

Figure 5. Effects of E2F decoy ODN transfection on IL-1 β , IL-6 and MMP-1 production by synovial tissue from RA patients. Medium was harvested 72 h after transfection. IL-1 β , IL-6 and MMP-1 production were analyzed by ELISA. (A) IL-1 β production (n=5), (B) IL-6 production (n=5) and, (C) MMP-1 production (n=5). The amount of IL-1 β , IL-6 and MMP-1 was standardized to the cell number. *p<0.01 vs. scrambled decoy ODN-treated cell number, and #, ##p<0.05 vs. scrambled decoy ODN-treated group.

studied 72 h after E2F decoy ODN transfection (n=5 in each group) (Fig. 5). The average level of IL-1 β was 100.2 \pm 7.2 pg/ml in untreated group and 104.7 \pm 22.5 pg/ml in scrambled decoy group, and 37.4 \pm 15.2 pg/ml in E2F decoy group, respectively. The average level of IL-6 was 995 \pm 145 pg/ml in untreated group and 1,032 \pm 120 pg/ml in scrambled decoy group, and 441 \pm 131 pg/ml in E2F decoy group, respectively. The average level of MMP-1 was 775 \pm 136 pg/ml in untreated group, 850 \pm 372 pg/ml in scrambled decoy group, and 283 \pm 76 pg/ml in E2F decoy group, respectively. E2F decoy ODN transfection reduced IL-1 β , IL-6 and MMP-1 production by 54.8 \pm 7.4, 42.4 \pm 9.5, 28.0 \pm 9.9%, respectively. Scrambled decoy ODN had no effect on the production of these mediators.

Marked suppression of invasion of cartilage by RA synovial tissue transfected with E2F decoy ODN. The therapeutic effect of E2F decoy ODN on joint destruction was examined in the severe combined immunodeficient (SCID) mice model for human RA. The volume of RA synovial tissue transfected with E2F decoy ODN was decreased as compared with untreated synovial tissue or synovial tissue transfected with scramble decoy ODN. The articular cartilage co-implanted with RA synovial tissue transfected with scramble decoy ODN showed multiple areas of synovial tissue invasion extending deep into the cartilage. The histological structure of RA synovitis was preserved in these groups. In contrast, the articular cartilage co-implanted with RA synovial tissue transfected with E2F decoy ODN showed marked suppression of invasion by synovial tissue. Infiltrating cells in synovium were decreased in this group (Fig. 6A-F). The grades of cartilage invasion co-implanted with untreated synovial tissue and synovial tissue transfected with scrambled decoy ODN ranged from 1 to 2, with an average of 1.4 \pm 0.8 and 1.8 \pm 0.4, respectively. The

grades of cartilage invasion co-implanted with E2F decoy ODN transfected synovial tissue ranged from 0 to 1, with an average of 0.4 \pm 0.5. The grade of cartilage invasion was significantly lower compared with untreated or scrambled decoy ODN group (Fig. 6G).

Discussion

One of the characteristic features of RA is the extensive bone and cartilage erosion caused by the invasive proliferative synovium derived from activated fibroblasts. Thus, cell cycle modulation is an attractive therapeutic target for bone and cartilage erosion in the affected joint of RA. Recent studies demonstrated that suppression of cell cycle in synovial fibroblasts results in inhibition of experimental arthritis (25). Additionally, recent work has found that E2F functions primarily as cell proliferation, suggesting that suppression of transcription of E2F-RB complex suppresses entry into the S phase (26,27). In this study, we used transcription factor E2F decoy oligodeoxynucleotides (ODN) to inhibit synovial cell proliferation. Our data demonstrate that E2F levels in nuclear synovial fibroblast extracts were markedly increased in RA. The specificity of the radiolabeled E2F probe was confirmed by adding a 100-fold excess of unlabeled double stranded E2F decoy ODN to the reaction compared with similar quantities of missense ODN that do not bind E2F. An inhibitory effect of E2F decoy ODN on RA synovial cell proliferation *in vitro* was shown in this study, as well as in the SCID mice model for human RA. Histological examination showed marked reduction of both the volume and cellularity in synovial tissue transfected with E2F decoy ODN. We showed that nuclear E2F expression in RA synovial tissue was downregulated by transfection of E2F decoy ODN following decreased mRNA expression of the

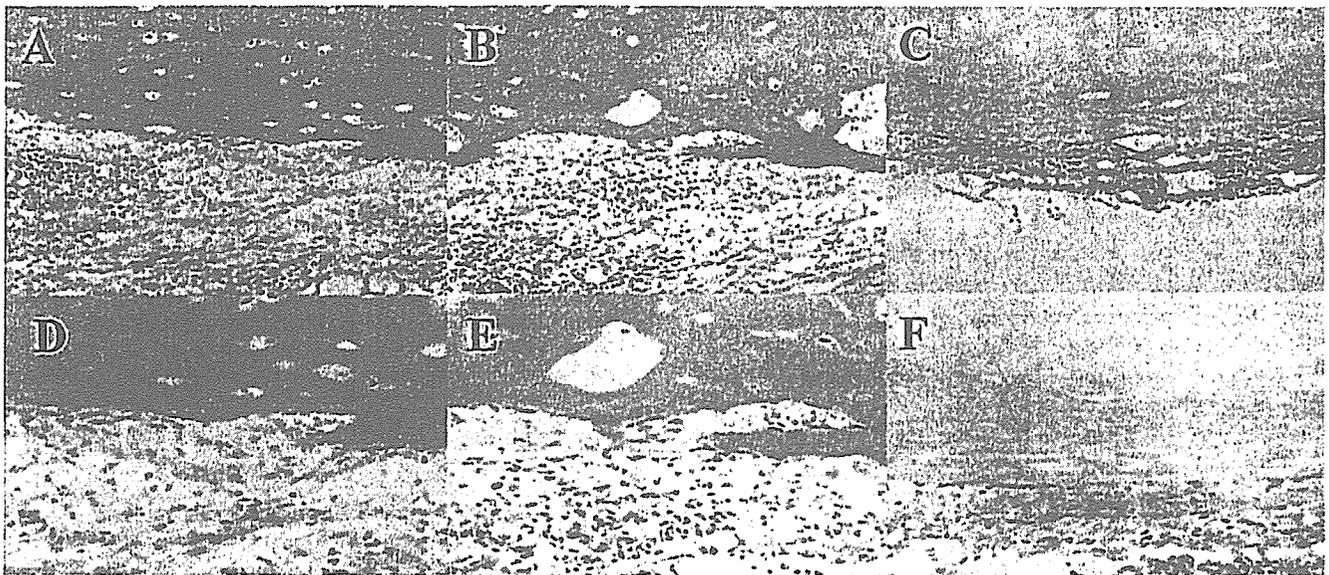


Figure 6. Histological analysis of the co-implanted synovial tissue and cartilage in SCID-HuRAg mice. (A and D) H&E stained sections from untreated synovial tissue. (B and E) H&E stained sections from synovial tissue transfected with scrambled decoy ODN. (C and F) H&E stained sections from synovial tissue transfected with E2F decoy ODN. Untreated synovial tissue and synovial tissue transfected with scrambled decoy ODN showed stratification of synovial cells and infiltration of inflammatory cells. Marked invasion of co-implanted articular cartilage by synovium is apparent (A, B, D and E). Synovial tissue transfected with E2F decoy ODN showed less hyperplasia of synovial cells and infiltration of inflammatory cells. The sections in this group mainly maintained intact cartilage (C and F). (A, B and C; original magnification x200, D, E and F; original magnification x 400). Histological score of the co-implanted synovial tissue and cartilage in SCID-HuRAg mice (n=8 in each group). There was a significant difference in histological score between E2F decoy ODN transfected group and untreated group or scrambled decoy ODN transfected group ($p<0.05$) (G).

cell cycle regulatory genes PCNA and cdk2. These results demonstrated that one mechanism by which E2F decoy ODN reduces synovial cell-associated damage is through inducing cell cycle arrest of synovial cells.

The production of proinflammatory mediators such as IL-1 β , IL-6, and MMP-1 was also suppressed by the transfection of E2F decoy ODN. This might be a secondary effect of inhibition of synovial cell proliferation, as synovial cells are the major producers of proinflammatory mediators in RA. However, the biological significance of E2F decoy ODN on proinflammatory mediator production *in vivo* still remains unclear.

One of the most important strategies for treating RA is prevention of joint destruction. We investigated the inhibitory effect of E2F decoy ODN on cartilage invasion with an *in vivo* murine model for human RA. Human normal articular cartilage and synovial tissue from patients with RA were co-implanted into SCID mice. On the basis of our *in vitro* observations, the predicted effect of E2F inhibition in this model would be prevention of cartilage invasion. The results of this study showed that transfection with E2F decoy ODN significantly suppressed cartilage invasion in this model. The exact etiology and pathogenesis have not yet been fully elucidated; however, stimulation of synovial cells by proinflammatory mediators results not only in proliferation but also in a wide variety of biological responses, including alterations in the generation

of many effector molecules potentially involved in the pathological process of cartilage destruction. With respect to this point, E2F decoy ODN strategy would be beneficial not only for inducing cell cycle arrest but also for inhibition of proinflammatory mediator secretion.

New classes of technologies, such as antisense ODN, ribozymes (28-31), and RNA interference (32,33), have been adopted by the arthritis field as strategies to inhibit target gene expression in a sequence-specific manner. In the present study, we used a unique molecular strategy: a synthetic double-stranded DNA with high affinity for a target transcription factor is introduced into target cells as a decoy cis element to bind the transcription factors and alter gene transcription. We previously reported a therapeutic strategy to suppress the inflammatory process in synovial cells by transfecting decoy ODN to block the binding of the critical transcription factor NF κ B to its promoter sequence of the target genes, thereby inhibiting the coordinated transactivation of genes of key cytokines and adhesion molecules necessary for the progressive joint destruction in RA (14). Joint destruction was ameliorated by the local injection of NF κ B decoy ODN into the affected joints in experimental arthritis models (12). The decoy ODN strategy is more effective than antisense ODN because it blocks multiple transcriptional factors that bind to the same cis element. There are several members of the E2F family, and

this strategy of using an E2F decoy ODN inhibits all E2F members because the decoy competitively blocks binding to the cis element. This ability of decoy ODN to block all transcription factors binding to a particular cis element is the reason that we focused on this technique and we suggest that this method may be more effective than the manipulation of a single cell cycle regulatory gene.

From the therapeutic point of view, the efficiency, stability, and specificity of decoy ODN in the tissue and cellular delivery are the most important issues to address. Specificity of the E2F decoy ODN was clearly shown in this study by gel mobility shift assay. The main limitation of unmodified ODN is the rapid degradation by nucleases prevalent in sera, cell, and tissue. To rectify this problem, ODNs have been chemically modified with sulfur ions, methyl groups, or other modifications to enhance their resistance against nuclease activity. Although the stability of ODNs is enhanced by these chemical modifications, other problems have been encountered that are attributed to foreign materials (28-30). In this study, we employed a circular dumbbell structure (CD) decoy ODN instead of phosphorothioate-modified decoy ODN to overcome the disadvantages of the chemically modified form; so to enhance their uptake and stability in synovial tissue or synovial fibroblast cells, we used the phosphorothioate-modified decoy ODN and HVJ-liposome delivery system. The effectiveness and usefulness of this delivery system has been demonstrated in various disease model both *in vivo* and *in vitro* (35,36). Additional effort is now being applied to use of the circular dumbbell structure decoy ODN instead of phosphorothioate modified decoy ODN to overcome the disadvantages of the chemically modified form (37).

In conclusion, the specificity of the effects of the E2F decoy ODN is supported by the results that only transfection with E2F decoy ODN and not with scrambled decoy ODN could achieve the following effects: a) decreased E2F expression in synovial fibroblasts nuclear extracts, b) decreased mRNA expression of the cell cycle regulatory genes such as cdk2 and PCNA, c) inhibition of cell proliferation, d) decreased production of inflammatory mediators, e) amelioration of cartilage invasion. Since the induction of cell cycle progression appears to be critical for the activation of synovial cells, therapeutic strategies designed to arrest cell cycle progression may prove to be effective in treating cartilage destruction by proliferative synovitis.

Acknowledgements

We wish to thank Drs Hiroaki Matsuno and Tomoatsu Kimura for their excellent technical assistance with animal model experiments. The study was supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sport, Science and Technology of Japan, and the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.

References

1. Firestein GS: Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 39: 1781-1790, 1996.
2. Farahat MN, Gianni G, Poston R and Panayi GS: Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 52: 870-875, 1993.
3. Chu CQ, Field M, Allard S, Abney E, Feldmann M and Maini RN: Detection of cytokines at the cartilage/pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: implications for the role of cytokines in cartilage destruction and repair. *Br J Rheumatol* 31: 653-661, 1992.
4. Michael VV and Alisa KE: Cell cycle implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 5: D594-D601, 2000.
5. Nasu K, Kohsaka H, Nonomura Y, Terada Y, Ito H, Hirokawa K and Miyasaka N: Adenoviral transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor genes suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 165: 7246-7252, 2000.
6. Perlman H, Bradley K, Liu H, Cole S, Shamiyeh E, Smith RC, Walsh K, Fiore S, Koch AE, Firestein GS, Haines GK 3rd and Pope RM: IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts. *J Immunol* 170: 838-845, 2003.
7. Dalton S: Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO J* 11: 1797-1804, 1992.
8. Thalmeyer K, Synovzik H, Mertz R, Winnacker EL and Lipp M: Nuclear factor E2F mediates basic transcription and transactivation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev* 3: 527-536, 1989.
9. Wagner S and Green MR: Retinoblastoma. A transcriptional tryst. *Nature* 352: 189-190, 1991.
10. Watson RJ, Dyson PJ and McMahon J: Multiple c-myc transcript cap sites are variously utilized in cells of mouse haemopoietic origin. *EMBO J* 6: 1643-1651, 1987.
11. Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Ellison KE, Nakama M, Zhang L, *et al.*: A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5855-5859, 1995.
12. Tomita T, Takeuchi E, Tomita N, Morishita R, Kaneko M, Yamamoto K, *et al.*: Suppressed severity of collagen-induced arthritis by *in vivo* transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum* 42: 2532-2542, 1999.
13. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, *et al.*: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-324, 1988.
14. Tomita T, Takano H, Tomita N, Morishita R, Kaneko M, *et al.*: Transcription factor decoy for NFkappaB inhibits cytokine and adhesion molecule expressions in synovial cells derived from rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 39: 749-757, 2000.
15. Tomita N, Horiuchi M, Tomita S, Gibbons GH, Kim JY, Baran D, *et al.*: An oligonucleotide decoy for transcription factor E2F inhibits mesangial cell proliferation *in vitro*. *Am J Physiol* 275: F278-F284, 1998.
16. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, *et al.*: *Ex vivo* gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet* 354: 1493-1498, 1999.
17. Ehsan A, Mann MJ, Dell'Acqua G and Dzau VJ: Long-term stabilization of vein graft wall architecture and prolonged resistance to experimental atherosclerosis after E2F decoy oligonucleotide gene therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121: 714-722, 2001.
18. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Moriguchi A, Tomita N, *et al.*: *In vivo* transfection of cis element 'decoy' against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 3: 894-899, 1997.
19. Kaneda Y, Saeki Y and Morishita R: Gene therapy using HVJ-liposomes: the best of both worlds? *Mol Med Today* 5: 298-303, 1999.
20. Geiler T, Kriegsmann J, Keyszer GM, Gay RE and Gay S: A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum* 37: 1664-1671, 1994.
21. Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE and Gay S: Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 149: 1607-1615, 1996.
22. Matsuno H, Sawai T, Nezuka T, Uzuki M, Nishimoto N, Tsuji H, and Yoshizaki K: Treatment of rheumatoid synovitis with anti-resolving human interleukin-6 receptor monoclonal antibody: use of rheumatoid arthritis tissue implants in the SCID mouse model. *Arthritis Rheum* 41: 2014-2021, 1998.

23. Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Nakazawa F, Uzuki M, Sawai T, Yonezawa T, Saeki Y, Panayi GS, Pitzalis C and Kimura T: The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology* 41: 329-337, 2002.
24. Müller-Ladner U, Evans CH, Franklin BN, Roberts CR, Gay RE, Robbins PD and Gay S: Gene transfer of cytokine inhibitors into human synovial fibroblasts in the SCID mouse model. *Arthritis Rheum* 42: 490-497, 1999.
25. Taniguchi K, Kohsaka H, Inoue N, Terada Y, Ito H, Hirokawa K, *et al*: Induction of the p16INK4a senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 5: 760-767, 1999.
26. Murga M, Fernandez-Capetillo O, Field SJ, Borlado LR, Moreno B, Fujiwara Y, *et al*: Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* 15: 959-970, 2001.
27. Harbour JW and Dean DC: Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2: E65-E67, 2000.
28. Flory CM, Pavco PA, Jarvis TC, Lesch ME, Wincott FE, Beigelman L, Hunt SW 3rd and Schrier DJ: Nuclease-resistant ribozymes decrease stromelysin mRNA levels in rabbit synovium following exogenous delivery to the knee joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 754-758, 1996.
29. Jarvis TC, Bouhana KS, Lesch ME, Brown SA, Parry TJ, Schrier DJ, Hunt SW 3rd, Pavco PA and Flory CM: Ribozymes as tools for therapeutic target validation in arthritis. *J Immunol* 165: 493-498, 2000.
30. Takahashi M, Funato T, Suzuki Y, Fujii H, Ishii KK, Kaku M and Sasaki T: Chemically modified ribozyme targeting TNF-alpha mRNA regulates TNF-alpha and IL-6 synthesis in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 22: 228-236, 2002.
31. Rutkauskaite E, Zacharias W, Schedel J, Müller-Ladner U, Mawrin C, Seemayer CA, Alexander D, Gay RE, Aicher WK, Michel BA, Gay S and Pap T: Ribozymes that inhibit the production of matrix metalloproteinase 1 reduce the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 50: 1448-1456, 2004.
32. Schedel J, Seemayer CA, Pap T, Neidhart M, Kuchen S, Michel BA, Gay RE, Müller-Ladner U, Gay S and Zacharias W: Targeting cathepsin L (CL) by specific ribozymes decreases CL protein synthesis and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Gene Ther* 11: 1040-1047, 2004.
33. Zwicky R, Muntener K, Goldring MB and Baici A: Cathepsin B expression and down-regulation by gene silencing and anti-sense DNA in human chondrocytes. *Biochem J* 367: 209-217, 2002.
34. Zhou HW, Lou SQ and Zhang K: Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA *in vitro*. *Rheumatology* 43: 555-568, 2004.
35. Kaneda Y, Yamamoto S and Hiraoka K: The hemagglutinating virus of Japan-liposome method for gene delivery. *Methods Enzymol* 373: 482-493, 2003.
36. Kaneda Y, Uchida T, Kim J, Ishiura M and Okada Y: The improved efficient method for introducing macromolecules into cells using HVJ (Sendai virus) liposomes with gangliosides. *Exp Cell Res* 173: 56-69, 1987.
37. Tomita N, Tomita T, Yuyama K, Tougan T, Tajima T, Ogihara T and Morishita R: Development of novel decoy oligonucleotides: advantages of circular dumb-bell decoy. *Curr Opin Mol Ther* 5: 107-112, 2003.

The Elevated Level of Circulating Matrix Metalloproteinase-9 in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms Decreased to Levels Equal to Those of Healthy Controls after an Aortic Repair

Tetsuo Watanabe, MD, PhD,¹ Akira Sato, MD, PhD,¹ Takashi Sawai, MD, PhD,² Miwa Uzuki, MD, PhD,² Hitoshi Goto, MD, PhD,¹ Hiroshi Yamashita, MD, PhD,¹ Daijirou Akamatsu, MD, PhD,¹ Hiroko Sato, MD, PhD,¹ Takuya Shimizu, MD,¹ Noriyuki Miyama, MD,¹ Yoshiyuki Nakano, MD,¹ and Susumu Satomi, MD, PhD,¹ Sendai and Morioka, Japan

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is abundantly expressed in abdominal aortic aneurysms (AAAs), and it is considered to play a pivotal role in aneurysmal formation. Elevated circulating concentrations of MMP-9 have been reported in patients with AAA, but the influence of an operation on circulating MMP-9 is unclear. Therefore, to clarify the influence of an operation on circulating MMP-9 levels and to determine the role of MMP-9 in the progression of AAA, we measured serum MMP-9 levels in patients before and after AAA repair. Blood samples were obtained from 53 patients with AAA; 22 patients underwent AAA operations, including 17 patients with arterial occlusive disease (AOD), and nine normal control subjects. Serum MMP-9 levels were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. The serum MMP-9 concentration was significantly higher in AAA patients (622.0 ± 400.2 ng/mL) than in either AOD patients (284.3 ± 151.4 ng/mL) or healthy controls (280.8 ± 165.5 ng/mL) ($p < 0.001$). The mean serum MMP-9 levels in patients undergoing surgery for AAA (268.1 ± 215.9 ng/mL) was significantly lower than that in AAA patients ($p < 0.01$). Among the 10 patients whose sera were obtained preoperatively and postoperatively, the serum MMP-9 concentration fell significantly after the patients underwent the operation ($p = 0.004$). No significant difference was identified in serum MMP-9 concentrations among AOD patients, controls, and postoperative patients. These studies suggest that MMP-9 plays a pivotal role in aneurysm formation, and the circulating MMP-9 level is thus considered to reflect the biological behavior of the aneurysm.

INTRODUCTION

The development of an abdominal aortic aneurysm (AAA) is characterized by the destruction of the elastic media of the aortic wall.¹⁻³ Several studies have demonstrated the destruction of the extracellular matrix in AAA to likely be mediated by a series of enzymes called matrix metalloproteinases (MMPs).⁴⁻⁹ Among the several known MMPs, MMP-9 (92 kDa gelatinase) has been suggested to play a major role in the development of AAA.¹⁰⁻¹²

¹Division of Advanced Surgical Science and Technology, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan.

²First Department of Pathology, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan.

Correspondence to: Tetsuo Watanabe, MD, PhD, Division of Advanced Surgical Science and Technology, Graduate School of Medicine, Tohoku University, 1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, 980-8574, Japan, E-mail: wataatetu@mail.tains.tohoku.ac.jp

Ann Vasc Surg © 2006

DOI: 10.1007/s10016-006-9038-7

© Annals of Vascular Surgery Inc.

Published online: ■

Our previous histological study^{13,14} also demonstrated that MMP-9 was actively produced by aneurysm-infiltrating macrophages¹⁵ located at the site of a disruption of elastic fibers, and expression of MMP-9 appears to correlate with the expansion rate of the aneurysm diameter. From our results, MMP-9 was thus considered to possibly play an important role in the progression of AAA.

As a biomarker of AAA, the plasma MMP-9 concentration has been reported to significantly increase in AAA patients in comparison to arterial occlusive disease (AOD) patients.^{16,17} However, the influence of an operation on circulating MMP-9 levels remains unknown.¹⁸ Therefore, to clarify the influence of an operation on circulating MMP-9 levels and to determine the role of MMP-9 in the progression of AAA, we measured serum MMP-9 levels in patients before and after AAA repair.

PATIENTS AND METHODS

Samples

In this study, serum samples were obtained from 53 patients with AAA (42 men and 11 women, mean age 70.8 ± 7.8 years), including 22 who underwent open aortic reconstruction for AAA more than 3 months previously (post-AAA; 18 men and four women, mean age 70.1 ± 6.9 old), 17 patients with AOD (17 men, mean age 66.9 ± 7.8 years), and nine patients without any arterial disorder (control; seven men and two women, mean age 67.6 ± 14.1 years) at our institution. All patients were Japanese and had no collagen disease or cancer. All 53 patients with AAA had fusiform infrarenal AAA; the maximum diameter was >30 mm (average diameter: 56.1 ± 17.7 mm). In 10 of the 53 patients with AAA, serum samples were obtained preoperatively and 3 months after the aortic operation, and these 10 patients were thus also included in the post-AAA group.

Informed consent was obtained from all patients before joining this study. There were no significant differences in the age of patients between groups.

Measurement of Serum MMP-9 Concentration

Blood samples were immediately processed by centrifugation, and the serum was stored at -80°C until assayed.

The serum concentration of MMP-9 was measured by a double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using two different mouse monoclonal antibodies (2G9 and 8G7) generated

against pro-MMP-9. The specificity of these antibodies has been previously described.¹⁹ Biotinylated antibody 8G7 was used as the capture antibody by coating 96-well flat-bottomed microtiter plates at 0.5 mg/mL in bicarbonate buffer (pH 9.6). The plates were blocked with 25% Block Ace (Yukijirushi, Sapporo, Japan)/0.01 M (pH 7.6) phosphate-buffered saline (PBS, Block Ace/PBS) and washed. The serum samples of the AAA group were routinely diluted 1:50 with Block Ace/PBS, and the samples of the other groups were diluted 1:10. The diluted samples were added in 100 μL aliquots and then allowed to incubate for 2 hr at room temperature. After washing in 0.05% Tween-20-PBS, the second monoclonal biotinylated antibody against pro-MMP-9, 8G7, was added and allowed to incubate for 1 hr at room temperature. After extensive washing in Tween20-PBS, avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; Vector Laboratories, Burlingame, CA) was added and allowed to incubate for 30 min at room temperature. Finally, the substrate orthophenylenediamine dihydrochloride (Wako, Tokyo, Japan) at 20 mg/well was added and the optical density (OD) was determined at 492 nm. A standard curve was included with every assay, using incremental amounts of MMP-9.

The results were reported as mean \pm standard deviation (SD). A between-group analysis was performed using one-way analysis of variance and the Tukey test. Student's paired *t*-test was applied for comparison purposes between the preoperative and postoperative data of the 10 patients who belonged to both the AAA group and the post-AAA group. $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

The serum MMP-9 concentration was significantly higher in AAA patients (622.0 ± 400.2 ng/mL) than in either AOD patients (284.3 ± 151.4 ng/mL) or healthy controls (280.8 ± 165.5 ng/mL) ($p < 0.001$). The values of serum MMP-9 in all tested subjects are shown in Figure 1.

No correlation between serum MMP-9 levels and the maximum diameter of the AAA was found (Fig. 2). Furthermore, no significant correlation was observed between serum MMP-9 levels and clinicopathologic factors such as the expansion rate of AAA, the thickness of thrombus, the number of aneurysm-infiltrating macrophages, or the number of MMP-9-positive cells within the adventitia (data not shown).

The mean value of serum MMP-9 in the patients undergoing surgery for AAA (268.1 ± 215.9 ng/

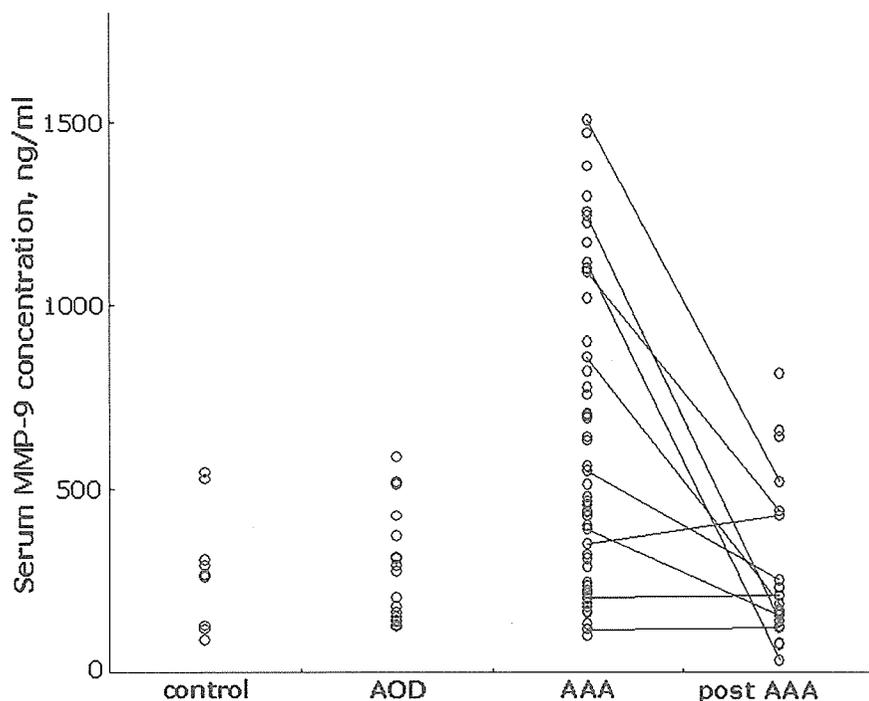


Fig. 1. Serum MMP-9 measured by ELISA. AAA patients had higher MMP-9 serum levels than controls, AOD patients, and operated AAA patients ($p < 0.01$). The elevated serum MMP-9 levels decreased after surgical AAA repair ($p = 0.004$).

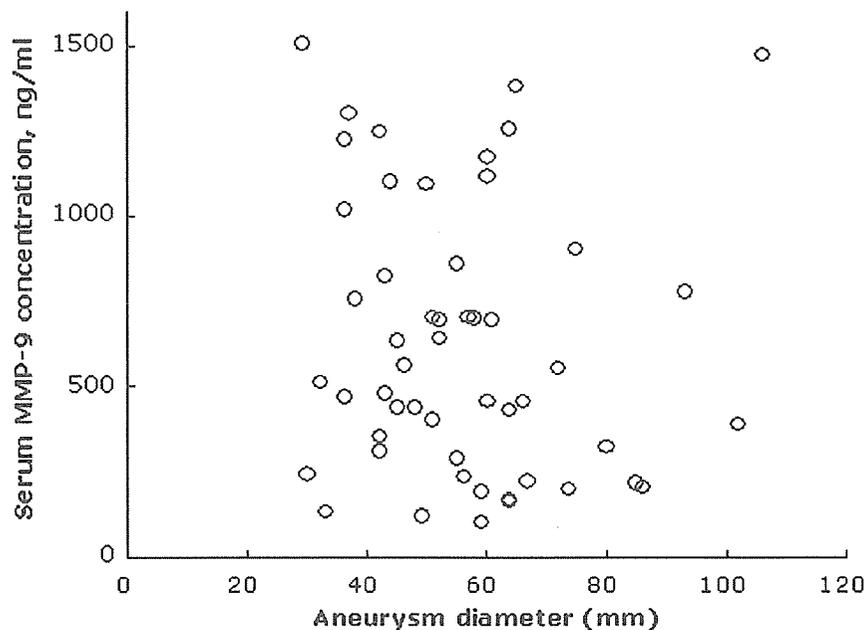


Fig. 2. Correlations between serum MMP-9 level and aneurysm diameter. No significant correlation was observed.

mL) was significantly lower than that in the patients with AAA ($p < 0.01$). Among the 10 patients whose sera were obtained both preoperatively and postoperatively, serum MMP-9 concentration fell significantly after undergoing the operation (Fig. 1, $p = 0.004$). No significant difference was identified in the serum MMP-9 concentration among AOD patients, controls, and postoperative patients.

DISCUSSION

The present study showed over a twofold elevation of MMP-9 level in AAA in comparison to either AOD or healthy controls. Furthermore, the level of MMP-9 was significantly downgraded after an aortic repair, equal to that of AOD or healthy controls.

Although previous reports measured the plasma MMP-9 concentration,¹⁶⁻¹⁸ we measured the serum MMP-9 concentration based on a report about rheumatoid arthritis in which the MMP-9 levels were high in both the serum and the joint liquid.¹⁹

The source of elevated circulating MMP-9 in AAA could not be defined in this study. We previously demonstrated the expression of MMPs associated with elastolysis in aortic wall serially taken from nondilating portions to the aneurysmal portion, where the elastic fibers were serially disrupted, based on a histological study using immunohistochemistry and in situ hybridization.^{13,14} Among the known MMPs, MMP-2 and MMP-9 are predominant and their expression has been associated with a disruption of elastic fibers. MMP-9 was mainly detected in the macrophages within the adventitia of the aneurysmal portion, at the sites of elastin fragmentation and remodeling; but it was not detected in the nondilating portions of the aorta. In addition, the number of MMP-9-positive cells in the adventitial layer of AAA correlated with the thickness of the adventitial fibrous layer and, furthermore, with the expansion rate of AAA. Macrophages do not store MMP-9;²⁰ therefore, the abundant intracellular expression of MMP-9 in adventitial macrophages can prove the active synthesis of MMP-9 in the aneurysmal wall.¹⁵ These findings suggest that the macrophages infiltrating the aneurysmal wall may thus be the primary source of MMP-9. As a result, MMP-9 may be ultimately responsible for the degradation of elastin in such cases.

An important question raised by this study is the mechanism of decline after an open AAA operation. The aneurysms in this study were treated by endoaneurysmorrhaphy intraluminal graft placement without a complete excision of the aneurysmal wall. We therefore speculate that the disappearance of the intra-aneurysmal bloodstream and the end of cyclic stretching in the aneurysmal wall could be responsible for the decreased MMP-9 levels observed after the operation.

Therefore, circulating MMP-9 should be considered a new marker for monitoring AAA; however, further studies are necessary to elucidate the mechanism of expression and activation of MMP-9 in order to clarify various unknown biological aspects related to its mechanism.

In conclusion, these findings suggest that MMP-9 plays a pivotal role in aneurysm formation, and the circulating MMP-9 level is thus considered to reflect the biological behavior of the aneurysm.

The authors thank Kanebo Corporation (Osaka, Japan) for their generous contribution of the reagents for the MMP-9 assay.

REFERENCES

1. Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch GR, Jr. Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003;38:584-588.
2. Rizzo RJ, McCarthy WJ, Dixit SN, et al. Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1989;10:365-373.
3. Baxter BT, Halloran BG. Matrix protein metabolism in abdominal aortic aneurysms In: Yao JST, Pearce WH, eds. *Aneurysms. New Findings and Treatments*. Norwalk: Appleton & Lange, 1994, pp 25-34.
4. Carrell TWG, Burnand KG, Wells GMA, et al. Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are overexpressed in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2001;105:477-482.
5. Newman KM, Malon AM, Shin RD, et al. Matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possible sources. *Connect Tissue Res* 1994;30:265-276.
6. Knox JB, Sukhova GK, Whittemore AD, et al. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation* 1997;95:205-212.
7. McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, et al. In situ localization and quantification of seventy-two-kilodalton type IV collagenase in aneurysmal, occlusive and normal aorta. *J Vasc Surg* 1995;22:295-305.
8. Freestone T, Turner RJ, Coady A, et al. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1145-1151.
9. Sakalihan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 2005;365:1577-1589.
10. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, et al. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms: an elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest* 1995;96:318-326.
11. Sakalihan N, Delvenne P, Nusgens BV, et al. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1996;24:127-133.
12. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002;110:625-632.
13. Watanabe T, Sawai T, Sato A, et al. The role of matrix metalloproteinases in progression of abdominal aortic aneurysm. *J Jpn Coll Angiol* 2000;40:505-510.
14. Watanabe T, Sawai T, Sato A, et al. Mapping analysis of the distribution of MMP-2 and MMP-9 in the wall of abdominal aortic aneurysms and correlation with the disruption of elastic fibers. *Jpn J Vasc Surg* 2000;9:539-544.
15. Tilson MD, Newman KM. Proteolytic mechanisms in the pathogenesis of aortic aneurysms In: Yao, JST, Pearce, WH, eds. *Aneurysms. New Findings and Treatments*. Norwalk: Appleton & Lange, 1994, pp 3-10.
16. Hovsepian DM, Ziporin SJ, Sakurai MK, et al. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with

- abdominal aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. *J Vasc Interv Radiol* 2000;11:1345-1352.
17. McMillan WD, Pearce WH. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1999;29:122-129.
 18. Lindholt JS, Vammen S, Fasting H, et al. The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms. A preliminary study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:281-285.
 19. Seki M, Uzuki M, Ohmoto H, et al. Matrix metalloproteinase (MMP-9) in patients with rheumatoid arthritis. *Ryumachi* 1995;35:792-801.
 20. Hibbs MS. Expression of 92kDa phagocyte gelatinase by inflammatory and connective tissue cells. *Matrix* 1992; (Suppl. 1):51-57.

関節病変の病理

Key words: rheumatoid arthritis,
histopathology,
synovium,
fibroblast-like cell

岩手医科大学病理学第一講座

宇月美和 澤井高志
徳永勢二

岩手医科大学整形外科科学講座

徳永勢二

東北労災病院整形外科

佐藤克巳

はじめに

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA) をはじめ、リウマチ性疾患において、関節・骨はもっとも病変頻度の高い臓器の一つである。他の膠原病でも程度の差はあれ、関節病変が生ずる場合が多い¹⁾²⁾¹⁰⁾¹³⁾。また、感染症や他の全身疾患など膠原病以外の様々な疾患においても副所見として関節症状を示す場合があり、関節病変は多くの疾患との鑑別を必要とする病変である。

本稿では RA の病理像を中心に他疾患との鑑別点および診断時の注意点について述べる。

肉眼像

様々な疾患においてもっとも早期に認められる滑膜病変は滑膜細胞の増生である。膠原病に限らず、関節内に刺激が加わると滑膜細胞の増生が起こり、滑膜は絨毛状の肉眼像を示すようになる。滑膜細胞の増生そのものは非特異的な反応なので、軽度の絨毛状増生は RA 以外の他の疾患でも認められる。この段階の滑膜炎での特異的な病理診断は困難であり、特に RA の早期および他の膠原病の滑膜病変は類似している

ため鑑別しがたい。RA でさらに炎症が高度になると滑膜の絨毛状増生は高度になり、文字どおり絨毛状になってくる。非炎症性疾患の変形性関節症 (osteoarthritis: OA) の滑膜増生が「こん棒状」と表現されるのに対して RA の場合にはより細かい絨毛状を示す。また、OA では浮腫や線維化を示すのに対して RA では血管の増生を反映して肉眼的には赤味を帯びている。RA では関節液中に滲出成分が多いために滑膜の表面にはフィブリンが付着し、しばしば不透明な白色を示す。また、滑膜細胞の増殖に対して血液の供給が追いつかないために滑膜の先端の部分が壊死になって関節液中に脱落するとも言われている。その他に米粒体 (rice body) と呼ばれる米粒大の白色の debris 状のものが認められることもある。また、関節内の出血のために滑膜内にヘモジデリンの沈着がみられ、滑膜が茶褐色を示す場合もある。

軟骨や骨については最近では MRI や CT で状態が把握できるようになり、RA や OA では軟骨や骨にびらんが確認される。軟骨や骨が検体として提出されるような手術が行なわれた病期の RA や OA の患者においては軟骨組織や半月板に変性や欠損が認められ、骨が露出して

The histopathology of the arthritis.

Miwa Uzuki*, Seiji Tokunaga***, Katsumi Satoh***, Takashi Sawai*.

*Department of Pathology, Iwate Medical University, School of Medicine, **Department of Orthopedic Surgery, Iwate Medical University, School of Medicine, ***Division of Orthopedic Surgery, Tohoku Rosai Hospital.

(2006. 2. 16 受付, 2006. 3. 1 受理)

いる場合が多い。RA ではパンヌスと呼ばれる肉芽組織が軟骨を破壊し、骨髓内に浸潤し骨破壊を示す。このパンヌスによる軟骨・骨破壊像はRA の特徴的な所見である。OA の場合の骨破壊はRA とは異なり物理的なストレスや荷重などが原因であるが、軟骨が失われ骨が露出しており関節面には高度な骨増生が認められ、骨梁は太くなっている。

病理組織像

1. 関節リウマチ (RA) ¹⁾²⁾⁴⁾⁻¹³⁾

膠原病のうち、関節に主な病変が生じるものがRA である。他の膠原病でも関節に病変があらわれることがあるが、いずれもRA に比較すると関節炎の程度は軽微であり、骨破壊まで至るものはまれである。RA の初期からの進行過程を時間を追って観察すると、初期では滑膜組織の浮腫のほかに血管周囲に class II 抗原陽性の紡錘形細胞(線維芽細胞様細胞)が出現する。筆者らがアメリカリウマチ学会(ACR)の1987年の診断基準7項目中4項目以上を満たす早期RA 患者の滑膜組織を検討した結果⁴⁾、もっとも早期の滑膜組織では浮腫や滑膜細胞の増生、血管周囲の紡錘形細胞の出現が起こり(図1)、続いてTリンパ球が浸潤し、一部は集簇する。発症から約半年ぐらいのRA の滑膜組織内にはBリンパ球が出現するが、集簇する傾向を示す。

以上のようにRA を特徴づける病理組織像は、大きく分けるとa)滑膜細胞の増殖、b)リンパ球などの炎症性細胞の浸潤、c)血管新生、d)軟骨・骨破壊、の4つであるが、以下にその詳細を述べる。

1) 滑膜細胞の増殖

正常の滑膜組織の表層は胸膜や腹膜と同様の中皮細胞系由来である1~2層の滑膜細胞でおおわれている(図2)。RA の滑膜組織の病理組織学的な変化のうちもっとも早期に認められるのが滑膜細胞の多層化である。滑膜表層細胞の多層化は他の様々な関節炎でも起こるとされ、モデル動物の関節内にバクテリアを注入すると滑膜には炎症性細胞の浸潤が生じ、数時間以内に滑膜細胞の増生が認められるようになるが、



図1 発症早期の関節リウマチの滑膜像

RA 発症から非常に早い時期の滑膜組織では浮腫や滑膜細胞の増生、血管周囲の紡錘形細胞の出現が起こる。続いてTリンパ球が浸潤してくるが、この時点での炎症は軽度であり、他の関節炎との鑑別は困難である。



図2 正常の滑膜組織

正常の滑膜組織の表層は1, 2層の滑膜細胞によって覆われており、その下はわずかな血管を含む脂肪組織からなる。

RA の滑膜では表層細胞の多層化は数層から20層程度にもなる。RA では増殖した滑膜細胞自らが class II 抗原の他に多くの蛋白分解酵素やサイトカイン、およびそのインヒビターや増殖因子を産生し、さらにコラーゲンやヒアルロン酸¹²⁾などの細胞外マトリックスの合成も行っており、機能的には非常に多彩である⁵⁾。

2) リンパ球などの炎症性細胞の浸潤

RA 滑膜組織ではリンパ球の浸潤、集簇が高度である。滑膜組織に浸潤するリンパ球の多くは濾胞を形成するBリンパ球と濾胞周囲でび漫

性に浸潤するTリンパ球からなり、さらにTリンパ球の中でもCD4陽性のhelper/inducer Tリンパ球がCD8陽性のsuppressor/cytotoxic Tリンパ球より量的に優位である。これらの細胞の比率は滑膜の炎症の程度によって異なり、同一患者でも時期によって異なる像を示す。また、この滑膜組織中のBリンパ球がリウマチ因子を産生すると言われている。炎症の初期および炎症が遷延して陳旧化してくるとリンパ濾胞はみられなくなるため、リンパ濾胞の有無は免疫反応の活動性を計るにはよい指標である。一般に骨破壊の病変部をみると、軟骨や骨の基質を分解する蛋白分解酵素を産生し破壊に関与するとされている細胞は好中球、マクロファージを中心とする非特異的な炎症性細胞であり、リンパ球はむしろRAにおける免疫学的反応に関与しているのではないかと思われる。つまり、RAの滑膜組織にみられる炎症はリンパ球を中心とする免疫学的反応による炎症と好中球中心の非特異的な炎症の混在した像であり、それらが複雑に絡みあっている状態とみると理解しやすい。

マクロファージについては、本来の貪食機能を呈する他に免疫学的に抗原提示能を有し、サイトカインや増殖因子、接着分子の発現など多くの機能を有することが明らかにされている。また、顆粒球については、RAの初期や炎症の増悪期に好中球浸潤が目立っている。なお、RAでは長期にわたって炎症が持続しているため線維化も目立つ。一般的には濾胞を形成するリンパ球の浸潤と血管新生がRAの滑膜像の特徴と言われているが(図3)、線維芽細胞による線維成分の増殖がみられるのもRAの特徴である。

3) 血管新生

RAの滑膜の特徴的な所見に血管新生がある。正常の滑膜組織では、脂肪組織および表層細胞直下には毛細血管ないしは小静脈が認められるのみであるが(図2)、RAになると、透過性亢進をみるとともに血管も増生し、増殖した血管の内皮細胞には種々の接着分子が発現する。また、深部にみられる血管周囲にも時間とともにリンパ球を主体とする炎症性細胞が集簇

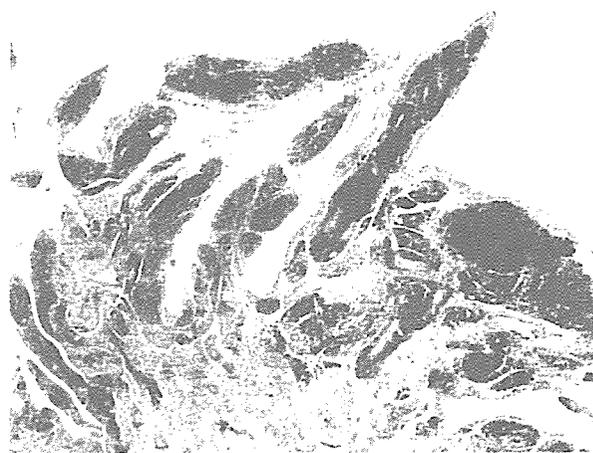


図3 典型的なRAの滑膜組織像

滑膜組織は絨毛状増殖を示しており、発達したリンパ濾胞の形成が高度に認められる。

してくるようになる。この時、滑膜組織では血管増殖因子が産生され、血管の内皮細胞には接着分子の発現、周囲の細胞にはそれぞれのリガンドの発現がみられるようになる⁷⁾。この毛細血管は炎症とともに成長し、絨毛状に増殖した滑膜組織内に伸びていくが、リンパ濾胞を形成したり多様な機能を営んでいることが考えられる。

4) 軟骨・骨破壊

RAでは、滑膜の炎症が軟骨・骨におよんで関節破壊に至るが、この滑膜におこった炎症は肉芽組織(パンスス)となって浸潤していく。パンススの進行の仕方には2通りあり、一つは滑膜と骨膜の移行部分でポケットとよばれる若い間葉系組織のみられるbare areaからsubchondralに浸潤していく形であり(図4)、もう一つは軟骨の表層を這うように浸潤し、下方にむかって侵食していく形である(図5)。そこにはマクロファージ以外にも線維芽細胞様細胞(fibroblast-like cell)、破骨細胞も認められる。線維芽細胞様細胞はpannocyteとも呼ばれ、class II抗原の他に種々の蛋白分解酵素も発現する。

2. RAの炎症の程度

RAの関節病変の特徴は長期間にわたって持続する炎症と進行する骨破壊であるが、病変の程度も発症初期の軽度のものから骨破壊の著し



図4 RA患者の骨破壊部 (bare area)

炎症性パンススは滑膜と骨膜との移行部位 (ポケットあるいはbare area と呼ばれる) から骨膜を越えて軟骨下骨の骨髓内へと骨破壊性に浸潤する。

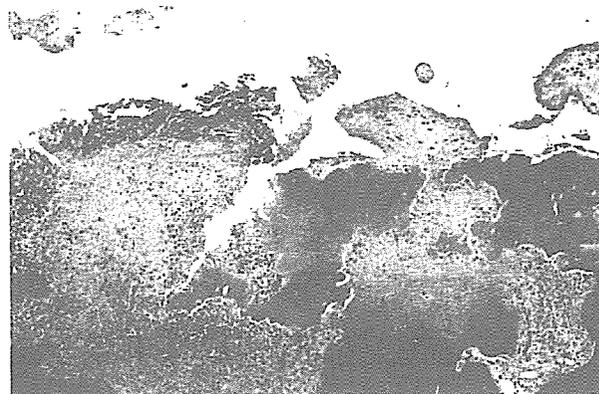


図5 RA患者の膝関節の骨破壊部のパンススの拡大像

図4と異なり、軟骨の表層を這うようにパンススが浸潤し、下方にむかって侵食していく像。骨吸収部においては破骨細胞をはじめ、線維芽細胞様の紡錘形細胞や単核球がみとめられる。

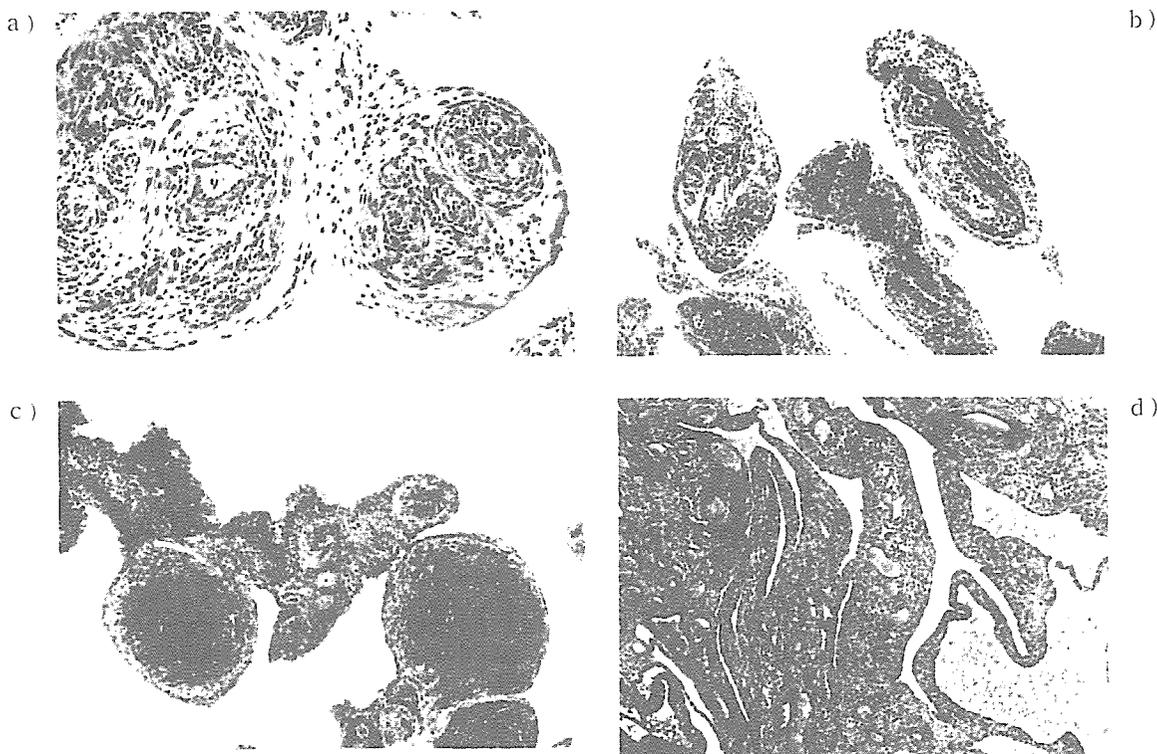


図6 RAの滑膜組織像

- a) 早期RAの滑膜像：発症から5カ月の患者の滑膜組織。滑膜細胞の軽度の多層化と浮腫、わずかなリンパ球浸潤が認められる。この段階では他の疾患との鑑別は困難である。
- b) 炎症が中等度の時期のRAの滑膜像：a)に比較して絨毛状増生や滑膜細胞の多層化が目立ち、リンパ球を主体とする炎症性細胞浸潤もびまん性にみとめられる。血管の新生もさかんである。
- c) 炎症が高度な時期のRAの滑膜像：炎症が高度な時期のRA滑膜では滑膜の絨毛状増生はさらに高度になり、滑膜細胞の多層化は20層にもおよぶことがある。また、胚中心を有するリンパ濾胞の形成も目立つ。RAとの診断は比較的容易である。
- d) 炎症が沈静化した時期のRAの滑膜像：内科的治療で炎症がコントロールされたり、罹病期間が長期化して炎症が落ち着いたRA患者の滑膜では線維化が目立ち、リンパ球浸潤などは軽度となっている。

いムチランス型のもまで患者によって異なっており、あたかもまったく異なる疾患であるかのように病理組織像にはばらつきが大きい。また、RAの病態に深く関与しているとされる種々のサイトカインや蛋白分解酵素についても、滑膜組織での陽性率や血中、関節液中の濃度が症例間でばらつく事が多く、同じRAでありながら健常人と同じレベルの値を示す症例や非常に高値を示す症例も含まれる。これはRAの滑膜組織像の多様性を反映するものと思われる。

筆者らの持っているRA症例を滑膜組織の炎症の程度で分類した場合、a)滑膜細胞の多層化もリンパ球浸潤も軽度で浮腫性の初期(発症から1年未満の初期症例が多い)(図6 a)), b)滑膜は軽度の絨毛状増生を示し、滑膜細胞の多層化や血管周囲のリンパ球集簇がみられるが高度ではない中期(図6 b)), c)滑膜の絨毛状増生や滑膜細胞の多層化、リンパ球浸潤ともに高度でありリンパ濾胞の形成を示す高度期(図6 c)), d)炎症は鎮静化し炎症性細胞浸潤は軽度になり滑膜に線維化がみられる線維化期(図6 d))の4期に分類される。このうち教科書的な組織像はc)の時期である。a)のような変化は他の関節病変でもみられる程度の滑膜病変である。また、RAで罹病期間が長期にわたる場合や内科的な治療によって炎症がコントロールされている場合などでは炎症は軽度で線維化を示すd)の変化を示し、必ずしもc)のような典型的な組織像を示さない。筆者らが持っているRA症例の組織像をa)~d)に分類した結果、典型的なc)の組織像を示す症例はわずかに17%のみであった(図7)。

以上のデータを見ると、実際に滑膜が検体として提出された場合には、教科書でよく眼にするようなリンパ濾胞や滑膜細胞の多層化が明らかに認められる症例は2割にも満たず、他の大部分ではそのような像を示さないということを考慮しなければならない。

鑑別診断¹⁾²⁾¹⁰⁾¹³⁾

RAと並んで患者数の多い関節疾患は変形性

RA 386例の検討

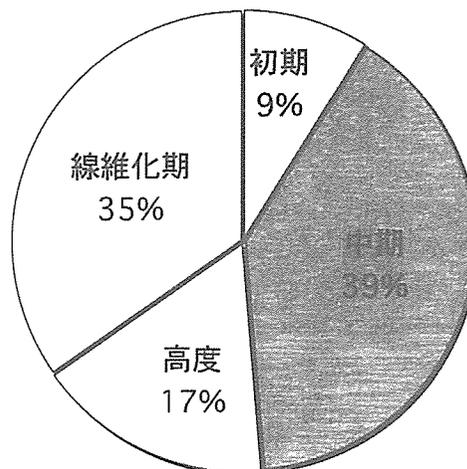


図7 RA患者の滑膜組織の炎症像

RA患者386例について滑膜組織の炎症の程度に応じ図6 a)~d)に分類した結果、a)初期は9%、b)中期は39%、c)高度は17%、d)線維化期は35%となった。RAの典型的な滑膜組織像はc)に相当するが、RA全体で占める割合は少ない。

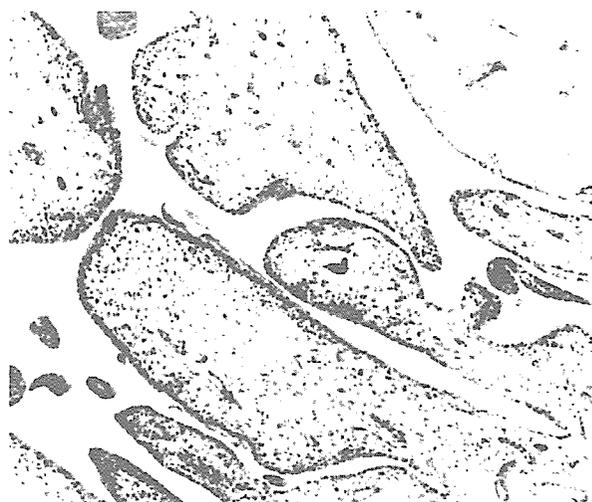


図8 OA患者の滑膜組織

OA患者の滑膜組織はこん棒状で浮腫性変化と線維化が目立ち、RA患者のような絨毛状の増生や炎症性細胞浸潤が見られることは少ない。

関節症(OA)である。この疾患の原因については、加齢、ホルモン、荷重、循環障害、外傷、先天性の代謝異常および他疾患から二次的に生じたものなどがあげられているが、単一の独立した因子によって引き起こされるというより



図9 軽度の炎症をともなったOA患者の滑膜組織

OAでもリンパ球の集簇や血管の増生、滑膜表層細胞の多層化がみられることもあるが、RAと比較して軽度である。

は、複数の因子の関与によるものが多い。OA患者関節の滑膜組織所見としては、こん棒状で浮腫性変化と線維化が目立ち(図8)、RA患者のような絨毛状の増生や炎症性細胞浸潤が見られることは少ない。しばしばリンパ球の集簇や血管の増生、滑膜表層細胞の3-5層程度までの多層化もみられるが、RAと比較して軽度である(図9)。関節軟骨は磨耗が生じ、手術適応となるころには軟骨組織が殆ど消失して骨が直接露出するようになり、subchondral boneも水平に磨耗した状態になる。多くの症例の中には臨床的にも病理組織学的にもRAとOAの鑑別が非常に難しいものがみられる。特に炎症性変化に乏しい高齢のRA患者の滑膜では多かれ少なかれOA様の変化が認められるため、両者が重なった像を示しており、鑑別はさらに困難となる。また、前述したように発症から一年未満の早期のRAや陳旧化した症例では典型的なリンパ濾胞の形成や絨毛状増生がみられないことが多く、滑膜像からの診断が困難なことも多い。こういった症例では臨床所見や血液学的データなどとともさまざまな面からの追跡が必要となる。

変形性関節症のほかにRAとの鑑別が必要な疾患は、1)細菌感染やウイルス感染によって引き起こされる感染性関節炎、2)尿酸塩やCPPDなどの結晶沈着による結晶性関節炎、

3)他の膠原病の関節病変、4)色素性絨毛結節状滑膜炎、5)急速破壊型股関節症(RDC)³⁾、6)結核やサルコイドーシスなど特異的な炎症、7)アミロイドーシス、8)血友病性関節症など多数認められる。いずれにおいても臨床所見などを参考に鑑別し得る。それぞれの病理組織像やRAとの鑑別点については紙面の関係で割愛するが、いずれにおいても軽度の滑膜増生や炎症性細胞浸潤がみられ、RAの初期症例に類似した組織像である。

RAの滑膜組織を特徴づける 線維芽細胞様細胞

「病理組織像」の部分ではRAとしての特徴的な所見1)滑膜細胞の増殖、2)リンパ球などの炎症性細胞の浸潤、3)血管新生、4)軟骨・骨破壊について述べてきた。しかし「RAの炎症の程度」の部分でも述べたように、実際のRA患者の滑膜組織のうちこれら全ての所見を満たすような高度な炎症を示す症例は全体の2割にも満たず(図7)、多くのRA患者の滑膜炎は比較的落ち着いた状態にある。一方、「鑑別診断」で述べたように、他の膠原病やOAをはじめとする多くの関節病変では、滑膜細胞の多層化や炎症性細胞浸潤が軽度ながら認められるが、これらの所見はRAの初期の滑膜病変に類似しており、鑑別が困難な場合もある。このような場合には、RAの滑膜病変に特徴的な線維芽細胞様細胞(fibroblast-like cell)の有無に注目する。RAの滑膜組織の深部では、紡錘形をした細胞が多くみられるが、この紡錘形細胞は線維芽細胞様細胞や滑膜線維芽細胞、樹状細胞などと呼ばれており、RAを組織学的に特徴づける細胞の一つと考えられている(図10)。この細胞の機能については、HLA/DRなどのclass II抗原、単球系細胞のマーカーであるCD14の発現など、一見マクロファージ系細胞の特徴を呈しながらも粗面小胞体を有し、貪食能よりはむしろ免疫応答に関与している可能性が大きく、電顕的にはこの紡錘形細胞がリンパ球に接している像がしばしば観察される⁹⁾。また、*c-myc*や*c-fos*などのoncogeneやPCNAなどの細胞周期に関わる

抗原が陽性となる上に、細胞学的な態度も浸潤傾向や組織破壊を示すなど、しばしば腫瘍に類似した性質を示すことも特徴の一つである。

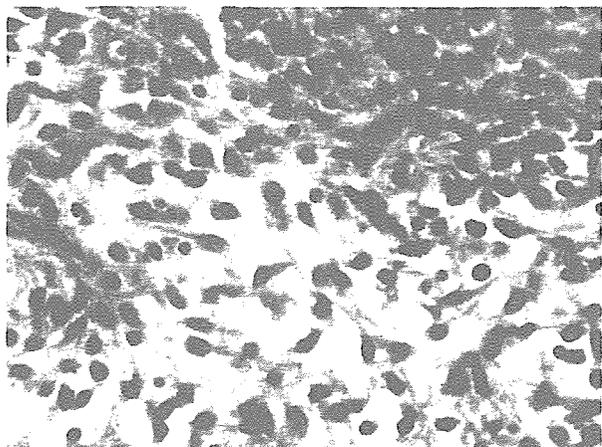


図10 RA 滑膜組織の線維芽細胞様細胞

RAの滑膜組織の深部には紡錘形細胞が多くみられるが、これは線維芽細胞様細胞や滑膜線維芽細胞、樹状細胞などと呼ばれており、RAを組織学的に特徴づける細胞の一つと考えられている。

骨破壊部においては破骨細胞の活性化が破壊の主体であると言われているが、ここでも pannocyte とよばれる fibroblast-like cell や単球/マクロファージが関与しているとされている。

症例の検討

以上、RAの病理組織像について述べてきたが、次に実際に鑑別が難しかった症例を提示する。

(症例1) 78歳女性

20年来の膝関節痛がある。1年前から朝のこわばりなどを自覚し、ESR 108/129であった。画像上ではOAであり、単関節のみの症状であった。

病理組織像：典型的なRAの滑膜組織像であった(図11)。(単関節炎)

(症例2) 50歳 男性

1年前から右肘痛と可動域制限がある。炎症反応(-)の単関節痛であり、変形性関節症とし

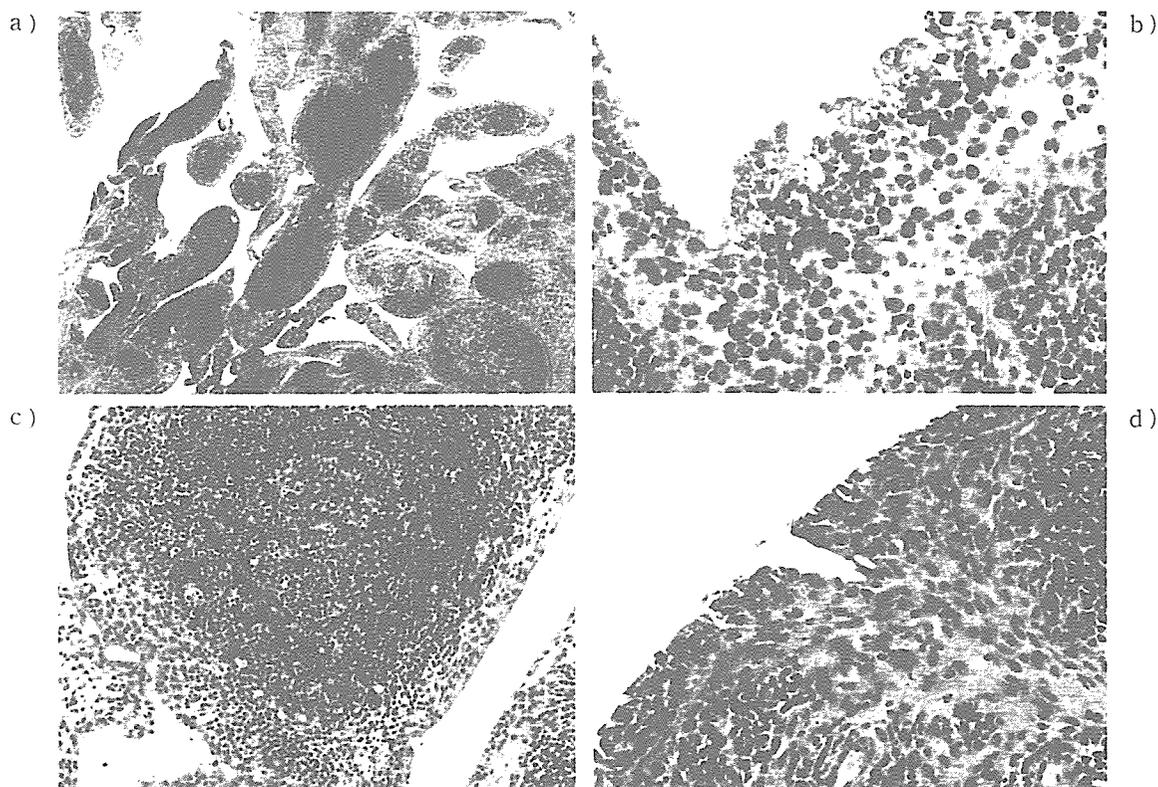


図11 症例1の滑膜組織像

78歳の女性。20年来の膝関節痛があり(単関節のみの症状)、画像上はOAであったが、1年前から朝のこわばりを自覚し、ESR 108/129であった。病理組織学的には典型的なRAの滑膜組織像であった。(単関節炎)

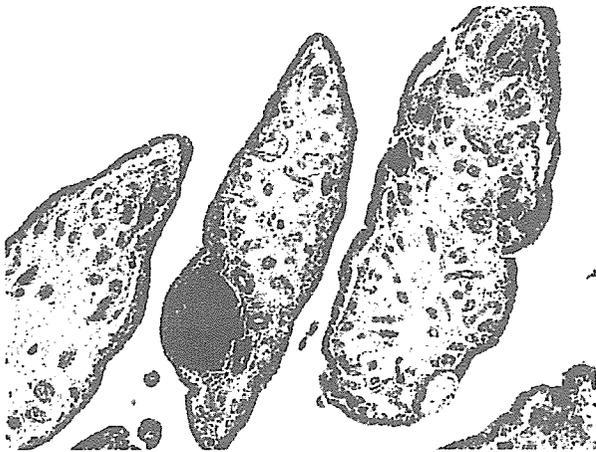


図12 症例3の滑膜組織像

71歳の女性。左膝 OA で手術後、右膝痛が出現し、右 TKA が施行された。赤沈値と CRP の軽度の上昇がみられるがリウマチ因子は陰性であり、骨の所見も臨床的には OA であった。病理組織学的にはリンパ濾胞の形成が目立つ滑膜であったが、炎症性細胞の背景には浮腫や線維化がみられ、滑膜線維芽細胞の増生はみられない。炎症をともなった OA である。

て治療を受けていた。

病理組織像：パンススによる骨破壊もみられる典型的 RA の組織像であった。(単関節炎)

(症例3) 71歳 女性

左膝 OA で手術後、杖歩行である。1年前から、右膝痛が出現し、TKA が施行された。赤沈値と CRP の軽度の上昇がみられるがリウマチ因子は陰性であり、骨の所見も臨床的には OA であった。

病理組織像：リンパ濾胞の形成が目立つ滑膜であるが、炎症性細胞の背景には浮腫がみられ、滑膜線維芽細胞の増生はみられない。炎症をともなった OA である (図12)。

(症例4) 44歳 男性

1年前から右肘関節痛あり。単関節痛で他の関節には症状はない。血液データでも炎症反応やリウマチ因子は陰性であった。

病理組織像：滑膜には線維化がみられ炎症性細胞浸潤は高度ではないが、背景には線維芽細胞様細胞の浸潤が認められた。

→再び関節痛が出現し初回の手術より約1年後に再手術となった。この際には骨破壊をともなう典型的な RA の組織像を示した。(単関節炎, seronegative)

(症例5) 22歳 男性

左肘関節のみの疼痛と腫脹がみられた。RAPA 1:320, RF 159, ESR 45/68であった。その後、他の関節にも所見がみられるようになり、CRP も上昇してきた。

病理組織像：滑膜の多層化やリンパ濾胞の形成を示しており、RA の滑膜組織像であった。(単関節炎)

(症例6) 53歳 女性

1年前から左膝関節の疼痛と腫脹が出現してきた。CRP や赤沈値は正常範囲内であり、リウマチ因子も陰性であった。その後、他の関節にも所見が認められるようになった。

病理組織像：炎症性細胞浸潤は高度ではなく、リンパ濾胞の形成もみられないが、間質には線維芽細胞様細胞の浸潤が認められ、RA と判断した (図13)。(発症初期例, seronegative)

(症例7) 67歳 女性

10ヶ月前より両膝痛を自覚している。リウマチ因子は陰性であるが、CRP と赤沈値は軽度上昇している。その後、他の関節にも所見が認められるようになった。

病理組織像：滑膜には線維化がみられ炎症性細胞浸潤は高度ではないが、背景には線維芽細胞様細胞の浸潤が認められた。(発症初期例, seronegative)

(症例8) 18歳 女性

3年前に運動後に右膝痛が生じ、その後は増悪と軽快を繰り返す。6ヶ月前から右膝の腫脹を自覚するようになった。CRP や赤沈値は正常でリウマチ因子も陰性であったが、後に他の関節にも所見が認められるようになった。

病理組織像：滑膜細胞の軽度の多層化とリンパ球浸潤がみられるが炎症は軽度である。背景には線維芽細胞様細胞の浸潤が認められた。(発症初期例, seronegative)

(症例9) 22歳 男性

2ヶ月前から右拇指 IP 関節と左膝の疼痛、腫脹あり。リウマチ因子(-)であった。左膝鏡視下滑膜切除術を行ったが症状は改善せず、1年後に再び滑膜切除となった。その後、RA として治療されている。

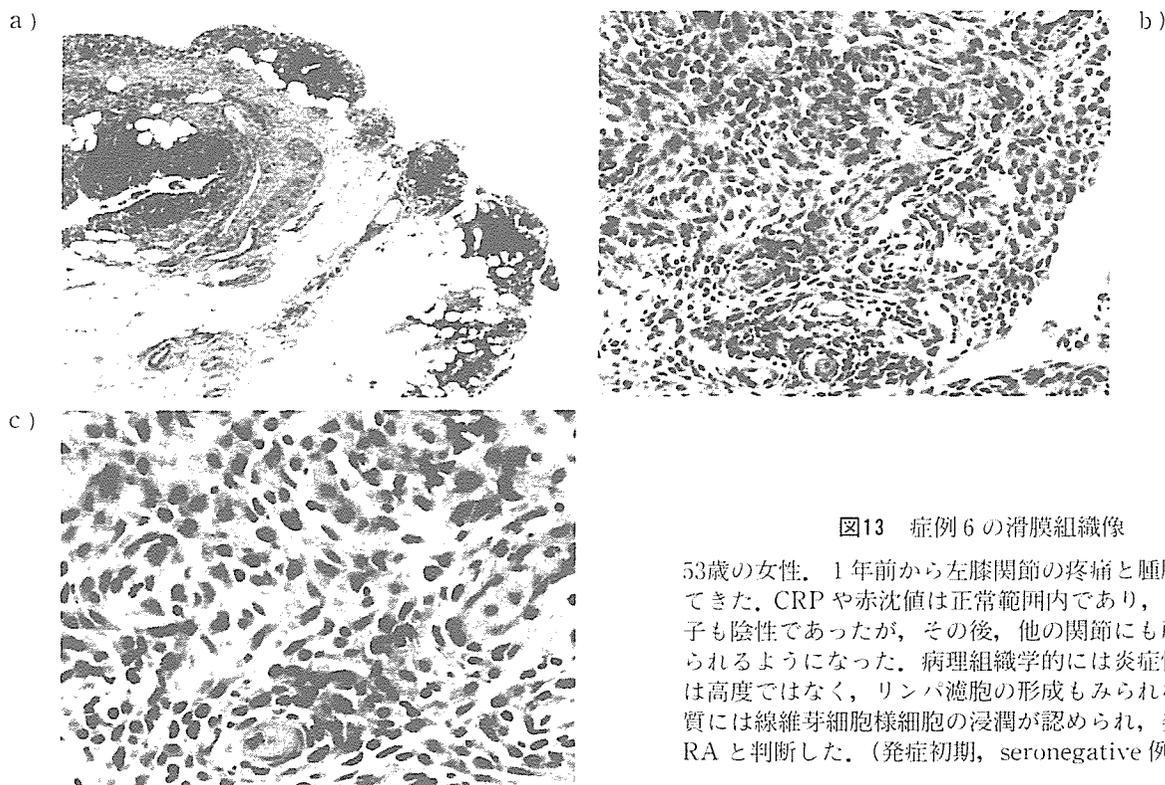


図13 症例6の滑膜組織像

53歳の女性。1年前から左膝関節の疼痛と腫脹が出現してきた。CRPや赤沈値は正常範囲内であり、リウマチ因子も陰性であったが、その後、他の関節にも所見が認められるようになった。病理組織学的には炎症性細胞浸潤は高度ではなく、リンパ濾胞の形成もみられないが、間質には線維芽細胞様細胞の浸潤が認められ、発症初期のRAと判断した。(発症初期, seronegative例)

病理組織像：滑膜細胞の多層化とリンパ球浸潤がみられるが炎症は軽度である。背景には線維芽細胞様細胞の浸潤が認められた。(発症初期例, seronegative)

鑑別が困難であった症例の特徴としては以下があげられる。

1. 単関節炎の症例が多い
2. Seronegative RAが多い
3. RAとしての発症初期例が含まれている
4. 変形性関節症が背景にあり、X線像はOA変化であるが、後からRAとしての所見がかぶってきた症例がある
5. 高齢発症の場合、典型的な経過や滑膜像を示さない場合がある

1や2の場合には臨床像がRAに典型的でなくても、組織学的には典型的なRA像である症例が比較的多い。一方、3や4、5の場合には臨床上も診断が難しいが、病理像も典型的ではない場合があり、鑑別が困難である症例が多い。このような場合には臨床的に十分な経過観察をおこなう必要があり、病理組織学的にもRAの滑膜所見として特徴的な線維芽細胞様細

胞の浸潤と骨破壊の有無がポイントとなる。しかし、実際にはRAともOAとも非特異的な炎症ともつかない像を示す症例があり、鑑別が非常に困難な症例も多い。また、上記の1や2のような症例については、時間がたてば典型的なRAに移行するのか、あるいはRAの特殊型なのか、などいまだに不明な点が多いが長期間にわたる追跡と多くの症例での検討が必要と思われる。

診断時の注意点

1. 検体の種類

RAの骨・関節領域の病理検体としては代表的なものに

- 1) 診断確定のための生検(針生検あるいは関節鏡下の生検)によるもの
 - 2) 滑膜切除術など治療のための手術によるもの
 - 3) 人工関節置換術など機能改善のための手術によるもの
- などがある。

当然ながら、1)の場合には他の疾患同様、診

断如何によって治療方針が変わってくる可能性がある。臨床像のみでの確定診断が困難な場合や他の関節炎との鑑別が必要な場合にこの生検が行なわれ、病理診断の結果は診断確定のために大いに参考になる情報である。ただし、この場合でも発症から1年未満の早期症例の病理診断は容易ではない。早期RAでは前述のように典型的な組織像を示さない場合が多く、鑑別すべき多数の疾患を考慮に入れる必要があるが、RAの初期滑膜像とこのような疾患の滑膜像は非常に似通っており、鑑別が難しい。

診断確定後の2)や3)の検体の場合にはRAではすでに内科的な治療が開始された後であり、炎症はある程度コントロールされている場合が多い。一般的な傾向としては1)は発症初期の炎症が軽度な場合が含まれているし、2)の場合は炎症が活発で滑膜の増生が高度である場合が多い。3)の場合は骨破壊のために関節の機能不全が生じ、それを改善するための手術であるが、人工関節の耐用年数の関係から高齢な患者に行なわれることが多い。そのためRAとしての疾患特異的な炎症所見に加えて加齢による変化、さらには関節の不安定性のために生じるOAの変化が加わっている場合が多く、組織像は複合的である。また、RAとしての炎症は内科的な治療によってある程度押さえられているにも関わらず関節の機能障害のために手術に至る場合もあるが、その場合にはリンパ球浸潤は軽度でリンパ濾胞の形成などもみられないことが多い。

2. 部位による違い

提出される関節部位は膝、股関節、肘関節、肩関節、手関節、足関節など様々である。この中で膝、股などの荷重関節においては、RAとしての変化に加えてOAによる変化も加わってくる。一方、肘や手関節などの非荷重関節ではそういった変化は加わりにくい。荷重関節においてOA様の骨や軟骨増生の所見が一部にみられても、それがRAを否定しうる所見とはならないことを考慮に入れる必要がある。荷重関節の手術ではOA様の変化や加齢変化が加わり、しかも炎症が内科的にコントロールされて

いる場合も多いので、必ずしも典型的な骨破壊像を示していない場合がある。

ま と め

1. RAの初期や線維化期の場合は典型的な滑膜組織像を示さないことが多い。
2. 臨床的に診断が困難な症例は病理組織像も典型的でない場合が多い。
3. 臨床像と病理組織像との間に乖離のある症例がある。
4. 滑膜の線維芽細胞様細胞はRAの特徴的な細胞である。

謝 辞

本研究にあたって、貴重な患者試料のご提供をいただいた東北大学医学部、東北労災病院、鳴子温泉病院(旧：国立鳴子病院)、東北厚生年金病院、岩手医科大学、独立行政法人国立病院機構盛岡病院(旧：国立療養所盛岡病院)、昭和大学に深謝いたします。

文 献

- 1) Firestein, G.S.: Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In; Textbook of Rheumatology, 5th edition (Kelley, W.N., et. al. ed.) p. 851-897, Philadelphia, W.B. Saunders, 1997.
- 2) Harris, E.D. Jr.: Clinical features of rheumatoid arthritis. In; Textbook of Rheumatology, 5th edition (Kelley, W. N., et. al. ed.) p. 898-932, Philadelphia, W.B. Saunders, 1997.
- 3) 松本不二夫, 宇月美和, 金子智香, 他: 急速破壊型股関節症(RDC)における関節組織でのMatrix Metalloproteinases (MMPs), Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs)の発現について —滑膜組織と骨破壊部の免疫組織化学的解析—. リウマチ, 37: 688-695. 1997.
- 4) 澤井高志, 大山 明, 村上一宏, 他: 慢性関節リウマチ滑膜初期病変の免疫組織化学的検討 —モノクロナル抗体を用いた炎症

- 性細胞の定性ならびに定量的解析. リウマチ, 30: 247-254, 1990.
- 5) 澤井高志, 宇月美和, 高橋裕一, 他: 炎症における蛋白分解酵素・サイトカインの発現について. 病理と臨床, 10: 1033-1040, 1992.
 - 6) 澤井高志: リウマチ性疾患の病理. 最新内科学大系. 免疫・アレルギー疾患 4 慢性関節リウマチ, p. 89-107, 東京, 中山書店, 1993.
 - 7) 澤井高志, 三上芳喜, 倉園普子: 慢性関節リウマチ (RA) の滑膜組織における ICAM-1 と LFA-1 の発現に関する免疫組織化学的研究. リウマチ, 34: 854-862, 1994.
 - 8) 澤井高志: 慢性関節リウマチの病態と発生機序. 現代病理学大系. 補遺 3, p. 165-178, 東京, 中山書店, 1996.
 - 9) 澤井高志, 宇月美和: 慢性関節リウマチ (RA) の病理. カレントセラピー, 17: 41-48, 1999.
 - 10) Schumacher, H.R. Jr.: Synovial fluid analysis and synovial biopsy. In; Textbook of Rheumatology, 5th edition (Kelley, W.N., et. al. ed.) p. 609-625, Philadelphia, W.B. Saunders, 1997.
 - 11) 宇月美和, 澤井高志: RA の関節破壊のメカニズムとその対策・病理学的側面より. Medical Practice, 13: 707-713, 1996.
 - 12) 宇月美和, 渡辺知幸, 桂 泰典, 他: 慢性関節リウマチ滑膜組織におけるヒアルロン酸 (HA) の分布と産生の定量的検索. 炎症, 18: 31-43, 1998.
 - 13) Whipple, T.L., Duval, M.J.: Arthroscopy and synovectomy. In; Textbook of Rheumatology, 5th edition (Kelley, W. N., et. al. ed.) p. 687-698, Philadelphia, W.B. Saunders, 1997.