

Fig. 3. (A) Proliferation of hFOB cells treated by estradiol (top) and 5α-DHT (bottom). \**p*<0.05 vs. vehicle control (0). (B) Proliferation of hFOB cells treated by exemestane (top), aminoglutethimide (middle), and Aromatase Inhibitor-I (bottom). \**p*<0.05 vs. vehicle control (0). *n*=5.

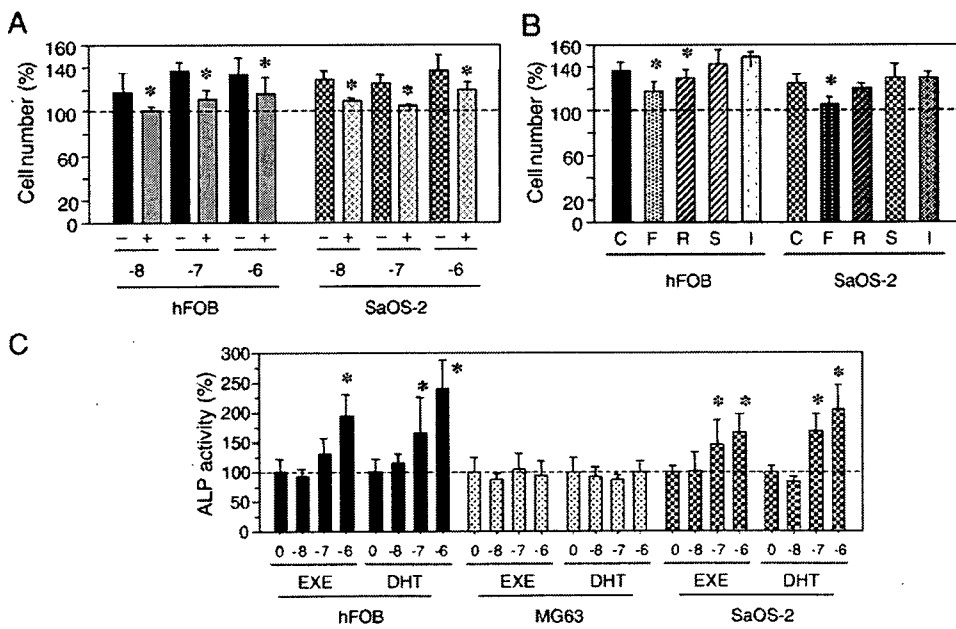


Fig. 4. (A) Effects of hydroxyflutamide on exemestane ( $10^{-8}$  to  $10^{-6}$  M) stimulated the cell proliferation of both hFOB and Saos-2. With (+) or without (-) hydroxyflutamide, *p*<0.05 vs. without hydroxyflutamide (\*). (B) Effects of steroid receptor blockers on exemestane ( $10^{-7}$  M) stimulated cell proliferation of hFOB and Saos-2. C,  $10^{-7}$  M exemestane; F, hydroxyflutamide ( $5 \times 10^{-6}$  M); R, RU38,486 ( $5 \times 10^{-6}$  M); S, spironolactone ( $5 \times 10^{-6}$  M); I, ICI182,720 ( $5 \times 10^{-6}$  M). \**p*<0.05 vs. C (C) ALP activity in hFOB, Saos-2, MG-63 treated with exemestane (EXE,  $10^{-8}$  to  $10^{-6}$  M), or 5α-DHT (DHT,  $10^{-8}$  to  $10^{-6}$  M). \**p*<0.05 vs. vehicle control (0).

RT-PCR. Aromatase, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR were all detected in osteoblast-like cell lines, Saos-2 and MG-63 (Fig. 2B). In hFOB cell, expression of ER $\beta$  mRNA was more predominant than that of ER $\alpha$  mRNA. ER $\alpha$  mRNA as well as ER $\beta$  mRNA was detected in Saos-2 and MG-63 cells. The levels of AR mRNA expression in both hFOB and Saos-2 were significantly higher ( $p=0.01$ ) than that in MG-63. ALP mRNA was also detected in intact hFOB, Saos-2, and MG-63 cells (data not present), respectively.

#### Estradiol and testosterone production

Results were summarized in Fig. 2C. The E2 levels in the medium of hFOB supplemented with  $\Delta_4$  treated with EXE or

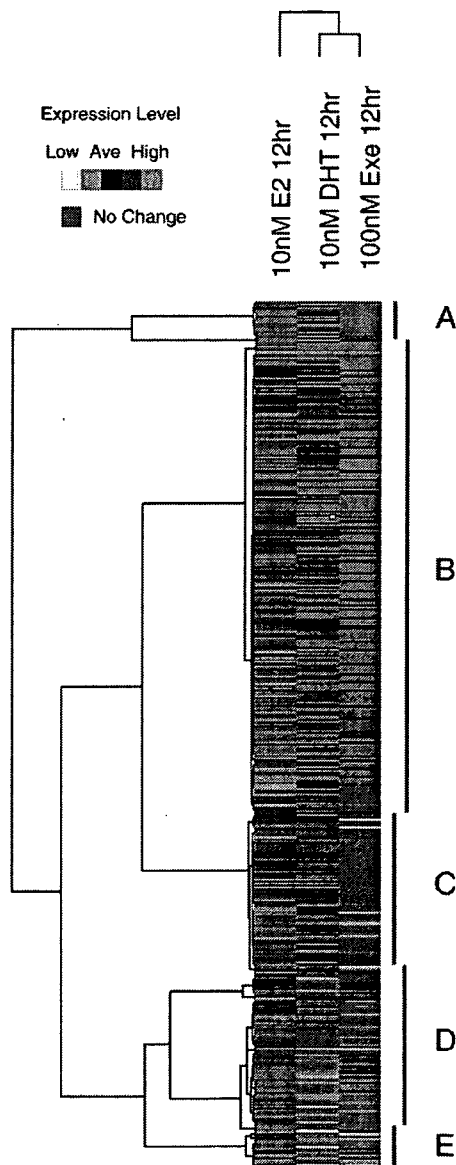


Fig. 5. In clustering analysis of the expression levels of each gene in hFOB cells treated with estradiol (E2), 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT), and exemestane (Exe).

AI-I were significantly lower than that of cells without AIs. The levels of TST in the medium of hFOB supplemented with  $\Delta_4$  treated with EXE or AI-I were significantly higher than that of cells without AIs.

#### Cell proliferation

Results of the cell proliferation assays are summarized in Figs. 3 and 4. There was a significant increment in the number of the cells after 72 h in hFOB, Saos-2, and MG-63 cells treated with  $10^{-9}$  M (Saos-2 and MG-63) or  $10^{-8}$  M (hFOB) to  $10^{-6}$  M E2 (Fig. 3A). The cell number of hFOB and Saos-2 cells treated by  $10^{-9}$  M (Saos-2) or  $10^{-8}$  M (hFOB) to  $10^{-6}$  M DHT for 72 h was also significantly higher than control (Fig. 3A). The number of MG-63 cells was significantly increased only by high dose of DHT ( $10^{-7}$  M and  $10^{-6}$  M) treatments (Fig. 3A). Prg ( $10^{-9}$  M to  $10^{-6}$  M) treatments did not change the number of cells even after 72 h in all three cell lines examined (data not present).

Both EXE (Fig. 3B) and 17H-EXE (data not present) treatments of  $10^{-8}$  M to  $10^{-6}$  M, which were comparable to pharmacological inhibition doses of aromatization (Table 1), significantly increased the hFOB cell number for 72 h, respectively. In Saos-2 cells treated with relatively low dose,  $10^{-9}$  to  $10^{-6}$  M EXE, there was a significant increment in the number of the cells after 72 h (Fig. 3B). However, all the dose ( $10^{-9}$  M to  $10^{-6}$  M) of EXE employed did not result in the change of cell number of MG-63 even after 72 h of treatment (Fig. 3B). The cell number of both hFOB and Saos-2 cells treated by both  $10^{-6}$  M EXE and/or 17H-EXE for 48 h was also significantly higher than that treated for 24 h (data not present).

AGM treatment [ $10^{-9}$  (hFOB) or  $10^{-7}$  (Saos-2 and MG-63) to  $10^{-6}$  M] diminished the number of these three cells (Fig. 3B) and morphological changes in these cells were consistent with those caused by cytotoxic effects (data not present). AI-I treatment ( $10^{-9}$  to  $10^{-7}$  M) was not associated with significant increment of the cell number in these cell lines (Fig. 3B). Only high dose ( $10^{-6}$  M) of AI-I significantly diminished the cell numbers of hFOB and Saos-2 but not of MG-63 (Fig. 3B).

The androgen receptor antagonist OHF ( $5 \times 10^{-6}$  M) diminished the effects of EXE on these increments of both hFOB and Saos-2 cells (Figs. 4A and B). Treatment with RU but not spironolactone and ICI also inhibited EXE effects on hFOB cells (Fig. 4B).

#### ALP activity assay

Results of the ALP activity assay were summarized in Fig. 4C. There was a significant increment in the ALP activity of both hFOB and Saos-2 cells treated with  $10^{-7}$  M (Saos-2) and/or  $10^{-6}$  M (hFOB and Saos-2) EXE. Both  $10^{-7}$  M and  $10^{-6}$  M DHT treatment also increased the ALP activity in hFOB and Saos-2 cells, respectively. There were no changes of ALP activity in MG-63 treated with  $10^{-8}$  M to  $10^{-6}$  M of EXE and DHT, respectively.

Table 3a  
Genes induced by exemestane treatment in hFOB cells—2.0 higher

	Gene title	Gene symbol	Raw data			Ratio	
			C	D	Ex	D	Ex
NM_002466	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	<b>MYBL2</b>	70.9	156.9	150.3	2.2	2.1
AW444985	–	–	57.8	124.7	127.1	2.2	2.2
AF143684	Myosin IXB	MYO9B	48.3	64.4	122.2	1.3	2.5
NM_024682	TBC1 domain family, member 17	TBC1D17	31.7	37.6	64.8	1.2	2.0
BE965311	Chromosome 16 open reading frame 23	C16orf23	29.2	44.2	64.0	1.5	2.2
NM_004233	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	CD83	29.0	66.5	60.9	2.3	2.1
AI806031	Skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase	SKIP	27.7	48.6	55.4	1.8	2.0
AL136729	Ring finger protein 123	RNF123	20.0	23.7	41.3	1.2	2.1
NM_015254	Kinesin family member 13B	KIF13B	13.0	24.5	39.4	1.9	3.0
AL110249	Chromosome 20 open reading frame 194	C20orf194	13.4	39.0	29.7	2.9	2.2
AF208502	Early B-cell factor	EBF	12.5	21.1	28.5	1.7	2.3
AW007221	Solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4	SLC13A4	12.3	9.6	27.8	0.8	2.3
AB007458	TP53 activated protein 1	TP53AP1	12.6	22.2	26.2	1.8	2.1
AV713913	Osteopetrosis associated transmembrane protein 1	<b>OSTM1</b>	9.8	16.5	21.3	1.7	2.2
BF339201	THAP domain containing 6	THAP6	6.0	14.0	20.6	2.3	3.4
AK000455	Hypothetical gene MGC16733 similar to CG12113	MGC16733	7.3	16.6	18.8	2.3	2.6
AW974816	–	–	2.2	16.0	17.2	7.2	7.7
AK025325	Transcribed locus, moderately similar to NP_689573.2 zinc finger protein 573	–	7.3	11.4	16.2	1.6	2.2
NM_021192	Homeo box D11	<b>HOXD11</b>	5.3	16.2	15.8	3.0	3.0
NM_022169	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4	ABCG4	7.0	10.5	15.7	1.5	2.2
R62907	Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein ( <i>Drosophila</i> )	DAB2	7.7	13.0	15.5	1.7	2.0
NM_002661	Phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)	PLCG2	7.3	12.3	15.3	1.7	2.1
BG393032	Solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4	SLC13A4	6.4	6.7	15.1	1.0	2.3
BC002794	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14	TNFRSF14	6.2	11.3	13.6	1.8	2.2
BC042908	KIAA0690	KIAA0690	5.6	7.4	13.5	1.3	2.4
AW451961	Adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I	<b>ADCYAP1R1</b>	4.3	11.7	13.2	2.7	3.1
AI863264	Glypican 2 (cerebroglycan)	<b>GPC2</b>	5.3	7.2	13.2	1.3	2.5
AF130050	ACA47 scaRNA gene	–	5.6	9.5	12.9	1.7	2.3
AK022326	Hypothetical gene supported by AK022326	–	6.1	12.7	12.9	2.1	2.1
AK021807	Low density lipoprotein receptor-related protein 11	LRP11	5.9	6.2	12.8	1.0	2.2
AU155415	Kallikrein 7 (chymotryptic, stratum corneum)	KLK7	5.6	13.5	12.7	2.4	2.3
BF673779	Hypothetical protein FLJ30834	FLJ30834	5.5	6.3	12.3	1.1	2.2
AV646335	–	–	2.6	13.0	11.2	5.0	4.3
BC040600	–	–	5.0	5.4	10.6	1.1	2.1
AI131035	–	–	5.1	9.2	10.5	1.8	2.1

C, vehicle control; D, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone; Ex, exemestane. Genes that performed quantitative RT-PCR were described in bold style.

### Microarray/clustering analysis

In hFOB cells, the hierarchical clustering analysis contains 430 genes which demonstrated expression ratios above 2.0-fold and below 0.5-fold compared with vehicle control cells after 12 h of each gene treated with 10<sup>-8</sup> M E2, 10<sup>-8</sup> M DHT, or 10<sup>-7</sup> M EXE. The expression profiles of EXE treated cells were closely related to those of DHT (Fig. 5). In this study, we focused on 35 genes (Table 3a), which were all up-regulated twice or more than control. In this group, we further focused on 5 genes, B-Myb 2 (MYBL2), osteopetrosis associated transmembrane protein 1 (OSTM1), homeo box D 11 (HOXD11), adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor (ADCYAP1R1), and glypican 2 (GPC2) which are all considered to play important roles in EXE or DHT induced cell proliferation. We therefore examined whether these 5 genes were increased by EXE or DHT treatments using quantitative RT-PCR in hFOB cells. We also examined the validation of results of microarray analysis obtained in hFOB cells in Saos-2 and MG-63 cells.

### Validation of microarray analysis using quantitative RT-PCR

In hFOB cells, all of these 5 genes described above were significantly increased by 10<sup>-7</sup> M EXE treatment, and 3/5 genes (except for OSTM1 and GPC2) were also significantly increased by 10<sup>-8</sup> M DHT treatment. HOXD11 and ADCYAP1R1 genes increased by both EXE and DHT were significantly diminished by OHF (5  $\times$  10<sup>-6</sup> M) treatment (Figs. 6A–C).

The similar results of changes of MYBL2 expression were also obtained in both Saos-2 and MG-63 treated with EXE and DHT, respectively (Fig. 6A). In addition, the results of HOXD11 expression in hFOB were equivalent to those in Saos-2 but not in MG-63 treated with EXE and DHT (Fig. 6B). Other genes induced by treatment of EXE and DHT in hFOB such as OSTM1, GPC2, and ADCYAP1R1 were not changed in both Saos-2 and MG-63 cells treated with EXE and DHT, respectively (data not present). AI-I or AGM treatment did not increase all of these genes expression in hFOB (data not present).

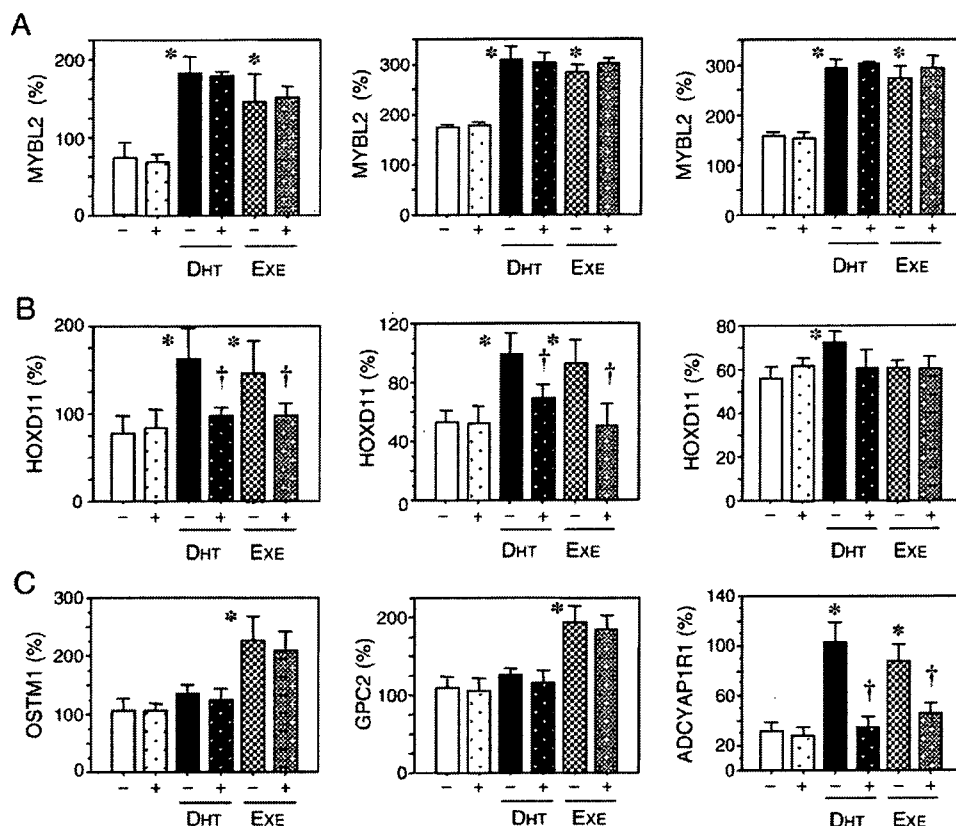


Fig. 6. Validation of microarray analysis. (A) Expression levels of MYBL2 in hFOB (left), Saos-2 (middle), and MG-63 (right). (B) Expression levels of HOXD11 in hFOB (left), Saos-2 (middle), and MG-63 (right). (C) Expression levels of OSTM1, GPC2, and ADCYAP1R1 in hFOB. DHT:  $10^{-8}$  M  $5\alpha$ -dihydrotestosterone, EXE:  $10^{-7}$  M Exemestane, with (+) or without (-) hydroxyflutamide,  $p < 0.05$  vs. control (\*) or without hydroxyflutamide (†).

#### Analysis of osteoblast growth-related genes

Results of microarray analysis in hFOB cell demonstrated that osteoblast growth-related genes [24,25] such as COL1A1, SMAD1, SMAD5, SPARC, and RUNX2 were all up-regulated by exemestane ( $10^{-7}$  M) treatment but the degrees of increment were all under 2-fold (Table 3b). In this microarray analysis, other expression levels of previously reported osteoblast-related genes were not altered.

In hFOB cells, the validation analysis of these genes described above using quantitative RT-PCR (Fig. 7) demonstrated that 4/5 genes (except for COL1A1) were significantly increased by  $10^{-7}$  M EXE treatment, and 4/5 genes (except for SMAD1) were also significantly increased by  $10^{-8}$  M DHT treatment. The increased expression of the SMAD1, SMAD5, and SPARC genes by EXE or DHT, was significantly diminished by OHF ( $5 \times 10^{-6}$  M) treatment. There were no effects of OHF pretreatment on the increased expression levels of RUNX2 that had occurred after both EXE and DHT treatments. Both AI-I and AGM treatment could not increase all of these genes expression in hFOB (data not present).

In Saos-2 cells, 4/5 genes (except for RUNX2) were significantly increased by  $10^{-7}$  M EXE treatment, and 3/5 genes (except for RUNX2 and SMAD1) were also significantly increased by  $10^{-8}$  M DHT treatment. The increment of the

COL1A1, SMAD5, and SPARC genes expression by EXE or DHT, was significantly diminished by OHF ( $5 \times 10^{-6}$  M) treatment. All of these 5 genes did not change in MG-63 cells treated with EXE or DHT, respectively (data not present).

#### Immunohistochemistry of AR

Marked AR immunoreactivity was detected in the nuclei of osteoblasts or lining cells but not in osteoclasts in four cases (Fig. 8). In these four cases, AR immunoreactivity was also detected in osteocytes and chondrocytes. In one case, there was no immunoreactivity in all types of bone cells.

#### Discussion

In the clinical study of EXE compared to placebo administered for two years [26,27], EXE modestly enhanced bone loss from the femoral neck without significant influence on lumbar bone loss despite a marked systemic estrogen depletion. Furthermore, the risks of clinical bone fractures are considered to be lower with EXE treatment than that seen with non steroidal AIs [27,28], though it is also important to recognize that EXE has not been shown to significantly increase the amount of bone mass in various clinical studies of breast cancer patients [26,27]. The relative protective effect of EXE, a

Table 3b  
Genes induced by exemestane treatment in hFOB cells—the osteoblast growth-related genes

Gene title	Gene symbol	Raw data			Ratio		
		C	D	Ex	D	Ex	
K01228	Collagen, type I, alpha 1	<b>COL1A1</b>	2797.2	3240.9	3058.5	1.2	1.1
BE221212	Collagen, type I, alpha 1	<b>COL1A1</b>	2741.1	3048.3	3052.2	1.1	1.1
AI743621	Collagen, type I, alpha 1	<b>COL1A1</b>	228.0	241.6	242.5	1.1	1.1
AA788711	Collagen, type I, alpha 2	<b>COL1A2</b>	2250.6	2474.3	2375.4	1.1	1.1
NM_000089	Collagen, type I, alpha 2	<b>COL1A2</b>	1749.1	1848.7	1787.6	1.1	1.0
M60485	Fibroblast growth factor receptor 1	<b>FGFR1</b>	178.9	185.7	198.6	1.0	1.1
BE467261	Fibroblast growth factor receptor 1	<b>FGFR1</b>	165.4	208.6	189.7	1.3	1.1
M63889	Fibroblast growth factor receptor 1	<b>FGFR1</b>	119.3	111.6	140.5	0.9	1.2
NM_023110	Fibroblast growth factor receptor 1	<b>FGFR1</b>	60.5	84.0	70.2	1.4	1.2
AU145411	Fibroblast growth factor receptor 1	<b>FGFR1</b>	29.2	44.1	37.5	1.5	1.3
AI359368	Fibroblast growth factor receptor 3	<b>FGFR3</b>	41.4	65.5	58.7	1.6	1.4
NM_001552	Insulin-like growth factor binding protein 4	<b>IGFBP4</b>	809.1	1027.5	1040.4	1.3	1.3
AL353944	Runt-related transcription factor 2	<b>RUNX2</b>	192.9	226.3	216.3	1.2	1.1
AU146891	SMAD, mothers against DPP homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	<b>SMAD1</b>	161.2	195.6	204.6	1.2	1.3
NM_005901	SMAD, mothers against DPP homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )	<b>SMAD2</b>	100.3	108.2	113.7	1.1	1.1
NM_005902	SMAD, mothers against DPP homolog 3 ( <i>Drosophila</i> )	<b>SMAD3</b>	110.2	106.5	127.7	1.0	1.2
BF526175	SMAD, mothers against DPP homolog 5 ( <i>Drosophila</i> )	<b>SMAD5</b>	361.0	488.3	514.2	1.4	1.4
AI478523	SMAD, mothers against DPP homolog 5 ( <i>Drosophila</i> )	<b>SMAD5</b>	300.7	384.9	346.9	1.3	1.2
AF010601	SMAD, mothers against DPP homolog 5 ( <i>Drosophila</i> )	<b>SMAD5</b>	79.2	99.7	87.6	1.3	1.1
AY014180	SMAD-specific E3 ubiquitin protein ligase 2	<b>SMURF2</b>	804.2	844.7	851.8	1.1	1.1
AU157259	SMAD-specific E3 ubiquitin protein ligase 2	<b>SMURF2</b>	77.1	81.5	86.3	1.1	1.1
AL575922	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	<b>SPARC</b>	1702.1	1935.5	1925.8	1.1	1.1
BF508662	Sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling ( <i>Drosophila</i> )	<b>SPRY1</b>	31.9	46.3	45.4	1.5	1.4
NM_014886	TGF beta-inducible nuclear protein 1	<b>TINP1</b>	1185.7	1259.5	1241.1	1.1	1.0

C, vehicle control; D, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone; Ex, exemestane. Genes that performed quantitative RT-PCR were described in bold style.

steroidal aromatase inhibitor, has been therefore attributed to its actions through AR in osteoblasts. Systemic androgenic effects such as hypertrichosis, hair loss, hoarseness, and acne have been reported only in 4% [6] of the patients treated with EXE (25 mg/day) and the frequency of these effects increases to approximately 10% in those treated with higher dose 200 mg/day of EXE [6]. This finding suggests that the patients treated with EXE are under relatively weak systemic androgenic effects. Androgen sensitivity has been well-known to be subject to great individual variation caused by AR gene CAG polymorphism in women as well as men [29,30]. Therefore, this 5 to 10% of the patients who manifested clinical androgenic effects by EXE treatment may be individuals associated with relatively enhanced androgenic sensitivity. Replacement therapy with TST is generally effective at restoring bone in hypogonadal men [31]. In female-to-male, genetic female transsexual subjects, high-dose TST therapy generally increased BMD at the femoral neck, despite decrement of E2 to postmenopausal levels [32,33]. Therefore, androgens may play an important role in bone protection in women as well as men.

The results of cell proliferation assay demonstrated that the cell number of MG-63 was increased by both E2 and DHT treatments, but the dose of DHT was relatively higher than that in two other cells. MG-63 expressed higher levels of ER $\alpha$ / $\beta$  mRNA, but the level of AR mRNA was lower than that in both Saos-2 and hFOB. Both cell proliferation and ALP activity of MG-63 could not be stimulated by EXE treatment. Molecular mechanisms of androgen actions on osteoblasts have remained largely unknown. Androgen is well-known to stimulate

osteoblast proliferation [34] and differentiation [35]. For instance, osteoprotegerin mRNA was increased by TST as well as DHT treatments in mouse 3T3-E1 cells [36].

AR and ER $\beta$  but not ER $\alpha$  are predominantly detected in osteoblasts located on human cancellous bone using immunohistochemical analysis [37]. Therefore, hFOB examined in this study is considered to maintain relatively native status of sex steroids pathways in human osteoblasts. Therefore, we employed hFOB for further examination of EXE effects on osteoblast gene expression pattern using microarray analysis. In this study, we demonstrated that the genes MYBL2 [38], OSTM1 [39], HOXD11 [40], ADCYAP1R1 [41], and GPC2 [42] were target genes of EXE alone or both EXE and DHT in hFOB using microarray/PCR analysis. These genes were demonstrated to be involved in regulation of cell cycle, differentiation, and transcription. In EXE or DHT treatment in hFOB and Saos-2, in which cells proliferations were stimulated, an increased expression of HOXD11 gene was detected. The product of the mouse Hoxd11 gene was reported to play a role in forelimb morphogenesis [40,43]. Therefore, these finding suggest that osteoblast cell proliferation stimulated by EXE treatment may depend on HOXD11 gene expression through AR. In this study, the cell proliferation of MG-63, which expressed relatively low level of AR, was not stimulated by EXE. In addition, HOXD11 gene expression was not up-regulated by EXE treatment in MG-63 cells. These results were also consist with the protective effects of EXE through potential androgen-HOXD11 pathway in osteoblast cells. In this study, we also examined the effects of EXE and DHT on osteoblast growth-related genes using micro-

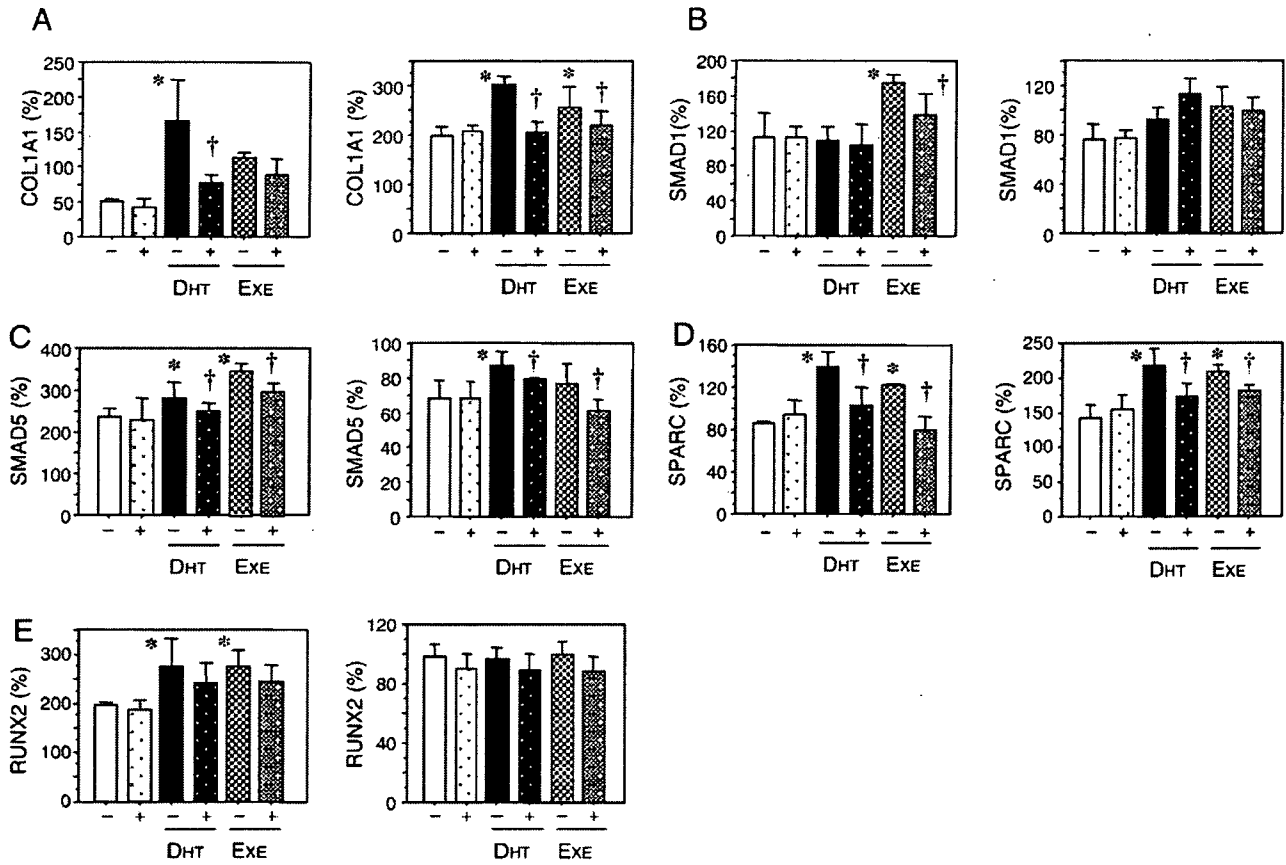


Fig. 7. Expression levels of osteoblast growth-related genes in hFOB (left) and Saos-2 (right). DHT:  $10^{-8}$  M  $5\alpha$ -dihydrotestosterone, EXE:  $10^{-7}$  M Exemestane, with (+) or without (-) hydroxyflutamide,  $p < 0.05$  vs. control (\*) or without hydroxyflutamide (†).

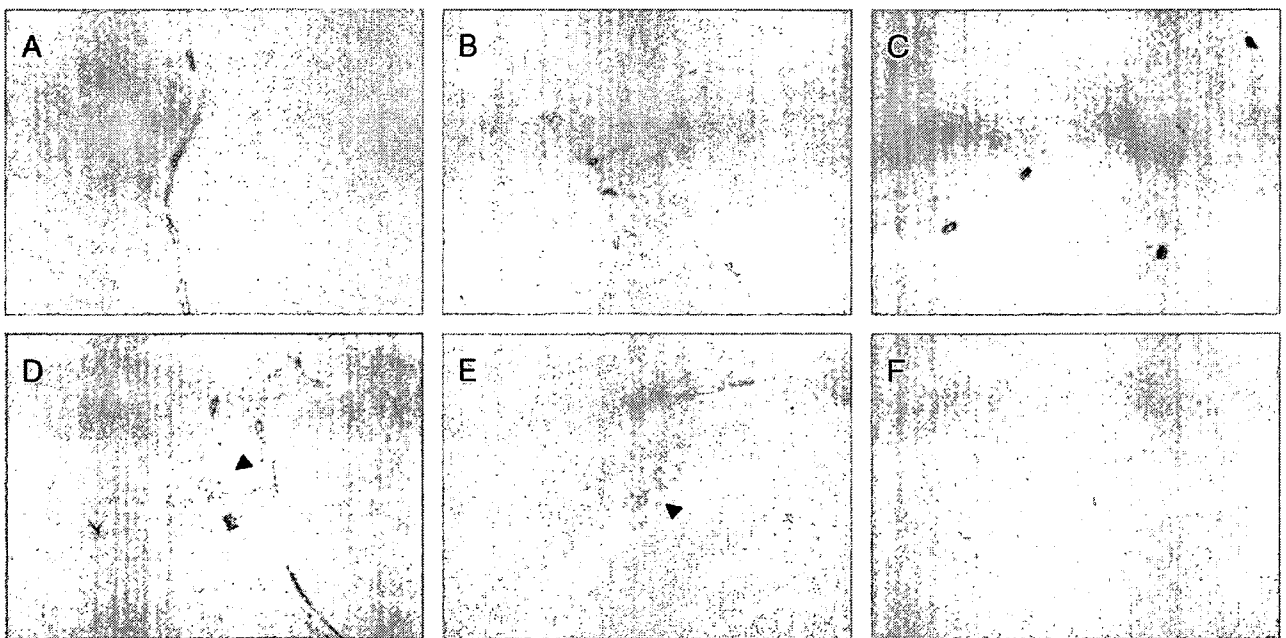


Fig. 8. Immunohistochemistry of androgen receptor in human bone tissues. Immunoreactivity of androgen receptor was detected in nuclei of osteoblasts/liner cells (A, B) but not in osteoclasts (D, E; arrowheads). Immunoreactivity of androgen receptor was also detected in nuclei of osteocytes (C) and condrocytes (F).

array analysis and following quantitative RT-PCR. COL1A1, SMAD5, and SPARC (osteonectin) were up-regulated by EXE and/or DHT treatments in both hFOB and Saos-2 cells. EXE or DHT treatments in both hFOB and Saos-2 also resulted in increased ALP activity. There have been, however, no studies reported on whether these genes are primary or secondary androgen responsive genes in osteoblasts. The AR-specific antagonist, OHF demonstrated no inhibitory effects on RUNX2 expression increased by EXE or DHT treatment in hFOB cells. In addition, hFOB cell growth induced by high dose of EXE treatment was not completely inhibited by OHF treatment. These results all suggest that EXE also may stimulate hFOB cell proliferation through both AR dependent and independent pathways. From our data of steroid production in hFOB, EXE may have an additional androgenic effect through increased TST levels in conjunction with inhibition of aromatization in hFOB cells. However, it awaits further investigations for clarification.

In normal bone remodeling, bone formation by osteoblasts follows bone resorption by osteoclasts and occurs in a precise and quantitative manner (coupling). In this coupling between bone formation and resorption, a coupling factor that induces bone formation is considered to be released during osteoclastic bone resorption [44]. This study has focused on the specific effects on osteoblast cells. However, it is true that there were significant increases in both serum bone formation and resorption markers in postmenopausal women administered with EXE for 2 years [26]. Osteoclasts, which are responsible for bone resorption, are target cells for many anti-osteoporosis therapeutic agents such as bisphosphonate of postmenopausal women [45]. However, it is unclear whether EXE acts on osteoclast directly. Chen et al. [46] reported that testosterone inhibited osteoclast formation stimulated by parathyroid hormone through the AR but not through the production of intrinsic estrogen using primary mouse osteoclast cells. In both human and rodent bone tissues, AR is expressed in both osteoblasts and osteocytes [47,48]. However, AR is detected in osteoclasts of rodent but not in human cells [31,47,48]. Therefore, in humans, androgens are considered to exert their effects on bone through osteoblasts. EXE may therefore exert its possible androgenic effects on human bone through osteoblasts but not osteoclasts. Results of our present study also suggest the possible roles of EXE on osteoblast cells through AR independent manner. Results of clinical studies suggest that the combination therapy of AI and COX-2 inhibitors could provide more effective aromatase inhibition than single therapy in hormone-sensitive postmenopausal breast cancer [49]. Bone resorption induced by IL-1 and IL-6 was also reported to occur via stimulation of COX-2 dependent PGE<sub>2</sub> production in osteoblasts *in vitro* [50]. Therefore, further investigations are required to clarify the effects of AI including EXE on human bone tissues.

In summary, this study using osteoblast and osteoblast-like cell lines suggested the potential protective effect of steroidal AI, EXE on osteoblasts occurred through both AR dependent and independent pathways. HOXD11 gene known as bone morphogenesis factor and osteoblast growth-related genes were induced by EXE treatment as well as DHT treatment in both hFOB and Saos-2. Damages of bone tissues by estrogen

depletion caused by AI administration are considered unavoidable but the selection of potential hormone therapies which could minimize the damages or injuries of bone tissues is considered important.

### Acknowledgments

We appreciate Dr. Shin-ichi Hayashi (Divisions of Molecular Medical Technology, Tohoku University School of Medicine) for critical comments. We also appreciate Ms. Chika Tazawa, Ms. Toshie Suzuki, Ms. Miki Mori and Mr. Katsuhiko Ono (Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine) for skillful technical assistances. This research was supported by Grant-in-aid for Health and Labor Sciences Research Grant on Risk of Chemical Substances (H16-Kagaku-002) from Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan and Kanzawa Medical Research Foundation, Nagano, Japan.

### References

- [1] Rogers J. Estrogens in the menopause and postmenopause. *N Engl J Med* 1969;280:364–7.
- [2] Wingate L. The epidemiology of osteoporosis. *J Med* 1984;15:245–66.
- [3] Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PW, Anderson JJ. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women. *N Engl J Med* 1993;329:1141–6.
- [4] Lester L, Coleman R. Bone loss and the aromatase inhibitors. *Br J Cancer* 2005;93:S16–22.
- [5] Miller WR, Dixon JM. Antiaromatase agents: preclinical data and neoadjuvant therapy. *Clin Breast Cancer* 2000;1:S9–S14.
- [6] Lønning PE, Paridaens R, Thurlimann B, Piscitelli G, di Salle E. Exemestane experience in breast cancer treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;61:151–5.
- [7] Center for Drug Evaluation and Research Application Number NDA 20753 (Exemestane) Medical Review. Food and Drug Administration, 1999.
- [8] Goss PE, Qi S, Josse RG, Pritzker KPH, Mendes M, Hu H, et al. The steroidal Aromatase inhibitor exemestane prevent bone loss in ovariectomized rats. *Bone* 2004;34:384–92.
- [9] Goss PE, Qi S, Cheung AM, Hu H, Mendes M, Pritzker KPH. Effects of steroidal aromatase inhibitor exemestane and the nonsteroidal aromatase inhibitor letrozole on bone and lipid metabolism in the ovariectomized rats. *Clin Cancer Res* 2004;10:5717–23.
- [10] Sasano H, Uzuki M, Sawai T, Nagura H, Matsunaga G, Kashimoto O, et al. Aromatase in human bone tissue. *J Bone Miner Res* 1997;12:1416–23.
- [11] Schweikert HU, Wolf L, Romalo G. Oestrogen formation from Androstendione in human bone. *Clin Endocrinol* 1995;43:37–42.
- [12] Purohit A, Flanagan AM, Reed MJ. Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *Endocrinology* 1992;131:2027–9.
- [13] Tanaka S, Haji M, Nishi Y, Yanase T, Takayanagi R, Nawata H. Aromatase activity in human osteoblast-like osteosarcoma cell. *Calcif Tissue Int* 1993;52:107–9.
- [14] Recanatini M, Bisi A, Cavalli A, Belluti F, Gobbi S, Rampa A, et al. A new class of nonsteroidal aromatase inhibitors: design and synthesis of chromone and xanthone derivatives and inhibition of the P450 enzymes aromatase and 17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase. *J Med Chem* 2001;44:672–80.
- [15] Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996;19:1S–12S.
- [16] Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 1995;10:178–86.
- [17] Suzuki T, Darnel AD, Akahira JI, Ariga N, Ogawa S, Kaneko C, et al. 5alpha-reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgenic actions. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2250–7.

- [18] Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Ishizuka M, Semba S, Gorai I, et al. Analysis of gene expression induced by diethylstilbestrol (DES) in human primitive Müllerian duct cells using microarray. *Cancer Lett* 2005;220:197–210.
- [19] Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 2003;24:4375–83.
- [20] Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, et al. "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics* 2006;29:64.
- [21] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Bostein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14863–8.
- [22] Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, et al. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5760–8.
- [23] Ishizuka M, Hatori M, Suzuki T, Miki Y, Darnel AD, Tazawa C, et al. Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis. *Clin Sci (Lond)* 2004;106:293–300.
- [24] Rodan GA, Noda M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1991;1:85–98.
- [25] Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key role of TGF- $\beta$  superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:43–7.
- [26] Lønning PE, Geisler J, Krag LE, Erikstein B, Bremnes Y, Hagen AI, et al. Effects of exemestane administered for 2 years versus placebo on bone mineral density, bone biomarkers, and plasma lipids in patients with surgically respected early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:4847–9.
- [27] Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. Intergroup Exemestane Study. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1081–92.
- [28] Coleman RE, Banks LM, Girgis SI, Vrdoljak E, Fox J, Porter LS, et al. Skeletal effect of exemestane in the Intergroup Exemestane Study (IES)—2 years bone mineral density (BMD) and bone biomarker data. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94:S233.
- [29] Vottero A, Stratalis CA, Ghizzoni L, Longui CA, Karl M, Chrousos GP. Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgen in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1091–5.
- [30] Brum IS, Spritzer PM, Paris F, Maturana MA, Audran F, Sultan C. Association between androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and plasma testosterone levels in postmenopausal women. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:135–41.
- [31] Vanderschueren D, Vandendput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004;25:389–425.
- [32] Turner A, Chen T, Barber T, Malabanan A, Holick M, Tangpricha V. Testosterone increases bone mineral density in female-to-male transsexuals: a case series of 15 subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:560–6.
- [33] Ruetsche AG, Kneubuehl R, Birkhaeuser MH, Lippuner K. Cortical and trabecular bone mineral density in transsexuals after long-term cross-sex hormonal treatment: a cross-sectional study. *Osteoporos Int* 2005;16:791–98.
- [34] Kasperk CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, Baylink DJ. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology* 1989;124:1576–8.
- [35] Kasperk C, Fitzsimmons R, Strong D, Mohan S, Jennings J, Wergedal J, et al. Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1322–9.
- [36] Chen Q, Kaji H, Kanatani M, Sugimoto T, Chihara K. Testosterone increases osteoprotegerin mRNA expression in mouse osteoblast cells. *Horm Metab Res* 2004;36:674–8.
- [37] Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2309–14.
- [38] Sala A, Watson R. B-Myb protein in cellular proliferation, transcription control, and cancer: latest developments. *J Cell Physiol* 1999;179:245–50.
- [39] Chalhoub N, Benachenhou N, Rajapurohitam V, Pata M, Ferron M, Frattini A, et al. Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat Med* 2003;9:399–406.
- [40] Boulet AM, Capecchi MR. Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. *Development* 2004;131:299–309.
- [41] Lundberg P, Lundgren I, Mukohyama H, Lehenkari PP, Horton MA, Lerner UH. Vasoactive intestinal peptide (VIP)/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in mouse calvarial osteoblasts: presence of VIP-2 receptors and differentiation-induced expression of VIP-1 receptors. *Endocrinology* 2001;142:339–47.
- [42] Gutierrez J, Osses N, Brandan E. Changes in secreted and cell associated proteoglycan synthesis during conversion of myoblasts to osteoblasts in response to bone morphogenetic protein-2: role of decorin in cell response to BMP-2. *J Cell Physiol* 2006;206:58–67.
- [43] Omi M, Fisher M, Mahle NJ, Dealy CN. Studies on epidermal growth factor receptor signaling in vertebrate limb patterning. *Dev Dyn* 2005;233:288–300.
- [44] Rodan GA, Raisz LG, Bilezikian JP. Pathophysiology of osteoporosis. (chapter 73)In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology, 2nd ed., vol. 1. NY, USA: Academic Press, A division of Harcourt, Inc.; 2002. p. 1275–90.
- [45] Kellinsalmi M, Monkkonen H, Monkkonen J, Leskela HV, Parikka V, Hamalainen M, et al. In vitro comparison of clodronate, pamidronate and zoledronic acid effects on rat osteoclasts and human stem cell-derived osteoblasts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97:382–91.
- [46] Chen Q, Kaji H, Sugimoto T, Chihara K. Testosterone inhibits osteoclast formation stimulated by parathyroid hormone through androgen receptor. *FEBS Lett* 2001;491:91–3.
- [47] Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3493–7.
- [48] Wiren KM, Orwoll ES. Androgens: receptor expression and steroid action in bone. (chapter 43)In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology, 2nd ed., vol. 1. NY, USA: Academic Press, A division of Harcourt, Inc.; 2002. p. 757–72.
- [49] Chow LW, Wong JL, Toi M. Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial for locally advanced breast cancer: preliminary report. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86:443–7.
- [50] Sato T, Morita I, Sakaguchi K, Nakahama KI, Smith WL, Dewitt DL, et al. Involvement of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in osteoclast-like cell formation induced by interleukin-1 beta. *J Bone Miner Res* 1996;11:392–400.



## 関節リウマチにおける 軟骨・骨破壊の病理学的特徴

宇月 美和<sup>\*1)</sup> 佐々木 喜子<sup>\*\*</sup> 澤井 高志<sup>\*2)</sup>

最近では遺伝子や細胞内タンパクなどを問題にした解析が目覚ましい発展を遂げ、ともすれば全体像をみることが失われがちである。本稿では、関節リウマチ (RA) の組織学的所見を中心にして滑膜の炎症から軟骨・骨破壊に至る過程を述べた。RA の病態を炎症という一つの流れに従って眺めてみると、まだまだ解明されるべき点が多いことに気がつく。たまには立ち止まって全体像を眺めることも必要ではないかと思われる。

### *Histopathological Features of Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis (RA).*

*Iwate Medical University, School of Medicine, Department of Pathology*

*Miwa Uzuki, Takashi Sawai*

*Iwate Medical University, School of Medicine, Department of Pathology/Orthopedics*

*Yoshiko Sasaki*

Recent technologies proceed the remarkable development of genetical and protein analysis. However, we are apt to lose opportunities to observe about the disease as a whole feature. In this article, we describe the inflammatory process from synovial inflammation to cartilage and bone destruction. We notice that there are many problems to be solved in rheumatoid arthritis (RA) from the point of inflammatory process. It is often needed for us to stand still and look over the whole features of disease.

#### はじめに

関節リウマチ (RA) は免疫異常を基盤とした慢性炎症性疾患であるが、その大きな特徴は滑膜の炎症と軟骨・骨の吸収であり、疼痛を伴った関節は最終的には変形と運動障害に至る (図 1, 2)。

疾患の本体はまだ十分に解明されたとは言いが、滑膜組織の炎症の特徴については比較的よく観察されており、そこに発現しているさまざまな炎症性細胞、サイトカインや増殖因子、タンパク分解酵素などの解析が行われている<sup>1)~7)</sup>。

\*岩手医科大学病理学第一講座 <sup>1)</sup>(うづき・みわ) <sup>2)</sup>教授(さわい・たかし)

\*\*岩手医科大学病理学第一講座/整形外科学講座 (ささき・よしこ)

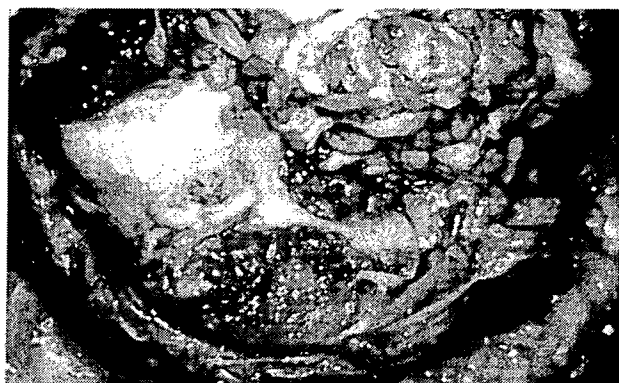


図1 RA患者の膝関節の手術所見

血管の豊富な炎症性肉芽組織(パンナス)によって滑らかな関節の表面は侵食されていく。

RA: 関節リウマチ

(筆者ら提供)

一方、骨破壊は、一般的には滑膜の炎症がそのまま骨組織に波及して軟骨や骨を破壊するか、あるいは破骨細胞を活性化して骨を壊すとイメージされていると思われるが、実際はそう単純ではない。例えば、軟骨組織は血管が侵入すると変性するが、骨は循環障害によって骨変性が起こるなど、対照的な反応を示す。

では、RAの関節破壊とはどのような形で進行するのであろうか。これを明らかにするためには、破骨細胞の動態、サイトカインの発現、タンパク分解酵素の個別的な活性とは別に、細胞や組織がどのような形で変化していくかという過程について、組織を通して全体的な面から眺めることも必要と思われる。

### RAの炎症はどこから始まるか

関節の炎症の始まりはどこかということに関しては諸説がある。RA初期の病理組織像については、①浮腫、②細胞浸潤、③フィブリンの析出と言われているが、どこから始まるかということとははっきりしていない。ポケットあるいはbare



図2 パンナスの組織所見

パンナスは腫瘍の浸潤のように軟骨を吸収し、下方にある骨へ至り、これを吸収する。

(筆者ら提供)

areaと呼ばれる、軟骨と滑膜の移行部から炎症が始まるとの報告があるが、ヒトの場合ははっきりと証明された文献は少ない。この部位には好中球が最初に浸潤してくるという考え方もあるが、これも確かではない。

我々が発症1年未満のRA患者の膝関節の内側、外側、膝蓋上部の滑膜組織を関節鏡で観察しながら採取して検討したところ、特にどの部位で病変が進んでいるという所見は得られず、むしろ採取部位にかかわらず同時に病変が進行しているという結果を得ている<sup>2)</sup>。その組織像は滑膜組織のsubliningの毛細血管あるいは小静脈周囲にhuman leukocyte antigen (HLA)-DR陽性の線維芽細胞様細胞(fibroblast like cell: FLC)がまず浸潤し、引き続いてTリンパ球、暫くしてBリンパ球の浸潤が見られるようである<sup>3)</sup>。炎症論からいえば急性炎症のstageでは、発症期に滲出とと

RA: 関節リウマチ, HLA: human leukocyte antigen, FLC: fibroblast like cell (線維芽細胞様細胞)

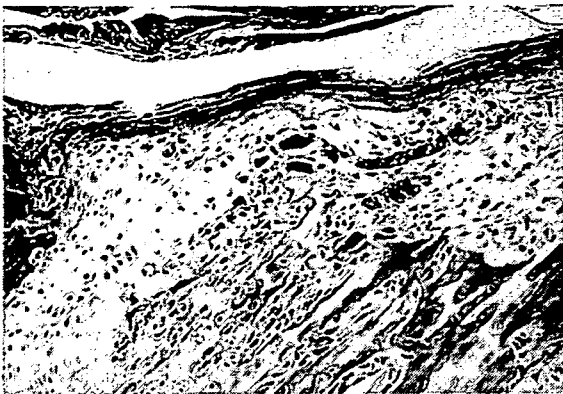


図3 10週齢のMRL/lマウスの膝関節 HE染色像

大腿骨において、成長軟骨、骨髄、骨幹部骨膜の3点に囲まれた部分である periphysis には、血管の増生、マクロファージと多核大型細胞の集積が認められる。

HE：ヘマトキシリン-エオジン

(文献10より)

もに好中球が浸潤することは十分考えられる。しかし最近では、RAの炎症がどのような形で始まるかという初期病態の観察のために組織を採取することは、困難になりつつある。

これに対して動物モデルを用いて病態を調べることは可能である。我々がRAなどの自己免疫疾患の動物モデルであるMRL/lマウスを用いて観察した結果、初期はsubchondralにあるossification groove of Ranvier (R zone)から入り込む血管に沿った形でMac-1陽性のマクロファージの浸潤が認められ、そこから炎症が拡大して軟骨に向かって拡がっていることを確認した(図3)<sup>10)</sup>。

また、初期には滑膜のsubliningにもこのMac-1陽性細胞が出現する<sup>11)</sup>。従って、滑膜組織に始まった炎症がポケットあるいはbare areaと呼ばれる部分から軟骨に拡大していくということは、物理的な距離、あるいは物質を透過しやすい有窓性の血管を持つという組織学的特徴からみても妥当性のある意見であると思われるが、今後、精度の高い画像によって観察していくことも可能になるとと思われる。



図4 パンヌス周囲の紡錘形細胞の電子顕微鏡像

紡錘形のFLCは多彩な像を示し、滑膜の深部から骨周囲まで浸潤する。この細胞はタンパク合成を示す粗面小胞体や分解酵素を示すリソソームを有する。滑膜深部のFLCとパンヌスのFLCが同一の細胞であるかどうかは問題である。

FLC：線維芽細胞様細胞

(筆者ら提供)

### 滑膜の病変から軟骨の吸収

滑膜の炎症と軟骨の吸収との関係にはまだ解明されていない点もあり、治療による抗炎症効果が上がったと言われながら、骨吸収が十分にコントロールできない問題がここにある。初期病変からみると、RAの病変は滑膜のsubliningから始まり、リンパ球やFLCを主体とする炎症性細胞が深部に浸潤し、それが軟骨に及んで肉芽組織(パンヌス)になったのではないかとと思われる(図4)。パンヌスでは、リンパ球浸潤とともに血管増生、多彩な細胞像を示すFLCの増殖が特徴であるが、滑膜にみられる炎症性の肉芽組織と軟骨や骨破壊を示す組織が同じ性質を持つものと考えていいかどうかは問題になる(図5)。軟骨、骨での一連の変化については、図6のような因子の関与が考えられる。

### 軟骨

#### 1. 関節液の影響

膝関節の場合、病変のない関節の関節液量は0.5mL程度であり、ヒアルロン酸が多く含まれて

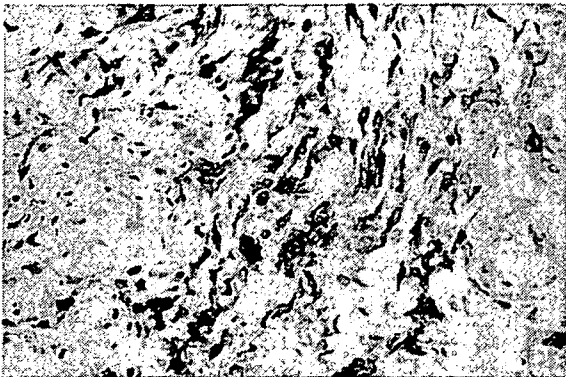


図5 滑膜深部の線維芽細胞様細胞

線維芽細胞様細胞はHLA-DRが陽性となるほかに、細胞によってはCD34、CD68、CD14などが陽性を示し、骨髄のstromal cell由来とも言われている。この写真はMy4 (CD14) による免疫染色であるが、線維芽細胞様細胞も陽性になる。

HLA-DR : human leukocyte antigen-DR

(筆者ら提供)

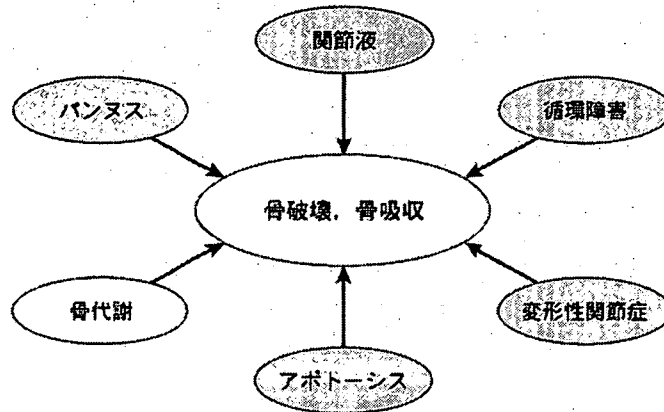


図6 軟骨や骨の変性を惹き起こすさまざまな因子

軟骨や骨に破壊や吸収をもたらす原因には、図のような因子があげられる。これらの因子が同時にあるいは順次作用して破壊が進行する。

(筆者ら提供)

いるため粘性が高く、生物活性はほとんどみられない<sup>10)</sup>。それに対してRAの関節液ではヒアルロン酸の分子量が低下し、粘性の低下した滲出液の状態になり、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-1、ヒアルロニダーゼをはじめ、多種類のタンパク分解酵素と好中球や滑膜細胞を中心とした細胞が含まれている<sup>11) 12)</sup>。関節液中のリンパ球は好中球に比べると少ないが、これは好中球の走化性と関節液中の因子との関係による。

しかし、関節液中にあるこれらのタンパク分解

酵素が、いつでも活性化されているわけではない。我々の検討では、RA患者から採取した関節液に、実験的にp-aminophenylmercuric acetate (APMA) を入れた状態でゼラチン分解活性がみられるのに対し、OA患者の関節液ではこのような現象はみられない<sup>13)</sup>。このことは、RAの関節液に含まれるタンパク分解酵素は通常それほど活性化されておらず、何か急性の症状が発生した場合に酵素の活性化が起こる可能性を示しているが、それが如何なる因子によるかは不明である。

APMA : p-aminophenylmercuric acetate, MMP : マトリックスメタロプロテアーゼ

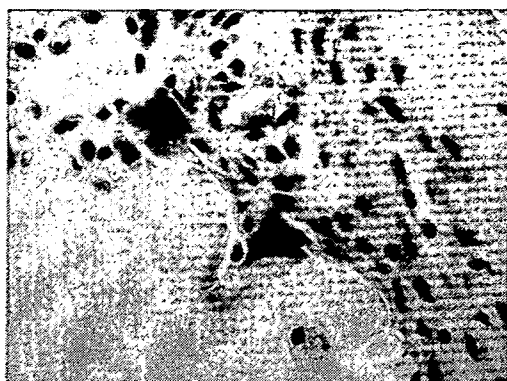


図7 軟骨周囲にみられる破軟骨細胞

破軟骨細胞は破骨細胞に類似した多核巨細胞である。破骨細胞はよく知られているが、破軟骨細胞の存在はあまり知られていない。

(筆者ら提供)

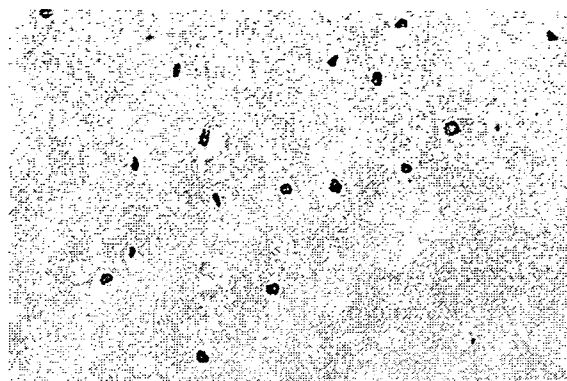


図8 RAの軟骨に発現するNO

変性しつつある軟骨の軟骨細胞には、NOの発現が認められる。

NO: nitric oxide, RA: 関節リウマチ

(文献13より)

## 2. 軟骨の変性

軟骨の変性、破壊には2つの様式がある。一つはパンススによる吸収であり、この中には浸潤してくる炎症性細胞およびFLCから産生されるタンパク分解酵素による変性、あるいは破軟骨細胞による吸収などがあげられる(図7)。特に前者のタンパク分解酵素には多くの種類の酵素があげられている。最近注目されているのはMMP、中でもMMP-3であるが、カテプシンL (Cat L) やカテプシンK (Cat K) などかなり強力なタンパク分解酵素である。

また、軟骨の分解、変性に関与するもう一つの大きな要素は、軟骨自らが nitric oxide (NO) やタンパク分解酵素などを発現して、基質を分解しながらアポトーシスに陥り自滅していくことである(図8, 9)<sup>16)19)</sup>。しかし、なぜ基質に囲まれた軟骨細胞に酵素の発現やNOの発現がみられるようになるのか、その機序は明らかにされていない。また、軟骨細胞が未分化な間葉系細胞、線維芽細胞に transform していることを示す変化もみられる。

タンパク分解酵素については、周囲の肉芽組織のみにみられる酵素、軟骨細胞のみに発現される酵素、そして肉芽組織と軟骨細胞いずれにも産生される酵素がそれぞれ存在することが明らかになった。例えば、Cat Lなどは周囲の肉芽組織と軟骨細胞自身にみられるが、MMP-9は破軟骨細胞や単球系細胞には発現するものの軟骨細胞自身に発現することはない<sup>17)</sup>。このように、軟骨組織は関節液、周囲のパンスス、軟骨細胞自らの自滅によって吸収が進行していく。

軟骨基質に関しても、破壊されるというよりは吸収される形で失われていく。それを示すマーカーにはヒアルロン酸、II型コラーゲン、コンドロイチン硫酸などがあげられているが<sup>18)19)</sup>、我々はヒアルロン酸が軟骨の破壊された結果ではなく、破壊されつつある際の有力なマーカーになり得ることを証明している<sup>20)21)</sup>。

### 骨吸収への進展

骨破壊というと一部では骨が壊されると思われているようであるが、実際は骨梁が細くなる吸収

Cat K: カテプシンK, Cat L: カテプシンL, NO: nitric oxid

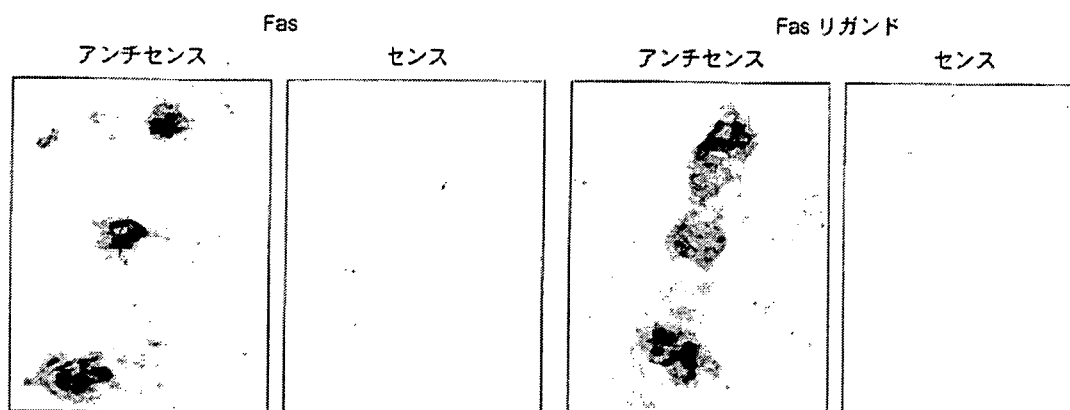


図9 RAの軟骨に発現するアポトーシス関連分子

変性しつつある軟骨細胞には、細胞にアポトーシス（細胞死）のシグナルを伝える際に重要とされる Fas および Fas リガンドが発現し、アポトーシスに至る。

RA：関節リウマチ

(筆者ら提供)

の形をとる。骨の吸収に関しては破骨細胞のほかにも単球、FLC などの関与も考えられるが、このほか、炎症に伴う閉塞性動脈炎など循環障害の影響もある（図 10）。

パンヌスによる骨吸収は、ほとんど軟骨の吸収に連続した形で進行する。骨吸収部では破骨細胞が多数、骨縁に沿ってみられるが、破骨細胞のマーカである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) やマクロファージマーカー (CD68) などで検討すると、破骨細胞以外にも多くの単球系細胞が陽性になっており、前破骨細胞であることを示唆している。

破骨細胞の周囲では水素イオン ( $H^+$ ) による酸性プロテアーゼの活性化も作用している。破骨細胞の胞体内には  $H^+$  を産生する carbonic anhydrase II (CA II) が証明され、さらに産生された  $H^+$  を胞体外にくみ出すプロトンポンプの液胞型アデノシントリホスファターゼ (V-ATPase) が同一細胞で証明されている。また、酸性下で初めて

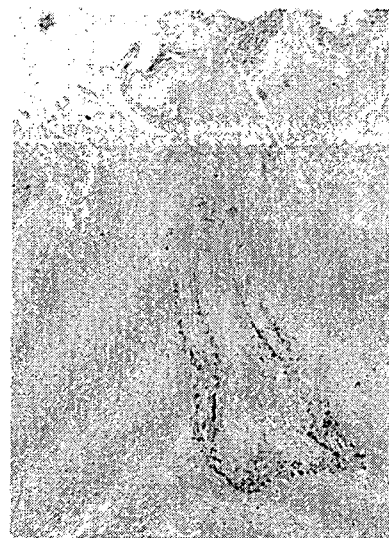


図 10 RA にみられる骨壊死と周囲の動脈の閉塞

RA では動脈の閉塞という循環障害によって骨壊死が起こる。これはあまり注目されていない所見であるが、骨の変性には循環障害も大きな影響を与える。

RA：関節リウマチ

(筆者ら提供)

CA II：carbonic anhydrase II,  $H^+$ ：水素イオン, TRAP：酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ, V-ATPase：液胞型アデノシントリホスファターゼ

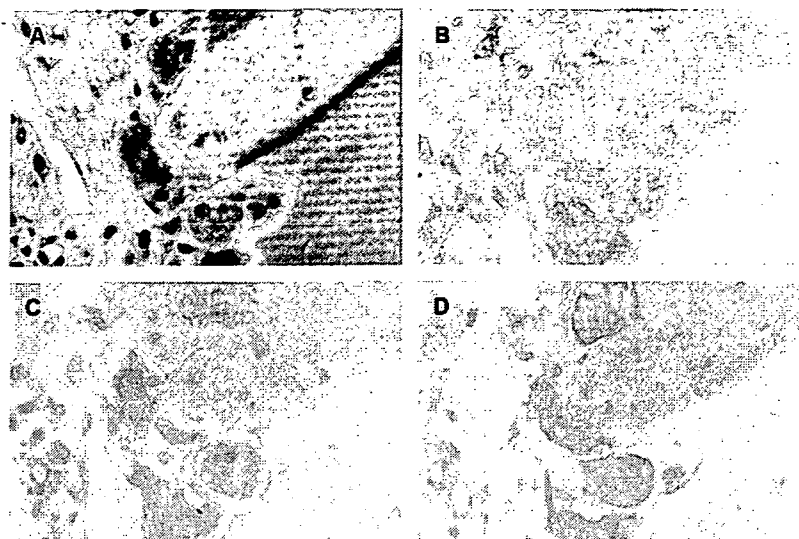


図 11 破骨細胞にみられる酸性プロテアーゼの活性機構

A : HE, B : Cat D, C : CA II, D : V-ATPase

吸収骨の周囲にみられる破骨細胞では、CA IIによりプロトンを生産し、V-ATPaseによりプロトンが細胞外に放出され、Cat Dのような酸性プロテアーゼが活性化される。破骨細胞周囲はかなり酸性であると考えられる。

CA II : carbonic anhydrase II, Cat D : カテプシンD, HE : ヘマトキシリン-エオジン染色, V-ATPase : 液胞型アテノセントリホスファターゼ

(文献 22 より)

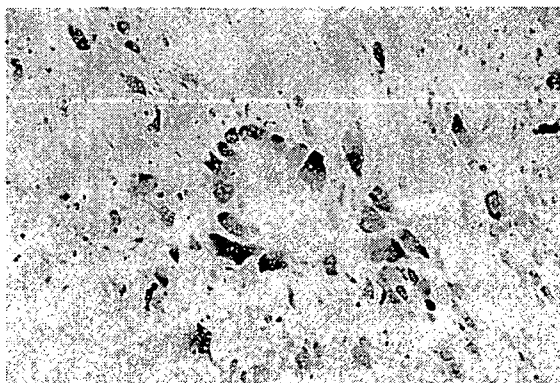


図 12 破骨細胞が産生する MMP-9

破骨細胞の周囲は酸性環境であるとされているが、MMP-9のような中性プロテアーゼも産生、放出される。MMPは完全に中性でなくても活性を示すという報告がある。

MMP : マトリックスメタロプロテアーゼ

(筆者ら提供)

活性化される Cat L, Cat D などの酸性プロテアーゼも同様の分布を示すことが知られている (図 11) <sup>22, 23</sup>。

破骨細胞周囲はこのように酸性化されているが、同細胞は MMP-9 などの中性プロテアーゼも産生しており (図 12) <sup>24</sup>、中性プロテアーゼが酸性環境下でも活性化され得ることが示唆される。また、パニヌスを電子顕微鏡で観察すると、破骨細胞のほかに紡錘形をした細胞が認められるが、これらは HLA-DR 陽性であるだけでなく、さまざまな酵素を産生、分泌している。

骨基質の面からみた骨破壊の様式は、カルシウム、リンが同じように減少して骨粗鬆症の形をとり、骨梁はもろくなる。RA の骨は、手で押すと簡単に崩れそうなほど柔らかいものであるが、組織学的には骨粗鬆症の形をとる。

このようにして RA 関節の骨は吸収されるが、

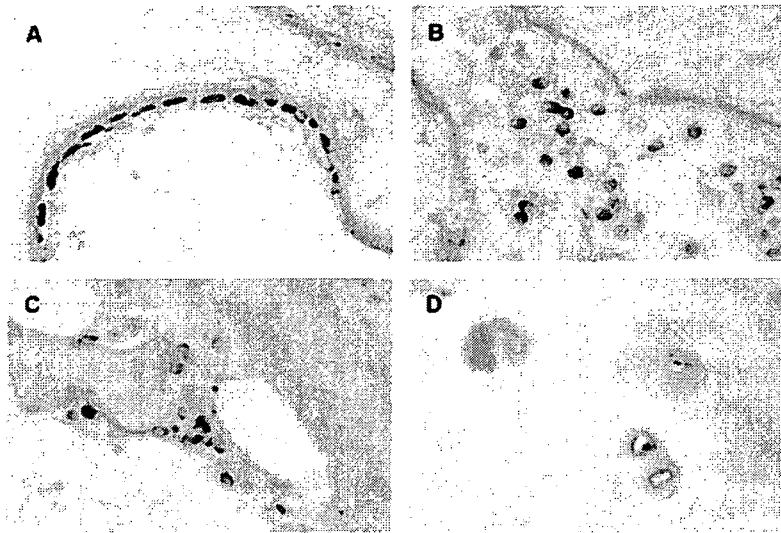


図 13 骨周囲にみられる RANKL の発現

A: 骨芽細胞, B: リンパ球, C: Mφ, D: 軟骨細胞

破骨細胞の分化、誘導を惹き起こす RANKL は、従来考えられていた骨芽細胞だけでなく、リンパ球、マクロファージ、軟骨細胞でも発現しており、破骨細胞の分化誘導以外の機能も有していることが示唆される。

RANKL: receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand

(筆者ら提供)

膝関節などでは関節面の軟骨が消失して関節腔が消失し、骨面が直接摺り合うようになると骨には間葉細胞の反応性巣状増殖あるいは線維性軟骨からなる fibrocartilagenous plug を形成するようになる。一方、炎症が長期化すると、靭帯の付着部に嚢胞を形成したり<sup>25)</sup>、軟骨・骨の吸収に加えて、靭帯の断裂や関節包の線維化などによる無理な外力が作用することによって、関節は大きく変形して運動の機能障害を惹き起こす。また、軟骨が消失したために二次的変化としての変形性関節症 (OA) 変化が進行して疼痛に結びつく。

#### 軟骨・骨破壊と滑膜の炎症との関係

RA の治療では、何を標的にして関節の変形を防ぐのが最も有効であろうか。これまでみてきた中で、RA の根本的な原因に対する治療は別とし

て、破骨細胞の分化誘導も含めて機能を抑えることがターゲットになり得るものと思われる。また、破骨細胞の分化誘導因子、タンパク分解酵素の合成を促進させる因子、分解酵素の分泌や活性の因子などを個々に抑制するべきかということも問題になる。

破骨細胞の分化誘導因子としては、receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) (図 13) あるいはさまざまなサイトカインが知られているが、その中で最近最も注目されているのは、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  である。これらの因子は破骨細胞だけではなく、さまざまな細胞で産生されており<sup>1)</sup>、サイトカインの刺激によってタンパク分解酵素が誘導され、軟骨細胞自体のアポトーシスが惹き起こされる可能性もある<sup>17)</sup>。一方、TNF- $\alpha$  単独での細胞障害性はなく、他の因

OA: 変形性関節症, RANKL: receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, TNF: tumor necrosis factor



子と協調してアポトーシスを誘導するという報告もあり、TNF- $\alpha$ はアポトーシスの必要条件であっても十分条件ではない可能性もあり、今後の検討課題である<sup>26)</sup>。

骨吸収は破骨細胞だけで行われるものではないが、RAの組織を観察するとOAなどの非RA例に比較してFLCの増殖が特徴的であり、このFLCがRAの骨吸収に関与しているのではないかと思われる。一般的に、RAを代表する滑膜の組織像というリンパ濾胞の形成や滑膜の絨毛状増生がよく知られているが、筆者らは、RAの最も大きな特徴はFLCの増殖であろうと考えている。この細胞は紡錘形で線維芽細胞様でもあるが、電子顕微鏡で観察するとライソゾームを保有しており、Catシなどのタンパク分解酵素を産生する一方で、MMP-9などの非ライソゾーム型のタンパク分解酵素も認められており<sup>27)</sup>、この細胞が直接あるいは間接的に骨破壊に関与していることは間違いない。

このFLCは骨髄にあるCD34陽性のnurse cell由来であり、それがFLCとなり<sup>28) 29)</sup>、さらに骨破壊に関与するのではないかという報告もある。もしそうであれば、さまざまなサイトカインやタンパク分解酵素と同時に、この細胞の活性を抑制することがRAの治療につながるものと思われる。

RAの炎症は、免疫異常を基礎とした炎症と非特異的炎症の2つに特徴づけられる。概論すると、前者を代表する炎症性細胞はリンパ球を中心としたものであり、後者は顆粒球と言えるが、後者の肉芽組織が骨吸収につながるのではないかと思われる。この非特異的な肉芽組織の活性を抑え、ここに含まれるサイトカイン、タンパク分解酵素の産生や活性を抑えることが骨吸収の抑制に繋がるのではないかと思われる。

## おわりに

以上、病理組織学からみて軟骨・骨破壊を取り上げてきたが、現在、未だにはっきりしていないのが滑膜の炎症から軟骨・骨吸収に至る過程である。この点についてはFLCを中心とした詳細な分析が今後の課題と言える。

## 文 献

- 1) 斎藤隆幸, 宇月美和, 力丸 暁ほか: RA患者の血清, 関節液, 関節組織におけるTNF $\alpha$ の動態. 炎症 14: 143-150, 1994.
- 2) 深町知博, 宇月美和, 田村裕昭ほか: 慢性関節リウマチにおけるIL-6レセプターの動態-血清, 関節液, 滑膜組織での検討- 炎症 14: 489-497, 1994.
- 3) Takahashi Y, Kasahara T, Sawai T, et al: The participation of IL-8 in the synovial lesions at an early stage of rheumatoid arthritis. Tohoku J Exp Med 188: 75-87, 1999.
- 4) 宗像孝佳, 宇月美和, 嶋村 正ほか: 慢性関節リウマチにおけるInterleukin (IL)-18の動態. リウマチ 41: 625-634, 2001.
- 5) 伊藤 崇, 宇月美和, 嶋村 正ほか: 慢性関節リウマチ血清, 関節液中のMatrix Metalloproteinase (MMP)-13の動態. リウマチ 42: 60-69, 2002.
- 6) Sawai T, Murakami K, Ohtani Y, et al: Stromelysin synthesizing cells in the synovial tissues of rheumatoid arthritis demonstrated by *in situ* hybridization and immunohistochemical methods. Tohoku J Exp Med 160: 285-286, 1990.
- 7) Maeda S, Sawai T, Uzuki M, et al: Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis. Annals Rheum Dis 54: 970-975, 1995.
- 8) 大山 明, 服部 彰, 力丸 暁ほか: 慢性関節リウマチにおける膝関節鏡視下滑膜生検例の検討. 関節鏡 13: 39-42, 1988.
- 9) 澤井高志, 大山 明, 村上一宏ほか: 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.

- 10) Tanaka M, Fujii K, Tsuji M, et al: Autoimmune reaction to type II collagen and cartilage degeneration in MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Rheumatol Int* **24**: 84-92, 2004.
- 11) 澤井高志, 京極方久: MRL/l マウス. 難治疾患のモデルと動物実験(京極方久編) ソフトサイエンス社, 東京. p232-243, 1984.
- 12) 貝山 潤, 宇月美和: 変形性膝関節症における関節液のヒアルロン酸とその性状の変化. *岩手医誌* **58**: 9-21, 2006.
- 13) 大内修二, 菅野祐幸, 宇月美和ほか: 関節リウマチ関節液による関節軟骨細胞のアポトーシス誘導と高分子ヒアルロン酸投与による抑制効果. *臨床リウマチ* **16**: 280-285, 2004.
- 14) 澤井高志, 吉田 渡, 岩崎真弓: Film *in situ* zymography (FIZ) は液中のゼラチン分解能を測定できるか. *岩手医学雑誌* **54**: 466, 2003.
- 15) Kim HA, Song YW: Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **42**: 1528-1537, 1999.
- 16) Uzuki M, Matsuno H, Yudoh K, et al: Apoptotic chondrocyte death and matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**: S386, 2000.
- 17) Ouchi N, Uzuki M, Iwasaki M, et al: Cartilage destruction is partly induced by the internal apoptotic phenomenon of chondrocytes associated with expression of proteolytic enzymes and nitric oxide in relapsing polycondritis. *Arthritis Rheum* **48**: S623, 2003.
- 18) Terato K, Hasty KA, Reife RA, et al: Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol* **148**: 2103-2108, 1992.
- 19) Pothacharoen P, Teekachunhatean S, Louthrenoo W, et al: Raised chondroitin sulfate epitopes and hyaluronan in serum from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Osteoarthritis Cartilage* **14**: 299-301, 2006.
- 20) Sawai T, Yamada N, Uzuki M: Increased levels of circulating hyaluronate in the sera of patients with rheumatoid arthritis with special reference to joint destruction. *Arthritis Rheum* **37**: S247, 1994.
- 21) 山田 登, 宇月美和, 澤井高志: RA 患者の血中ヒアルロン酸の測定とその意義. *The Bone* **8**: 114-123, 1994.
- 22) 井上高美, 宇月美和, 森山芳則ほか: 慢性関節リウマチ (RA) 関節破壊に関与する酸性プロテアーゼ (cathepsin D) の活性化機構に関する免疫組織化学的解析. *炎症* **15**: 313-321, 1995.
- 23) Hu SX, Inoue H, Moriyama Y, et al: Immunoreactivity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human tissues - Using polyclonal rabbit antibodies against V-ATPase subunits. *Acta Histochem Cytochem* **31**: 309-322, 1998.
- 24) Seki M, Uzuki M, Ohmoto H, et al: Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in patients with rheumatoid arthritis. *Jap J Rheum* **7**: 197-209, 1997.
- 25) Yoshida M, Ichinohe S, Uzuki M, et al: Development of large pseudocysts adjacent to the knee joint in rheumatoid arthritis.-Assessment of radiological and histopathological approaches. *Mod Rheumatol* **12**: 128-133, 2002.
- 26) Yoshimura F, Kanno H, Uzuki M, et al: Down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor-alpha and actinomycin D. *Osteoarthr Cartil* **14**: 435-441, 2006.
- 27) 松本不二夫, 宇月美和, 金子智香ほか: 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.
- 28) Hirohata S, Yanagida T, Nagai T, et al: Induction of fibroblast-like cells from CD34<sup>+</sup> progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Journal of Leukocyte Biology* **70**: 413-421, 2001.
- 29) Hirohata S, Miura Y, Tomita T, et al: Enhanced expression of mRNA for nuclear factor  $\kappa$ B1 (p50) in CD34<sup>+</sup> cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* **8**: R54, 2006.

# 関節疾患の病理学的基礎

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)などの関節疾患は画像診断の発達により早期の段階での診断が可能になったが、画像所見が組織学的にどのような状態を反映しているのかについての検討は十分ではない。本稿では、画像診断にも必要と思われる病理組織学的所見を示す。

宇月美和 佐々木喜子 澤井高志

本特集には「関節リウマチとその近縁疾患のCT・MRI診断」とのタイトルがついている。以前は画像をみている医師は全体をみることはできるが細かなことはみえない、逆に病理の医師は局所には強いが全体が読めないといわれてきた。しかし、最近では局所的な詳細な所見も読影可能になってきており、画像診断医も病理医顔負けの組織学的所見を述べている。これも機器のめざましい進歩と専門の方々の努力の賜と敬服に耐えない次第である。

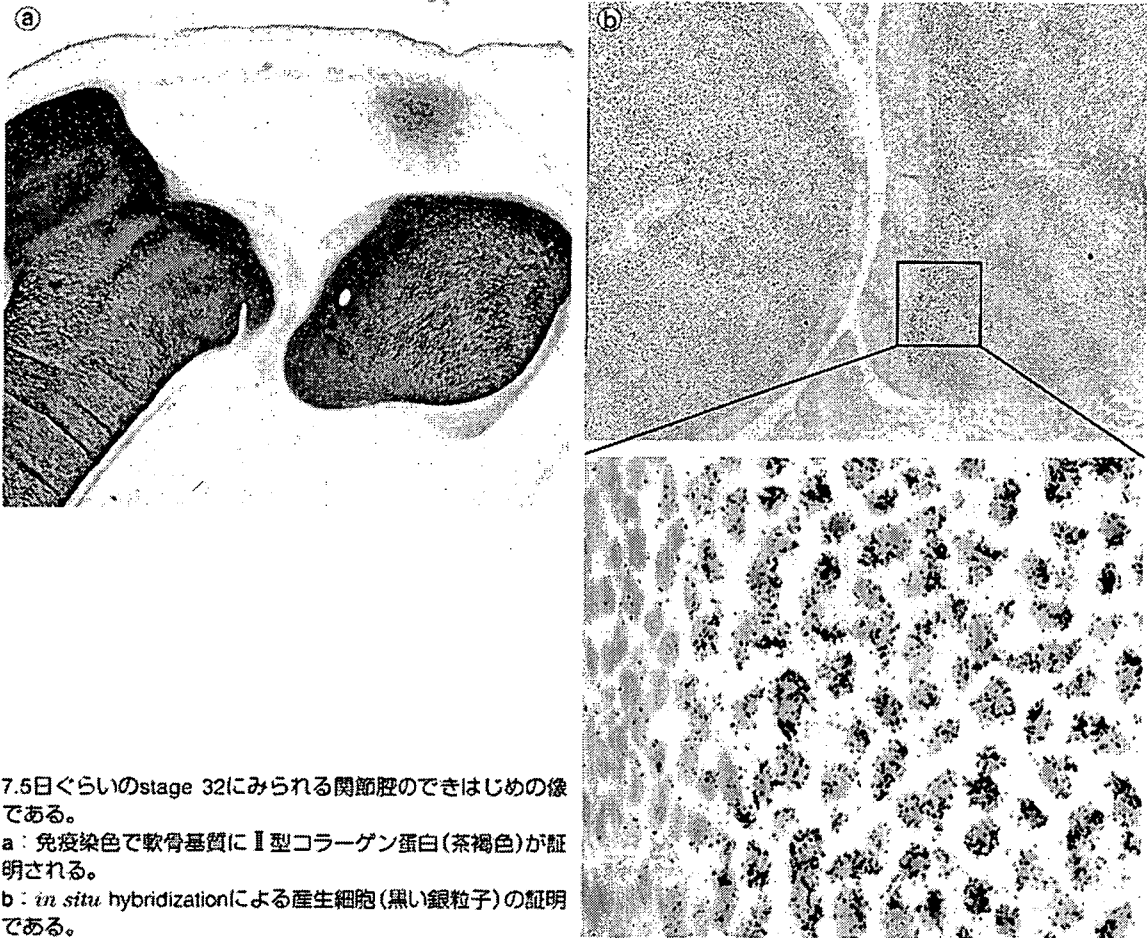
最近ではわれわれ病理医がRAのごく初期の病変をみたいと思っても機器の進歩に反して道義的な面が大きく立ちはだかってしまい、患者の了解を得ただけでは関節組織の一部を採取することは難しくなっている。それを打ち破るのが画像診断の進歩であるが、当面は画像の所見と病理所見を綿密に付き合わせてきちんとしたデータベースを築いていく必要がある。病理の最大のメリットは実際の病変部でどのような現象が起こっているかをみることができるということであり、これをもとにした判定は何ものにもかえがたい事実といえる。本稿では、正常の組織の観察とRAにみられる関節域の変化を中心に述べてみたい。

## 正常の関節の構造

### ※ 関節の発達

正常の関節を示す前に関節の発達について示しておきたい。これは一見画像診断には無関係なように思われるが、画像を読むときに発生学を念頭に置いておくと所見の取り方も深くなるかもしれない。以下に示す内容は筆者の米国留学時に行ったchick(ニワトリ胚)の関節の発達に関する研究であり、ヒトのそれとは若干異なるが、基本的には同じ方向を向いているものである。受精卵のchickは産卵後21日で孵化するが、その期間内に全身臓器も急速に発達するため、場合によっては同じ日でも目にみえる変化を示す場合もある。そのため、受精からの期間は日数ではなく、stageで表される。四肢については、stage17で体幹の横に小さな隆起として認められたlimb budに関節腔ができ、関節が形成される。図1は7.5日ぐらいのstage 32にみられる関節腔のできはじめである。図1aでは免疫染色で軟骨基質にII型コラーゲン蛋白が証明されており、図1bは*in situ* hybridizationによる産生細胞の証明である。この関節腔のcleftはアポトーシスにより生じるものとされている<sup>1)</sup>。図2は15日目(stage 41)ぐらいで、関節の原型がほぼ完成した像で、軟骨と骨がみられる。

図1 ニワトリ胚の膝関節でのⅡ型コラーゲンの発現



7.5日ぐらいのstage 32にみられる関節腔のできはじめの像である。

a: 免疫染色で軟骨基質にⅡ型コラーゲン蛋白(茶褐色)が証明される。

b: *in situ* hybridizationによる産生細胞(黒い銀粒子)の証明である。

chickの場合は関節軟骨の表面に線維軟骨のキャップが形成されるが、これは主にⅠ型コラーゲンからなる。このようにⅠ型コラーゲンとⅡ型コラーゲンでは、その発生部位がかなり早い段階から分化することがわかる。

関節の発達をみておもしろいのはそれだけではない。関節の発達を時間的に追跡すると、関節の周囲を取り巻く皮膚、筋肉のほかに、関節包、半月板、滑膜、靭帯の形成されていく過程が明らかになっていく。それをコラーゲンとの関係からみていくと、Ⅰ型コラーゲンが主な成分を占めるのは関節包、半月板、滑膜、靭帯であり、Ⅱ型コラーゲンは関節軟骨や骨端軟骨として長幹骨の長軸方向への成長に関与する(図2)。したがって同じ軟骨といっても半月板は線維軟骨で、滑膜や靭帯

の仲間であり、長幹骨で軟骨を形成している硝子軟骨とはかなり異なるものといえる。半月板の損傷部位に滑膜を移植するという方法<sup>3)</sup>は、発生学的にみると理を得た治療といえる。このように、外見ではみえない由来の“近いもの”“遠いもの”といった性質が組織学的にはみえてくる。なお、発生の後半になると、半月板や滑膜は靭帯と分かれてプロテオグリカンの産生を行うようになり、血管網が形成されるようになる。

### ※ 正常の関節組織

図3は正常の関節構造のシェーマである。本項ではこの図に沿って、関節疾患と関連する関節腔を取り巻く組織について述べる。