

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

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

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

鑑別診断¹⁾²⁾¹⁰⁾¹³⁾

RAと並んで患者数の多い関節疾患は変形性

RA 386例の検討

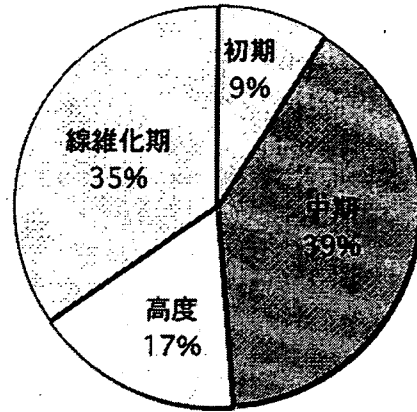


図7 RA患者の滑膜組織の炎症像

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

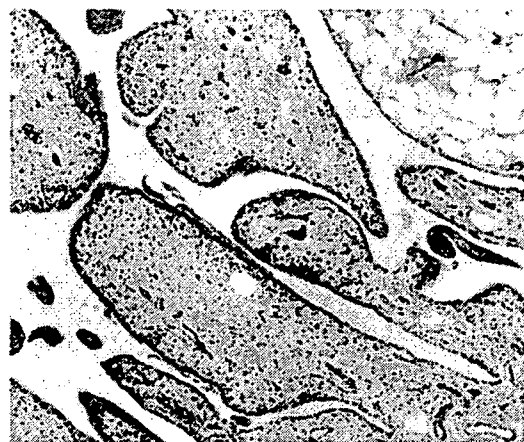


図8 OA患者の滑膜組織

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

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

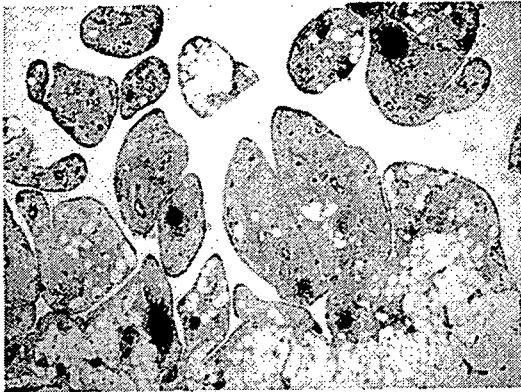


図9 軽度の炎症をともなったOA患者の滑膜組織

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

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

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

3)他の膠原病の関節病変、4)色素性絨毛結節状滑膜炎、5)急速破壊型股関節症(RDC)⁹⁾、6)結核やサルコイドーシスなど特異的な炎症、7)アミロイドーシス、8)血友病性関節症など多数認められる。いずれにおいても臨床所見などを参考に鑑別し得る。それぞれの病理組織像やRAとの鑑別点については紙面の関係で割愛するが、いずれにおいても軽度の滑膜増生や炎症性細胞浸潤がみられ、RAの初期症例に類似した組織像である。

RAの滑膜組織を特徴づける 線維芽細胞様細胞

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

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

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

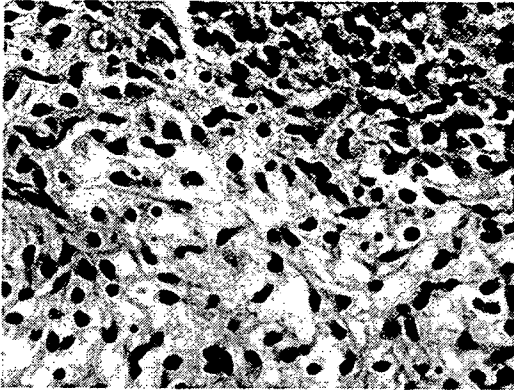


図10 RA 滑膜組織の線維芽細胞様細胞

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

症例の検討

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

(症例1) 78歳女性

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

病理組織像：典型的なRAの滑膜組織像であった(図11)。(単関節炎)

(症例2) 50歳 男性

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

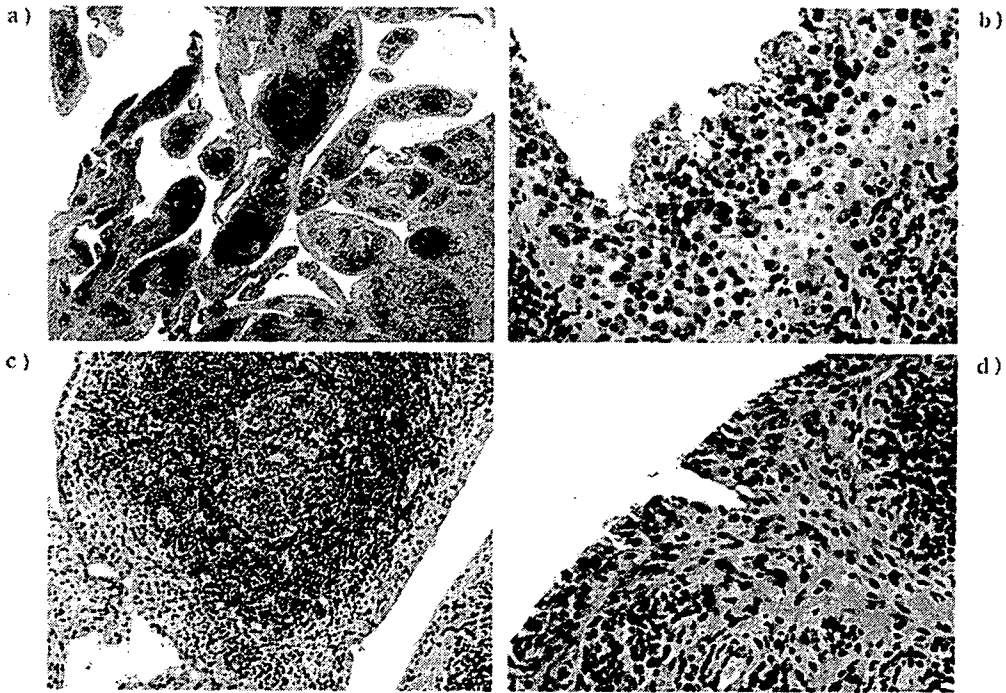


図11 症例1の滑膜組織像

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

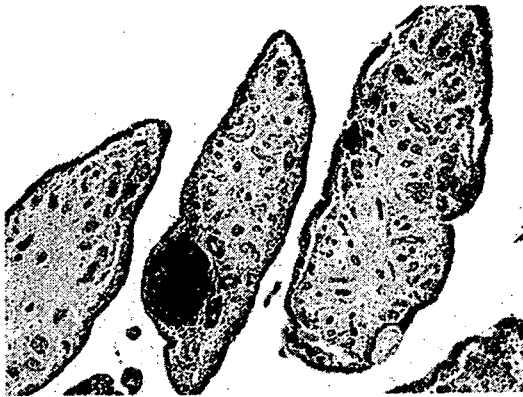


図12 症例3の滑膜組織像

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

て治療を受けていた。

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

(症例3) 71歳 女性

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

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

(症例4) 44歳 男性

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

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

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

(症例5) 22歳 男性

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

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

(症例6) 53歳 女性

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

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

(症例7) 67歳 女性

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

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

(症例8) 18歳 女性

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

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

(症例9) 22歳 男性

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

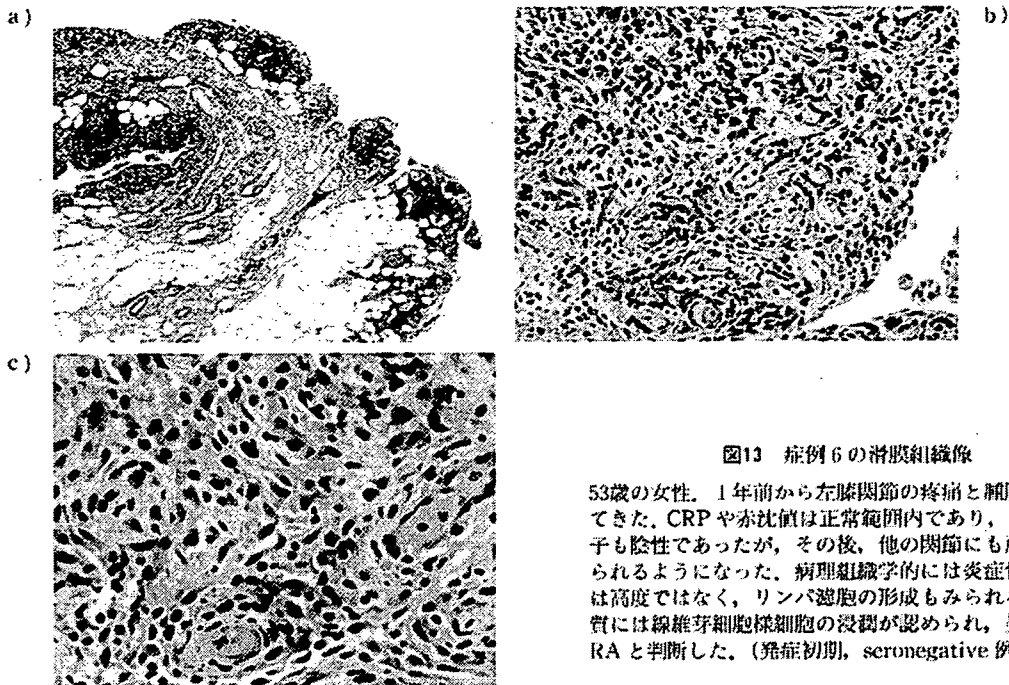


図13 症例6の滑膜組織像

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

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

鑑別が困難であった症例の特徴としては以下があげられる。

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

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

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

診断時の注意点

1. 検体の種類

RAの骨・関節領域の病理検体としては代表的なものに

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

当然ながら、1)の場合には他の疾患同様、診

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

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

2. 部位による違い

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

いる場合も多いので、必ずしも典型的な骨破壊像を示していない場合がある。

ま と め

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

謝 辞

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

文 献

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

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



Adiponectin activates c-Jun NH₂-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3 [☆]

Toshiaki Miyazaki, Jeffrey D. Bub, Miwa Uzuki, Yoshiki Iwamoto ^{*}

Department of Urology, Human and Molecular Genetics Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI 53226-0509, USA

Received 13 May 2005

Available online 26 May 2005

Abstract

Adiponectin, a major adipose cytokine, plays a crucial role in the inhibition of metabolic syndrome by acting on such cell types as muscle cells and hepatocytes. Furthermore, evidence suggests that adiponectin may influence cancer pathogenesis. Adiponectin occurs in non-proteolytic (full-length adiponectin: f-adiponectin) and proteolytic (globular adiponectin: g-adiponectin) forms in various oligomeric states. Different forms of adiponectin show distinct biological effects through differential activation of downstream signaling pathways. Here we identify c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) as common downstream effectors of f- and g-adiponectin. f- and g-adiponectin both stimulate JNK activation in prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and C2C12 myoblasts. Furthermore, both f- and g-adiponectin drastically suppress constitutive STAT3 activation in DU145 and HepG2 cells. These suggest that JNK and STAT3 may constitute a universal signaling pathway to mediate adiponectin's pathophysiological effects on metabolic syndrome and cancer.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Adiponectin; c-Jun NH₂-terminal kinase; Signal transducer and activator of transcription 3; Metabolic syndrome; Obesity; Prostate cancer; Hepatocellular carcinoma

Adiponectin is a cytokine encoded by a gene that is expressed most abundantly and highly specifically in adipose tissue [1–3]. Plasma levels of adiponectin correlate negatively with body mass index [4] and visceral fat accumulation [5]. Furthermore, low levels of plasma adiponectin are associated with such obesity-related disorders as diabetes mellitus [6], coronary artery (atherosclerotic) disease [7], and hypertension [8]. Mouse model studies have demonstrated crucial roles of adiponectin in pathogenic alterations of these disorders [9–12]. In addition, several lines of evidence indicate that adiponectin may influence cancer pathogenesis. Circu-

lating adiponectin levels are inversely associated with an increased risk of breast [13,14] and endometrial [15,16] cancer, and breast tumors arising in women with low adiponectin levels are more likely to show a biologically aggressive phenotype [14]. Furthermore, adiponectin has been shown to inhibit cell proliferation and induce apoptosis in leukemia cells [17] and to suppress tumor growth in mice, most likely due to inhibition of neovascularization through suppression of endothelial cell proliferation, migration, and survival [18].

Adiponectin is found in both non-proteolytic (full-length adiponectin: f-adiponectin) and proteolytic forms. f-Adiponectin, a 30-kDa polypeptide, is comprised of an amino-terminal signal sequence, a variable domain, a collagen-like domain, and a carboxyl-terminal globular domain [1–3,19], and circulates at high levels in the bloodstream [4]. f-Adiponectin forms oligomers through disulfide bond formation mediated

[☆] This study was supported in part by Department of Defense Grant DAMD17-02-1-0161 and by a grant from the Gustavus and Louise Pfeiffer Research Foundation.

^{*} Corresponding author. Fax: +1 414 456 6516.

E-mail address: yiwamoto@mcw.edu (Y. Iwamoto).

by Cys in the amino terminus and exists as three major oligomeric forms: a trimer, a hexamer, and a high molecular weight (HMW) form [20,21]. A proteolytic product of f-adiponectin containing the globular domain (globular adiponectin: g-adiponectin) exists as a trimer [22]. Differential biological functions have been reported among the oligomeric forms of f-adiponectin and g-adiponectin.

Adiponectin receptors, AdipoR1 and 2, have been identified in various tissues and cell types [23], although their expression in prostate has not previously been reported. AdipoR1 is abundantly expressed in skeletal muscle, while AdipoR2 is predominant in liver [23]. These receptors mediate cellular functions of both f- and g-adiponectin via activation of intracellular signaling pathways [23]. Several signaling molecules, such as 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK), nuclear factor (NF)- κ B, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α , and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase, are known to mediate adiponectin-induced metabolic alterations. Some of the signaling pathways are differentially regulated by distinct forms of adiponectin. f-Adiponectin, but not g-adiponectin, down-regulates genes involved in gluconeogenesis through AMPK in liver [24]. In contrast, both f- and g-adiponectin stimulate fatty acid oxidation, glucose uptake, and lactate production via AMPK activation in C2C12 myocytes [24]. Interestingly, the trimeric form of f-adiponectin, but not the hexameric or HMW form, activates AMPK in C2C12 cells [25]. Activation of NF- κ B by adiponectin in C2C12 cells is also oligomerization state-dependent: hexameric and HMW forms of f-adiponectin, but not trimeric f- or g-adiponectin, stimulate NF- κ B activation in C2C12 cells [22,25]. Adiponectin regulates endothelial cell function as well. Contradictory to the observation that f-adiponectin inhibits angiogenesis through endothelial cell apoptosis in capillary endothelial cells *in vitro* and in a mouse tumor model *in vivo* [18], f-adiponectin stimulates angiogenesis via cross-talk between AMPK

and Akt in umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro* [26]. Furthermore, the HMW form of f-adiponectin selectively suppresses apoptosis with concomitant stimulation of AMPK in HUVECs [27]. These contradictions may be due to differences in endothelial cell types used here and in microenvironments between *in vivo* and *in vitro* [18]. f-Adiponectin also stimulates NO production mediated by Akt through AMPK in bovine aortic endothelial cells [28]. In addition, f-adiponectin inhibits tumor necrosis factor- α -induced NF- κ B activation through protein kinase A in human aortic endothelial cells [29]. Although adiponectin has been demonstrated to modulate such signaling pathways, the effect of adiponectin on either c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) or signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways has not been reported.

JNK constitutes one of the mammalian mitogen-activated protein (MAP) kinase families and is activated in response to various stimuli, including cytokines [30–33], and mediates the phosphorylation and activation of such transcription factors as c-Jun [34]. JNK is involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis during various physiological and pathological events, including tumor development [35]. In addition, JNK plays a crucial role in obesity and insulin resistance [36,37].

The transcription factor STAT3 regulates diverse cellular functions, such as cell proliferation, survival, apoptosis, and differentiation [38]. In response to cytokines and growth factors, such as IL-6 family cytokines and leptin, STAT3 is activated through phosphorylation at Tyr-705 mediated by Janus kinase. The Tyr-phosphorylation allows STAT3 to dimerize, translocate to the nucleus, and activate transcription from target gene promoters containing a sis-inducible element (SIE) [39]. Constitutive STAT3 activation is crucial in malignant transformation and cancer progression [40]. Furthermore, STAT3 is involved in obesity and diabetes [41].

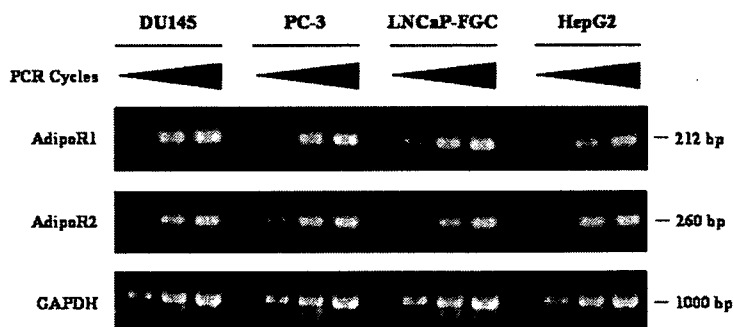


Fig. 1. Expression profiles of adiponectin receptor 1 and 2 in prostate cancer and hepatocellular carcinoma cells. Semi-quantitative reverse transcriptase-PCR analysis profiled the mRNA expression of adiponectin receptor isoforms in prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, and hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Adiponectin receptor has two isoforms (adiponectin receptor 1 and 2). After cells were deprived of serum for 24 h, total RNA was prepared and subjected to quantitative reverse transcriptase-PCR analysis. Amplifications were performed with 23, 26, and 29 cycles for adiponectin receptor 1 (AdipoR1) and adiponectin receptor 2 (AdipoR2) or 18, 21, and 24 cycles for GAPDH.

In this study, we determine the effects of f- and g-adiponectin on the activation of JNK and STAT3 in prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and C2C12 myoblasts. We show that both f- and g-adiponectin stimulate JNK activation in these cell lines and

inhibit STAT3 activation significantly in DU145 and HepG2 cells, in which STAT3 is constitutively activated. This suggests that JNK and STAT3 may be involved in the adiponectin regulation of metabolic disorders and that adiponectin may affect the pathogenesis of prostate cancer and hepatocellular carcinoma.

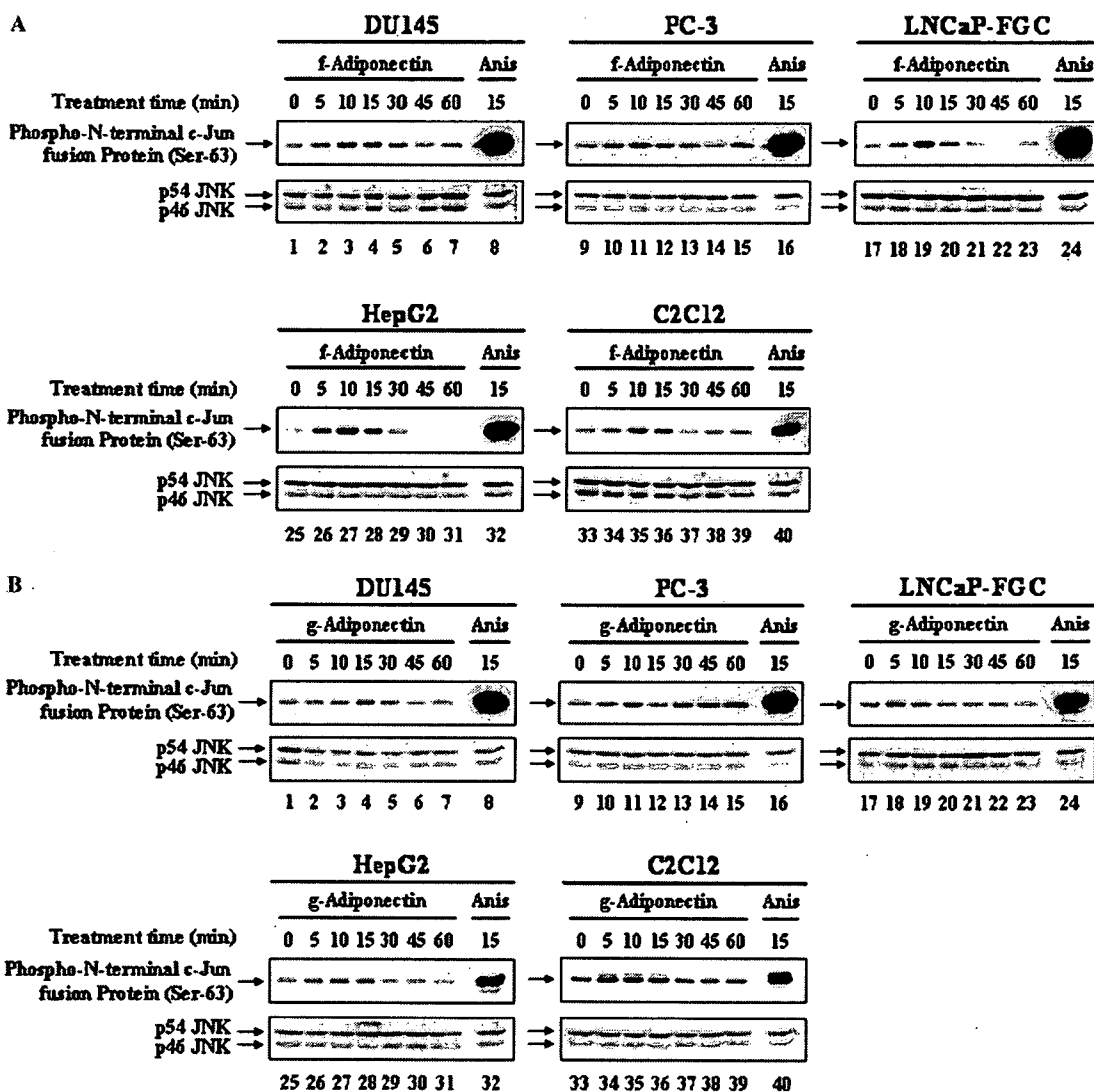


Fig. 2. (A) f-Adiponectin activates JNK in prostate cancer cells, hepatocellular carcinoma cells, and myoblasts. Prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and C2C12 myoblasts were deprived of serum for 24 h and incubated in serum-free medium (lanes 1, 9, 17, 25, and 33) or the serum-free medium containing 1.0 $\mu\text{g/ml}$ f-adiponectin (lanes 2–7, 10–15, 18–23, 26–31, and 34–39) or 10 $\mu\text{g/ml}$ anisomycin (Anis) (lanes 8, 16, 24, 32, and 40) for indicated periods. Anisomycin served as a positive control to stimulate JNK activation. Cell lysates (250–500 μg protein) were subjected to the in vitro JNK assay with N-terminal c-Jun fusion protein as a substrate. Phosphorylation of the substrate protein on Ser-63 was detected by Western blot analysis using the specific antibody (phospho-N-terminal c-Jun fusion protein (Ser-63)). To normalize JNK activity to total JNK protein levels, cell lysates (100 μg protein) were applied to Western blot analysis using the anti-JNK antibody that detects both active and inactive forms of JNK (p54 JNK and p46 JNK). (B) g-Adiponectin activates JNK in prostate cancer cells, hepatocellular carcinoma cells, and myoblasts. Prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and C2C12 myoblasts were deprived of serum for 24 h and incubated in serum-free medium (lanes 1, 9, 17, 25, and 33) or the serum-free medium containing 1.0 $\mu\text{g/ml}$ g-adiponectin (lanes 2–7, 10–15, 18–23, 26–31, and 34–39) or 10 $\mu\text{g/ml}$ anisomycin (Anis) (lanes 8, 16, 24, 32, and 40) for indicated periods. Anisomycin served as a positive control to stimulate JNK activation. Cell lysates (250–500 μg protein) were subjected to the in vitro JNK assay with N-terminal c-Jun fusion protein as a substrate. Phosphorylation of the substrate protein on Ser-63 was detected by Western blot analysis using the specific antibody (phospho-N-terminal c-Jun fusion protein (Ser-63)). To normalize JNK activity to total JNK protein levels, cell lysates (100 μg protein) were applied to Western blot analysis using the anti-JNK antibody that detects both active and inactive forms of JNK (p54 JNK and p46 JNK).

noma by acting on tumor cells directly through modulation of these molecules.

Materials and methods

Cytokines and antibodies. Recombinant human g-adiponectin was purchased from PeptoTech (Rocky Hill, NJ). Recombinant human f-adiponectin was from R&D Systems (Minneapolis, MN). Velocity sedimentation with sucrose gradients revealed that the batch of human recombinant f-adiponectin used for this study was composed of the HMW and lower molecular weight forms with the majority of the HMW form (data not shown). The stress-activated protein kinase/JNK assay kit, anti-JNK, anti-c-Jun, anti-phospho-c-Jun (Ser-63), and anti-phospho-c-Jun (Ser-73) polyclonal antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The anti-STAT3 antibody for the supershift assay was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Cell lines and culture conditions. Human prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, human hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and murine immortalized C2C12 myoblasts were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA). DU145, HepG2, and C2C12 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) plus penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). PC-3 and LNCaP-FGC cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and antibiotics.

Semi-quantitative reverse transcriptase-PCR analysis. Total RNA was isolated using the TRIzol standard technique from DU145, PC-3, LNCaP-FGC, and HepG2 cells deprived of serum for 24 h. cDNA was then generated from total RNA, and the reaction mixtures for PCR were prepared as described before [42]. PCR primers to detect AdipoR1 and AdipoR2 are as follows: AdipoR1 (forward: 5'-AG GACAACGACTATCTGCTAC-3' and reverse: 5'-CATCCCAAAA ACCACCTTCTC-3') and AdipoR2 (forward: 5'-AGAGAAAGTGG TGGGAAAG and reverse: 5'-GGGCGAGGGAGGAAAATAAC-3'). PCR was carried out with an initial denaturing at 94 °C for 1 min, followed by 23–29 cycles consisting of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and extending at 72 °C for 1 min. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was employed as an internal standard to normalize sample variation as described previously [42]. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels with ethidium bromide staining and compared after reaction cycles that showed DNA amplification in a linear range.

Cell lysate preparation. Seventy-percent confluent cells were deprived of serum for 24 h, followed by treatment with 1 µg/ml f- or g-adiponectin or 10 µg/ml anisomycin for indicated periods. After being rinsed with cold phosphate-buffered saline, cells were harvested using a

scraper and collected by centrifugation at 700g for 10 min at 4 °C. The cell pellets were then homogenized in cell lysis buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 300 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and rocked gently for 30 min at 4 °C. The homogenates were centrifuged at 15,000g for 5 min at 4 °C, and the supernatants were saved as cell lysates and stored at –80 °C until use.

In vitro JNK assay. Using the stress-activated protein kinase/JNK assay kit, JNK activity was assessed with a fusion protein of the c-Jun NH₂ terminus (amino acids 1–89) and glutathione S-transferase as a substrate according to the manufacturer's instructions with some modifications as reported before [42]. Briefly, JNK was precipitated in cell lysates (250–500 µg protein) with 2 µg glutathione-Sepharose beads immobilized by the fusion protein. The precipitates were rinsed with the cell lysis buffer three times, followed by incubation in 50 µl of the kinase buffer containing 100 µM ATP at 30 °C for 30 min. The reaction was terminated by adding the SDS sample buffer. The substrate fusion protein was separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and its phosphorylation by JNK was determined by Western blot analysis using anti-phospho-c-Jun (Ser-63) polyclonal antibody. To normalize sample variation, JNK protein levels were also determined by Western blot analysis using anti-JNK antibody.

Measurement of c-Jun phosphorylation by Western blot analysis. Cell lysates (100 µg of protein) were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. After being washed and blocked, the membranes were hybridized with anti-phospho-c-Jun (Ser-63 or Ser-73) polyclonal antibody that specifically detects phosphorylated c-Jun molecules. The membranes were then stripped and re-hybridized with anti-c-Jun antibody that recognizes both phosphorylated and unphosphorylated c-Jun molecules to normalize sample variation.

Electromobility shift assay. Electromobility shift assay (EMSA) was performed as described previously [43]. Cell lysates containing 10 µg protein were subjected to the assay with ³²P-end-labeled, double-stranded oligonucleotide M67-SIE (forward: 5'-AATTC CATTCC CGTAAATCCCTG-3' and reverse: 5'-AATTCAGG GATTACGG GAAATGG-3') as a probe. The supershift assay was carried out to confirm the STAT3-DNA complex using anti-STAT3 antibody.

Results

Expression of AdipoR1 and AdipoR2 by prostate cancer and hepatocellular carcinoma cells

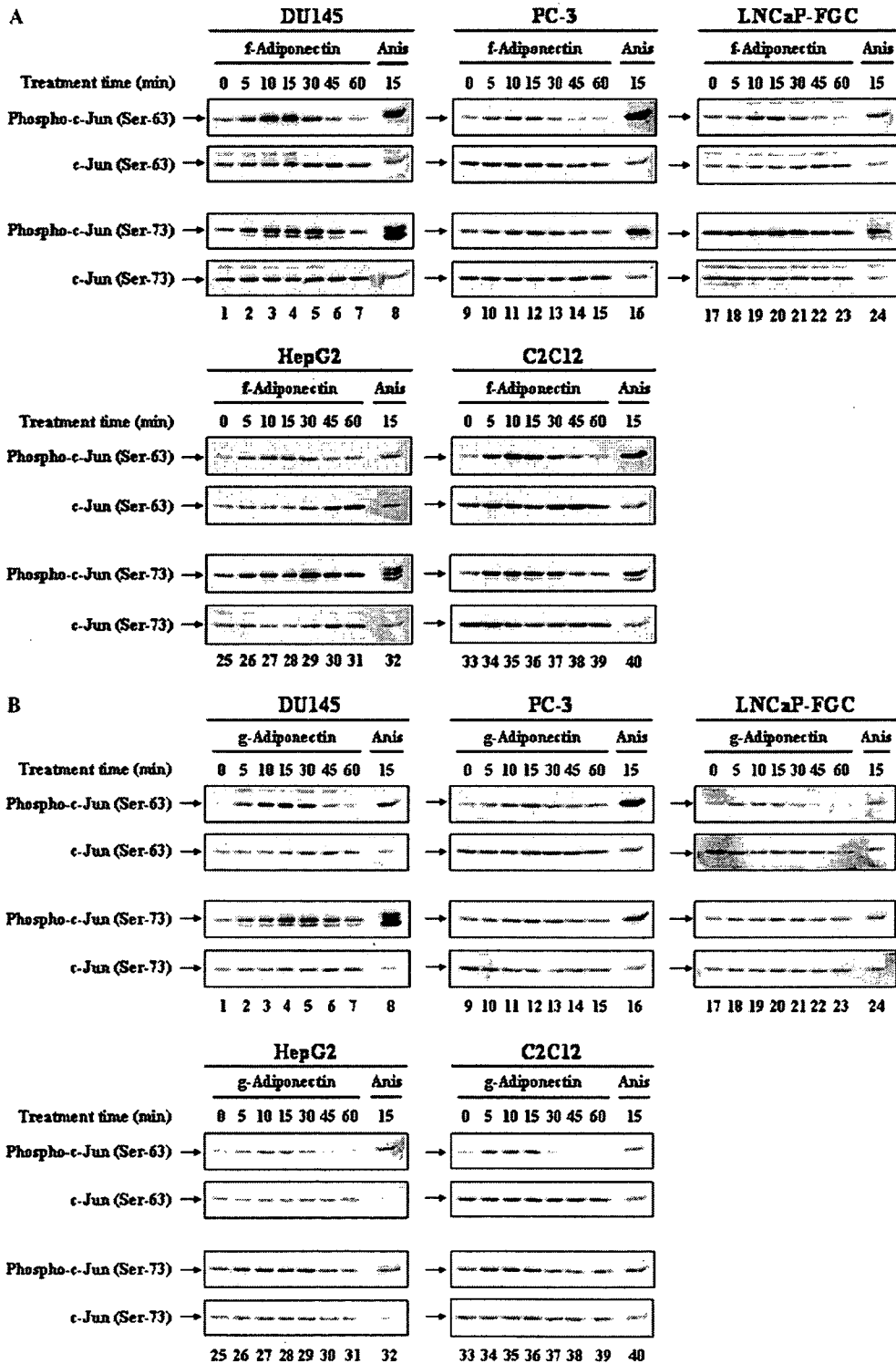
The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 have been identified in various tissues and cell types,

Fig. 3. (A) f-Adiponectin stimulates phosphorylation of c-Jun, an endogenous JNK substrate, in prostate cancer cells, hepatocellular carcinoma cells, and myoblasts. Prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and C2C12 myoblasts were serum-starved for 24 h and treated with either 1.0 µg/ml f-adiponectin (lanes 2–7, 10–15, 18–23, 26–31, and 34–39) for indicated periods or 10 µg/ml anisomycin (Anis) (lanes 8, 16, 24, 32, and 40) for 15 min. Untreated (lanes 1, 9, 17, 25, and 33) and anisomycin-treated cells served as negative and positive controls. Cell lysates (100 µg protein) were subjected to Western blot analysis. c-Jun phosphorylation at Ser-63 and Ser-73 was determined with phospho-c-Jun (Ser-63) and (Ser-73) antibodies (phospho-c-Jun (Ser-63) and phospho-c-Jun (Ser-73)). To normalize c-Jun phosphorylation levels to total amounts of c-Jun protein, membranes probed with these antibodies were stripped and re-probed with the anti-c-Jun antibody that recognizes both phosphorylated and non-phosphorylated forms of c-Jun (c-Jun). (B) g-Adiponectin stimulates phosphorylation of c-Jun, an endogenous JNK substrate, in prostate cancer cells, hepatocellular carcinoma cells, and myoblasts. Prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and C2C12 myoblasts were serum-starved for 24 h and treated with either 1.0 µg/ml g-adiponectin (lanes 2–7, 10–15, 18–23, 26–31, and 34–39) for indicated periods or 10 µg/ml anisomycin (Anis) (lanes 8, 16, 24, 32, and 40) for 15 min. Untreated (lanes 1, 9, 17, 25, and 33) and anisomycin-treated cells served as negative and positive controls. Cell lysates (100 µg protein) were subjected to Western blot analysis. c-Jun phosphorylation at Ser-63 and Ser-73 was determined with phospho-c-Jun (Ser-63) and (Ser-73) antibodies (phospho-c-Jun (Ser-63) and phospho-c-Jun (Ser-73)). To normalize c-Jun phosphorylation levels to total amounts of c-Jun protein, membranes probed with these antibodies were stripped and re-probed with the anti-c-Jun antibody that recognizes both phosphorylated and non-phosphorylated forms of c-Jun (c-Jun).

including myocytes and hepatocytes [23]. However, their expression by cancer cells has not been reported.

Using quantitative RT-PCR, we profiled expression of AdipoR1 and AdipoR2 in prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, and hepatocellular carcinoma HepG2 cells (Fig. 1). All four cell lines expressed mRNA of both receptors. AdipoR1 and AdipoR2 were both expressed at similar levels in the three prostate cancer cell lines. HepG2 cells expressed more AdipoR2 and less AdipoR1 than prostate cancer cells. This is

shown in Fig. 1. All four cell lines expressed mRNA of both receptors. AdipoR1 and AdipoR2 were both expressed at similar levels in the three prostate cancer cell lines. HepG2 cells expressed more AdipoR2 and less AdipoR1 than prostate cancer cells. This is



consistent with a previous report that AdipoR2 is the predominant form expressed in liver [23].

Stimulation of JNK activation by f- and g-adiponectin

We examined JNK activity in prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells, hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and C2C12 myoblasts treated with f- or g-adiponectin for periods up to 60 min. JNK was constitutively activated at low levels in all the five cell lines, and f-adiponectin further stimulated JNK activation, peaking at 10 min after the addition of f-adiponectin (Fig. 2A). Likewise, g-adiponectin stimulated JNK activation in all the cell lines (Fig. 2B). However, g-adiponectin maximized JNK activation at different time points varying between 5 and 15 min after cytokine addition among the cell lines.

Stimulation of c-Jun phosphorylation by f- and g-adiponectin

c-Jun is a physiological substrate for JNK [44]. JNK phosphorylates c-Jun at Ser-63 and Ser-73, and phosphorylation of these residues is required for c-Jun activation [44].

We examined c-Jun phosphorylation during f- or g-adiponectin treatment in DU145, PC-3, LNCaP-FGC, HepG2, and C2C12 cells. c-Jun was constitutively phosphorylated at Ser-63 and Ser-73 in all the five cell lines. f- and g-adiponectin both augmented c-Jun phosphorylation at Ser-63 in the five cell lines (Figs. 3A and B) in correlation with JNK activation (Figs. 2A and B). Both forms of adiponectin also stimulated Ser-73 phosphorylation in all the cell lines although the stimulation was quite modest in LNCaP-FGC cells (Figs. 3A and B). It should be noted that adiponectin induced Ser-63 phosphorylation to a higher extent than Ser-73 phosphorylation and that adiponectin stimulated Ser-73 phosphorylation longer than Ser-63 phosphorylation. This indicates that Ser-63 is more susceptible to both phosphorylation and dephosphorylation than Ser-73 during adiponectin treatment. Therefore, Ser-63 phosphorylation may play a major role in the immediate control of c-Jun activation by adiponectin, and Ser-73 phosphorylation may be important in the sustained activation of c-Jun.

Inhibition of constitutive STAT3 activation by f- and g-adiponectin

We examined the effect of f- and g-adiponectin on STAT3 activation using an EMSA. Constitutive STAT3 activation was detected in DU145 and HepG2 cells (Fig. 4A). Both f- and g-adiponectin inhibited constitutive STAT3 activation drastically in these cell lines (Figs. 4B and C). STAT3 activation returned to the original level in DU145 cells and began to rise in HepG2 cells

within 60 min after adding f- or g-adiponectin. Neither f- nor g-adiponectin influenced STAT3 activation in any of the other cell lines (data not shown).

Discussion

Adiponectin is a major adipose cytokine that ameliorates metabolic disorders, such as obesity and diabetes mellitus [9,10]. Adiponectin may also influence cancer pathogenesis [17,18]. Obesity is associated with certain types of cancer, including prostate cancer [45–47] and hepatocellular carcinoma [48]. In this study, we employed prostate cancer cells, hepatocellular carcinoma cells, and immortalized myoblasts, and showed for the first time that adiponectin modulates the activation of JNK and STAT3 pathways. This suggests that JNK and STAT3 may be involved in adiponectin-mediated, metabolic alteration, and that adiponectin may influence the pathophysiology of these obesity-associated cancers by acting on tumor cells directly mediated by these signaling pathways.

Both f-adiponectin (consisting mainly of the HMW form) and g-adiponectin stimulated JNK activation (Fig. 2) and c-Jun phosphorylation (Fig. 3) in all the cell lines examined, and inhibited STAT3 activation where it was constitutively activated in DU145 and HepG2 cells (Fig. 4). As mentioned above, extensive evidence indicates that distinct forms of adiponectin differentially activate such signaling molecules as AMPK and NF- κ B to mediate diverse biological functions among different cell types. Therefore, JNK and STAT 3 may be involved in pivotal pathways for any forms of adiponectin in universal biological functions, while such signaling pathways as AMPK and NF- κ B may determine specific roles of the distinct forms of adiponectin in certain functions.

Adiponectin exerts antidiabetic effects by enhancing insulin action through such signaling pathways as the AMPK pathway in muscle and liver as stated above [10,23,24]. We demonstrated that adiponectin activated JNK remarkably in C2C12 myoblasts and hepatocellular carcinoma HepG2 cells (Fig. 2), suggesting the possible involvement of JNK in adiponectin-mediated, antidiabetic effects. It is interesting to note that JNK activity is abnormally elevated in muscle, liver, and adipose tissue in obesity and insulin resistance [36]. Highly activated JNK in obesity may mediate a negative feedback loop to maintain normal metabolic homeostasis by adiponectin: activated JNK may sensitize muscle cells and hepatocytes to adiponectin, enhancing its antidiabetic effects. Furthermore, JNK activation accompanied STAT3 inhibition in HepG2 cells during adiponectin treatment (Fig. 4). Thus, STAT3 inhibition concomitant with JNK activation may be important in antidiabetic action of adiponectin in hepatocytes.

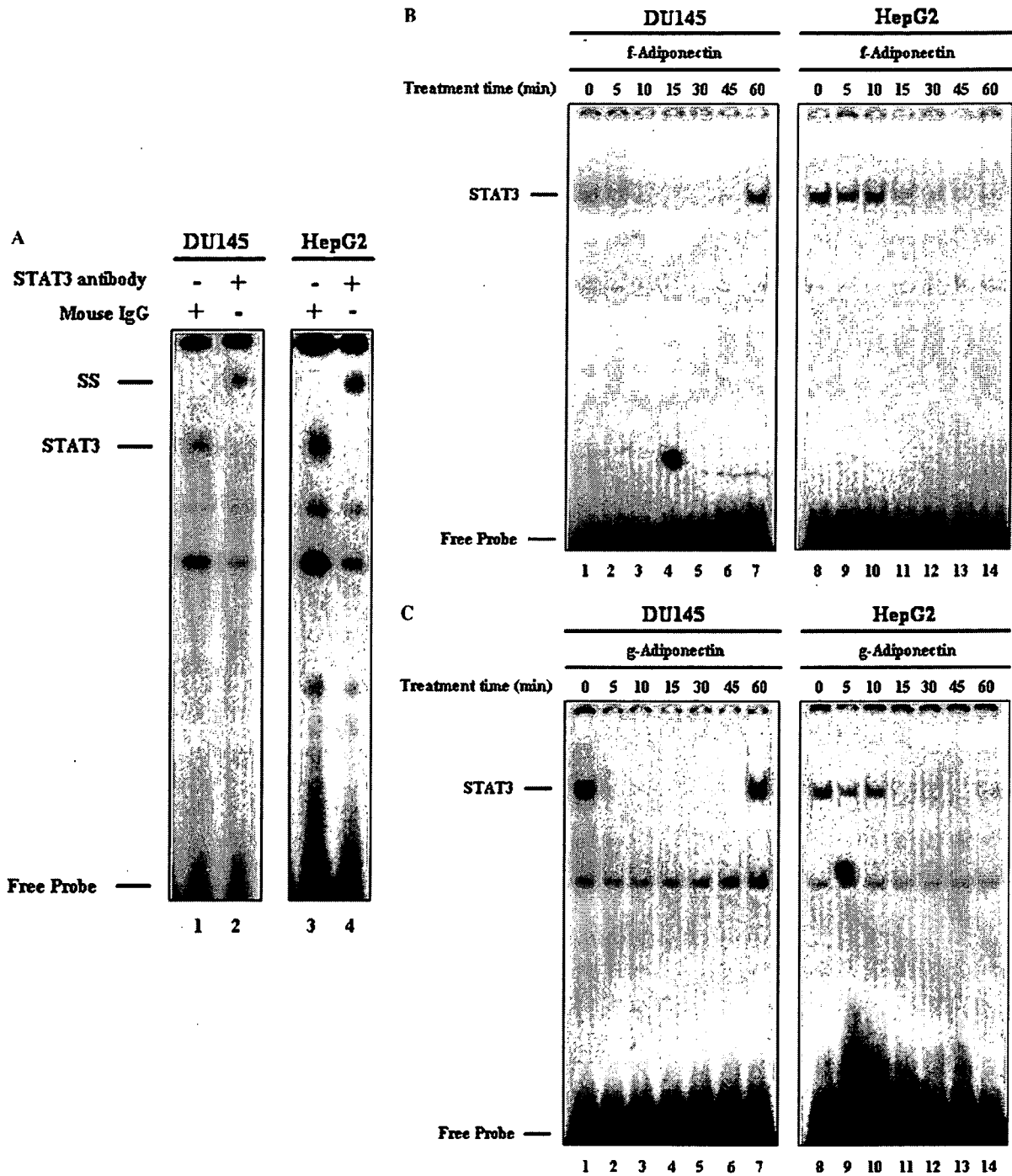


Fig. 4. (A) STAT3 is constitutively activated in DU145 and HepG2 cells. Prostate cancer DU145 cells and hepatocellular carcinoma HepG2 cells were serum-starved for 24 h, and cell lysates were prepared. Cell lysates (10 μ g protein) were subjected to the electromobility shift assay using 32 P-end-labeled M67-SIE as a probe. The STAT3–DNA complex (STAT3) was observed and supershifted (SS) by the anti-STAT3 antibody. (B) f-Adiponectin inhibits STAT3 DNA binding activity in prostate cancer DU145 cells and hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Prostate cancer DU145 cells and hepatocellular carcinoma HepG2 cells were deprived of serum for 24 h and incubated in serum-free medium (lanes 1 and 8) or serum-free medium containing 1.0 μ g/ml f-adiponectin (lanes 2–7 and 9–14) for various periods up to 60 min. Cell lysates (10 μ g protein) were subjected to the electromobility shift assay using 32 P-end-labeled M67-SIE as a probe. STAT3, STAT3–DNA complex. (C) g-Adiponectin inhibits STAT3 DNA binding activity in prostate cancer DU145 cells and hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Prostate cancer DU145 cells and hepatocellular carcinoma HepG2 cells were deprived of serum for 24 h and incubated in serum-free medium (lanes 1 and 8) or serum-free medium containing 1.0 μ g/ml g-adiponectin (lanes 2–7 and 9–14) for various periods up to 60 min. Cell lysates (10 μ g protein) were subjected to the electromobility shift assay using 32 P-end-labeled M67-SIE as a probe. STAT3, STAT3–DNA complex.

JNK plays a crucial role in various cancers as well [35]. We demonstrated that adiponectin stimulated JNK activation (Fig. 2) and c-Jun phosphorylation (Fig. 3) in all the four cancer cell lines examined, including prostate cancer DU145, PC-3, and LNCaP-FGC cells and hepatocellular carcinoma HepG2 cells (Figs. 2 and 3). Furthermore, adiponectin inhibited STAT3 activation in DU145 and HepG2 cells (Figs. 4B and C), in which STAT3 was constitutively activated (Fig. 4A). Therefore, adiponectin acts on these cancer cells directly and may regulate their function through modulation of JNK and STAT3. It should be noted that constitutive STAT3 activation induces malignant transformation and stimulates cancer progression including cell growth promotion [40]. Thus, inhibition of constitutive STAT3 activation is considered to be a therapeutic intervention for cancer [40]. Therefore, adiponectin may also be therapeutic through STAT3 inactivation. Further investigation is ongoing in our laboratory to address potential roles of adiponectin in cancer pathogenesis.

In conclusion, JNK and STAT3 may play a role in adiponectin suppression of metabolic syndrome, and adiponectin may influence the pathogenesis of prostate cancer and hepatocellular carcinoma by acting on tumor cells directly via these signaling molecules. Since obesity is associated with some types of cancer, including prostate cancer [45–47] and hepatocellular carcinoma [48], adiponectin, as well as JNK and STAT3, may be molecular mediators between obesity and its associated cancers and could be their common therapeutic targets.

Acknowledgment

We thank Dr. Daniel H. Maloney for a critical review of the manuscript.

References

- [1] K. Maeda, K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, K. Matsubara, cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221 (1996) 286–289.
- [2] E. Hu, P. Liang, B.M. Spiegelman, AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 10697–10703.
- [3] P.E. Scherer, S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, H.F. Lodish, A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 26746–26749.
- [4] Y. Arita, S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 (1999) 79–83.
- [5] M. Cnop, P.J. Havel, K.M. Utzschneider, D.B. Carr, M.K. Sinha, E.J. Boyko, B.M. Retzlaff, R.H. Knopp, J.D. Brunzell, S.E. Kahn, Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex, *Diabetologia* 46 (2003) 459–469.
- [6] K. Hotta, T. Funahashi, Y. Arita, M. Takahashi, M. Matsuda, Y. Okamoto, H. Iwahashi, H. Kuriyama, N. Ouchi, K. Maeda, M. Nishida, S. Kihara, N. Sakai, T. Nakajima, K. Hasegawa, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa, Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 1595–1599.
- [7] M. Kumada, S. Kihara, S. Sumitsugi, T. Kawamoto, S. Matsumoto, N. Ouchi, Y. Arita, Y. Okamoto, I. Shimomura, H. Hiraoka, T. Nakamura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 85–89.
- [8] Y. Iwashima, T. Katsuya, K. Ishikawa, N. Ouchi, M. Ohishi, K. Sugimoto, Y. Fu, M. Motone, K. Yamamoto, A. Matsuo, K. Ohashi, S. Kihara, T. Funahashi, H. Rakugi, Y. Matsuzawa, T. Ogihara, Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension, *Hypertension* 43 (2004) 1318–1323.
- [9] J. Fruebis, T.S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M.R. Erickson, F.T. Yen, B.E. Bihain, H.F. Lodish, Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 2005–2010.
- [10] A.H. Berg, T.P. Combs, X. Du, M. Brownlee, P.E. Scherer, The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action, *Nat. Med.* 7 (2001) 947–953.
- [11] N. Maeda, I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30, *Nat. Med.* 8 (2002) 731–737.
- [12] N. Ouchi, M. Ohishi, S. Kihara, T. Funahashi, T. Nakamura, H. Nagaretani, M. Kumada, K. Ohashi, Y. Okamoto, H. Nishizawa, K. Kishida, N. Maeda, A. Nagasawa, H. Kobayashi, H. Hiraoka, N. Komai, M. Kaibe, H. Rakugi, T. Ogihara, Y. Matsuzawa, Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity, *Hypertension* 42 (2003) 231–234.
- [13] C. Mantzoros, E. Petridou, N. Dessypris, C. Chavelas, M. Dalamaga, D.M. Alexe, Y. Papadiamantis, C. Markopoulos, E. Spanos, G. Chrousos, D. Trichopoulos, Adiponectin and breast cancer risk, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 1102–1107.
- [14] Y. Miyoshi, T. Funahashi, S. Kihara, T. Taguchi, Y. Tamaki, Y. Matsuzawa, S. Noguchi, Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 5699–5704.
- [15] E. Petridou, C. Mantzoros, N. Dessypris, P. Koukoulomatis, C. Addy, Z. Voulgaris, G. Chrousos, D. Trichopoulos, Plasma adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer: a case-control study in Greece, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 993–997.
- [16] L. Dal Maso, L.S. Augustin, A. Karalis, R. Talamini, S. Franceschi, D. Trichopoulos, C.S. Mantzoros, C. La Vecchia, Circulating adiponectin and endometrial cancer risk, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 1160–1163.
- [17] T. Yokota, K. Oritani, I. Takahashi, J. Ishikawa, A. Matsuyama, N. Ouchi, S. Kihara, T. Funahashi, A.J. Tenner, Y. Tomiyama, Y. Matsuzawa, Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages, *Blood* 96 (2000) 1723–1732.
- [18] E. Brakenhielm, N. Veitonmaki, R. Cao, S. Kihara, Y. Matsuzawa, B. Zhivotovsky, T. Funahashi, Y. Cao, Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated

- endothelial cell apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 2476–2481.
- [19] Y. Nakano, T. Tobe, N.H. Choi-Miura, T. Mazda, M. Tomita, Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma, *J. Biochem. (Tokyo)* 120 (1996) 803–812.
- [20] U.B. Pajvani, X. Du, T.P. Combs, A.H. Berg, M.W. Rajala, T. Schulthess, J. Engel, M. Brownlee, P.E. Scherer, Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9073–9085.
- [21] K. Kishida, H. Nagaretani, H. Kondo, H. Kobayashi, S. Tanaka, N. Maeda, A. Nagasawa, T. Hibuse, K. Ohashi, M. Kumada, H. Nishizawa, Y. Okamoto, N. Ouchi, K. Maeda, S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with the metabolic syndrome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306 (2003) 286–292.
- [22] T.S. Tsao, H.E. Murrey, C. Hug, D.H. Lee, H.F. Lodish, Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30), *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 29359–29362.
- [23] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N.H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai, T. Kadowaki, Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature* 423 (2003) 762–769.
- [24] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B.B. Kahn, T. Kadowaki, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat. Med.* 8 (2002) 1288–1295.
- [25] T.S. Tsao, E. Tomas, H.E. Murrey, C. Hug, D.H. Lee, N.B. Ruderman, J.E. Heuser, H.F. Lodish, Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 50810–50817.
- [26] N. Ouchi, H. Kobayashi, S. Kihara, M. Kumada, K. Sato, T. Inoue, T. Funahashi, K. Walsh, Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1304–1309.
- [27] H. Kobayashi, N. Ouchi, S. Kihara, K. Walsh, M. Kumada, Y. Abe, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin, *Circ. Res.* 94 (2004) e27–e31.
- [28] H. Chen, M. Montagnani, T. Funahashi, I. Shimomura, M.J. Quon, Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45021–45026.
- [29] N. Ouchi, S. Kihara, Y. Arita, Y. Okamoto, K. Maeda, H. Kuriyama, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway, *Circulation* 102 (2000) 1296–1301.
- [30] B. Derjard, M. Hibi, I.H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, R.J. Davis, JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain, *Cell* 76 (1994) 1025–1037.
- [31] M. Hibi, A. Lin, T. Smeal, A. Minden, M. Karin, Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain, *Genes Dev.* 7 (1993) 2135–2148.
- [32] J.M. Kyriakis, P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E.A. Rubie, M.F. Ahmad, J. Avruch, J.R. Woodgett, The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases, *Nature* 369 (1994) 156–160.
- [33] J. Raingeaud, S. Gupta, J.S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R.J. Ulevitch, R.J. Davis, Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 7420–7426.
- [34] R.J. Davis, Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase, *Biochem. Soc. Symp.* 64 (1999) 1–12.
- [35] R.J. Davis, Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell* 103 (2000) 239–252.
- [36] J. Hirosumi, G. Tuncman, L. Chang, C.Z. Gorgun, K.T. Uysal, K. Maeda, M. Karin, G.S. Hotamisligil, A central role for JNK in obesity and insulin resistance, *Nature* 420 (2002) 333–336.
- [37] U. Ozcan, Q. Cao, E. Yilmaz, A.H. Lee, N.N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Gorgun, L.H. Glimcher, G.S. Hotamisligil, Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science* 306 (2004) 457–461.
- [38] D.E. Levy, J.E. Darnell Jr., Stats: transcriptional control and biological impact, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 651–662.
- [39] D.S. Aaronson, C.M. Horvath, A road map for those who don't know JAK-STAT, *Science* 296 (2002) 1653–1655.
- [40] T. Bowman, R. Garcia, J. Turkson, R. Jove, STATs in oncogenesis, *Oncogene* 19 (2000) 2474–2488.
- [41] Q. Gao, M.J. Wolfgang, S. Neschen, K. Morino, T.L. Horvath, G.I. Shulman, X.Y. Fu, Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 4661–4666.
- [42] M. Onuma, J.D. Bub, T.L. Rummel, Y. Iwamoto, Prostate cancer cell-adipocyte interaction: leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 42660–42667.
- [43] Y. Iwamoto, Y.E. Chin, X. Peng, X.Y. Fu, Identification of a membrane-associated inhibitor(s) of epidermal growth factor-induced signal transducer and activator of transcription activation, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18198–18204.
- [44] E. Shaulian, M. Karin, AP-1 as a regulator of cell life and death, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) E131–E136.
- [45] C. Rodriguez, A.V. Patel, E.E. Calle, E.J. Jacobs, A. Chao, M.J. Thun, Body mass index, height, and prostate cancer mortality in two large cohorts of adult men in the United States, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10 (2001) 345–353.
- [46] C.L. Amling, C.J. Kane, R.H. Riffenburgh, J.F. Ward, J.L. Roberts, R.S. Lance, P.A. Friedrichs, J.W. Moul, Relationship between obesity and race in predicting adverse pathologic variables in patients undergoing radical prostatectomy, *Urology* 58 (2001) 723–728.
- [47] Y. Furuya, S. Akimoto, K. Akakura, H. Ito, Smoking and obesity in relation to the etiology and disease progression of prostate cancer in Japan, *Int. J. Urol.* 5 (1998) 134–137.
- [48] J.M. Regimbeau, M. Colombat, P. Mognot, F. Durand, E. Abdalla, C. Degott, F. Degos, O. Farges, J. Belghiti, Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma, *Liver Transpl.* 10 (2004) S69–S73.

関節リウマチにおけるヒアルロン酸の動態 —高分子ヒアルロン酸による治療の有効性を示す基礎的研究—

Key words: hyaluronic acid,
hyaluronic acid synthase (HAS),
hyaluronic acid binding protein
(HABP),
rheumatoid arthritis,
synovial tissue

岩手医科大学医学部病理学第一講座

宇月美和 大内修二
澤井高志

岩手医科大学医学部整形外科講座

貝山潤 大内修二

はじめに

ヒアルロン酸(HA)は全身の臓器に含まれているが、その分子構造はN-acetyl-D-glucosamineとD-glucuronic acidの二糖の繰り返しからなる単純な構造で、分子量的には低分子のオリゴ糖から数百万の高分子のものまで様々である。軟骨組織内では、HAにコア蛋白が結合してプロテオグリカンのネットワークを形成するが、このコア蛋白とHAとの結合部位にはHAに特異的に結合するhyaluronic acid binding protein (HABP)が存在する。HAは動物による種差がないため抗体を作製することが困難であるが、組織に含まれるHAの存在の証明はこのHABPを特異的に結合させることによって可能となる¹⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾。組織に含まれるHAの量は動物の種類や臓器によって異なるが、鶏冠、ヒトの臍帯、関節液、牛の鼻軟骨、眼球の硝子体などには多く含まれており、特に鶏冠から採取されたHAはこれまでヒトの医薬品や化粧品として広く利用されてきた。従来、HAの生体内での機能は組織外マトリックスとして細胞周囲の間質、つまり細胞に対しての支

持機能の作用が主であるとみなされてきたが、最近では、細胞の分化、成長、移動や接着をはじめ、CD44のリガンドとしての細胞機能の活性化などいろいろ報告されている。HAは関節域では関節液をはじめとして軟骨、滑膜組織などに多く含まれており、粘弾性物質としての物理的な作用の他に上述したような多彩な機能を有しているとされ、HAの喪失は関節機能の障害と深く結びつくことが示唆される。

滑膜組織でのヒアルロン酸(HA)の動態¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁵⁾

はじめにHAと特異的な結合を示すHABPを用いて、滑膜組織におけるHAの動態を検討した(図1)。その結果、滑膜組織でのHAは正常例や関節リウマチ(RA)の初期例で広範囲に分布が認められるものの、炎症が進行するにつれて分布が滑膜の表層に限局するようになり、やがてリンパ濾胞の形成をとまなうような炎症の最盛期になると滑膜ではHAがほとんど証明されなくなっていった。つまり、HAは炎症が高度になるとともに滑膜組織から消失していく。ここで問題になるのは、このHAの減少が

The dynamics of hyaluronic acid in patients with rheumatoid arthritis. —The basic research about the effectivity of high molecular weight hyaluronic acid therapy—

Miwa Uzuki, Shuji Ouchi, Takashi Sawai, Jun Kaiyama*, Shuji Ouchi*.

Department of Pathology, Iwate Medical University, School of Medicine. *Department of Orthopaedic Surgery, Iwate Medical University, School of Medicine.

(2005. 2. 24 受付, 2005. 3. 7 受理)

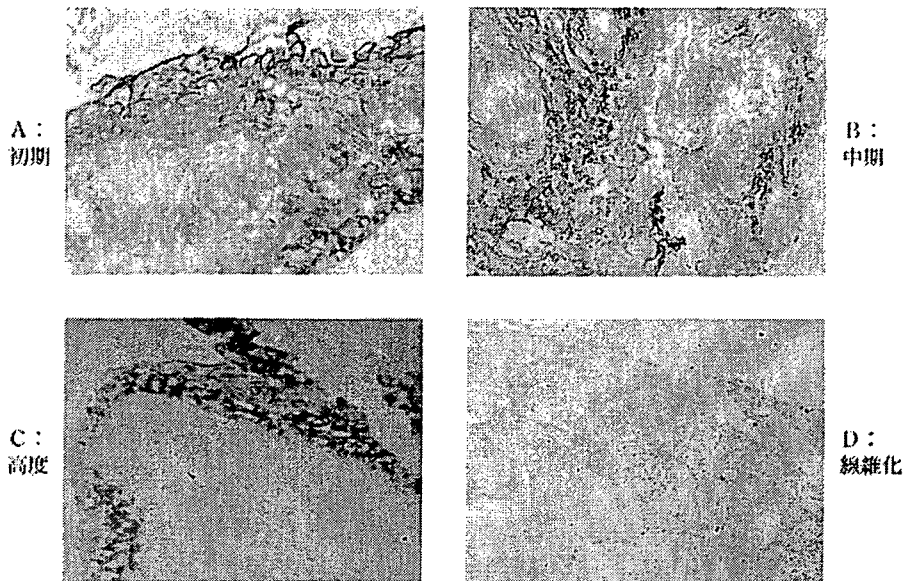


図1 ヒアルロン酸の分布 (HABPによる：茶褐色)

RAの滑膜炎の炎症の程度をA：初期，B：中期，C：高度，D：線維化と分類すると，HAの分布面積は滑膜炎の炎症がA>B>C>Dと高度になるにつれて減少していく

滑膜からのHAの産生そのものが減少することによるものなのか，産生後に酵素などで分解されたために生じるものであるのかということである。RAの関節組織はMatrix metalloproteinases (MMPs)などの蛋白分解酵素によって破壊されるが，同様にHAが産生後に分解される可能性も十分に考えられる。

そこで我々は，HAの産生について合成酵素の酵素活性と*in situ* hybridizationによるmRNAの発現を検討した。HAが合成される際にUDP-glucoseをUDP-glucuronic acidに変換する酵素としてUDP-glucose dehydrogenase (UDPGD)が必要となるが，この酵素の活性を酵素組織化学にて証明することによりHAの合成能を間接的に証明した。ただし，このUDPGDはHAだけでなくコンドロイチン硫酸の合成の際にも発現する酵素であるため厳密にはHAの合成能のみを示すのではなくHA+コンドロイチン硫酸の合成を示す。それを考慮に入れながらUDPGD酵素活性を観察すると，HABPによる検討の結果と同様，RAの初期，中期，炎症が高度な進行期，線維化期と炎症がすすむにつれてUDPGDは減少し最

後には証明されなくなった(図2)。さらに，HABPとUDPGDの二重染色では，両者の陽性細胞の分布はほぼ一致して認められた。このように，HABPの反応面積，UDPGDの酵素活性(吸光度)，UDPGD陽性細胞数でいずれもRAの初期，中期，進行期，線維化期の順に減少していくことが証明された。これら一連の結果はHAが分布，産生ともにRAの炎症の進行とともに徐々に滑膜組織から減少していく過程を示している。それでは，HAはRAの炎症とともに滑膜組織からどのような形で姿を消すのであろうかということが疑問であった。

最近，hyaluronic acid synthase (HAS) 1, HAS2, HAS3と3種類のHA合成酵素が木全らによってクローニングされた。それぞれのHASによって合成されるHAの分子量は異なっており，HAS1, HAS2は分子量200万程度の高分子，HAS3は20万程度の低分子である。*in situ* hybridizationと免疫組織化学でそれぞれの陽性細胞の分布を検討した結果，HAS1, HAS2ともに多層化した滑膜表層細胞に認められるが，HAS3は滑膜表層細胞の他に炎症性細胞，血管内皮細胞など多彩な細胞に認められ

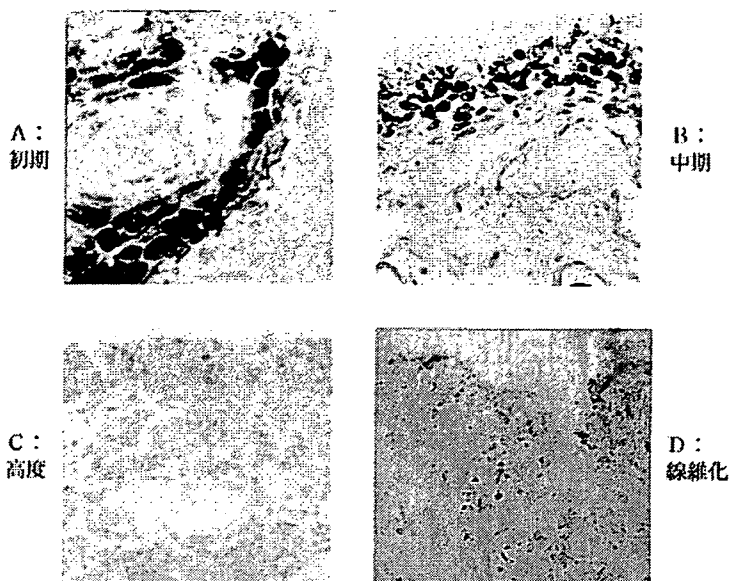


図2 UDPGD 酵素活性 (青紫色)

HAの合成過程で出現する酵素UDP GDの活性を証明する事によって、間接的にHAの合成活性を証明した。滑膜の炎症がA>B>C>Dと高度になるにつれてUDP GD酵素活性は減少していく

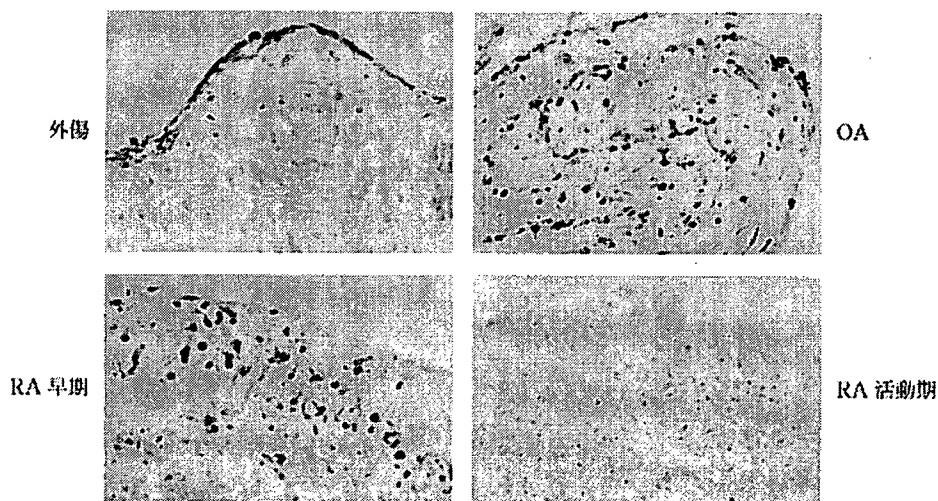


図3 HAS1の免疫組織化学 (茶褐色)

高分子HA(分子量200万程度)を合成するHAS1の陽性細胞数は、外傷, OA>RA早期>RA活動期となっていた。

た。また、症例間で比較してみると、HAS1は外傷やOAなどの非炎症性の滑膜組織に多く、RAでは早期から活動期になるにつれて陽性細胞数は減少した(図3)。HAS2もHAS1と同様に外傷, OAで多く、RAの早期から活動期の順

で減少した。一方、HAS3は滑膜表層細胞の他に血管内皮細胞、炎症性細胞などで発現し、炎症が激しくなるにつれて陽性細胞が目立っていた(図4)。そこで滑膜中のHAS3陽性細胞数と滑膜組織の炎症スコアの関係について検討する

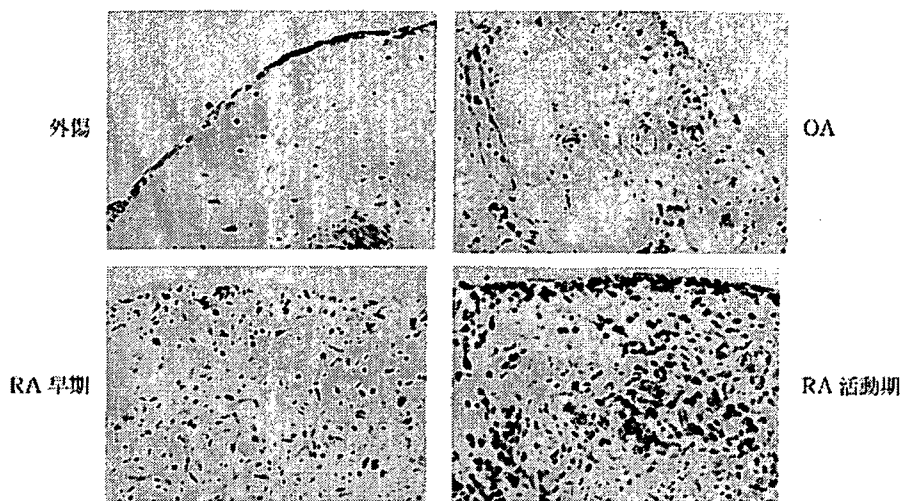


図4 HAS3 (低分子) 免疫組織化学 (茶褐色)

低分子 HA (分子量20万程度) を合成する HAS3 の陽性細胞数は, RA 活動期>RA 早期>外傷, OA となっていた。

と, 炎症が高度な滑膜組織では HAS3 陽性細胞数も増加し, 正の相関を示していた(図5)。また, 滑膜組織を採取したのと同じ関節から採取された関節液の HA 分子量を検討した結果, HAS3 陽性細胞数の多い関節からの関節液では HA 分子量が低下する傾向が認められ, HAS3 陽性細胞数と関節液中の HA 分子量とは逆相関する結果となった。

軟骨における HA の動態

ヒトの軟骨組織には多量の HA が含まれている。ヒトの軟骨組織に RA 患者の関節液をかけて反応させると軟骨からプロテオグリカンなどの基質の遊出が認められたが, これは関節液のなかに HA をはじめとする軟骨基質を分解する因子が含まれていることを示唆している。この現象は OA の関節液を反応させた場合にはみられず, RA 特有のものであった。この所見から *in vivo* でも RA 患者の関節液中には軟骨基質を分解する物質が含まれており, RA 患者の軟骨ではプロテオグリカンの分解が起こっていることが示唆される。また, RA 患者の軟骨周囲の肉芽組織あるいは軟骨細胞自身にも蛋白分解酵素や NO の発現が証明されており, HA のみならず多くの細胞外基質の分解が起こっている

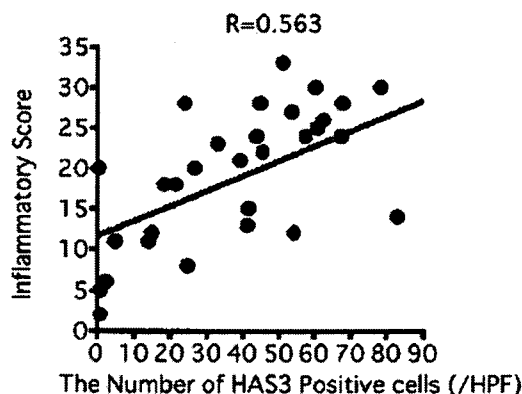


図5 RA 滑膜組織における HAS3 陽性細胞数と滑膜組織の炎症の程度の相関

RA 滑膜組織での HAS3 mRNA 陽性細胞数は滑膜組織の炎症の程度 (Rooney による炎症スコア) とは正の相関(R=0.563)を示し, 炎症が高度な滑膜組織では HAS3 陽性細胞数も多くなっていた。

ることが証明されている。

関節液中の HA の動態⁶⁾

RA 患者の関節液の全量を採取し, 関節液中の HA の総量 (濃度×volume) を剖検例から得られた正常コントロールや外傷例と比較すると, RA の関節液では HA の総量が増加していた。これは RA では炎症による滲出液によって