発症初期の変化は軟骨代謝を変化させ、軟骨細胞による組織の維持あるいは修復機構が働いて基質産生能は亢進し、細胞外基質は膨化し、いわゆる軟骨軟化(chondromalacia)を呈する。この状態は可逆的とされ、要因がとり

除かれれば、正常の代謝に戻る時期でもある。表層の障害や軟骨下骨の障害の防止はほぼ不可能であり、治療側はいかに初期病変を捉え、非可逆の状態に陥らせないようにするかがOA進行防止のカギを握っているといっても過言ではない(図1)。

軟骨変性の進展に関与する因子

以前から指摘されているように、加齢、異常なメカニカルストレス、遺伝的素因は軟骨変性の重要なrisk factorである。異常なメカニカルストレスは、関節の形態、外傷、体重増加、職業、生活様式などの因子によって引き起こされる。一方、OAの進展には軟骨細胞自身からも産生される種々の炎症性サイトカインが関与する。また、MMPs(matrix metalloproteinases)やcathepsinをはじめとする蛋白分解酵素の関与も重要である。MMPsによりプロテオグリカンのコア蛋白が分解を受けると、保水性も失われ、その機能を失う。さらにII型コラーゲンをはじめとするコラーゲンも分解を受けるが、軟骨細胞周囲のマイナーコラーゲンの分解も、細胞接着やシグナル伝達にとって非常に重要と思われる。一方で、軟骨細胞による基質産生能自体もとくに表層においては著しく減少する。

他方、RAやOA患者の関節液や組織中では正常に比較して高いレベルのNOが検出される²⁾ことから、関節炎症の進展にNOが大きく関与していることが示唆されてきた。NOは生体防御にも、障害性にも働き得るガス・メデイエーターであるが、誘導型NO合成酵素(iNOS)が発現すると、ほかのアイソフォームの1,000倍以上の持続的・高濃度のNOが産生されることがわかっており、生体防衛的に働くか、組織障害性に働くかはその局所濃度に依存するといわれる。NOはさらにスーパーオキシド(O_2^-)と反応して細胞障害性の強いperoxynitriteに変換され、軟骨細胞のDNAを障害し、脂質や蛋白の変性を装飾する³⁾。以下では個々の軟骨変性因子とNOの関係についてとくに最近の報告から考察する。

加齢とNO産生

軟骨組織の器官培養ではOA軟骨は無刺激でNOやPGE₂を産生することは以前から知られていた。

Minら⁹⁾はNO産生に与える加齢、OA変化の影響を*in vitro*で検討した。無刺激の状態では、高齢者の非荷重部および荷重部軟骨細胞は若年者の軟骨細胞のそれぞれ5倍、15倍のNOを、OA軟骨細胞は約7倍のNOを産生する。一方、IL-1 β によって誘導されるNO産生量は若年者の軟骨細胞に比べて高齢者では非荷重部の軟骨細胞で約2倍、荷重部で約4倍であるが、その増加率は加齢とともに減少しており、OA軟骨細胞ではIL-1 β による産生誘導はほとんどみられない。一方、iNOS阻害剤であるaminoguanidine(AG)はiNOS発現を若年、老年、荷重、非荷重にかかわらず、正常軟骨では完全に阻害するが、OA軟骨では完全には阻害し得ない。また、IL-1 β によるII型コラーゲン産生抑制はOA軟骨細胞でより顕著であった。以上の結果は、加齢により軟骨細胞はより多量のNOを産生すること、IL-1 β 刺激に対する反応性は加齢およびOA変化により減弱すること、すでにOA軟骨細胞は最大量のNO産生を行っていることを示唆しており、正常軟骨細胞とOA軟骨細胞の質的相違(分化度の違い)が関与していると思われる。さらに、Millward-SadlerらによってOA軟骨細胞では、メカニカルストレスに対する応答も変化していることが報告されている⁹⁾。Loeserらは酸化ストレスの指標にニトロチロシン(NOによる組織内チロシン残基ニトロ化の指標、NT)の染色性を用いて、若年および老年サル、ヒトOAの軟骨組織を検討した⁶⁾。NT染色性は年齢およびOA変化に関連しており、また同時に行ったIL-1 β の染色性と一致した。一部の高齢サル軟骨ではIL-1の存在なしにNT染色性が亢進しているものがあり、年齢に関連した酸化ストレスはIL-1非依存性であると報告している。

メカニカルストレスとNO

軟骨細胞に対するメカニカルストレスを*in vitro*で再現する方法としてはこれまで、静的圧負荷、伸張ストレス、shearストレスなどさまざまな方法が試みられている。上記のように、正常軟骨細胞とOA軟骨細胞ではメカニカルストレスに対する反応は異なる。また、刺激のサイクルや負荷量といったストレスの条件を変えたり、単層、三次元培養、器官培養など細胞培養の条件によっては、

軟骨細胞は異なる反応を示すことも知られている。生体内でも軟骨組織は表層から石灰化層に至る層状構造を示し、またそれぞれの深度によって酸素分圧も異なることから、メカニカルストレスに対する応答も異なるものと考えられる。また、炎症性メディエーターに対する反応も異なっており、たとえば表層の軟骨細胞は深層に比較してIL-1刺激に対する反応性が高い¹¹⁾。

軟骨細胞によるメカニカルストレスに対するNO産生については、亢進するとの報告と逆に抑制されるとの報告があるが、上述のように刺激条件が異なっており、また生体内のどのような状態を反映しているかの評価も難しい。われわれのラット正常軟骨細胞を用いた実験では、0.5Hz、7%伸張ストレスは時間依存性にiNOSおよびNO産生を亢進させる。この刺激はアグリカン、II型コラーゲンの遺伝子発現を24時間刺激で低下させるストレス条件であり、比較的強い刺激であると考えられる⁶⁾。Leeら⁹⁾によると、OA軟骨細胞ではshearストレスに応じて負荷および時間依存性にNO産生が亢進することを報告している。静水圧はこのNO産生を抑制するが、ストレスなしでも内因性NOには影響を与えない。Shearストレスにより産生されたNOあるいはNO供与体によるNOはアグリカン、II型コラーゲンのmRNAレベルを下げ、間欠的圧負荷はSNPによるこの抑制効果をブロックしたが、shearストレスによる遺伝子発現に影響を与えなかった。一方、Islamら¹⁰⁾は持続的な静水圧は5 Mpa、4時間、1HzでiNOSのmRNAレベルでの発現亢進を認めた。また、2時間でbcl-2の発現低下を、4時間ではDNA fragmentation、caspase-3活性化、PARPの分解による軟骨細胞のアポトーシスを誘導することを報告している。

一方、*in vivo*でのOAモデルの多くは、靭帯切離により異常なメカニカルストレスを誘導するものが多く、短期間でOAが進行することから薬効評価にも用いられるが、軟骨組織におけるNO産生は亢進するとの報告が多い。イヌあるいはウサギでは、前十字靭帯切離によるOAモデルがよく使用されており、Hashimotoら¹¹⁾は前十字靭帯切離による実験的OAモデルにおいてTUNEL陽性細胞率とNO産生が相関することを報告してい

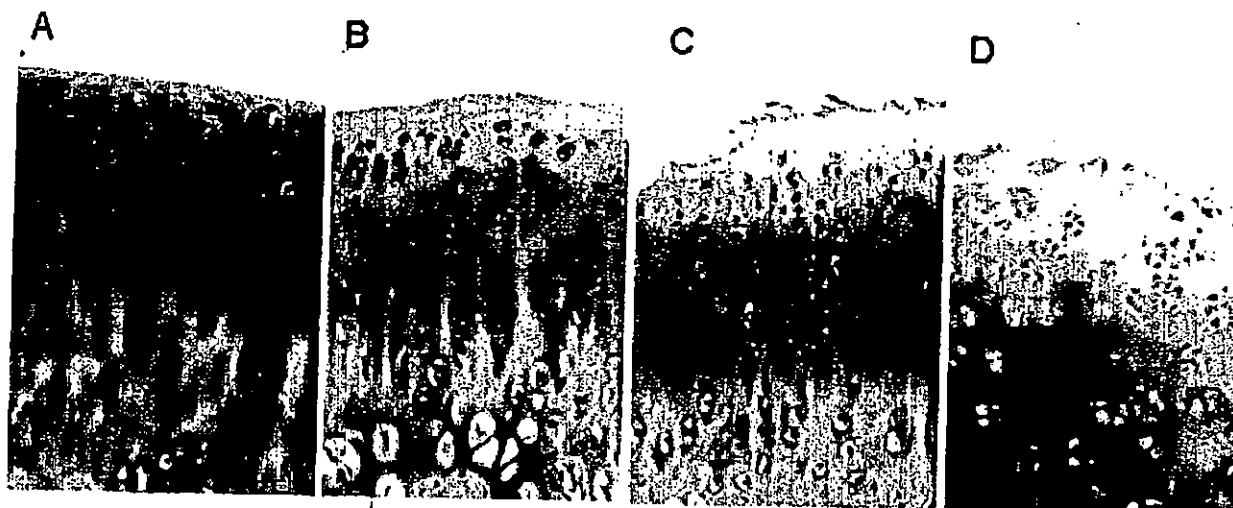


図2 ラット膝関節軟骨における種々のOA変化

前十字靭帯、内側側副靭帯の切離、内側半月板切除によりOAモデルを作成し、術後6週までの変化をサフラニンO染色で組織学的にみた。A: 関節包のみの切開、B: 表層のサフラニンOの染色性の低下と細胞数の増加、C: 表層のfibrillationと細胞数の低下、D: 表層の消失と軟骨細胞のクローニング、配列異常。

る。われわれの経験からは、ラットにおいては前十字靭帯切離のみではOA変化は軽微であり、プロテオグリカンの喪失はあっても短期間で強い形態学的な変化は生じない。しかし、臨床的にも重要ないわゆるunhappy triadとして内側側副靭帯切離、内側半月板切除を加えると、軟骨破壊は4~6週で急速に進行する⁹⁾(図2)。このことは、加齢とは関係なく、程度によってはメカニカルストレスのみでOA病態の再現が可能であることを示す。

サイトカインとNO

OAの関節炎においてIL-1, TNF α といったサイトカインはMMPsの誘導を通じてマトリックス破壊に関与したり、プロテオグリカン産生を抑制するほか、iNOSやCOX(cyclooxygenase)-2などの発現によりNOやPGE₂といった炎症のメディエーターを誘導して、滑膜炎と軟骨破壊に中心的な役割を果たす。培養軟骨細胞では、IL-1, TNF α , IL-17, IL-18といった炎症性サイトカインやLPS(lipopolysaccharide)刺激によるiNOSの発現誘導がみられる¹²⁾。

IL-1はOAやRA患者の関節液中に多量に認められ、MMPによる基質分解を促進し、細胞外基質の産生を抑えることにより軟骨破壊に強く関与する。IL-1 β のレセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)がOAあるいはRAの動物モデルにおいて軟骨破壊

を抑制することからも、IL-1 β の軟骨組織への強い影響が示唆される¹³⁾。培養軟骨細胞ではIL-1 β 刺激に反応して刺激後約12~48時間で多量のNOを産生するが、ラット膝関節へのIL-1 β 関節内注入では、関節液中のNOは約10時間でピークに達し、24時間までに元のレベルに復帰する。さらにNOはIL-1 β によるプロテオグリカン産生抑制に関与することも知られているが、IL-1 β 関節内注入後のプロテオグリカン産生の著明な抑制は2日の間にみられる。これらの結果は、NOはIL-1 β による軟骨破壊における初期のメディエーターであることを示唆する。一方で、NO合成酵素阻害剤の関節内投与、ならびにosmotic pumpによる持続的腹腔内投与は、IL-1 β 関節内注入によるプロテオグリカン産生抑制に拮抗するが、IL-1 β の効果を完全に障害するほど十分ではないことも報告されている¹⁴⁾。われわれはNOS阻害剤の効果検証のため、iNOSノックアウトマウスに関節炎を誘導して軟骨破壊の程度を検討したが、組織変化を有意に抑制する一方で血清中のIL-1および軟骨組織中のMMP-3, MMP-9発現は野生型と比べて差がなく、NOS阻害剤単独での使用には限界があると考えている¹⁵⁾。

また、最近では、RAに対する生物学的治療としてのキメラ型抗ヒトTNF α モノクローナル抗体infliximabや可溶性TNF α 受容体化合物etanerceptの有用性が示され、臨床応用が各国で始まって

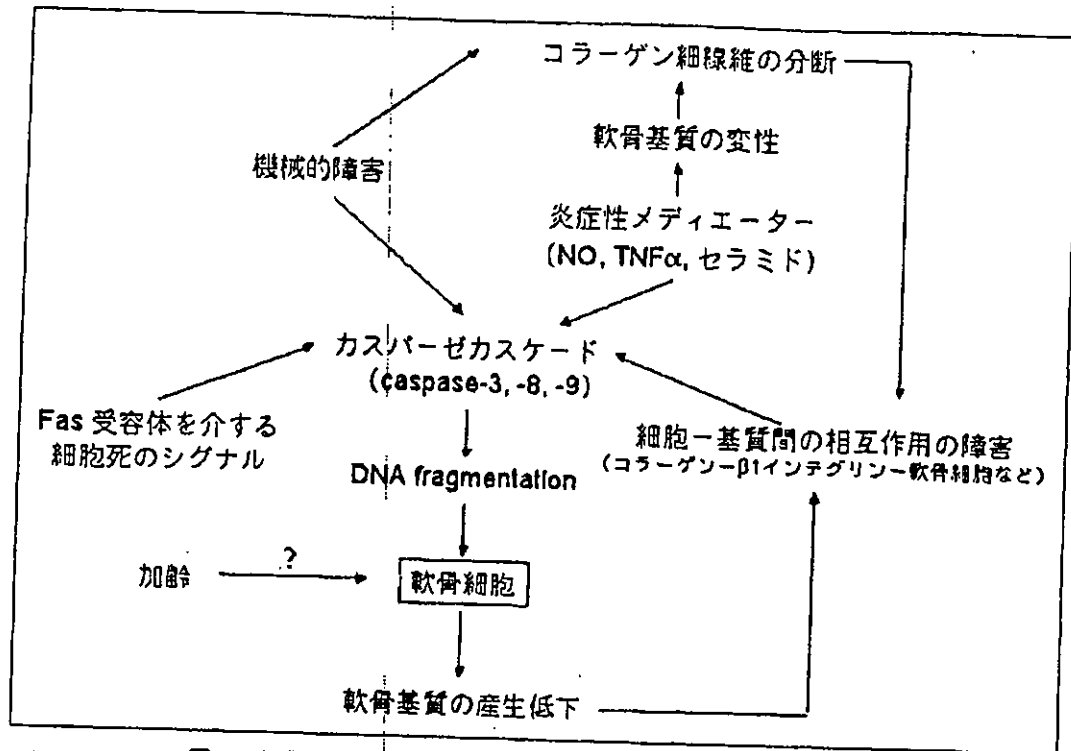


図3 軟骨細胞のアポトーシス誘導因子(文献¹⁹⁾より引用改変)

いる。Vuolteenahoら¹⁶⁾によると、これらTNF α 拮抗薬は、軟骨の器官培養において、iNOS発現低下を伴う容量依存性のNO産生抑制効果を示す。また、TNF α の可溶性受容体sTNF α RIに対する中和抗体の培養液中への添加はNO産生を亢進させることから、OA病態においても、内因性のTNF α およびその可溶性受容体がNO産生を調節していることが示唆される。

一方、IL-4、IL-10、IL-13といった抗炎症性サイトカインはIL-1やTNF α といった炎症性サイトカインに拮抗する。Wangら¹⁷⁾の報告によると、ラット軟骨細胞においてIL-10(20ng/ml)はIL-1に拮抗して細胞死を抑制し、iNOSおよびMMP-3の発現を抑制した。われわれの最近の研究では、IL-4は伸張ストレスの結果発現が亢進するiNOS mRNAレベルを用量依存性に低下させる¹⁸⁾。また、IL-4とIL-10の同時投与は軟骨細胞によるIL-1Raの産生量を変えずにIL-1およびTNF α の発現を抑え、結局IL-1/IL-1Ra比を減少させることにより、軟骨保護的に作用する¹⁸⁾。

OA病態における軟骨細胞死

軟骨細胞死は組織学的にも、OA初期から認められるようになる。OAの病態において軟骨細胞

死は重要であり、軟骨組織中の唯一の基質産生細胞である軟骨細胞の減少により軟骨修復が妨げられたり、軟骨変性が進展すると考えられる。軟骨組織に比較的緩やかな衝撃を加えた場合には、細胞死は主にアポトーシスによって生じると報告されているが、一方で強く早い衝撃(53MPa, 250ms)を加えた場合にはアポトーシスではなく、ネクローシスが軟骨の亀裂周辺に生じる。強い衝撃の場合、インパクターの周辺に細胞死が生じやすく、かえって中心部には生じにくい。このことは衝撃の強度や弾性による変形のみでは細胞死は生じないことを示す¹⁹⁾。したがって、急激な衝撃によって起こる軟骨細胞のネクローシスに対しては、衝撃によって生じた亀裂の修復・安定化が必要であり、一方で比較的緩やかな衝撃が繰り返される場合には、アポトーシスを抑止することが有効となる。前述の衝撃力によって誘導された軟骨細胞のアポトーシスは、部分的にしてもカスパーゼ阻害剤で防止できることも報告されている²⁰⁾。

軟骨細胞のアポトーシスは1995年頃から研究が盛んになった。これまでの研究で繁用されてきたTUNEL染色は偽陽性を生じやすく、10%とも20%とも報告されてきた軟骨細胞のアポト-

シスの出現率は進行の緩徐なOAの臨床像に合致しない。むしろ、0.02~0.04%に脳神経細胞のアポトーシスが生じるとされるアルツハイマー病のように、OA軟骨におけるアポトーシスはかなり低い率で生じているものと考えられ、また慢性疾患としてのOAの臨床像をより反映する。

軟骨細胞のアポトーシスは、NOやFas Lがその原因として報告されているが、そのほかの誘因、たとえば低酸素、基質のアシドーシス、異常なメカニカルストレス、向炎症性サイトカインの影響については検討が始まったばかりである。また、IGF-1などの成長因子や抗炎症性のサイトカインがアポトーシスを抑制できるかについてもほとんど検討されていない。イヌのACL切離OAモデルではiNOSの選択的阻害剤であるN-iminoethyl-L-lysine (L-NIL)の投与により、軟骨変性、骨棘形成が有意に抑制され、組織学的な検討でもL-NIL投与群においてiNOS, nitrotyrosine, COX-2, MMP-1, MMP-3の発現率が減少する²⁰⁾。さらに同様の系において軟骨細胞のアポトーシスとcaspase-3の発現率もNOS阻害剤により低下することも報告されている²¹⁾。いずれにしても、軟骨細胞のDNA fragmentationを誘導するカスパーゼの活性化は、サイトカインやNOなどのケミカルメディエーター、軟骨損傷などによる細胞外基質の変性、あるいはそれらの直接効果によって細胞-基質間接着の阻害を介して誘導され、軟骨細胞の数の減少は基質産生能の低下を介した軟骨変性に向かう悪循環に陥ると考えられる²²⁾(図3)。

おわりに

変形性関節症(OA)を可及的早期に把握し、適切な治療に導く上で、今後さらにMRIを含めた画像診断の進歩、あるいは病態を反映するより有用な関節マーカー、血清・尿中マーカーの発見、臨床応用が重要と思われる。OA初期を把握し得ても、形態、アライメント異常、外傷を基盤とする場合には手術的介入あるいは理学療法による関節の安定化、筋力強化、さらには装具療法が必須となる。その上で、軟骨代謝異常を是正し、非可逆的な変性を防止し得る生物学的アプローチに関する研究は、今後ますます必要になってくると考えられる。

文 献

- 1) Evans CH, Robbins PD. Potential treatment of osteoarthritis by gene therapy. *Rheum Dis Clin North Am* 1999; 25: 333.
- 2) Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, et al. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1219.
- 3) 西田圭一郎, 土井英之, 藤原一夫, ほか. 変形性関節症における軟骨破壊とNO. In: 平澤泰介, 井上一, 高岡邦夫, ほか・編. 先端医療シリーズ 22 整形外科の最新医療. 東京: 先端医療技術研究所; 2003. p. 81.
- 4) Min BH, Kim HJ, Lim H, et al. Effects of ageing and arthritic disease on nitric oxide production by human articular chondrocytes. *Exp Mol Med* 2001; 33: 299.
- 5) Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, et al. Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through alpha5beta1 integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 272.
- 6) Loeser RF, Carlson CS, Del Carlo M, et al. Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2349.
- 7) Fukuda K, Kumano F, Takayama M, et al. Zonal differences in nitric oxide synthesis by bovine chondrocytes exposed to interleukin-1. *Inflamm Res* 1995; 44: 434.
- 8) Nishida K, Doi H, Shimizu A, et al. The role of IL-4 in the control of mechanical stress-induced inflammatory mediators by rat chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2003; 5 Suppl 3: 57.
- 9) Lee MS, Trindade MC, Ikenoue T, et al. Intermittent hydrostatic pressure inhibits shear stress-induced nitric oxide release in human osteoarthritic chondrocytes *in vitro*. *J Rheumatol* 2003; 30: 326.
- 10) Islam N, Haqqi TM, Jepsen KJ, et al. Hydrostatic pressure induces apoptosis in human chondrocytes

- from osteoarthritic cartilage through up-regulation of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase, p53, c-myc, and bax-alpha, and suppression of bcl-2. *J Cell Biochem* 2002 ; 87 : 266.
- 11) Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, et al. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998 ; 41 : 1266.
 - 12) Lots M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 1999 ; 25 : 269.
 - 13) Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* 1996 ; 39 : 1535.
 - 14) Presle N, Cipolletta C, Jouzeau JY, et al. Cartilage protection by nitric oxide synthase inhibitors after intraarticular injection of interleukin-1beta in rats. *Arthritis Rheum* 1999 ; 42 : 2094.
 - 15) Kato H, Nishida K, Inoue H. Effect of NOS2 gene deficiency on the development of autoantibody mediated arthritis and subsequent articular cartilage degeneration. *J Rheumatol* 2003 ; 30 : 247.
 - 16) Vuolteenaho K, Moilanen T, Hamalainen M, et al. Effects of TNFalpha-antagonists on nitric oxide production in human cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002 ; 10 : 327.
 - 17) Wang Y, Lou S. Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes *in vitro*. *Chin Med J (Engl)* 2001 ; 114 : 723.
 - 18) Leo AB, Lubberts E, Durez P, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 1997 ; 40 : 249.
 - 19) Lewis JL, Deloria LB, Oyen-Tiesma M, et al. Cell death after cartilage impact occurs around matrix cracks. *J Orthop Res* 2003 ; 21 : 881.
 - 20) D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, et al. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage* 2001 ; 9 : 712.
 - 21) Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol* 1999 ; 26 : 2002.
 - 22) Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis *in vivo*. Possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 2000 ; 43 : 1290.
 - 23) Aigner T, Kim HA. Apoptosis and cellular vitality : issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* 2002 ; 46 : 1986.

* * *