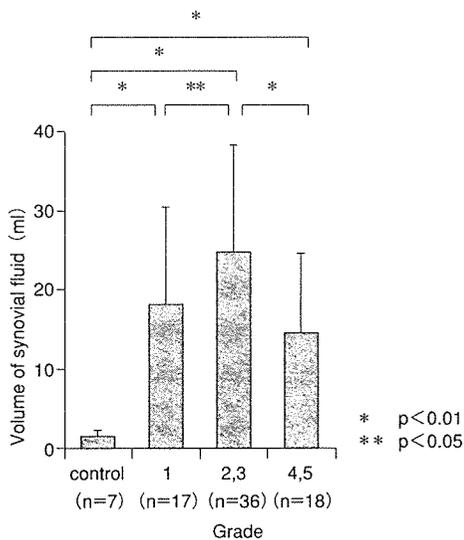


Fig. 4 . Relation of volume of synovial fluid, viscosity, HA concentration and total amount of HA in the synovial fluid of osteoarthritis

- a: Correlation between volume of synovial fluid and viscosity Volume of synovial fluid showed negative correlation with viscosity. ($r = -0.422, p < 0.01$)
- b: Correlation between HA concentration and viscosity HA concentration showed positive correlation with viscosity. ($r = 0.795, p < 0.01$)
- c: Correlation between volume of synovial fluid and total amount of HA Volume of synovial fluid showed correlation with total amount of HA. ($r = 0.805, p < 0.01$)



(Mann-Whitney U-test with Bonferroni Correction)

Fig. 5 . Comparison of volume of synovial fluid between normal synovial fluid and osteoarthritis

Volume of synovial fluid was significant decreased in end stage compared with middle stage of osteoarthritis.

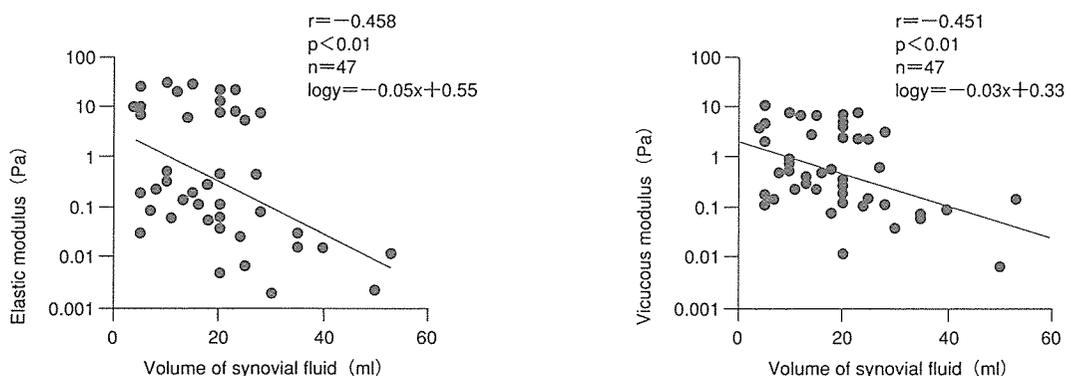


Fig. 6 . Correlation between volume of synovial fluid and viscoelasticity in the synovial fluid of osteoarthritis
Volume of synovial fluid showed negative correlation with elastic modulus and viscous modulus.

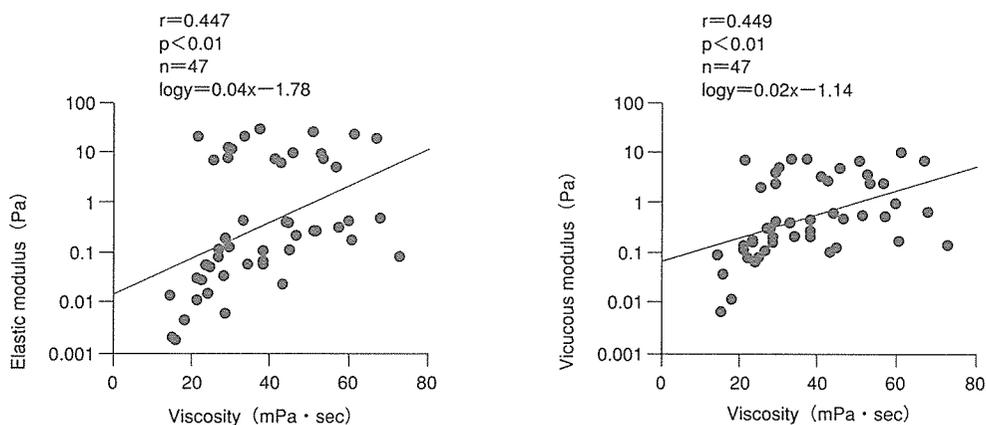


Fig. 7 . Correlation between viscosity and viscoelasticity in the synovial fluid of osteoarthritis
Viscosity showed positive correlation with elastic modulus and viscous modulus.

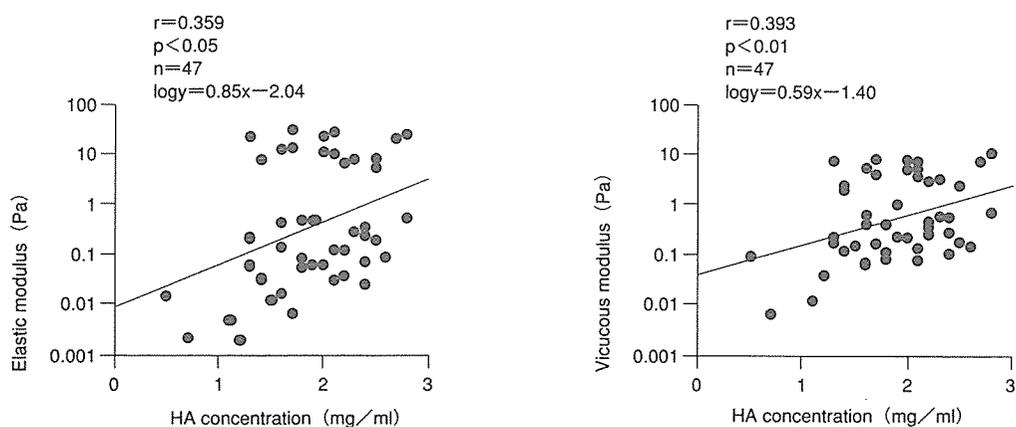
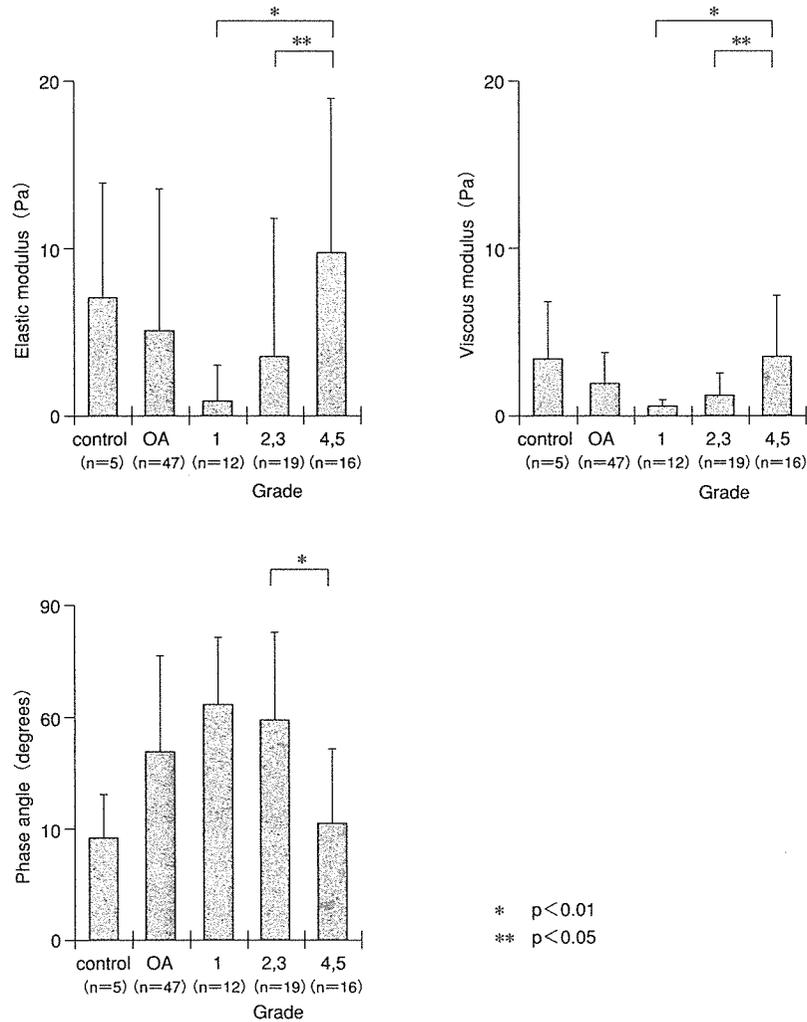


Fig. 8 . Correlation between HA concentration and viscoelasticity in the synovial fluid of osteoarthritis
HA concentration showed positive correlation with elastic modulus and viscous modulus.



(Mann-Whitney U-test with Bonferroni Correction)

Fig. 9. Comparison of viscoelasticity and phase angle in each stages of osteoarthritis. Viscoelasticity was significant increased in advanced stage compared with the early stage of osteoarthritis. The synovial fluid of advanced stage was similar to normal synovial fluid in phase angle. (normal: $27.8 \pm 11.1^\circ$, advanced stage of OA: $31.5 \pm 19.8^\circ$)

$p < 0.01$) (Fig. 6). 粘度と対数 G' , 対数 G'' との間に正の相関を認めた (G' : $r = 0.447$, $p < 0.01$, G'' : $r = 0.449$, $p < 0.01$) (Fig. 7). さらに, HA濃度と対数 G' , 対数 G'' との間に正の相関を認めた (G' : $r = 0.359$, $p < 0.01$, G'' : $r = 0.393$, $p < 0.05$) (Fig. 8). すなわちOAでは関節液量が増えるに従い関節液の粘弾性は低下し, 粘度, HA濃度の増加に伴い

粘弾性も上昇する傾向にあった. 粘弾性では弾性 (G'), 粘性 (G'')とも健常例がOAよりも増加していたが有意差は認めなかった. 位相差では末期群grade 4, 5 ($14.5 \sim 75.2^\circ$, 平均 $31.5 \pm 19.8^\circ$)が中期群grade 2, 3 ($17.2 \sim 88.1^\circ$, 平均 $59.2 \pm 23.6^\circ$)に比べて有意に低値を示した ($p < 0.01$) (Fig. 9).

Table 4. Comparison of property of hyaluronic acid in synovial fluid of controls and osteoarthritic patients

	normal			OA			
	Results in this study (n=7)	Namiki ²¹⁾ (n=12)	Okamoto ²⁰⁾ (n=74)	Results in this study (n=71)	Namiki ²¹⁾ (n=122)	Okamoto ²⁰⁾ (n=72)	Sato ²²⁾ (n=45)
HA concentration (mg/ml)	3.3±1.3	2.7±0.7	2.5	1.73±0.56	1.5±0.6	1.6	1.41±0.45
HA molecule weight (×10 ⁴)	531±61		650	370±103		460	251±71
Viscosity (mPa·s)	130.7±99.3		114	33.1±14.6		33.3	40±24

IV. 考 察

健常例およびOAの関節液のHA濃度, HA分子量, 粘度についてはいくつかの報告が見られるが, 我々の測定結果とほぼ同じ結果であり (Table 4) ²¹⁻²³⁾, HA濃度, HA分子量, 粘度は健常例がOAより高値であったが, 健常例の検体数が少ないため有意差は認められなかった. また, 関節液量, HA濃度, HA分子量, 総HA量, 粘度のそれぞれの相関についても健常例では年齢とHA濃度に負の相関 ($r=-0.984$, $p<0.01$) ^{13, 24)} を認め, 関節液量と総HA量に正の相関 ($r=0.809$, $p<0.05$), HA濃度と粘度に正の相関 ($r=0.962$, $p<0.01$), 粘度と年齢に負の相関 ($r=-0.998$, $p<0.01$) を認めた. すなわち健常例の関節液では粘度はHA濃度の影響を受けるのに対して, 関節液量やHA分子量の影響は受けていないことが明らかになった. また, HA濃度と粘度は加齢とともに減少していくことが示された. さらにOAでもこれまでの報告と同様にHA濃度と粘度に正の相関 ($r=0.795$, $p<0.01$) ^{13, 24, 25)}, 関節液量と総HA量に正の相関 ($r=0.805$, $p<0.01$) ²⁶⁾, 関節液量と粘度に負の相関 ($r=-0.422$, $p<0.01$) ¹³⁾ を認めた. これらの結果よりOAでは関節液量が多いため関節液中に含まれる総HA量は増加するが, HA濃度としては減少するため粘度は低下する. 粘度とは液体の粘りの度合を表

す指標であるが, OAのような病的状態ではHA濃度と関節液量に大きく影響を受けていることが証明された.

一方, 物質の変形と流動を表すものが粘弾性であり, 粘性と弾性に別けて考えられている. 粘弾性について簡単に説明すると, ある物質に力をかけると瞬間的に伸縮したりたわんだりと変形するものの力をかけるとやめると元の形に戻る. このような性質を弾性といい, ゴムやボールのようなものがあてはまる. これに対して, ハチミツや水飴のように粘り気のある液体 (粘性流体) は力をかけた時, その応力により変形が生じ, 力を抜いても元に戻らない様な性質を粘性といい, これら弾性と粘性の性質を併せて粘弾性という. この粘弾性の測定にはレオメーターが用いられ, 平円板または円錐板に往復回転による正弦振動をあたえることにより, この時の応力とサンプルの変形の差が位相差として表される. 位相差では 0° が理想的弾性体を表し, 90° が理想的粘性体を表している.

関節液は粘性と弾性の両方の性質を併せ持っている. 歩行のような低速の関節運動に際しては粘性による潤滑作用が優位となり, スポーツ時のような急速な運動に対しては弾性による衝撃緩衝機能が優位となるが, その粘性と弾性はいずれも加齢とともに低下する^{24, 25)}. Balazsら²⁷⁾ は, 正常膝関節液において弾性

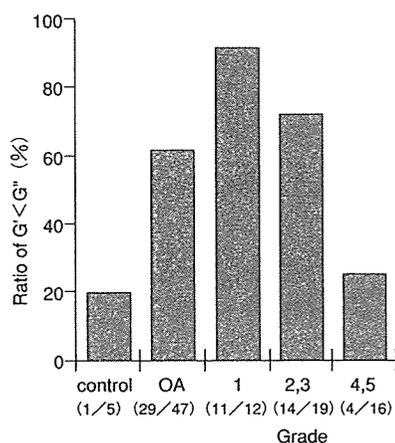


Fig. 10. Ratio of $G' < G''$ in stage of osteoarthritis

(G') と粘性 (G'') の交差する点に着目し、低周波数領域のゆっくりした運動時には粘性が支配的であり、高周波数領域では弾性が強く働くと述べている。それは、ちょうど歩行時と走行時の状態に相応する。また、遠藤²⁸⁾らは変形性関節症の関節液では、どの周波数帯でも G'' の占める割合が高く、 G' は低下していると述べている。しかし、今回の研究では歩行程度の速度である0.5 Hzにおいて G' が G'' よりも低下していた症例の数はOA膝関節液の47検体中29検体 (61.7%) と約6割で、あとの約4割は弾性が優位の状態であった。OA経過分類別には初期群grade 1が11/12 (91.7%)、中期群grade 2, 3が14/19 (72.1%)、末期群grade 4, 5が4/16 (25%) とOAでは一概に弾性が粘性よりも低下するわけではなく初期、中期では粘性が優位 ($G' < G''$) となる関節液の割合が増えるものの、末期になると逆に粘性よりも弾性が優位 ($G' > G''$) となる関節液の割合が多くなった (Fig. 10)。つまりOA経過分類にわけて粘弾性、位相差を比較すると、OAの初期、中期には粘性が優位となるものの、末期では弾性が優位に変化していく傾向にあった。

OAでは関節内での滑膜などからのHA産生が亢進する一方、関節内炎症が血液-滑膜関

門 (blood-synovial barrier, 以下, BSB) の崩壊を引き起こし、血管透過性が亢進することにより関節液量が増加して相対的なHA濃度の低下が生じ^{29, 30)}、それが弾性の低下に結びついているものと思われる。OAの病態をHAと関節液の性状の側面から考えてみると、OA初期には軽微な軟骨損傷あるいは加齢変化などで生じた軟骨のdebrisが関節内の滑膜の炎症を起こし、OAの中期にかけて関節水症が徐々に進行する。そのためHA濃度が低下し、関節液の弾性が低下する。その結果、関節液の軟骨保護機能である潤滑性と緩衝性が損なわれ、OAが一層進行すると推測された。そして末期に関節のBSBが再構築されるにしたがい関節液量が減少し相対的に弾性が増加していくと考えられた。勿論、関節の破壊を関節液中のHA濃度や関節液の性状からだけ論じるわけにはいかないが、関節液中の成分、特にHA濃度の変化に伴う粘度や粘弾性の変化がOAの進行に対して大きな影響を与えていることが証明された。

V. まとめ

1. OA 68例71膝、健常例7例7膝に対し、膝関節液のHA濃度、分子量、粘度、粘弾性の測定をおこない病期別に比較検討した。
2. OAではHA濃度、分子量、粘度、粘弾性において健常例より低値であった。
3. OAにおいて関節液の粘度、粘弾性は関節液中のHA濃度に強い影響を受け変化することが明らかとなった。
4. OAの初期、中期では関節液の粘弾性は粘性優位となるが末期では弾性優位となる傾向を認めた。

本研究に際し多大な御協力をいただきました電気化学工業株式会社総合研究所、三好照三氏、前田和章氏ほか研究員各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 福田 明, 中村耕三: 変形性膝関節症の疫学-臨床疫学研究の文献的考察. 別冊整形外科 42, 2-6, 2002.
- 2) Fujii K, Kuboki Y and Sasaki S: Aging of human bone and articular cartilage collagen. Changes in the reducible cross-links and their precursors. *Gerontology* 22, 363-370, 1976.
- 3) Mankin HJ: Current concepts review. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg* 64-A, 460-466, 1982.
- 4) Hashimoto S, Setareh M and Ochs R L, et al.: Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 40, 1749-1755, 1997.
- 5) Westacott CI, Whicher JT, Barnes IC, et al.: Synovial fluid concentration of different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 49, 676-681, 1990.
- 6) Hirano T, Matsuda T, Turner M, et al.: Excessive production of interleukin-6/B cell stimulator factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 18, 1797-1801, 1988.
- 7) Houssiau FA, Devogelaer JP, Damme JV, et al.: Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 31, 784-788, 1988.
- 8) Hutadilok N, Smith MM and Gosh P: Effects of hydrogen peroxide on the metabolism of human rheumatoid and osteoarthritic synovial fibroblasts in vitro. *Ann Rheum Dis* 50, 219-226, 1991.
- 9) 福田寛二: ヒアルロン酸の軟骨保護作用. 関節外科 24, 32-36, 2005.
- 10) Fukuda K, Dan H, Saitoh M, et al.: Superoxide dismutase inhibits interleukin-1-induced degradation of human cartilage. *Agents actions* 42, 71-73, 1994.
- 11) Fukuda K, Takayama M, Ueno M, et al.: Hyaluronic acid inhibits interleukin-1-induced superoxide anion in bovine chondrocytes. *Inflamm Res* 46, 114-117, 1997.
- 12) 立石博臣: 関節液の液性成分と細胞検査. 臨床検査MOOK 20, 178-186, 1985.
- 13) 近藤 仁: 正常および病的ヒト関節液の粘性に関する研究 とくに粘性変化に関する因子と潤滑への影響について. 北里医大 10, 485-498, 1980.
- 14) 腰野富久: 膝診療マニュアル, 2版, p. 166, 医歯薬出版, 東京, 1988.
- 15) Bitter T and Muir H: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 4, 330-334, 1962.
- 16) 近藤孝司, 秩父賢司, 臼杵浩志, 他: 血中ヒアルロン酸の簡易測定法. 臨床病理 36, 536-540, 1991.
- 17) Tengblad A: Affinity chromatography on immobilized hyaluronate and its application to the isolation of hyaluronate binding proteins from cartilage. *Biochem Biophys Acta* 578, 281-289, 1979.
- 18) Reissig JL, Strominger JL and Leloir LF: A modified colorimetric method for the estimation of n-acetylamino sugars. *J Biol Chem* 217, 959-966, 1955.
- 19) 宮地 勳, 小國大作: ヒアルロン酸ナトリウムの極限粘度の測定. 薬理学 44, 88-93, 1984.
- 20) 並木 脩: 関節液とヒアルロン酸の病態生理. 医療 37, 247-254, 1983.
- 21) 岡本彰夫: ヒアルロン酸および関節液. 日本バイオレオロジー学会誌 13, 168-174, 1999.
- 22) 並木 脩: 正常関節液の構成成分と代謝. 関節外科 15, 31-39, 1996.
- 23) 佐藤正夫, 葛西千秋, 竹村正男, 他: 変形性関節症及び慢性関節リウマチの膝関節液分析. 中部整災誌 38, 119-120, 1995.
- 24) 小島隆史, 北爪伸仁, 池田貴英, 他: 正常および変形性関節症の関節液の粘度、生化学的検討とくに加齢変化について. 東京膝関節会誌 18, 11-15, 1997.
- 25) 塚本行男, 山本 真, 馬淵清資: 粘性・潤滑. 整形外科MOOK 32, 9-17, 1984.
- 26) 上坂真司, 中山義人, 藤井信人, 他: 変形性関節症における関節液の生化学的分析. 臨床所見, X線学的評価ならびに血液所見との関連について. 東京膝関節会誌 18, 16-20, 1997.
- 27) Balazs EA, Watson D, Duff IF, et al.: Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluid. *Arthritis Rheum* 10, 357-376, 1967.
- 28) 遠藤太刀男, 八木英憲, 小島隆史, 他: 変形性膝関節液の粘弾性挙動に基づく実験的考察. 日臨バイオメカ会誌 19, 235-252, 1998.
- 29) 浜西千秋: 血液-滑膜関門. 整形外科MOOK 32, 58-70, 1984.
- 30) 浅利 晃: 基礎からみたヒアルロン酸と滑膜・軟骨. 関節外科 24, 16-22, 2005.

Alteration of hyaluronic acid property in synovial fluid of patients with osteoarthritis

Jun KAIYAMA^{1, 2)} and Miwa UZUKI¹⁾

¹⁾ Department of Pathology I, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

²⁾ Department of Orthopedics, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on October 5, 2005 & Accepted on January 11, 2006)

Abstract

Synovial fluid supports chondral bone nutrition and keeps the joint function of cushioning and lubrication normal. In addition, it serves a defensive function in response to the physical stress occurred in aging and exercise processes. However, the property of synovial fluid is changed in joint diseases such as osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA), and the above cushioning and lubrication functions are thought to be impaired. The aim of this study is to elucidate the changes in the property of hyaluronic acid (HA), represented by the concentration, molecular weight, viscosity and viscoelasticity of the synovial fluid in patients with OA, which may be

closely associated with joint destruction. Synovial fluids examined in this study were obtained from 71 knees of 68 patients. HA concentration was measured by color metric assay using the Morgan-Elson method. HA molecule weight was demonstrated by the GPC-MALLS method. Viscosity and viscoelasticity were measured by rheometer. The synovial fluid of OA was lower than normal synovial fluid in HA concentration, molecule weight and viscosity of HA. The viscoelasticity was increased in the advanced stage compared with the early stage of OA. Viscosity and viscoelasticity of OA were significantly influenced by HA concentration.

Downregulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor-alpha and actinomycin D

Dr F. Yoshimura M.D.†‡, Dr H. Kanno M.D., Ph.D.†*, M. Uzuki M.D., Ph.D.†,

K. Tajima M.D., Ph.D.‡, T. Shimamura M.D., Ph.D.‡ and T. Sawai M.D., Ph.D.†

† Department of Pathology, Iwate Medical University School of Medicine, Morioka, Japan

‡ Department of Orthopaedic Surgery, Iwate Medical University School of Medicine, Morioka, Japan

Summary

Objective: Apoptosis of chondrocytes plays a pivotal role in cartilage degeneration. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a proinflammatory cytokine and has been assumed to cause the degradation of human cartilage. To investigate the mechanisms of TNF- α -mediated apoptosis of human chondrocytes from a point of view of the balance between the caspase-cascade and the expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), although both of them are induced with TNF-signals.

Methods: The expression of TNF-receptors (TNF-Rs) in normal human articular chondrocyte (NHAC-kn) was examined with immunocytochemistry. Subconfluent cultures of NHAC-kn were tested with TNF- α and/or actinomycin D (actD), and the induction of apoptosis was evaluated by the frequency of apoptotic cells visualized with nuclear staining using Hoechst 33342. The activation of caspases and the expression of IAPs were examined with Western blot analyses.

Results: NHAC-kn expressed TNF-R1 and -R2. When NHAC-kn was treated with TNF- α (10 ng/ml) and actD (0.2 μ g/ml) for 24 h, the frequency of apoptotic cells increased to more than 25%. TNF- α alone, however, induced the apoptosis insufficiently (up to 8.3%), even when used at the concentration of 100 ng/ml for 48 h. In apoptotic human chondrocytes induced with TNF- α (10 ng/ml) and actD (0.2 μ g/ml), the caspase-3, -8, and -9 were activated and the protein expression of XIAP and c-IAP1 decreased.

Conclusions: In apoptotic human chondrocytes induced with TNF- α and actD, the balance between caspase activation and IAPs' expression lay with the executioner caspase (caspase-3) and led to decreased expression of XIAP and c-IAP1.

© 2005 OsteoArthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Chondrocyte, Apoptosis, Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), Actinomycin D, Inhibitor of apoptosis proteins.

Introduction

Apoptosis of chondrocytes plays a pivotal role in cartilage degeneration. The apoptosis of chondrocytes is observed in the cartilage of patients of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA)^{1,2}. Various stimuli such as nitric oxide (NO) and Fas-signals induce the apoptosis in chondrocytes^{3,4}. Proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) have been assumed to cause the degradation of human cartilage^{5,6}. TNF- α is a multifunctional cytokine that initiates a wide variety of biological responses, and as one of these functions, may play a role in the course of apoptosis of chondrocytes. Nowadays, several anti-TNF- α therapies have been reported to be effective on RA^{7,8}. Although there are a few reports describing TNF- α -mediated apoptosis of human chondrocyte, the detailed signaling mechanisms are still unknown^{9–12}.

Through binding to the major TNF-receptor (TNF-R), TNF-R1, TNF- α activates two intracellular signaling pathways. One is apoptosis pathway involving caspase-cascade, and the other is anti-apoptosis survival signals, an opposite function, mediated by nuclear factor- κ B (NF- κ B)^{13,14}. As the outcome of opposite signals, many cellular lineages, including chondrocyte, are resistant to programmed cell death mediated by TNF superfamily, including TNF- α , Fas, and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)^{9–12,15–18}. These cells, however, undergo apoptosis in the presence of actinomycin D (actD), which inhibits DNA-dependent RNA polymerases^{10,12,15–18}. At low concentration (less than 0.1 μ g/ml) actD induces the segregation of the nucleolar components and impairs r-RNA synthesis, and the treated cells display the early apoptosis features. When used at high concentration (more than 1 μ g/ml), on the other hand, actD induces massive apoptosis¹⁹. In many cellular lineages except chondrocytes, TNF superfamily in combination with actD inhibits NF- κ B activation¹⁵, increases the expression of Fas-associating death domain (FADD)¹⁶, and downregulates FADD-like IL-1 converting enzyme (ICE) (FLICE)-inhibitory protein (FLIP)¹⁷ and survivin expression¹⁸. In apoptotic human chondrocytes induced with TNF- α in combination with actD, on the other hand, the caspases and c-Jun N-terminal kinase (JNK) are activated, but the activation of NF- κ B is not inhibited^{10,12}. Furthermore, actD alone does not affect the

*Address correspondence and reprint requests to: Dr Hiroyuki Kanno, M.D., Ph.D., Department of Pathology, Iwate Medical University School of Medicine, 19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505, Japan. Tel: 81-19-651-5200; Fax: 81-19-651-9246; E-mail: hirokan@iwate-med.ac.jp

Received 29 September 2005; revision accepted 7 November 2005.

expression of apoptosis-related protein (Bcl-2, Bax, FLIP)¹⁰. But there are many still unidentified points about the details of an apoptosis-related signal.

Nowadays, inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) has been identified as a new category of regulators of apoptosis. In 1993, the first IAP's family member was identified in SF21 insect cells²⁰. XIAP is identified in a search for mammalian genes homologous to the insect IAPs²¹, which binds and inhibits caspase-3, -7, and -9 with nanomolar affinity, but does not bind and inhibit caspase-8^{22,23}. XIAP also activates NF- κ B through the phosphorylation and degradation of I- κ B²⁴. c-IAP1 and c-IAP2 are identified as the proteins interacting with TNF-R-associated factors (TRAFs), which are signaling complexes on the cytoplasmic tail of the second TNF-R, TNF-R2²⁵. These two IAPs bind and inhibit caspase-3, -7, and -9, albeit less strongly than XIAP²². TNF- α -induced anti-apoptotic signals through both TNF-R1 and TNF-R2 require the interaction between c-IAPs and TRAFs^{26,27}, and then, activate NF- κ B. Furthermore, the activation of NF- κ B induces expression of XIAP, c-IAP1 and c-IAP2^{26,28}. Therefore, this pathway would work as positive feedback mechanism on the inhibition of TNF- α -induced apoptotic signals.

In the current study, we investigated the mechanisms of TNF- α -mediated apoptosis of human chondrocytes from points of view of the expression of TNF-R, the identification of apoptosis by morphologic examination, and the activation of caspase-cascade. Furthermore, we examined the change of expression of IAPs in human chondrocytes in the course of apoptosis induced with the TNF- α and actD.

Materials and methods

CELL CULTURE AND REAGENTS

Normal human articular chondrocyte (NHAC-kn) was purchased from Cambrex (Walkersville, MD). The cells were cultured in the growth medium specifically supplied by the manufacturer. Recombinant human TNF- α was purchased from Pepro Tech (London, UK). actD was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

IMMUNOCYTOCHEMICAL DETECTION OF TNF-R

NHAC-kn was cultured in 2-well Lab-Tek chamber slides (Nalge Nunc International, Naperville, IL), and fixed in acetone at room temperature for 10 min. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), incubated in 10% normal horse serum (Vector laboratories Inc., Burlingame, CA) in PBS at room temperature for 30 min, and then incubated with primary antibodies at 4°C overnight. Primary antibodies used in this study were mouse monoclonal anti-human TNF-R1 (Austral Biologicals, San Ramon, CA) and TNF-R2 (Austral Biologicals). After washing with PBS, slides were dipped in 0.3% H₂O₂ for 30 min, and washed with PBS again, and cells were incubated with 2% biotinylated anti-mouse-IgG made in horse (Vector laboratories Inc.) at room temperature for 30 min. After washing with PBS, cells were further incubated with ABC kit (Vector laboratories Inc.) at room temperature for 30 min, and signals were generated with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride.

NUCLEAR STAINING WITH HOECHST 33342

Subconfluent culture of NHAC-kn in 6-well culture plates was used. After the treatment with apoptosis-inducing

reagents for indicated time periods, Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) was added to the culture at the final concentration of 20 μ g/ml.

After incubation at 37°C for 30 min, cells were examined under fluorescence microscopy and fragmented apoptotic nuclei were identified. In each preparation, 300 cells were examined and apoptosis rates were calculated.

IMMUNOBLOT ANALYSIS

Subconfluent culture of NHAC-kn in 10 cm culture dishes was tested with 10 ng/ml of TNF- α and/or 0.2 μ g/ml of actD for 24 h in total. Cells were detached with 0.025% of trypsin and 0.01% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), counted by using trypan-blue dye exclusion, and collected by centrifugation at 7000 rpm for 5 min. Cells were lysed in Tris-NaCl-EDTA (TNE) buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50-fold diluted protease inhibitor cocktail for use with mammalian cells (P8340; Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100], incubated at 4°C for 30 min with gentle rotation, sonicated, and followed by further incubation at 4°C for 30 min. The cell lysates were mixed with the equal volume of 2 \times Laemmli sample buffer with 2-mercaptoethanol, and boiled for 5 min. Cell lysates were separated in 12% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Hybond-P; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). After incubation in 5% nonfat dried milk in Tris-buffered saline (TBS), pH 7.6 containing 0.1% Tween 20 (TBST) at room temperature for 2 h. Membranes were incubated with primary antibodies at 4°C overnight or at room temperature for 1 h. Antibody solutions used in this study were mouse monoclonal antibody to β -actin (Sigma-Aldrich) and rabbit polyclonal antibody to human c-IAP1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) diluted with 5% bovine serum albumin (Fraction V; Sigma-Aldrich) in TBST, and mouse monoclonal antibodies to human caspase-8 (Cell Signaling, Beverly, MA) and to human XIAP (BD Biosciences, San Diego, CA), and rabbit polyclonal antibodies to human caspase-3, caspase-9 (Cell Signaling) and to human c-IAP2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted with solution-1 (Can get signal; Toyobo, Tokyo, Japan). After washing with TBST, membranes were incubated at room temperature for 1 h with horseradish peroxidase (HRP)-linked F(ab')₂ fragment of anti-mouse immunoglobulins (Igs) made in sheep (Amersham Biosciences) or with HRP-linked F(ab')₂ fragment of anti-rabbit Igs made in donkey (Amersham Biosciences). After washing with TBST and subsequently with TBS, signals were generated with ECL Plus detection reagents (Amersham Biosciences) by chemiluminescence and exposed at room temperature according to the protocols suggested by the manufacturer.

Results

EXPRESSION OF TNF-R1 AND TNF-R2 IN CHONDROCYTE

Before investigating the effects of TNF- α on human chondrocytes, we examined the expression of TNF-Rs in human chondrocytes by immunocytochemistry. Figure 1(a and b) shows the expression of two TNF-Rs, TNF-R1 and TNF-R2, in cultured human chondrocytes. The receptors are diffusely expressed in the cytoplasm, which is probably consistent with the localization of membrane receptors. Slides treated without the primary antibody exhibited no staining (results not shown).

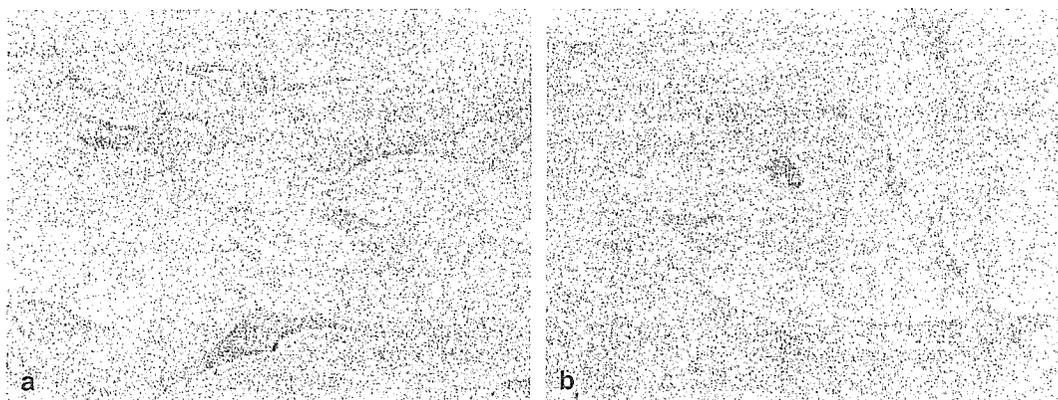


Fig. 1. Immunostaining for TNF-R1 (a) and TNF-R2 (b) of human cultured chondrocytes. Positive staining is visible in cytoplasm of all cells.

APOPTOSIS INDUCED BY TNF- α AND actD

When we treated, at first, the cultured chondrocytes with TNF- α alone at the concentration of up to 100 ng/ml for 24 h, the frequency of the cells with apoptosis features was low, up to 7.0%, and further reached to 8.3% with longer incubation periods up to 48 h [Figs. 2(a) and 3(a)]. Thus, this apoptosis-inducing protocol was insufficient for further biochemical analyses.

Therefore, we tested the combination of TNF- α and actD as an apoptosis-inducing stimulation. We added actD to the cell culture, incubated for 2 h, and further added TNF- α ¹⁰. After 22 h incubation, 24 h in total as for actD treatment, the cells were examined for apoptotic features with Hoechst 33342 staining. The apoptosis-promoting effects of actD were negligible at the concentration of 0.02 μ g/ml. The frequency of apoptosis significantly increased to more than 25% used at 0.2 μ g/ml [Figs. 2(b) and 3(b)]. The cells were almost completely broken when treated with 2 μ g/ml actD and 10 or 100 ng/ml TNF- α , thus the frequency of apoptosis was not exactly calculated. From these results, we selected the conditions of apoptosis induction, 10 ng/ml of TNF- α and 0.2 μ g/ml of actD for 24 h in total, for the following experiments.

COMBINATION OF TNF- α AND actD INDUCES CASPASE CLEAVAGE

Activation of the cascade of caspase proteases is the major arm of the apoptotic machinery, because caspases are responsible for cleavage and degradation of important intracellular proteins. To determine whether the treatment of chondrocyte with TNF- α and actD causes activation of caspases, we performed Western blot analyses for the initiator caspases (caspase-8, -9) and executioner caspase (caspase-3) using antibodies recognizing both the pro-form and cleaved forms of these caspases. As shown in Fig. 4, TNF- α in combination with actD induced the cleavage of the 57-kDa procaspase-8 in human chondrocytes, and increased the accumulation of its cleaved forms of 43-, 41-, and 18-kDa. On the other hand, neither TNF- α nor actD alone induced the cleavage of procaspase-8. As for caspase-9, TNF- α in combination with actD induced the cleavage of the 47-kDa procaspase-9, and we observed its 37- and 35-kDa cleaved forms. Neither TNF- α nor actD alone did cause the cleavage of procaspase-9. Furthermore, as for executioner caspase (caspase-3), treatment with TNF- α in combination with actD causes the cleavage of the 32-kDa procaspase-3 to its 19- and 17-kDa cleaved

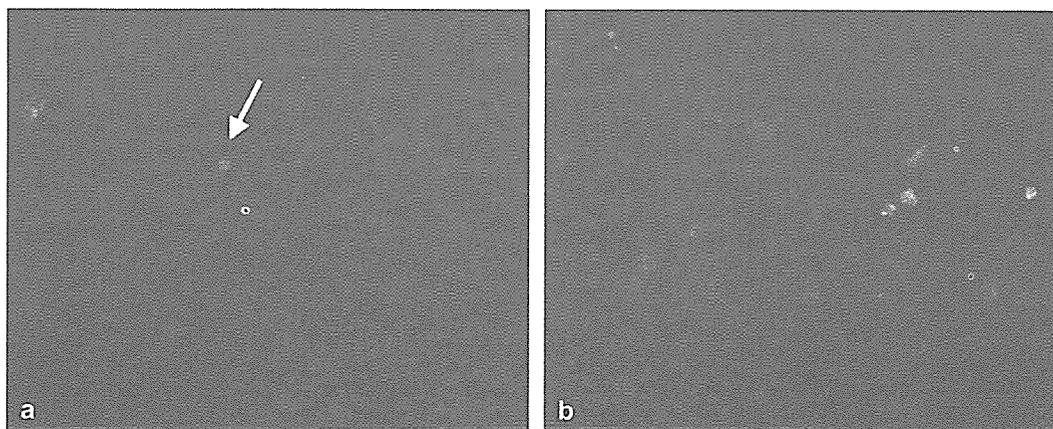


Fig. 2. Hoechst 33342 staining of chondrocytes incubated with 10 ng/ml of TNF- α (a), and with 10 ng/ml of TNF- α and 0.2 μ g/ml of actD (b) for 24 h. One cell shows chromatin condensation (arrow) (a). Chromatin condensation and fragmentation are visible, indicating definite apoptosis (b).

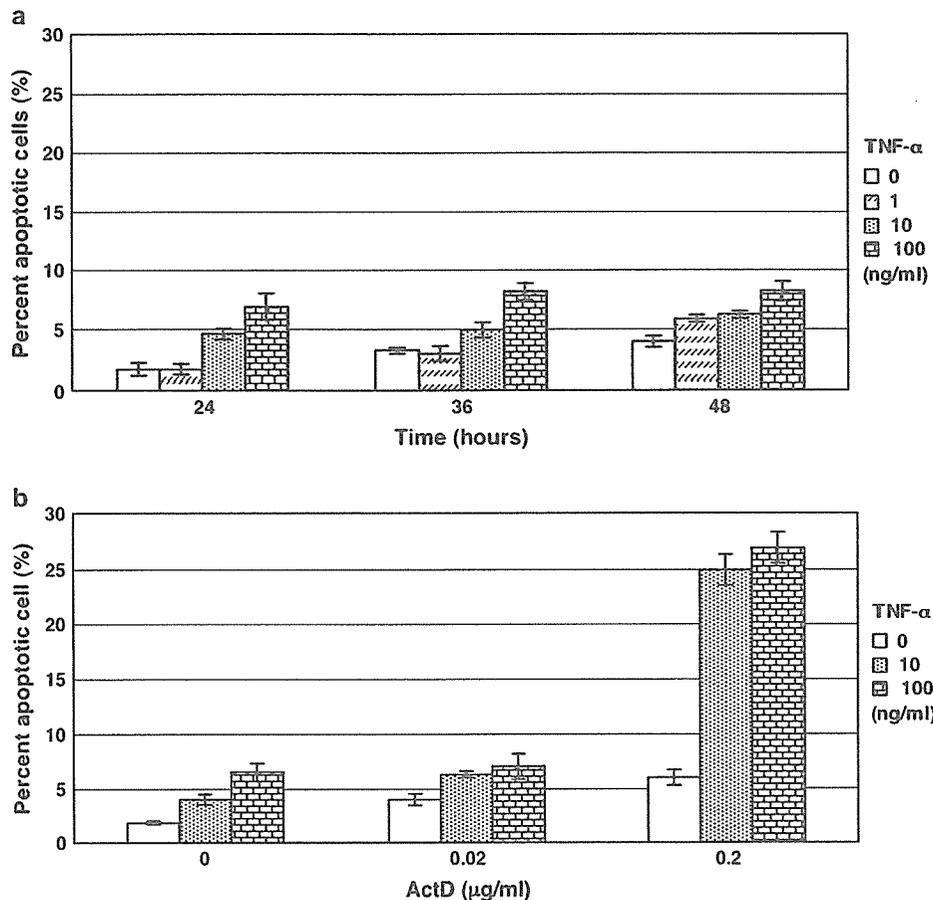


Fig. 3. Apoptosis-inducing effect of TNF- α and/or actD on human chondrocytes. Effect of TNF- α alone at different time points (a) and those of TNF- α in combination with actD at 24 h (b). After the indicated treatment, the cells were stained with Hoechst 33342 and percent apoptotic cells were calculated as described in Materials and methods. Results were presented as mean \pm s.d. of duplicate wells of three independent experiments.

forms. Neither TNF- α nor actD alone did cause the cleavage of procaspase-3.

DECREASED PROTEIN EXPRESSION OF THE IAPS BY TNF- α IN COMBINATION WITH actD

IAP family proteins play a critical role in the inhibition of caspase-dependent cell death by binding to caspases. We examined the alteration of protein expression of the IAPs' families during TNF- α -induced apoptosis of human chondrocyte. The protein expression of the XIAP (57-kDa) and c-IAP1 (68-kDa) decreased by the 24-h treatment of TNF- α in combination with actD. TNF- α alone, on the other hand, slightly upregulated the expression of these two IAPs. In contrast, the treatment of TNF- α in combination with actD rather increased c-IAP2 (66-kDa) in human chondrocytes (Fig. 5).

Discussion

This is the first report describing the change of expression of IAPs in chondrocytes during the course of apoptosis induced with TNF- α and actD. In combination with actD, TNF- α -mediated signals decreased the expression of XIAP and c-IAP1 in human chondrocytes and led to apoptosis, while TNF- α -mediated activation of NF- κ B signaling increases the expression of IAPs in other cell lineages^{26,28}.

Human chondrocytes express TNF-Rs^{6,29}. In previous reports describing TNF- α -mediating apoptosis of chondrocytes, however, the expression of TNF-Rs is not examined⁹⁻¹². In our apoptosis-inducing system, the cultured chondrocytes clearly expressed TNF-R1 and -R2, and thus, the TNF- α -signaling would be effective in our system.

We examined the activation of initiator caspases (caspase-8, -9) and executioner caspase (caspase-3) by Western blot analyses. Kim and Song reported that the apoptosis of human chondrocytes is induced through caspase activation, not inhibition of NF- κ B activation by treatment with TNF- α and actD¹⁰. However, this report describes only the activation of caspase-3. In our current study, we demonstrated the activation of caspase-3, -8, and -9 during apoptosis induced by TNF- α and actD.

In nonchondrocyte cells, TNF- α signal activates NF- κ B, resulting in the increased expression of IAPs^{26,28}. IAPs suppress the activation of caspase-3, and lead to the inhibition of apoptosis^{22,23}. Activated caspase-3, on the other hand, degrades XIAP and c-IAP1^{25,30,31}. Therefore, the balance between the activation of caspase-3 and the expression level of XIAP and c-IAP1 would be a critical factor determining the fate of cells stimulated with TNF- α (Fig. 6). In our apoptosis-inducing system using actD, the balance lay with the activation of caspase-3 and led to decreased expression of XIAP and c-IAP1 proteins (Figs. 4 and 5). Since the activation of caspase-3 is

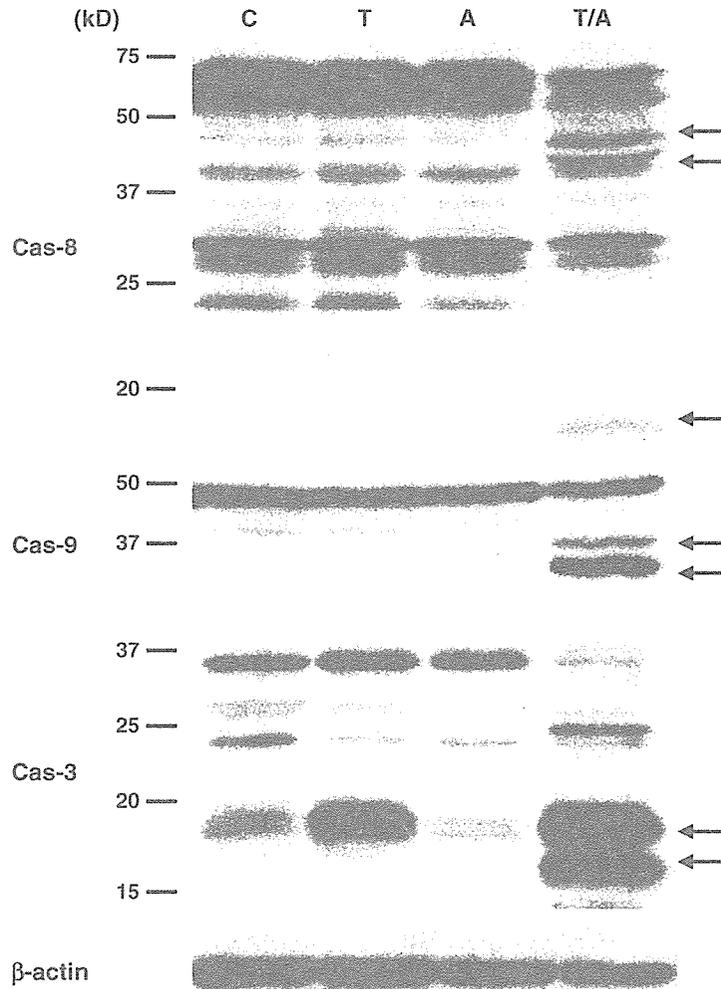


Fig. 4. Western blot for caspase-8, -9, and -3. Four hundred microliters of cell lysates was prepared from 4×10^6 cells, and a 30 μ l aliquot of each sample was applied to each wall. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane, incubated with anti-caspase antibodies, and visualized as described in Materials and methods. The positions of molecular size markers are indicated (in kDa) on the left. Chondrocytes treated with TNF- α in combination with actD contain the cleaved form of caspases (arrows). C, medium only; T, TNF- α (10 ng/ml); A, actD (0.2 μ g/ml); T/A, TNF- α (10 ng/ml) and actD (0.2 μ g/ml); and Cas, Caspase.

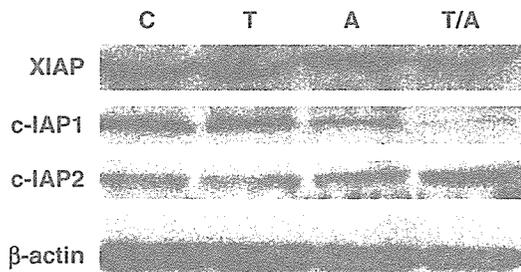


Fig. 5. Western blot for XIAP, c-IAP1, and c-IAP2. Four hundred microliters of cell lysates was prepared from 4×10^6 cells, and a 30 μ l aliquot of each sample was applied to each wall. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane, incubated with anti-caspase antibodies, and visualized as described in Materials and methods. The amount of XIAP and c-IAP1 in apoptosis-induced chondrocytes decreases, and that of c-IAP2, on the other hand, rather increases. C, medium only; T, TNF- α (10 ng/ml); A, actD (0.2 μ g/ml); and T/A, TNF- α (10 ng/ml) and actD (0.2 μ g/ml).

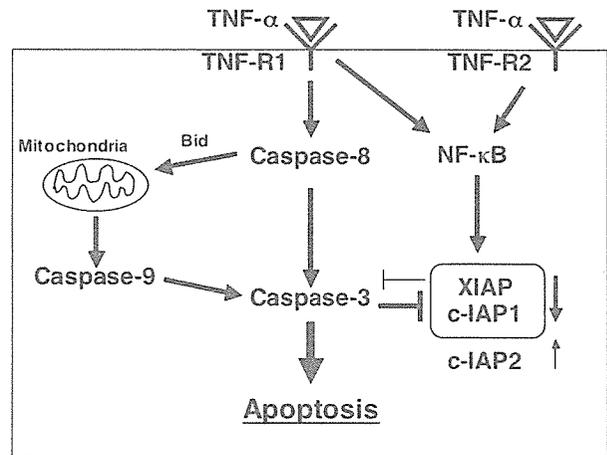


Fig. 6. Schematic diagram of TNF- α -induced apoptotic signals in human chondrocytes.

due to the activation of caspase-8 in our system (Figs. 4 and 6), activation of caspase-8 would be the pivotal event in the apoptosis induced with additional actD treatment. Because the caspase-9 was also activated in apoptotic chondrocytes (Fig. 4), the activation of initiator caspases would be critical in TNF- α -induced apoptosis of human chondrocytes. The mechanisms in which actD promotes the activation of initiator caspases in the presence of TNF- α are still unknown. In contrast with XIAP and c-IAP1, the protein expression of c-IAP2 was slightly increased in apoptotic chondrocytes (Fig. 5). The upregulation of c-IAP2 in TNF- α -mediated apoptotic cells was previously reported in human T-cell line³², however, the precise mechanisms of this upregulation are still unknown.

In the patients with RA and OA, the apoptosis of chondrocytes is observed *in vivo*^{33,34}. TNF- α induces the degradation of cartilage *in vivo*, however, TNF- α alone did not induce the apoptosis of human chondrocytes *in vitro*. Therefore, the inhibition of chondrocyte apoptosis might not be induced with anti-TNF- α drugs, although the anti-TNF- α therapy is effective in RA patients. The frequency of apoptotic chondrocytes in patients received with anti-TNF- α therapy needs to be examined.

Acknowledgment

The authors thank Ms Etsuko Komai and Machiyo Hirata for technical assistance. This work was supported in part by a grant from Chugai Pharmaceutical Corporation, Japan.

References

- Kim HA, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1528–37.
- Héraud F, Héraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2000;59:959–65.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995;146:75–85.
- Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, Lotz M. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1997;40:1749–55.
- Ismaiel S, Atkins RM, Pearse MF, Dieppe PA, Elson CJ. Susceptibility of normal and arthritic human articular cartilage to degradative stimuli. *Br J Rheumatol* 1992;31:369–73.
- Westacott CI, Barakat AF, Wood L, Perry MJ, Neison P, Bisbinas I, *et al.* Tumor necrosis factor alpha can contribute to focal loss of cartilage in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:213–21.
- Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, *et al.* Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 2003;48:35–45.
- Breedveld FC, Emery P, Keystone E, Patel K, Furst DE, Kalden JR, *et al.* Infliximab in active early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:149–55.
- Fischer BA, Mundle S, Cole AA. Tumor necrosis factor- α induced DNA cleavage in human articular chondrocytes may involve multiple endonucleolytic activities during apoptosis. *Microsc Res Tech* 2000;50:236–42.
- Kim HA, Song YW. TNF- α -mediated apoptosis in chondrocytes sensitized by MG132 or actinomycin D. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:937–44.
- Relić B, Bentires-Alj M, Ribbens C, Franchimont N, Guerne PA, Benoît V, *et al.* TNF- α protects human primary articular chondrocytes from nitric oxide-induced apoptosis via nuclear factor- κ B. *Lab Invest* 2002;82:1661–72.
- Yoon HS, Kim HA. Prolongation of c-Jun N-terminal kinase is associated with cell death induced by tumor necrosis factor alpha in human chondrocytes. *J Korean Med Sci* 2004;19:567–73.
- Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998;17:3261–70.
- Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1403–8.
- Mohan RR, Mohan RR, Kim WJ, Wilson SE. Modulation of TNF- α -induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF- κ B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1327–36.
- Kim PK, Wang Y, Gambotto A, Kim YM, Weller R, Zuckerbraun BS, *et al.* Hepatocyte Fas-associating death domain protein/mediator of receptor-induced toxicity (FADD/MORT1) levels increase in response to pro-apoptotic stimuli. *J Biol Chem* 2002;277:38855–62.
- Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Rue M, Comella JX, Matias-Guiu X. FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Lab Invest* 2005;85:885–94.
- Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Alizadeh H. Resistance and susceptibility of human uveal melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Arch Ophthalmol* 2005;123:654–61.
- Fraschini A, Bottone MG, Scovassi AI, Denegri M, Risueño MC, Testillano PS, *et al.* Changes in extranuclear transcription during actinomycin D-induced apoptosis. *Histol Histopathol* 2005;20:107–17.
- Crook NE, Clen RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993;67:2168–74.
- Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, *et al.* A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996;15:2685–94.
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, *et al.* IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome *c* by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998;17:2215–23.
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 1999;18:5242–51.
- Levkau B, Garton KJ, Ferri N, Kloke K, Nofer JR, Baba HA, *et al.* XIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor- κ B: new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res* 2001;88:282–90.
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2–TRAF signaling complex contains two

- novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83:1243–52.
26. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680–3.
 27. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:401–10.
 28. Stehlik C, Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J. Nuclear factor (NF)- κ B-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *J Exp Med* 1998;188:211–6.
 29. Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ. Tumor necrosis factor- α receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. *J Rheumatol* 1994;21:1710–5.
 30. Johnson DE, Gastman BR, Wieckowski E, Wang GQ, Amoscato A, Delach SM, *et al.* Inhibitor of apoptosis protein hILP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis. *Cancer Res* 2000;60:1818–23.
 31. Clem RJ, Sheu TT, Richter BW, He WW, Thornberry NA, Duckett CS, *et al.* c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem* 2001;276:7602–8.
 32. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibition of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10057–62.
 33. Matsuo M, Nishida K, Yoshida A, Murakami T, Inoue H. Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama* 2001;55:333–40.
 34. Sharif M, Whitehouse A, Sharman P, Perry M, Adams M. Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum* 2004;50:507–15.

骨吸収・骨形成の相互作用

BMP シグナルと骨形成・骨吸収

Role of BMP signals in bone formation and resorption

妻木 範行・村井 純子・岩井 貴男・岡本 美奈・吉川 秀樹

Noriyuki Tsumaki (助手), Junko Murai, Takao Iwai, Mina Okamoto, Hideki Yoshikawa (教授) / 大阪大学大学院医学系研究科器管制御外科学(整形外科)

key words

骨形成因子(BMP)
 遺伝子改変マウス
 骨形成
 骨吸収
 noggin
 内軟骨性骨化

骨芽細胞特異的プロモーターを用いた種々の遺伝子改変マウスが作製・解析され、骨形成因子(BMP)の骨形成・維持における機能がここ数年の間に明らかにされつつある。骨芽細胞特異的に BMP シグナルを抑制すると骨芽細胞の機能が障害され、骨量が減少することから、BMP シグナルは生後の骨質の維持に不可欠であることが明らかにされた。一方で細胞培養系において、BMP は破骨細胞を刺激することが報告されている。BMP の骨に対する作用は骨形成・骨吸収の両面から理解する必要がある。

骨形成因子 (bone morphogenetic proteins : BMPs) は、皮下に移植した場合に異所性に骨・軟骨形成を誘導する物質として1965年に Urist によって同定された¹⁾。その発見の経緯から、BMP は骨形成において重要な役割を果たしていると40年前から考えられ、また難治性骨折や骨欠損といった疾患において治癒を促進する治療薬としての役割が期待されてきた。昨今、骨形成・骨吸収を制御する分子メカニズムが詳細に解析され、それに参画する物質が明らかにされてきたが、BMPs はこれらの研究においても相互作用やそのシグナル伝達の間接的な関係を調べるべき候補となり、あるいは実験のコントロー

ルとして使われてきた。しかし意外にも、BMPs の生体の骨形成における機能や、骨折治癒に対する明確な作用が明らかになったのはここ数年のことである。本稿では主に遺伝子改変マウスを用いて明らかにされた BMP の骨形成・骨吸収における役割について概説する。

BMP シグナル伝達

BMP の細胞内へのシグナル伝達は I 型および II 型のセリン/スレオニンキナーゼ型受容体を通して行われる²⁾ (図)。TGF- β (transforming growth factor- β) や BMP リガンドが結合することにより、II 型受容体は I 型受容体をリン酸化する。BMP IA 型受容体

[BMPRII or ALK (activin receptor-like kinase)-3], BMP IB 型受容体 (ALK-6), そして ALK-2 が BMP シグナルを伝達する。TGF- β /BMP 受容体の下流には Smad と呼ばれる一群の蛋白質が存在し、細胞内シグナルを伝達する。哺乳類では8種の Smad が同定され、3つのサブグループに分類される。特異型 Smad (R-Smad) は I 型受容体によってリン酸化される。Smad1, Smad5, そして Smad8 は BMP シグナルを伝達し、一方、Smad2 および Smad3 は TGF- β シグナルを伝達する。リン酸化を受けた特異型 Smad は共有型 Smad (Co-Smad) である Smad4 と多量体を形成し、核内へ移行して種々の転写因子と相互作用して標的となる遺伝子の転写を直接的あるいは間接的に制

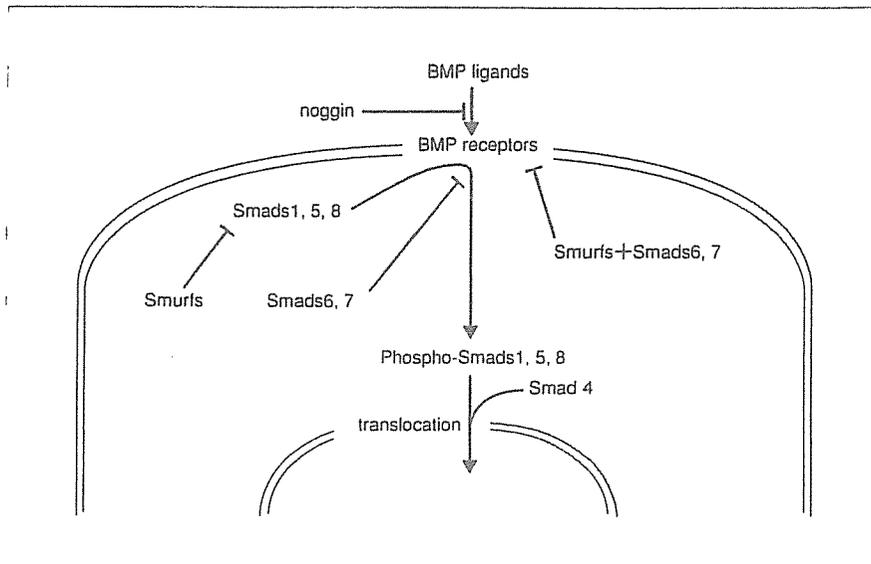


図1 BMPシグナル伝達

BMPシグナルはBMP受容体を介して主にSmad蛋白で伝達される。この過程は各段階で調節を受ける。細胞外ではnoggin, gremlinなどがアンタゴニストとして働く。細胞内では抑制型Smad (I-Smad)であるSmad6, Smad7が特異型SmadとI型受容体との結合を競合し、特異型Smadのリン酸化を抑制する。さらにSmurfを介したSmadとBMP受容体のユビキチン化と蛋白分解が報告されている

御する。

BMPシグナル伝達は各段階で調節を受ける。細胞外ではいくつかの分子がアンタゴニストとして働く。Nogginは主に軟骨で発現し、BMPに結合してBMPが受容体に作用することを阻害する³⁾。また、細胞内では抑制型Smad (I-Smad)であるSmad6とSmad7が特異型SmadとI型受容体との結合を競合し、特異型Smadのリン酸化を抑制する。Smad7がBMPとTGF-βの両方のシグナル伝達を阻害するのに対し、Smad6はBMPシグナルを主に阻害するようである。さらに、ユビキチン化と蛋白分解によるSmadシグナル伝達の阻害が報告されている。Smurf1 (Smad ubiquitin regulatory fac

tor-1)とSmurf2はSmad1とSmad5の分解を誘導する。さらに、Smurf1はSmad6やSmad7と相互作用することでI型受容体と結合し、これらの受容体をユビキチン化・蛋白分解へと誘導することが明らかにされた⁴⁾。一方、Smurf1のノックアウトマウスの解析から、Smurf1はMEKK2の分解誘導によってJNK (c-Jun N-terminal kinase)シグナルを抑制することが示され、BMPシグナルの抑制効果はこの経路を阻害することによると報告されている⁵⁾。

BMPノックアウトマウス

UristによるBMPsの発見後しばらくして遺伝子クローニング⁶⁾と蛋白抽出⁷⁾が行われた。そして、BMPsは多くのメンバーからなるファミリーを形成し、TGF-βスーパーファミリーに属することが明らかにされた。BMPファミリーにはgrowth and differentiation factorサブファミリーのメンバーも含まれる。生体でのBMPの生理作用を調べるために、BMPを欠失したマウスが作製・解析された。Bmp2, Bmp4は着床後の発生初期の胎児に発現するために、受精後9日ごろに致死となり、骨格形成が始まる12.5日目以降の解析は不可能であった。BMP I A型受容体やII型受容体のノックアウトマウスも、中胚葉の形成不全により9日ごろに致死となった。その

くして遺伝子クローニング⁶⁾と蛋白抽出⁷⁾が行われた。そして、BMPsは多くのメンバーからなるファミリーを形成し、TGF-βスーパーファミリーに属することが明らかにされた。BMPファミリーにはgrowth and differentiation factorサブファミリーのメンバーも含まれる。生体でのBMPの生理作用を調べるために、BMPを欠失したマウスが作製・解析された。Bmp2, Bmp4は着床後の発生初期の胎児に発現するために、受精後9日ごろに致死となり、骨格形成が始まる12.5日目以降の解析は不可能であった。BMP I A型受容体やII型受容体のノックアウトマウスも、中胚葉の形成不全により9日ごろに致死となった。その

表 骨芽細胞特異的 BMP シグナル抑制マウス

promoter	transgenic/knockout	文献
osteocalcin	noggin transgenic mice	11, 12
osteocalcin	gremlin transgenic mice	14
<i>Col1a1</i>	dominant negative <i>BMPR 1A</i> transgenic mice	9
<i>Col1a1</i>	<i>Smurf1</i> transgenic mice	15
osteocalcin	<i>BMPR 1A</i> conditional knockout mice	10

Col1a1: I 型コラーゲン α 1鎖遺伝子,
Col1a2: XI 型コラーゲン α 2鎖遺伝子,
Col2a1: II 型コラーゲン遺伝子,
BMPR 1A: BMP I A 型受容体遺伝子,
BMPR 1B: BMP I B 型受容体遺伝子

致死の原因は、BMP シグナル伝達が障害されたためと考えられた。一方、*Bmp5*, *Bmp6*, *Bmp7* そして *Gdf5* のノックアウトマウスは生き残り、骨格コンポーネントの数や形の異常を呈した。BMP I B 型受容体のノックアウトマウスもほぼ同様の形態異常を呈した。これらのノックアウトマウスの解析から明らかにされたことは BMP が骨格形成のパターニングに関与していることであり、その後の骨形成における作用はあまり明らかにされなかった。このマイルドな表現型の異常は、同じ組織に発現する他の BMP ファミリーメンバーやその受容体が、欠失した BMP や受容体の機能を代償したためと推測されている。この考えは *Bmp5* と *Bmp7* の両方を欠失したダブルノックアウトマウスが発生初期に致死となることから証明された。また、BMP は骨格に限らず広範な組織で発現するため、ノックアウトマウスでは腎臓や眼など種々の組織で異常が認められる。

骨芽細胞特異的
BMP シグナル抑制マウス

そこで、数年前から組織特異的に BMP シグナルを抑制したトランスジェニックマウスが作製・解析されるようになった(註)。骨組織特異的発現を得るために、I 型コラーゲン α 1鎖遺伝子(*Col1a1*)プロモーターの骨特異的シスエレメントあるいはオステオカルシンプロモーターが用いられた。*Col1a1* プロモーターを用いて dominant negative BMPR 1B を発現させ、骨芽細胞において BMP シグナルを抑制したトランスジェニックマウスでは、生後において骨量の低下と骨形成速度の低下を認める一方、骨芽細胞数と破骨細胞数はともに不変であった⁹⁾。これにより、BMP シグナルが生後の骨量の維持に必要であることが判明する一方、骨芽細胞数が減少しなかったことから BMP は骨芽細胞の機能に必要であると考えられた。骨芽細胞数が不変であったことは、培養細胞の実験において、recombinant BMPs 添加が未

分化な細胞を骨芽細胞の系譜へ強力にリクルートすると考えられてきたことから意外な結果であった。同様に、オステオカルシンプロモーター Cre トランスジェニックマウスを用いて骨芽細胞において BMPR 1A を欠失させ BMP シグナルを抑制したコンディショナルノックアウトマウスにおいても、生後の骨量の低下と骨形成速度の低下を認める一方で、骨芽細胞数と破骨細胞数はともに不変であった¹⁰⁾。しかし、この BMPR 1A コンディショナルノックアウトマウスでは、生後10ヵ月あたりから骨量の増加と破骨細胞機能の低下を認めた。その理由として、骨芽細胞の機能低下が破骨細胞の支持機能の低下につながっている可能性が推測されている。

BMP のアンタゴニストである noggin は結晶構造解析と機能解析から、BMP を極めて特異的に阻害することが明らかにされた³⁾。このため、種々の組織において noggin を過剰発現させ BMP シグナルを抑制したモデルマウスが作製されている。オステオカル

シンプロモーターを用いて *noggin* を過剰発現させたマウスにおいても生後における骨量の低下と骨形成速度の低下を認める一方、骨芽細胞数と破骨細胞数はともに不変であった¹¹⁾¹²⁾。*Noggin* トランスジェニックマウスの骨変化が軽微である理由としては、オステオカルシンプロモーターが骨芽細胞の中でも限られた成熟した細胞のみ発現しているためと推測されている¹²⁾。それに比して、*Col1a1* プロモーターは骨芽細胞において遺伝子を強力に発現させることで知られている¹³⁾。また、*noggin* とは別の BMP アンタゴニストである *gremlin* をオステオカルシンプロモーターを用いて骨芽細胞に過剰発現させ、BMP シグナルを抑制したマウスでは、骨量の低下、骨形成速度の低下と、骨芽細胞数および破骨細胞数の低下も認めた¹⁴⁾。*Smurf1* を *Col1a1* プロモーターで過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、骨量の低下、骨形成速度の低下、骨芽細胞数の減少が認められ、骨芽細胞の増殖と分化の両方が阻害されていた¹⁵⁾。

破骨細胞に対する BMP の作用

BMP は異所性骨化を誘導し得るといふ現象とその名前から、BMP の骨芽細胞に対する作用に注目が集まるが、BMP は破骨細胞を刺激することが培養系において示されている(図2)。骨芽細胞様細胞と破骨細胞前駆細胞との共培養において、*noggin* を添加すると骨芽細胞分化が抑えられるとともに破骨細胞形成も抑制されることが報告

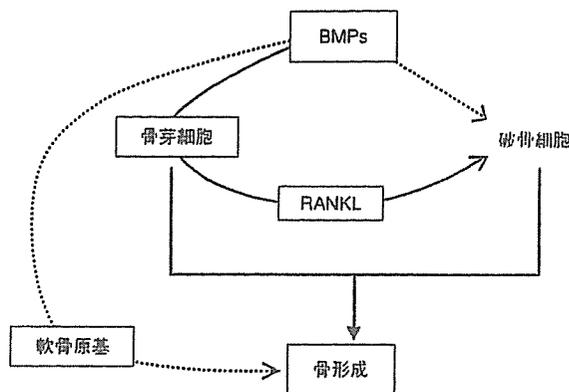


図2 骨形成に対する BMP の作用

骨組織において BMPs は骨芽細胞だけでなく、破骨細胞にも作用し得る。これには RANKL を介する経路と直接破骨細胞へ作用する経路があると考えられる。また、BMPs は軟骨原基へ作用する結果、骨形成にも影響する。

されている¹⁶⁾。*Noggin* によって骨芽細胞の RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) の発現量が低下するため、この系では骨芽細胞による破骨細胞支持能が阻害されたために破骨細胞数が減少したと考えられている。その一方で破骨細胞は BMP 受容体を発現し、BMPs は破骨細胞を直接刺激することが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。M-CSF と RANKL によってマクロファージから誘導される破骨細胞への分化を、BMPs が促進することが示された¹⁹⁾。また、TGF- β にも破骨細胞に直接作用して、分化を促進する作用があることが示された²⁰⁾。I 型コラーゲンプロモーターを用いて *noggin* を骨特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作製したところ、胎児期後期から生後早期にかけて破骨細胞数が減少して骨量が増加すること、BMP4 を過剰発現させた場合は胎児期後期に破骨細

胞数が増加して骨量が減少することを見出した²¹⁾。

内軟骨性骨化と BMP

膜性骨化に対し、内軟骨性骨化では一旦軟骨で骨格が形成され、それを鋳型に骨に置き換わる。四肢の骨格は内軟骨性骨化の過程を経て形成される。したがって原基である軟骨の性状が、その後の骨形成に大きな影響を与えるであろうことが予想される。BMP は軟骨細胞に対して増殖作用がある。我々が作製した BMP を軟骨特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスでは大きな軟骨原基が形成される²²⁾²³⁾。このトランスジェニックマウスの骨を調べたところ、骨幅は広く、骨梁が増大しており、BMP の軟骨細胞に対する作用が間接的に骨形成を制御していることがわかった²⁴⁾。同様に、

軟骨特異的に noggin や Smad6 を過剰発現させて BMP シグナルを抑制したトランスジェニックマウスでは骨量が減少していた。特に Smad6 トランスジェニックマウスの骨組織から破骨細胞を培養したところ正常であったので、このマウスでは軟骨原基における細胞肥大化の遅れが骨量の減少につながったと考えた²⁴⁾。

おわりに

BMPs は種々の組織に発現および機能し、その標的細胞は多岐にわたる。生体の骨組織においても、BMP は骨芽細胞のみでなく破骨細胞に対しても直接作用することは十分に考えられる。実験的骨折モデルなどに対し BMP を投与する場合、状況によっては骨吸収を起こすこともみられる。また内軟骨性骨化の経過から、軟骨細胞に対する BMPs の強力な作用が骨形成に大きな影響を及ぼす。BMP が有する作用は骨形成のみでなく、骨吸収に対する作用、そして軟骨細胞に対する作用を含め総合的に理解する必要がある(図2)。

文献

- 1) Urist MR : Bone formation by auto-induction. *Science* **150** : 893-899, 1965
- 2) Shi Y, Massague J : Mechanisms of TGF beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113** : 685-700, 2003
- 3) Groppe J, Greenwald J, Wiater E, et al : Structural basis of BMP signaling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* **420** : 636-642, 2002
- 4) Murakami G, Watabe T, Takaoka K, et al : Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by smurf1 and inhibitory smads. *Mol Biol Cell* **14** : 2809-2817, 2003
- 5) Yamashita M, Ying SX, Zhang GM, et al : Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation. *Cell* **121** : 101-113, 2005
- 6) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al : Novel regulators of bone formation : molecular clones and activities. *Science* **242** : 1528-1534, 1988
- 7) Takaoka K, Yoshikawa H, Hasimoto J, et al : Gene cloning and expression of a bone morphogenetic protein derived from a murine osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* **294** : 344-352, 1993
- 8) Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, et al : Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* **264** : 13377-13380, 1989
- 9) Zhao M, Harris SE, Horn D, et al : Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *J Cell Biol* **157** : 1049-1060, 2002
- 10) Mishina Y, Starbuck MW, Gentile MA, et al : Bone morphogenetic protein type 1A receptor signaling regulates postnatal osteoblast function and bone remodeling. *J Biol Chem* **279** : 27560-27566, 2004
- 11) Devlin RD, Du Z, Pereira RC, et al : Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology* **144** : 1972-1978, 2003
- 12) Wu XB, Li Y, Schneider A, et al : Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. *J Clin Invest* **112** : 924-934, 2003
- 13) Dacquin R, Starbuck M, Schinke T, et al : Mouse alpha 1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn* **224** : 245-251, 2002
- 14) Gaggero E, Pereira RC, Jorgetti V, et al : Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia. *Endocrinology* **146** : 655-665, 2005
- 15) Zhao M, Qiao M, Harris SE, et al : Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **279** : 12854-12859, 2004
- 16) Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, et al : Essential requirement of BMPs 2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice ;

豊木 範行(Noriyuki Tsumaki)
1989年 大阪大学医学部卒業
1996年 米国 NIH Visiting Fellow
1998年 大阪大学整形外科 助手
1999年 大阪警察病院 副医長
2002年 大阪大学整形外科 助手
専門 : 骨・軟骨代謝, 変形性関節症

- antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* **15** : 663-673, 2000
- 17) Kaneko H, Arakawa T, Mano H, et al : Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* **27** : 479-486, 2000
- 18) Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, et al : Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Endocrinology* **142** : 3656-3662, 2001
- 19) Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, et al : Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J Bone Miner Res* **10** : 1681-1690, 1995
- 20) Iyama K, Ninomiya Y, Olsen BR, et al : Spatiotemporal pattern of type X collagen gene expression and collagen deposition in embryonic chick vertebrae undergoing endochondral ossification. *Anat Rec* **229** : 462-472, 1991
- 21) Okamoto M, Murai J, Yoshikawa H, et al : Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts as well as osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res* (in press)
- 22) Tsumaki N, Tanaka K, Arikawa-Hirasawa E, et al : Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation. *J Cell Biol* **144** : 161-173, 1999
- 23) Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, et al : Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res* **17** : 898-906, 2002
- 24) Horiki M, Imamura T, Okamoto M, et al : Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J Cell Biol* **165** : 433-445, 2004