

図3 性別・年代別膝伸展筋力
男女とも60歳代以降で有意な筋力低下を認めた。

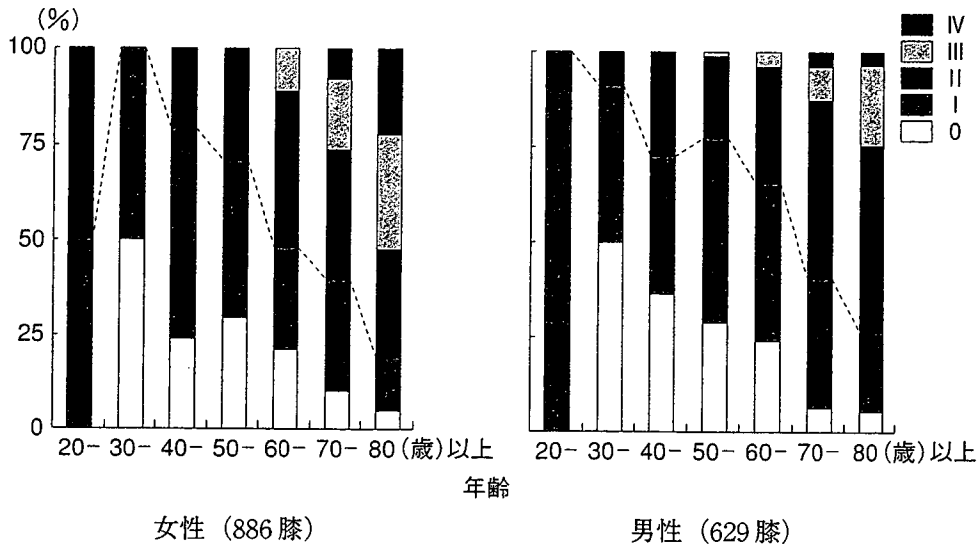


図4 性別・年代別・grade別割合
男女とも grade II以上の割合は年齢とともに増加し、60歳代では女性が有意に高い割合であった。

検定および χ^2 検定を、年代別、grade別ではSchefféの多重比較検定を、2群間の比較では対応のないt検定および年齢の影響を取り除く多変量解析を用い、有意水準は5%未満とした。

結果

性別・年代別膝伸展筋力の結果を図3に示

す。性別の測定値では、20歳代以外のすべての年齢層で女性が有意に低い値であった。WBI値では、50歳代以降で女性が有意に低い値であった。年代別の測定値は、男女とも60歳代以降に有意な低下を認め、WBI値でも男女とも60歳代以降で低下しており、特に60-70歳代間において有意な低下を認めた。

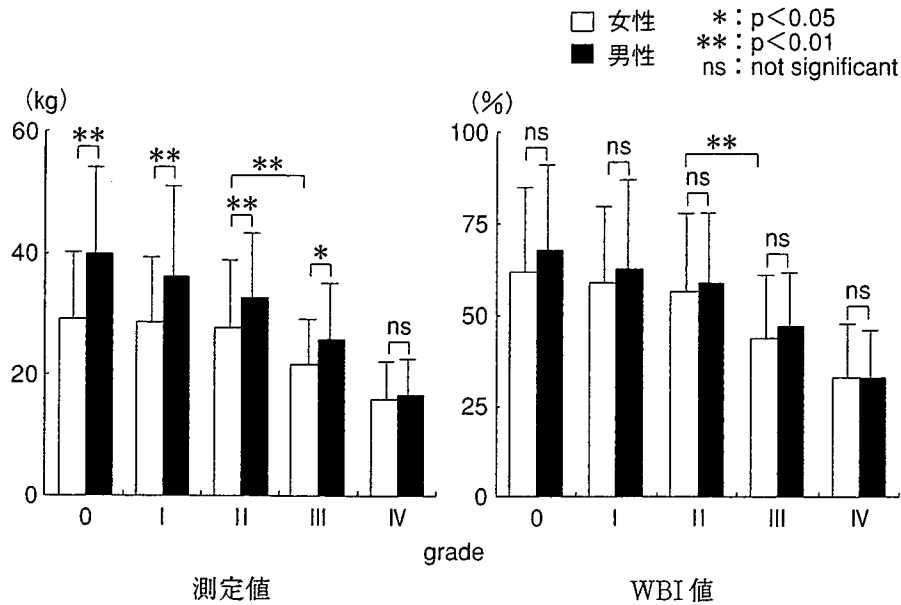


図5 性別・grade別膝伸展筋力
男女とも grade の進行とともに筋力が低下していた。

性別・年代別・grade別割合の結果を図4に示す。X線撮影をした757名のgrade II以上の割合は女性で53.2%，男性では48.6%であった。年代別では男女とも年齢とともにgrade II以上の割合は増加し、60歳代では、女性52.3%，男性34.7%で女性が有意に高い割合であった。また60歳代以降では、女性に進行した膝OAを多く認めた。

性別・grade別膝伸展筋力の結果を図5に示す。性別の測定値では、grade IV以外すべてにおいて女性が有意に低い値であった。WBI値ではすべてのgradeにおいて性差を認めなかった。grade別では、男女ともgradeの進行とともに筋力が低下する傾向で、特にgrade II-III間で有意な低下を認めた。

2群間で膝伸展筋力を比較した結果を図6に示す。一般的なWBI値の指標³⁾を基準にし、日常生活に問題ないとされているWBI値60%以上と60%未満に分けて比較した(表3)。女性では年齢の影響を除外してもOA群のWBI値60%未満の割合が有意に高

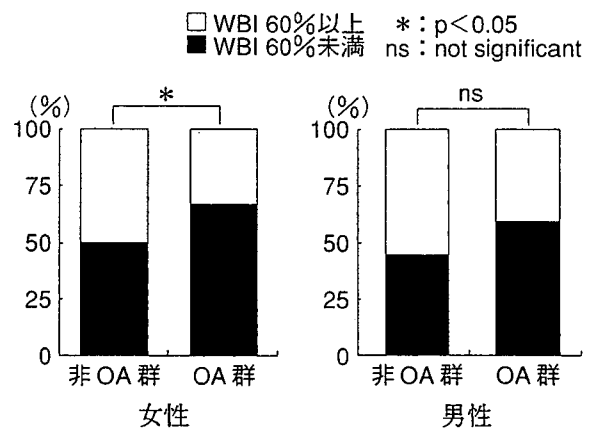


図6 2群間の膝伸展筋力
女性では年齢の影響を除外しても、OA群のWBI 60%未満の割合が有意に高かった。

い結果であった。また2群間の年代別WBI値では、女性の60歳代のみOA群が有意に低い値であった(図7)。

考 察

今回の簡易筋力測定器は、cybexとの関係で $r=0.78$ ，再現性においても $r=0.88$ と統計的に有意な強い相関関係を得ており，信頼性における問題はないと考えている。

表3 体重支持指数と運動機能

<40%	杖や松葉杖歩行
40～60%	平地はOK 階段, 凹凸などは不安
60～80%	日常生活は問題なし 家庭外活動(通勤など)で易疲労感
80～100%	日常生活は問題なし 家庭外活動で疲労感あるも翌日には解消
100～120%	日常あらゆる活動に積極的に参加可能
130%以上	スポーツをしても筋疲労が残らない 朝の目覚めでスポーツをする喜びが生ずる状態

WBI法は、大腿四頭筋の等尺性最大筋力を体重比で表した数値で、運動機能を評価する方法である。

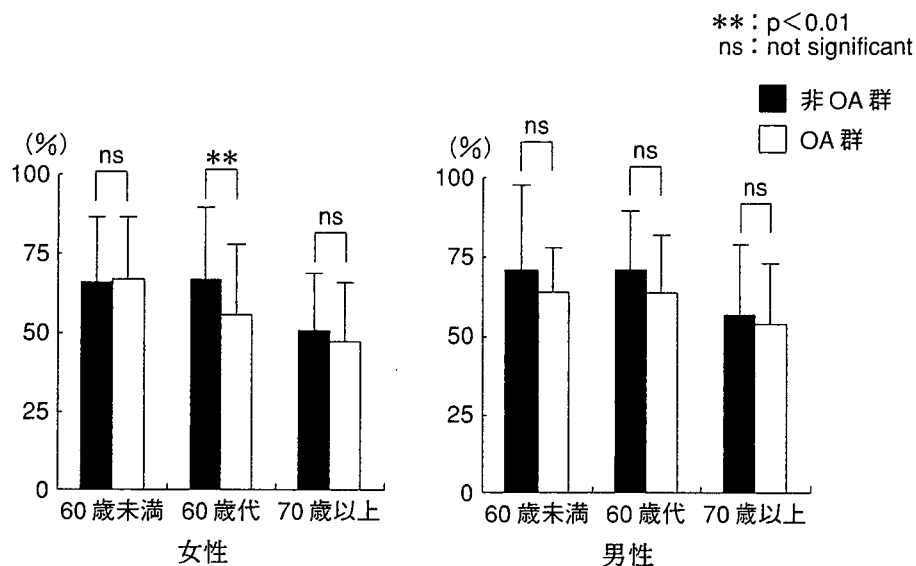


図7 群別・年代別 WBI 値

女性の60歳代のみOA群が有意に低い値であった。

膝伸展筋力の加齢変化について Larsson⁵⁾ は、50歳を越えると筋力低下が顕著になると述べ、Calmels ら¹⁾ は60歳以降で有意な筋力低下が認められたと報告している。また佐藤ら⁶⁾ は、筋の横断面積の研究にて男女とも60歳代から減少すると述べている。その他どの研究においても、60歳以降に筋力低下の傾向が顕著になると報告しており、本研究も男女とも同様の結果で、ほぼ一致した見解を得た。

膝OAと膝伸展筋力の関係について Slemenda ら⁷⁾ は、体重に対する膝伸展筋力の

低い者は膝OAに罹患しやすいと述べている。そして月村⁸⁾ は、女性について体重に対する下肢筋肉量の割合の研究で60歳代のみ低下を認め、60歳代で膝OAに罹患する可能性が高まると報告している。またわれわれの20年を越す松代検診疫学調査でも、60歳代から女性に多く発症する膝OAの要因として、肥満、加齢や膝の動揺性とともに関係を明らかにしてきた⁴⁾。本研究の結果も同様で、60歳代のgrade II以上の割合が女性に高いことや、群別・年代別WBI値の比較で60歳代の女性のみ有意差を認め

OA群が低値を示したことなど、それらの影響が考えられた。

今回膝 OA 発症要因としての肥満、加齢の影響を取り除いても、女性においては膝 OA と膝伸展筋力との関連性を認め、女性の膝 OA 発症における膝伸展筋力低下の影響が示唆された。そして、膝 OA の発症予防のために、特に 60 歳代において減量を含めた運動療法にて、体重に対する膝伸展筋力を維持していくことが重要であると考えられる。

今後は女性の 60 歳代における筋力低下と他の膝 OA 発症因子の縦断的検討を行いたいと考えている。

まとめ

1. 膝伸展筋力の加齢変化と膝 OA 発症との関係を検討した。
2. 膝伸展筋力の変化は男女とも 60 歳以降で著明に低下した。
3. 60 歳代の grade II 以上の割合は、女性が有意に高い値であった。
4. 女性では、肥満や加齢の影響を除外しても膝 OA と膝伸展筋力との関連を認め、女性の膝 OA 発症における膝伸展筋力低下の影

響が示唆された。

文献

- 1) Calmels P. et al: Cross-sectional study of muscle strength and bone mineral density in a population of 106 women between the ages of 44 and 87 years: relationship with age and menopause. *Eur J Appl Physiol.* **70**: 180-186, 1955.
- 2) Kellgren JH. et al: Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* **16**: 494-501, 1957.
- 3) 黄川昭雄ほか：機能的筋力測定・評価法—体重支持指数 (WBI) の有効性と評価の実際. *日整外スポーツ医学会誌* **10**: 463-468, 1991.
- 4) 古賀良生ほか：変形性膝関節症の悪化因子の疫学的検討. *関節外科* **24**: 51-55, 2005.
- 5) Larsson L.: Morphological and functional characteristics of the aging skeletal muscle in man. *Acta Physiol Scand suppl.* **457**: 1-36, 1978.
- 6) 佐藤広徳ほか：日本人成人男女 259 名における大腿部筋群横断面積と筋力の年齢変化について. *体力科学* **48**: 353-364, 1999.
- 7) Slemenda C. et al: Quadriceps weakness and osteoarthritis the knee. *Ann Intern.* **127**: 97-104, 1997.
- 8) 月村規子ほか：60 歳代女性で発症する変形性膝関節症の身体的特徴について. *臨整外* **40**: 1293-1298, 2005.

《シンポジウム》

骨関節疾患リハビリテーションの実学（運動器の10年）
—変形性膝関節症のリハビリテーション実学—

座長/上尾 豊二・浅山 滉

内側型変形性膝関節症の発症危険因子*

新潟大学超域研究機構

大森 豪

対象と方法

松代膝検診の概要¹⁻³⁾

松代膝検診は、新潟県十日町市松代地区において毎年7月に行われる住民の総合検診に合わせて行った。初回検診は、1979年に40～65歳の男女1,844名を対象として行い、以後基本的に同一の集団を7年毎に縦断的に評価した。初回検診の受診者は1,327名で受診率は81%であり、以後3回の検診でも受診率は70%以上と比較的良好であった（表）。また、第1回検診の受診者のうち558名（女性494名、男性64名）が以後21年間に行われた3回の検診を全て受診していた。

検診内容は問診（事前アンケートを含む）、視触診および膝X線撮影とし、基本的に4回の検診とも同一内容とした。問診では、全身的な項目として職業、日常活動性、全身合併症と既往歴、喫煙習慣などを調べた。膝関節については、外傷歴や加療歴、水腫の既往および歩行・階段昇降能について聞いた。視触診では全身的に歩容と下肢アライメント、腰椎、股関節可動域、円背やHeberden結節の有無について調べ、膝関節においては歩行時のthrustの有無と膝のアライメント、可動域、関節安定性、関節裂隙の圧痛や水腫の有無について評価した。膝関節のX線撮影は立位膝関節正面像を撮影し、内側型膝OAの病期をKellgren分類⁴⁾に準じた5段階で評価しgrade-II以上を膝OAと判定した（図1）。したがって、本論文における膝OAの表記はX線上の定義に基

はじめに

内側型変形性膝関節症（以下、内側型膝OA）は我が国における代表的な骨・関節の加齢性疾患であり、荷重関節である膝関節の機能が障害されるため中高年者のADL（activity of daily life）やQOL（quality of life）に大きな影響を与える。内側型膝OAの80%以上は1次性であり加齢に伴って発症するため、その病態や危険因子の解明には自然経過の把握が極めて重要である。我々は、内側型膝OAの自然経過と危険因子を知る目的で長期の疫学調査（松代膝検診）を行ってきた。本稿では、この疫学研究を紹介し本研究から得られたX線上の内側型膝OAの発症危険因子について概説する。

* 本稿は第44回日本リハビリテーション医学会学術集会シンポジウム「骨関節疾患リハビリテーションの実学（運動器の10年）—変形性膝関節症のリハビリテーション実学—」の講演をまとめたものである。

頭筋力として膝 OA-grade との関係性を評価した。Grade-0, I の非 OA 群と grade-II, III, IV の OA 群の 2 群間で大腿四頭筋力を比較すると、男性では差が見られなかったのに対して女性では OA 群で有意に筋力が低下していた (図 6)。

考 察

疫学調査による膝 OA の発症悪化要因については、欧米を中心に現在まで多方面からの研究が行われている⁵⁻¹²⁾。これまでに報告された因子の中で、肥満、女性、非喫煙、日常生活の活動性 (職業歴、運動歴)、膝関節外傷の既往、人種などは膝 OA との関与がある程度明らかになっているが、一方で骨粗鬆症、女性ホルモンなどは一定した見解が得られておらず、さらにビタミンやミネラル、抗酸化物質などの微量栄養素や遺伝子の関与については不明な点が多い。

我が国においても膝 OA に関する疫学調査の報告は散見されるが、いずれも対象集団が比較的小さくさらに横断調査が多いため、内側型膝 OA の発症悪化要因を明らかにするにはいたっていない¹³⁻¹⁶⁾。近年、人種による差に注目して、我が国や中国において比較的大規模な母集団を設定して欧米の疫学調査と比較した研究も行われ、日本人女性では肥満、膝外傷の既往、職業の影響が大きいことや、中国では外側型の膝 OA の頻度が高いことなどが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。

我々が行ってきた松代膝検診は、対象集団の規模および縦断調査の期間から他に比類のない疫学調査である。今回、第 4 回の横断調査の解析から、加齢、女性、肥満、膝内反変形、thrust 現象、および大腿四頭筋力低下が内側型膝 OA と関連があることが明らかとなった。このうち、加齢、女性、肥満については他の報告と同様の結果であったが、膝内反変形、thrust 現象、大腿四頭筋力低下に関しての他の研究報告は少なく、松代膝検診から得られた貴重な研究結果の 1 つと考えられる^{20,21)}。我々は、内側型膝 OA の病態解明に対して疫学的手法と同時に生体力学的手法を用いて研究を行ってきた。その結果、下肢アライメントとしての膝内反変形および歩行時の thrust 現象は膝関節の内

側荷重を増加させることを実験的にも明らかにしている^{22,23)}。これらの点から内側型膝 OA の発症・進行の機械的因子として膝内反変形および thrust 現象は極めて重要であり、さらに詳細な検討が必要と考えられる。今後、縦断調査の詳細な解析を行い各因子と膝 OA との因果関係を明らかにすることで危険因子を確定し、内側型膝 OA の発症・進行予防法の確立を目指すことが課題とされる。

松代膝検診の解析検討に際し、以下の諸氏の多大なる協力に深謝する。古賀良生 (新潟こばり病院整形外科)、渡辺博史、蕪木武史、菅原治美、浜田政晴 (新潟こばり病院リハビリテーション部)、田中正栄、西野勝敏 (新潟県スポーツ医科学センター)、遠藤和男、粟生田博子 (新潟医療福祉大学)、速水正、日向野行正 (新潟大学医学部整形外科)。

文 献

- 1) 大森 豪, 古賀良生, 瀬川博之, 他: 変形性膝関節症に対する 21 年間の疫学的縦断調査—松代検診 2000—の経験. 膝 2002; 26: 243-246
- 2) Shiozaki H, Koga Y, Omori G, et al: Epidemiology of osteoarthritis of the knee in a rural Japanese population. Knee 1999; 6: 183-188
- 3) Omori G: Epidemiology of knee osteoarthritis. Acta Med Biol 2005; 53: 1-11
- 4) Kellgren JH, Lawrence JS: Radiological assessment of osteoarthritis. Ann Rheum Dis 1957; 16: 494-501
- 5) Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al: The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. Arthritis Rheum 1995; 38: 1500-1505
- 6) Anderson JJ, Felson DT: Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-1). Evidence for an association with overweight, race and physical demands of work. Am J Epidemiol 1988; 128: 179-189
- 7) Davis MA, Ettinger WH, Neuhaus JM, et al: The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee. Am J Epidemiol 1989; 130: 278-288
- 8) Hart DJ, Doyle DV, Spector TD: Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. J Rheumatol 1995; 22: 1118-1123
- 9) Hart DJ, Mootosamy I, Doyle DV: The relationship between osteoarthritis and osteoporosis in the general population: the Chingford Study. Ann Rheum Dis 1994; 53: 158-162
- 10) Sowers MF, Lachance L: Vitamins and arthritis: the

- role of vitamins A, C, D, and E. *Rheum Dis Clin North Am* 1999; **25**: 315-332
- 11) Oliveria SA, Felson DT, Klein RA, et al: Estrogen replacement therapy and the development of osteoarthritis. *Epidemiology* 1996; **7**: 415-419
 - 12) Spector TD, Cicuttini F, Baker J: Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *Br Med J* 1996; **312**: 940-944
 - 13) 小松原良雄, 高橋貞雄: 膝関節症の頻度とその関連因子について. *成人病* 1968; **9**: 44-56
 - 14) 中条 仁, 遠藤博之, 小坂史朗, 他: 東北地方における変形性膝関節症の疫学. *東北整形災害外科学会雑誌* 1966; **10**: 23-27
 - 15) 竹日行男, 三橋 隆, 森田秀穂, 他: 草津町住民検診による膝関節検診結果. *膝* 1990; **15**: 90-93
 - 16) 須藤啓広, 宮本 憲, 田島正稔: 変形性膝関節症の疫学的調査. *整形外科* 1999; **50**: 1033-1038
 - 17) Yoshimura N, Nishioka S, Kinoshita H, et al: Risk factors for knee osteoarthritis in Japanese women: heavy weight, previous joint injuries, and occupational activities. *J Rheumatol* 2004; **31**: 157-162
 - 18) Yoshida S, Aoyagi K, Felson DT, et al: Comparison of the prevalence of radiographic osteoarthritis of the knee and hand between Japan and the United States. *J Rheumatol* 2002; **29**: 1454-1458
 - 19) Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, et al: Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States. The Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* 2001; **44**: 2065-2071
 - 20) Sharma L, Song J, Felson DT, et al: The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. *JAMA* 2001; **286**: 1880-95
 - 21) Chang A, Hayes K, Dunlop D, et al: Thrust during ambulation and the progression of the knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 3897-3903
 - 22) 岩崎洋史, 大森 豪, 古賀良生, 他: 下肢アライメント変化による膝関節接触圧力への影響についての実験的検討. *日本臨床バイオメカニクス学会誌* 1992; **14**: 341-344
 - 23) 大森 豪, 古賀良生, 瀬川博之, 他: 変形性膝関節症用装具の効果に対する運動学的検討. *膝* 1995; **21**: 30-33

変形性膝関節症の治療適応の選択の考え方—ADLとQOLへの影響を踏まえて—*

順天堂大学医学部整形外科

池田 浩

はじめに

わが国は急速に高齢化社会へと向かっており、10 数年後には 4 人に 1 人が老人（65 歳以上）になると予測されている。高齢化に比例して、加齢に伴う骨関節疾患も増加し、中・高年者の ADL や QOL を低下させる 1 つの大きな要因となっている。その主たるものが変形性関節症およびその類似疾患であり、最も多いのが変形性膝関節症（膝 OA）で、患者数は 1000 万人以上と推測されている。

膝 OA の治療は、1) 非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAID) などの薬物療法、2) 温熱、電気などの物理療法、3) 筋力訓練などの運動療法¹⁻¹⁴⁾、4) 足底板^{15,16)} などの装具療法からなる保存的治療と、関節鏡視下手術¹⁷⁻²⁰⁾ 骨切り術や人工関節置換術などの外科的治療とに大別される。しかし、外科的治療が必要となるケースはごく一部であり、大部分は保存的治療の対象となる。主症状である疼痛のコントロールには NSAID が用いられることが多いが、対象の多くは高齢者であり NSAID では副作用が懸念され、より安全な治療法が望まれる。一方、運動療法は、home exercise として一人で安全に行えるほか、医療費を含め経済的など多くのメリットが挙げられる。

今回、ADL や QOL への影響を踏まえた膝 OA の治療法選択に対する考え方について解説する。

膝 OA の治療

治療法は、保存的治療と外科的治療とに大別さ

* 本稿は第 44 回日本リハビリテーション医学会学術集会シンポジウム「骨関節疾患リハビリテーションの実学（運動器の 10 年）—変形性膝関節症のリハビリテーション実学—」の講演をまとめたものである。

変形性関節症 医療現場での 最新治療と新薬開発

Drug therapy for osteoarthritis

山田 治基 森田 充浩 金治 有彦 小崎 直人 伊達 秀樹 石村 大輔 前原 一之 早川 和恵

藤田保健衛生大学整形外科

1 はじめに

変形性関節症 (osteoarthritis, OA) は人口の高齢化が進む我が国における運動器の疾患のなかでは変形性脊椎症に次いで有病率の高い疾患である。厚生労働省の行った平成 16 年度介護票による国民生活基礎調査では要支援となる原因として本症は老衰に次いで 2 位 (17.5%) を占めている。本邦で臨床的に使用されている OA に対する薬剤は疼痛などの臨床症状を改善させる対症療法的な治療薬 (symptom modifying drug) である。厳密な評価法により軟骨構造そのものに変化をもたらし、OA の進行を遅らせる、いわゆる軟骨保護作用が確認された真の抗 OA 薬 (structure modifying drug) はまだ存在しない (表 1)。本稿では OA に対する最新の薬物治療について述べることを目的としているので、まだ臨床的評価の確定していない薬剤、物質、OA に対する保健適応のない薬剤についての記述がある点をお許しいただきたい。

表 1 抗 OA 薬の分類

1) structure modifying drug (disease modifying anti-OA drug) OA の進行そのものを遅らせる (開発途上にある)
2) symptom modifying drug 疼痛を主とした臨床症状を改善する
<ul style="list-style-type: none"> ・ NSAIDs ・ 副腎皮質ステロイド薬 (関節内注入) ・ ヒアルロン酸 (関節内注入)

2 OA の病態

OA は関節軟骨に初発するとされる疾患であるが、その病態には二次性滑膜炎や骨・軟骨の修復反応が加わる。OA におこる最初の病変は軟骨表面の粗造化であり、生化学的には軟骨マトリックスの変性、すなわち低分子化である。OA 軟骨における病変を演出するのは軟骨に存在する唯一の細胞腫である軟骨細胞である。軟骨細胞からのアグリカンや II 型コラーゲンなどの軟骨マトリックスは病初期には合成および破壊ともに亢進して代謝回転が高くなるが、最終的には破壊が合成を上回る結果となり、衝撃吸収などの軟骨機能は低下し、臨床的な OA の発症へとつながる。軟骨マトリックスの変性、低分子化は軟骨細胞自らが産生する活性酸素種、プロテアーゼなどである。プロテアーゼのなかでも以前は matrix metalloproteinase (MMP) が重視されていたが、現在では aggrecanase (ADAM-TS) の役割が大きいことが明かにされている。これらのプロテアーゼの軟骨細胞による産生を調節しているのは、同じく軟骨細胞から産生される各種のサイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α など) や成長因子 (TGF- β , bFGF など) である。

OA の初発病変部位として軟骨下骨の役割を重視する説もある。軟骨マトリックス変性の結果、軟骨の衝撃吸収能が低下し軟骨下骨には過大なストレスが伝達される。その結果、軟骨下骨のリモデリングは亢進し、骨硬化も進行する。OA では軟骨下骨に骨稜のマイクロフラクチャーがおこるが、その治癒過程により骨硬化はさら

に進行する。これらの骨硬化が表層に位置する関節軟骨の力学的脆弱性を高める。一方、OAを自然発症する動物モデルでは、軟骨変性より骨硬化などの軟骨下骨の変化が先に、かつ高度に認められる。

2.1 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs)

・NSAIDsはプロスタグランジン (PG) の合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX) を阻害することによって抗炎症作用を発揮する。COXには2種類のアイソザイムがあるが、炎症の場で発現の高いCOX-2に対する選択性の強いNSAIDsが注目されている。COX-2に選択性の強いNSAIDsとして我が国ではエトドラク、メロキシカムなどが使用されてきたが、最近ではセレコキシブが上梓された。本邦における膝OAを含めた第III相試験の結果でも、重篤な消化管出血に関してはセレコキシブのほうが非選択型NSAIDsより少ないことが報告されている¹⁾。ただし、これらのコキシブ系NSAIDsは心筋梗塞を含む心血管系の副作用が高まる可能性が示唆されており、心疾患のある患者さんへの投与には注意を要する²⁾。ただし、NIHの報告では心血管系の副作用はCOX-2選択型NSAIDsだけでなく従来型NSAIDsにも起こりうるとされており、十分に留意すべきである。

・OA患者へのNSAIDs投与で注意すべき点

高齢者に多いOAでのNSAIDs使用上のポイントは、1) 半減期の短いものを使用する、2) 長期投与を避ける、3) 常用量の半量など少量から投与する、などである。高齢者では肝臓における代謝が遅延し、かつ腎機能障害が潜在するため薬物代謝動態が健常人とは異なり、NSAIDsの半減期は延長する。よって、半減期の短いNSAIDsを選択すべきである。徐放型NSAIDsは高齢者のOA症例での使用には注意を要する。ほとんどのNSAIDsは腎機能を抑制する作用を有する。腎機能についてはCOX-1だけでなくCOX-2も腎血流維持に大きな影響を及ぼしており、COX-2選択的阻害薬が腎機能上、安全というわけではない。明らかに腎機能の低下している症例では、腎血流量への負担の少ないスリンダクを選択する。消化管障害の予防が必要な症例では、プロドラッグ製剤およ

びCOX-2選択性の高いNSAIDsなどが有用である。

2.2 副腎皮質ステロイド薬 (関節内注入)

・OAは非炎症性の疾患であるが、軽度の二次性滑膜炎をおこしている。滑膜炎は関節水腫をおこし、疼痛、可動域制限などのOAの臨床症状が増悪する。滑膜炎が高度な病期のOAには副腎皮質ステロイド薬の関節内注入が効果的である。ステロイドは、好中球・単球の遊走阻止、炎症細胞からのサイトカイン産生阻害、炎症性プロスタグランジンの生合成の阻害などの強力な抗炎症作用を有する。注入されたステロイドは主として滑膜組織に作用し急速な臨床症状の改善が期待できる。アメリカリウマチ学会 (ARA) のOA治療ガイドラインでは副腎皮質ステロイド薬の関節内注入は関節液貯留や局所炎症が存在する症例、NSAIDsや選択的COX-2阻害薬が使用できない症例に有用であるが、数ヶ月に一回にとどめるべきとされている。副腎皮質ステロイド薬の関節内注入によるOA治療効果に関するメタ解析では注入後、早期に有意な症状改善が消失することが明かとなっている (表2)^{3,4)}。ただし本剤による臨床症状の改善はあくまで対症療法的であることを念頭におくべきである。

表2 OAに対する副腎皮質ステロイド薬の関節内注入療法に関する報告 (メタ解析)

報告者	検討した試験数	結果
Godwin M ³⁾	RCT 5 試験	注入後1週で疼痛およびVASは有意に改善するが、3~4週でVASの改善は消失する。6~8週では改善は全く消失する。
Bellamy N ⁴⁾	RCT 28 試験	Weighted mean differencesで評価。注入後2~3週での改善効果は疼痛については明かだが機能についてはなし。注入後4~24週での改善効果は疼痛、機能ともになし。

2.3 ヒアルロン酸

・ヒアルロン酸 (hyaluronan, 以下HA) は直鎖状の多糖類であり、関節液の主成分である。HAは軟骨間の低摩擦性などの関節機能維持に関与している。正常人の

関節液中 HA の分子量は約 400 ~ 500 万 Da であるが、OA などの関節疾患では、分子量が低分子化するとともに、その濃度も低下している。新規の質のよい HA を関節腔内に補充する治療法 (visco-supplementation) は我が国でも 20 年以上前より行われている。物理的な軟骨間の潤滑作用のほかに、HA は軟骨や滑膜に対して種々の作用を有することが *in vitro* の研究で明らかとなっている。たとえば HA は軟骨細胞からの II 型コラーゲンやアグリカンなどのマトリックス産生を促進し、マトリックス破壊に働く MMP などのプロテアーゼ、活性酸素種や NO などのガスメディエーター、炎症性サイトカインなどの産生抑制作用、軟骨細胞のアポトーシス抑制などを通じて軟骨保護的に作用する⁵⁾。

HA の関節内注入療法に対する臨床成績は報告によって大きくことなるが、これは対象とする OA の病期、使用する HA 製剤の分子量、注入頻度、コントロールの有無、評価法などの違いが原因である。膝 OA に対する HA の臨床効果については、最近、複数のメタ解析の結果が報告されている (表 3)。それらのメタ解析によれば HA 注入療法は OA の疼痛、機能、患者による総体的評価における改善がプラセボに対して有意に優れている

表 3 OA に対するヒアルロン酸関節内注入療法の臨床効果についての報告 (メタ解析)

報告者	検討した試験数	結果
Wang CT ⁶⁾	RCT 20 試験	運動時疼痛、安静時疼痛、機能で評価した結果、HA 注入は副作用も少なく、臨床症状改善効果が明らかであった。ただし、試験間のバラツキが大きい。
Arrich J ⁷⁾	RCT 22 試験	歩行時疼痛 VAS は 2 ~ 6 週で -3.8mm, 10 ~ 14 週で -4.3mm, 22 ~ 30 週で -7.1mm で有意の改善に達していない。
Lo GH ⁸⁾	RCT 23 試験	effect size で検討。分子量 600 万の HA 製剤の 2 試験で大きな効果があったが、同様の製剤を使用した 1 試験では全く効果なく、試験間のバラツキが大きい。これらの 3 試験を除くと effect size は 0.19 で効果は小さい。
Bellamy N ⁹⁾	RCT 63 試験	Weighted mean differences で評価。注入後 5-13 週での改善効果は疼痛がベースラインから 11-54%, 機能が 9-15% と明らかである。副作用は少ない。

ことが明かであるが、効果のばらつきも大きいとの指摘もある^{6,9)}。臨床効果の強さについては週に 1 回、3 回の注入を行うと 3 ないし 6 ヶ月での評価で副腎皮質ステロイド薬とほぼ同等の効果があるとされており、短期的な効果よりも長期的な臨床効果が期待できる。

・HA は OA の進行を遅らせる効果があるか

HA に OA の進行を遅らせる、真の抗 OA 効果 (structure modifying effect) があるか否かについては種々の議論がある。Listrat らによる関節鏡を併用した評価、Frizzero らの軟骨生検による評価などでは HA に軟骨変性の進行を抑制する効果を認めたとしているが、いずれも症例数の少ないパイロットデータの域を脱しない^{10,11)}。Jubb らは 319 例の RCT 研究で Hyalgan (分子量 500 ~ 730 万) を週 1 回で 3 回、3 セット注入し、1 年間の関節裂隙狭小化をイメージデジタルアナライザーで計測した結果、HA 注入群で狭小化進行防止効果があったとしている¹²⁾。

2.4 ビスフォスフォネート製剤

・骨粗鬆症に対する薬剤であり OA に対する保健適応はないが、海外では OA に対する臨床試験が行われている。前述したように OA においては関節軟骨だけでなく、軟骨下骨がその発症および進行に関与している。たとえば、OA では軟骨下骨の代謝亢進、骨密度と骨強度の低下、骨髄の減少が存在する。ビスフォスフォネート製剤は破骨細胞に親和性が高く、軟骨細胞に直接、作用する可能性は少ないが、OA における軟骨下骨の脆弱性を改善し、2 次的に進行を抑制する作用は期待できる。ラットの前十字靭帯切離による OA モデルではアレンドロネート投与により軟骨変性、破壊が有意に抑制されることも示されている¹³⁾。

英国で行われたリセドロネートの膝 OA に対する治験 (British study of risedronate in structure and symptoms of knee OA, BRISK, 総 284 症例) では、15mg のリセドロネート投与群で WOMAC インデックスでは患者による総体的評価、杖の使用などでプラセボ群との間に有意差が認められ、臨床症状の改善効果が確認された。15mg のリセドロネート投与群では II 型コラーゲンの分

解マーカーである CTX-II の減少が認められた。ただし、関節裂隙狭小化に対する抑制効果は傾向 ($P = 0.067$) にとどまっていた¹⁴⁾。プラセボ群との間に有意性が出なかった背景には 1 年間の観察で裂隙狭小化の進行が検知できたものがプラセボ群でも 8% にすぎなかったことが影響している。一方、北米と欧州の 2 カ所で同時に行われた研究 (Knee OA Structural Arthritis, KOSTAR, 総 2483 名) では、2 年間にわたる観察でリセドネートは疼痛などの臨床症状改善効果、関節裂隙狭小化に対する抑制効果ともに認められなかった。BRISK 研究と異なり、疼痛に対する効果が認められなかったのはプラセボ群でも疼痛が大きく改善してしまったため、OA 治験の困難性を示している¹⁵⁾。

2.5 グルコサミン

グルコサミンは厚生労働省の定める栄養補助食品などとは異なり健康食品に属し薬品ではない。グルコサミンは約 30 年前より欧州を中心に OA に対して使用されており、ヨーロッパリウマチ学会 (EURLA) のガイドラインでは推奨度 A とされている。グルコサミンは経口投与された後は数% が関節軟骨に到達することが明かとされている。*In vitro* では軟骨細胞のマトリックス産生を促進し、軟骨および滑膜細胞の MMP、NO などの破壊メディエーターを抑制する薬理作用を有することも報告されている。グルコサミンについては、OA の臨床症状を改善する symptom modifying drug の作用があるか否かについては幾多の議論がある。最近、NIH がスポンサーとなって大規模な研究が行われた。有痛性の膝 OA 患者 (1583 名) を 24 週観察した結果、グルコサミン (1500mg)、コンドロイチン硫酸 (1200mg)、その両者の併用の 3 群ともに疼痛の改善効果は有意でないと報告された¹⁶⁾。グルコサミンの structure modifying drug としての効果を明示した論文はまだ少ない。2001 年に Reginster らが Lancet に発表した、一次性膝 OA の 212 名に対する RCT が有名である¹⁷⁾。彼らは関節裂隙はプラセボ群で 0.31mm 狭小化したのに対して、グルコサミン硫酸 1500mg を毎日、3 年間服用した群では 0.07mm 増加していたと報告し、軟骨保護効果が認められたとしている。

2.6 プロテアーゼ・インヒビター

OA の軟骨マトリックス破壊には複数の key molecule が存在し、これをターゲットとした薬剤が考案されてきた。最も注目されてきたのは、軟骨の特性を維持している軟骨型プロテオグリカン (アグリカン) や II 型コラーゲンなどのマトリックスの分解、低分子化作用を有するプロテアーゼである。アグリカンの破壊は当初、活性発現に 2 価の金属イオンを必要とするマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) のうち、MMP-3 が主役と考えられていたが、最近の研究では ADAM-TS という別のプロテアーゼ種に属する、いわゆるアグリカナナーゼの方が大きな作用を有していることが知られている。II 型コラーゲンの破壊は以前はもっぱら古典的なコラゲナーゼである MMP-1 によるとされていたが、最近の研究で OA では MMP-13 (コラゲナーゼ 3) の作用が主体とされている。以上のプロテアーゼは軟骨細胞自身から産生されて、軟骨に作用している。これらの MMP をはじめとするプロテアーゼに対する低分子量の合成インヒビターが競って製薬会社で開発されてきた。MMP インヒビターは関節疾患のほかに、MMP が癌の浸潤や転移に大きな役割を果たしているとの研究結果から、抗腫瘍薬としての治験も並行して行われてきた。しかしながら、現在までに開発された MMP インヒビターについては、ヒトに対する短期的な投与でも主として骨・関節痛 (関節周囲組織の線維化) を誘発するなどの副作用の問題点が多く出現し、軟骨破壊の抑制を目指した長期投与治験まで進展していない。

2.7 抗サイトカイン療法剤

前述した軟骨細胞からのプロテアーゼ産生は、同じく軟骨細胞から産生されるインターロイキン-1 (IL-1) などの炎症性サイトカインによって促進される。よって、抗サイトカイン療法も OA 治療の戦略の一つである。Diacerein は *in vitro* において軟骨細胞からの IL-1 産生を抑制することによって MMP-1、-3 の産生を低下させる薬剤であり、イヌ ACL 切離による OA モデルにおいても軟骨破壊を抑制することが報告されている。

Diacerein は欧州では、以前より関節痛を軽減させる symptom modifying drug として臨床的に使用されてきたが、総計 507 名の股 OA 患者に対する 3 年間にわたる投与の結果、X 線上の関節裂隙狭小化進行を有意に抑制し得たと報告されている¹⁸⁾。臨床的に使用されている薬剤のなかで、structure modifying drug としての可能性をもつ数少ない候補の一つである。なお、抗 TNF- α モノクローナル抗体を OA モデルに使用すると軟骨破壊が有意に抑制されるという報告があるが、有病率の高く生命予後の良好な OA に抗 TNF- α モノクローナル抗体などのクリティカルな合併症を有する薬剤を使用することには様々な議論がある。

3 おわりに

OA は高齢者における運動器の most common disease であるが、薬物療法に効果的なものが少ない。その進行を遅らせる真の抗 OA 薬である structure modifying drug と言えるものは厳密にはまだない。骨粗鬆症の領域ではビスフォスフォネート製剤という薬剤の開発によって、その研究が飛躍的に発展した。OA においても break through となる薬剤の開発が待たれる。

参考文献

- 1) 宗園聡 : COX-2 選択的阻害薬セレコキシブの登場とその臨床意義. *Progress in Medicine* 27 : 1655-1664, 2007
- 2) Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. : Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA.* ; 286 : 954-9, 2001
- 3) Godwin M, Dawes M. : Intra-articular steroid injections for painful knees:systematic review with meta-analysis. *Can Fam Physician*, 50 : 213-215, 2004
- 4) Bellamy N, Campbell J, Robinson V, et al. : Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane database of systematic reviews* (2): CD005328, 2006
- 5) 山田治基, 杉本春夫, 金治有彦 : ヒアルロン酸製剤の関節内注入療法の効果について. *リウマチ科* 34 : 317-326, 2005
- 6) Wang CT, Lin J, Chang CJ, et al. : Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee;a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg* 86-A : 538-545, 2004
- 7) Arrich J, Piribauer F, Mad P, et al. : Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee ; systematic review and meta-analysis. *CMAJ*, 172 : 1039-1043, 2005
- 8) Lo GH, LaValley M, McAlindon T, et al. : Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis;a meta-analysis. *JAMA*, 290 : 3115-3121, 2003
- 9) Bellamy N, Campbell J, Robinson V, et al. : Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane database of systematic reviews* (2) : CD005321, 2005
- 10) Listrat V, Ayrat X, Patarnello F, et al. : Arthroscopic evaluation of potential structure modifying activity of hyaluronan in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 5 : 153-160, 1997
- 11) Frizziero L, Govoni E, Bacchini P. Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee ; clinical and morphological study. *Clin Exp Rheumatol*, 16 : 441-449, 1998
- 12) Jubb RW, Piva S, Beinat L, et al. : A one-year, randomized, placebo (saline)-controlled clinical trial of the structure modifying effect of 500-730 kDa sodium hyaluronate(Hyalgan) in osteoarthritis of the knee. *Int J Clin Pract* , 57 : 467-474, 2003
- 13) Hayami T, Pickarski M, Wesowski GA, et al. : The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis. Reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the art anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*, 50:1193-1206,2004.
- 14) Spector TD, Conaghan PG, Buckland-Wright JC, et al. :Effect of risedronate on joint symptoms of knee osteoarthritis:results of the BRISK randomized, controlled trial. *Arthritis Res Therapy*, 7 : R625-R633, 2005
- 15) Bingham CO 3rd, Buckland-Wright JC, Garnero P, Cohen SB, Dougados M, Adami S, Clauw DJ, Spector TD, Pelletier JP, Raynauld JP, Strand V, Simon LS, Meyer JM, Cline GA, Beary JF. :Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degradation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee : results of the two-year multinational knee osteoarthritis structural arthritis study. *Arthritis Rheum*. 54 : 3494-507, 2006

- 16) Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham CO 3rd, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher HR Jr, Oddis CV, Wolfe F, Molitor JA, Yocum DE, Schnitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt KD, Moskowitz RW, Williams HJ. : Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med.* 354 : 795-808, 2006
- 17) Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC. Et al. : Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression : a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet.* 357 : 251-6, 2001
- 18) Dougados M, Nguyen M, Berdah L, Mazières B, Vignon E, Lequesne M; ECHODIAH Investigators Study Group. : Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. Evaluation of the Chondromodulating Effect of Diacerein in OA of the Hip. *Arthritis Rheum.* 44 : 2539-47, 2001

LIGHT Induces Cell Proliferation and Inflammatory Responses of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts via Lymphotoxin β Receptor

SATORU ISHIDA, SHOJI YAMANE, SAORI NAKANO, TOSHIHITO MORI, TAKUO JUJI, NAOSHI FUKUI, TSUNETOSHI ITOH, RYUJI SUZUKI, and TAKAHIRO OCHI

ABSTRACT. Objective. To investigate the effects of LIGHT (lymphotoxin-like, exhibits inducible expression and competes with herpes simplex virus glycoprotein D for herpes virus entry mediator, a receptor expressed by T lymphocytes) on the proliferation and gene expression of fibroblast-like synoviocytes (FLS) from patients with rheumatoid arthritis (RA).

Methods. We measured LIGHT levels in RA synovial fluids (SF) by ELISA, and compared them with those in osteoarthritis (OA) SF. Levels of LIGHT and its receptors in RA-FLS and synovium were assessed using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). RA-FLS proliferation was examined by a bromodeoxyuridine assay. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and several chemokines, such as interleukin 8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), was examined by real-time quantitative PCR, ELISA, and flow cytometry. The effects of LIGHT on nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation were investigated using immunofluorescence and Western blotting.

Results. LIGHT was upregulated in both SF and synovium of RA patients compared with OA patients. Herpes virus entry mediator (HVEM) and lymphotoxin β receptor (LT β R), but not LIGHT, were detected in RA-FLS. LIGHT significantly promoted RA-FLS proliferation and induced expression of MCP-1, IL-8, MIP-1 α , and ICAM-1 by RA-FLS. As well, LT β R silencing RNA (siRNA), but not HVEM siRNA, inhibited these effects of LIGHT. LIGHT induced I κ B α degradation and NF- κ B translocation, and a NF- κ B inhibitor suppressed the effects of LIGHT on RA-FLS.

Conclusion. Our findings suggest that LIGHT signaling via LT β R plays an important role in the pathogenesis of RA by affecting key processes such as the proliferation and activation of RA-FLS. Regulation of LIGHT-LT β R signaling may represent a new therapeutic target for RA treatment. (J Rheumatol First Release xxxxx)

Key Indexing Terms:

RHEUMATOID ARTHRITIS

INFLAMMATION

SYNOVIOCYTES

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease characterized by synovial hyperplasia and progressive destruction of cartilage and bone. Fibroblast-like synovio-

cytes (FLS), an important component of the synovial lining in joints, proliferate aggressively to form a pannus causing irreversible joint damage. In RA synovial tissue, activated FLS and infiltrating macrophages and lymphocytes produce inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), and IL-6, that play important roles in the pathogenesis of RA^{1,2}. These cytokines have been shown to not only directly promote FLS proliferation leading to pannus formation³, but also to induce the expression of inflammatory cytokines, chemokines, and adhesion molecules, which further recruit inflammatory leukocytes and perpetuate inflammatory responses.

LIGHT (lymphotoxin-like, exhibits inducible expression and competes with herpes simplex virus glycoprotein D for herpes virus entry mediator, a receptor expressed by T lymphocytes) is a recently identified type-2 transmembrane glycoprotein of the TNF ligand superfamily (TNFSF14)⁴. LIGHT is expressed on activated T lymphocytes^{4,5}, monocytes⁶, granulocytes⁶, and immature dendritic cells⁷. LIGHT signaling is transduced via 2 members of the TNFR family,

From the Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital, Sagamihara, Kanagawa; Discovery Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., Toyonaka, Osaka; and Department of Immunology and Embryology, Tohoku University School of Medicine, Aoba-ku, Sendai, Japan.

S. Ishida, MSc; S. Yamane, PhD, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital, Discovery Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.; S. Nakano, BSc; T. Mori, MD, PhD; T. Juji, MD, PhD; N. Fukui, MD, PhD, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital; T. Itoh, MD, PhD, Department of Immunology and Embryology, Tohoku University School of Medicine; R. Suzuki, DVM, PhD; T. Ochi, MD, PhD, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital.

Address reprint requests to S. Ishida, Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital, Sakuradai 18-1, Sagamihara, Kanagawa, 228-8522, Japan.

E-mail: satoru.ishida@shionogi.co.jp

Accepted for publication January 10, 2008.

herpes virus entry mediator (HVEM, TNFRSF14) and lymphotoxin β receptor (LTBR, TNFRSF3). HVEM is expressed prominently on monocytes, dendritic cells, and lymphocytes^{5,8-10}, whereas LTBR is expressed on many cell types with the exception of lymphocytes^{4,6,11}. LIGHT has been shown to regulate cell proliferation^{7,12,13} and apoptosis^{6,14} to induce the secretion of various cytokines, and to augment the expression of adhesion molecules^{12,15-17}. Recently, Fava, *et al* reported that LTBR-Ig protein blocked the induction of experimental arthritis in mice¹⁸. Moreover, LIGHT induced the expression of inflammatory cytokines in macrophages from RA synovial fluid (SF)¹⁹. These studies suggest that LIGHT may be an important inflammatory cytokine in the development of RA. However, the effect of LIGHT on RA-FLS has not yet been analyzed.

Our aim was to clarify the role of LIGHT in the proliferation and inflammatory response of RA-FLS. We observed that the concentrations of LIGHT in both SF and synovium were higher in patients with RA than in those with osteoarthritis (OA). In addition, LIGHT signaling via LTBR, but not HVEM, enhanced RA-FLS proliferation and induced the expression of inflammatory cytokines, chemokines, and adhesion molecules in RA-FLS through a nuclear factor- κ B (NF- κ B)-dependent signal transduction pathway. We suggest that activation of RA-FLS by LIGHT/LTBR signaling may play an important role in the pathogenesis of RA.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Recombinant human LIGHT and platelet-derived growth factor (PDGF)-AB were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Monoclonal antibodies (mAb) against human actin and NF- κ B p65 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and BD Biosciences (Palo Alto, CA, USA), respectively. The mAb against I κ B α was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA).

Patients and tissue samples. All patients with RA fulfilled the 1987 American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) criteria²⁰ for the diagnosis of RA. Patients with RA ranged in age from 41 to 74 years (mean \pm SD 66.0 \pm 12.0 yrs). Patients with OA ranged in age from 39 to 90 years (mean \pm SD 64.1 \pm 14.7 yrs). All patients were women. Synovial tissues were obtained from 27 patients with RA and 11 patients with OA at the time of knee prosthetic replacement surgery. RA-FLS were established from the synovia of RA patients as described²¹. RA-FLS were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin, streptomycin, and L-glutamine. RA-FLS from passages 4-9 were used for each experiment. SF were obtained by arthrocentesis from 23 RA patients and 10 OA patients and, after centrifugation at 20,000 \times g for 10 min, the supernatants were collected and frozen at -80°C until used. All specimens were obtained from patients who gave written informed consent, according to the protocol approved by the institutional review board of the National Hospital Organization, Sagami-hara National Hospital.

LIGHT in synovial fluids. The amount of LIGHT in SF was measured using an ELISA kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. The minimum and maximum detection levels of the ELISA were 7.8 pg/ml and 2000 pg/ml, respectively.

RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis. Total RNA was extracted from synovium and FLS using an RNeasy Micro kit (Qiagen). cDNA was generated from

RNA using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) and used as a template for real-time quantitative PCR on a LightCycler (Roche Diagnostics). PCR was performed using SYBR Premix Ex Taq (Takara). The primers used for real-time PCR were as follows: for IL-6, 5'-AAG CCA GAG CTG TGC AGA TGA GTA-3' and 5'-TGT CCT GCA GCC ACT GGT TC-3'; for IL-8, 5'-ACA CTG CGC CAA CAC AGA AAT TA-3' and 5'-TTT GCT TGA AGT TTC ACT GGC ATC-3'; for granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), 5'-CAT GAT GGC CAG CCA CTA CAA-3' and 5'-ACT GGC TCC CAG CAG TCA AAG-3'; for monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), 5'-GCT CAT AGC AGC CAC CTT CAT TC-3' and 5'-GGA CAC TTG CTG CTG GTG ATT C-3'; for RANTES, 5'-ACC AGT GGC AAG TGC TCC AAC-3' and 5'-CTC CCA AGC TAG GAC AAG AGC AAG-3'; for MIP-1 α , 5'-TCC GTC ACC TGC TCA GAA TCA-3' and 5'-AGC ACT GGC TGC TCG TCT CA-3'; for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), 5'-CGT GAT CCT TGG AGC CTC AAA TA-3' and 5'-GAC GGA GTC ACC AAT CTG AGC A-3'; for intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), 5'-CCT GAT GGG CAG TCA ACA GCT A-3' and 5'-ACA GCT GGC TCC CGT TTC A-3'; for GAPDH, 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3' and 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3'; for LIGHT, 5'-TCA CGA GGT CAA CCC AGC AG-3' and 5'-CCC AGC TGC ACC TTG GAG TAG-3'; for HVEM, 5'-TTT GCT CCA CAG TTG GCC TAA TC-3' and 5'-CAA TGA CTG TGG CCT CAC CTT C-3'; and for LTBR, 5'-ATG CTG ATG CTG GCC GTT C-3' and 5'-AGG CTC CCA GCT TCC AGC TA-3'.

PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 10 s, then 40 cycles of 95°C for 5 s and 60°C for 20 s. When SYBR Green dye was used to monitor PCR, melting curves were routinely recorded to verify the singularity of the PCR product. In each sample, the level of cDNA was normalized to the level of GAPDH.

Proliferation assay. RA-FLS were seeded into a 96-well plate at a density of 5.0×10^3 cells/well. After 24 h of preculture, the cells were stimulated for 48 h by the addition of LIGHT or PDGF used as a positive control. A previous report described stimulation of RA-FLS proliferation by PDGF²². Bromodeoxyuridine (BrdU) was added for the last 24 h of culture, then incorporation of BrdU was measured using a cell proliferation ELISA (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

Measurement of cytokine and chemokine levels in culture supernatants. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and GM-CSF levels were measured in the supernatants of RA-FLS cultures using a Human Inflammatory Five-Plex Antibody bead kit (Biosource, Camarillo, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, on a Luminex 100 instrument (Luminex, Austin, TX, USA). The levels of MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, eotaxin, and RANTES in the supernatant were measured using a Human Chemokine Five-Plex Antibody bead kit (Biosource).

Transfection of RA-FLS with silencing RNA (siRNA). All siRNA were purchased from Qiagen. The sense strand sequences of the RNA duplexes were as follows: HVEM, 5'-GGC ACU GCC UCA CAG CCA AdTdT-3'; LTBR, 5'-CAU CUA CAA UGG ACC AGU AdTdT-3'; and control siRNA 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT-3'. The day before transfection, RA-FLS were seeded into 6-well culture plates at a density of 4×10^4 cells/well, or 96-well plates at 5×10^3 cells/well, in complete medium without antibiotics. The next day, siRNA (at final concentration of 50 nM) were introduced into cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions; 24 h after transfection, media were replaced with regular culture media. The cells were then cultured for 96 h before analysis of the gene-silencing effects. mRNA levels were measured by real-time quantitative PCR analysis.

Immunofluorescence assay for NF- κ B localization. To examine the nuclear translocation of NF- κ B, RA-FLS were seeded at a density of 5×10^3 cells/well in 8-well Lab-Tek chamber slides (Nalgen Nunc International, Naperville, IL, USA). Cells were stimulated with 10 ng/ml LIGHT for 40 min, washed with cold PBS, and then fixed in PBS with 4% paraformaldehyde for 10 min. The cells were permeabilized with PBS and 0.1% Triton-X100 for 10 min. Nonspecific binding was prevented with blocking buffer

containing 2% goat serum diluted in PBS. The cells were incubated with mouse monoclonal anti-NF- κ B p65 antibody or an isotype control for 1 h at room temperature, then with AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse antibody for 30 min at room temperature. Slides were coverslipped and examined using a fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Western blotting analysis. For measurement of I κ B α by Western blotting, RA-FLS at a density of 1.5×10^6 /well were seeded into 6-well plates in culture medium for 24 h. After incubation with 10 ng/ml LIGHT for 40 min, cells were washed twice in ice-cold PBS and lysed in 100 μ l of sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (62.5 mM Tris HCl, pH, 10% glycerol, 2% SDS, 5% mercaptoethanol, and 0.001% bromophenol blue). Cell lysates were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in 12% polyacrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose membranes (Invitrogen). After blocking, membranes were incubated with either anti- β -actin or anti-I κ B α antibody, overnight at 4°C, and then with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Dako), at room temperature for 1 h. The signals were visualized using chemiluminescence reagent (ECL; Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Statistical analysis. Comparisons of = 3 populations were made using the Kruskal-Wallis test. Comparisons of 2 independent data sets were by Mann-Whitney U-test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Increased expression of LIGHT in SF of patients with RA. To examine whether LIGHT is involved in the pathogenesis of RA, we analyzed the level of LIGHT in SF from 23 RA patients and 10 OA patients by ELISA. SF from OA patients were used as controls, because they were not available from healthy individuals. The concentration of LIGHT in SF from RA patients was significantly higher than in those from OA patients (Figure 1). The median levels of LIGHT in SF from RA and OA patients were 108.5 pg/ml and 7.8 pg/ml, respectively.

Expression of LIGHT and its receptors in RA synovial tissue and RA-FLS. Because RA patients had more LIGHT in their SF than OA patients, we investigated whether LIGHT and its membrane-bound receptors HVEM and LT β R were expressed in the RA and OA synovial tissues. Although

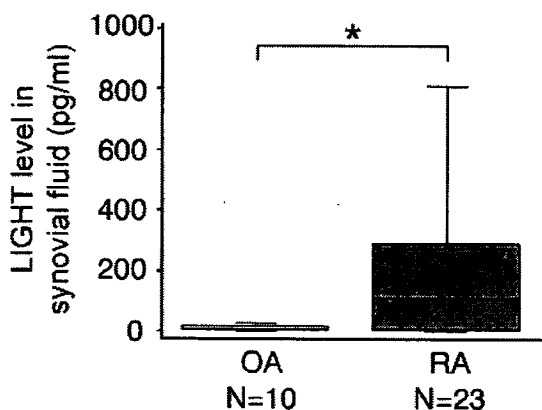


Figure 1. Levels of LIGHT in synovial fluid from RA patients and OA patients, determined by ELISA. Box plots represent 25th to 75th percentiles. Error bars represent 10th to 90th percentiles. Lines inside boxes represent the median. *p < 0.05.

quantitative real-time PCR analysis revealed that mRNA expression of LIGHT in synovial tissue was significantly higher in RA patients than in OA patients (Figure 2A), HVEM and LT β R levels were not different between RA and OA patients.

Further, we investigated the mRNA expression of LIGHT, HVEM, and LT β R in RA-FLS by quantitative real-time PCR. RA-FLS from all 7 patients expressed HVEM and LT β R mRNA, and the level of LT β R mRNA was significantly higher than that of HVEM mRNA, whereas no LIGHT expression was detected (Figure 2B).

Induction of RA-FLS proliferation by LIGHT. Previous studies reported that LIGHT induces cell proliferation in T lymphocytes^{7,12} and vascular smooth muscle cells¹³. Since the expression of HVEM and LT β R in RA-FLS had been confirmed, we next evaluated the effect of LIGHT on the proliferation of RA-FLS using a BrdU assay. As shown in

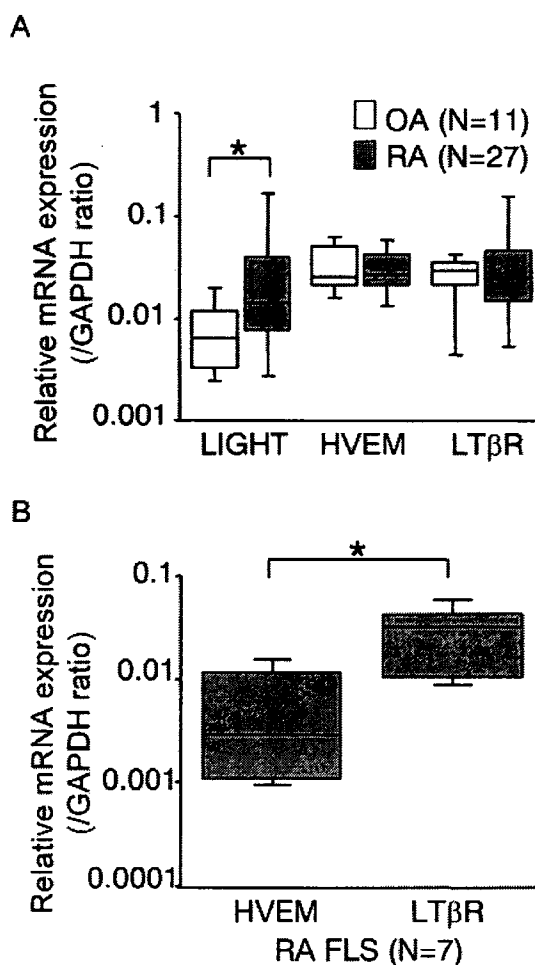


Figure 2. Expression of LIGHT, herpes virus entry mediator (HVEM), and lymphotoxin β receptor (LT β R) mRNA in synovial tissues and fibroblast-like synoviocytes (FLS): A. In synovial tissues from RA patients and OA patients. B. In RA-FLS. Level was evaluated by real-time quantitative PCR; results are represented as relative ratios to GAPDH levels. *p < 0.05.

Figure 3A, treatment with LIGHT significantly enhanced *de novo* DNA synthesis in RA-FLS in a dose-dependent manner. LIGHT showed a stronger growth-promoting activity than PDGF, at lower concentrations.

To investigate the contributions of HVEM and LT β R to the LIGHT-induced proliferation of RA-FLS, we transfected RA-FLS with HVEM siRNA or LT β R siRNA. Quantitative real-time PCR analysis revealed that the HVEM mRNA level in HVEM siRNA-transfected RA-FLS was reduced by 75% compared with control siRNA-transfected RA-FLS (Figure 3B). Similarly, treatment of RA-FLS with LT β R siRNA led to a 75% reduction in the LT β R mRNA level compared with that in control siRNA-transfected RA-FLS (Figure 3B). Under these conditions, LIGHT-induced growth of RA-FLS was significantly decreased by LT β R siRNA, but not by HVEM siRNA, when compared with RA-FLS transfected with control siRNA (Figure 3C).

LIGHT induces expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and adhesion molecules in FLS via LT β R. Previous studies reported that LIGHT induces secretion of various cytokines and augments the expression of adhesion molecules^{13,15-17,19}. We examined the effects of LIGHT on inflammatory cytokine and chemokine production by RA-FLS. Treatment with LIGHT enhanced both mRNA and protein expression of IL-8, MCP-1, MIP-1 α , and RANTES in RA-FLS, in a dose-dependent manner (Figures 4A, 4B). LIGHT induced IL-1 β , IL-6, and GM-CSF, but not TNF- α , eotaxin, or MIP-1 β (data not shown). Next, to assess whether LIGHT can induce the expression of cell-surface adhesion molecules on RA-FLS, we examined ICAM-1 and VCAM-1 expression on LIGHT-stimulated RA-FLS. LIGHT treatment significantly increased the expression of ICAM-1 mRNA in a dose-dependent manner (Figure 4C). Flow cytometry analysis revealed the augmented expression of ICAM-1 protein on the cell surface of RA-FLS stimulat-

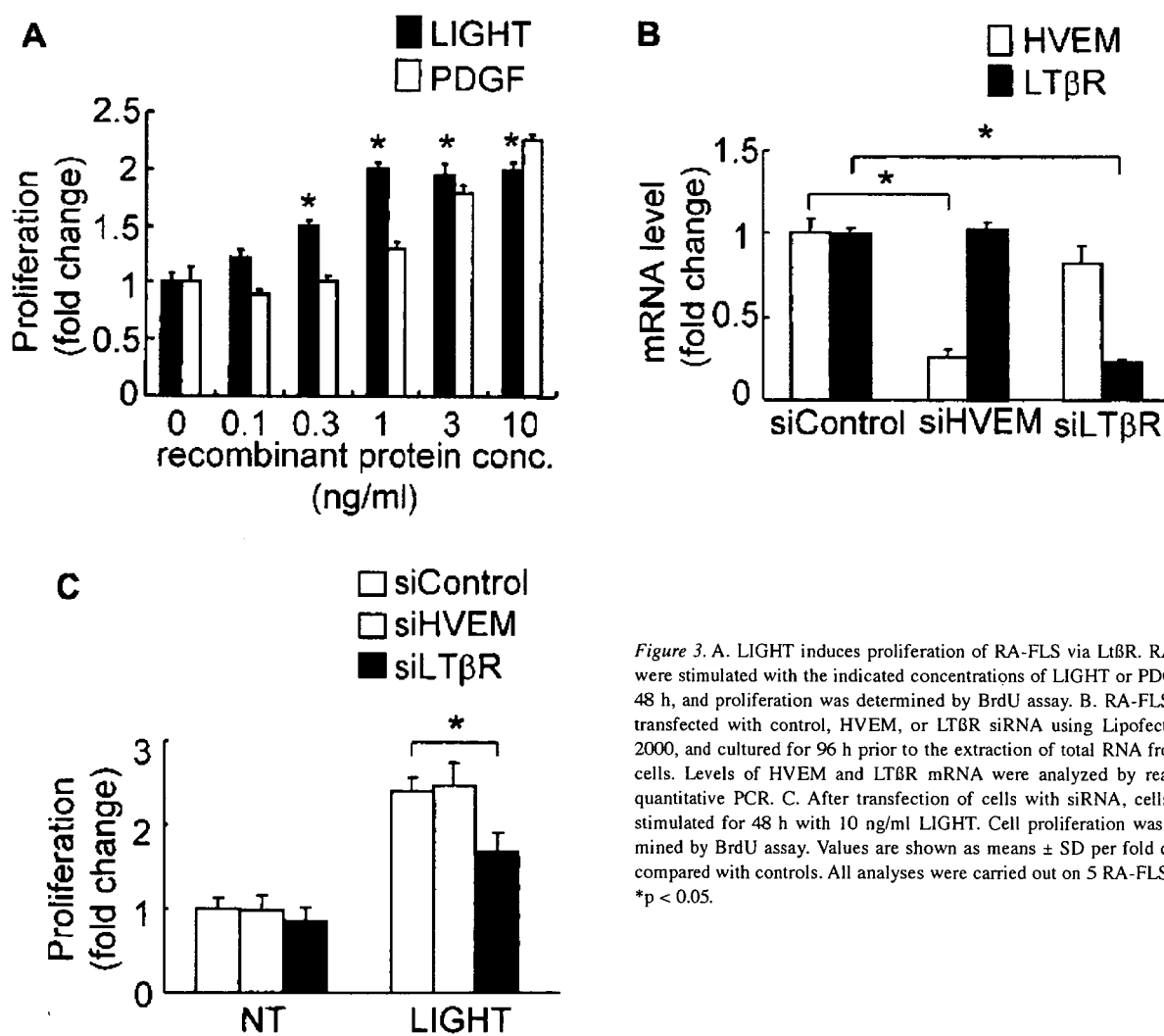


Figure 3. A. LIGHT induces proliferation of RA-FLS via Lt β R. RA-FLS were stimulated with the indicated concentrations of LIGHT or PDGF for 48 h, and proliferation was determined by BrdU assay. B. RA-FLS were transfected with control, HVEM, or LT β R siRNA using Lipofectamine 2000, and cultured for 96 h prior to the extraction of total RNA from the cells. Levels of HVEM and LT β R mRNA were analyzed by real-time quantitative PCR. C. After transfection of cells with siRNA, cells were stimulated for 48 h with 10 ng/ml LIGHT. Cell proliferation was determined by BrdU assay. Values are shown as means \pm SD per fold change compared with controls. All analyses were carried out on 5 RA-FLS lines. * $p < 0.05$.

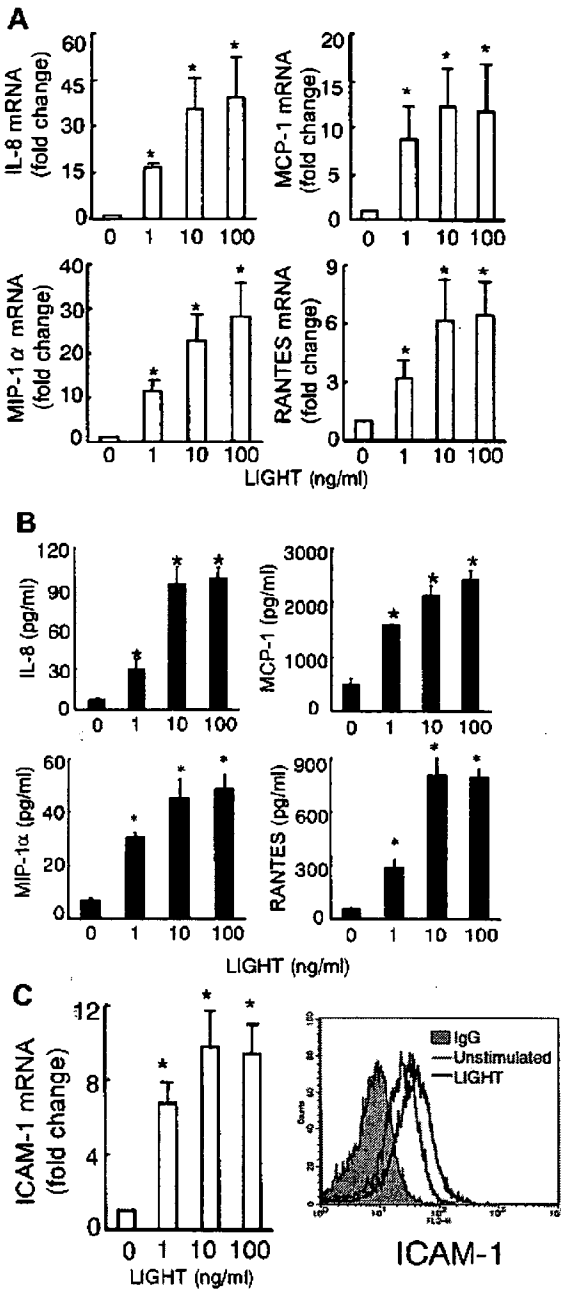


Figure 4. Upregulation of IL-8, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, and ICAM-1 expression in RA-FLS by LIGHT. **A.** RA-FLS were stimulated with the indicated concentrations of LIGHT for 3 h, and real-time quantitative PCR was performed to determine levels of IL-8, MCP-1, MIP-1 α , and RANTES mRNA expression. Values are shown as means \pm SD per fold change compared with controls. **B.** RA-FLS were stimulated with the indicated concentrations of LIGHT for 72 h. Concentrations of IL-8, MCP-1, MIP-1 α , and RANTES in cell culture supernatants were determined by multiplex bead array assays. Values are shown as means \pm SD pg/ml. **C.** RA-FLS were stimulated with the indicated concentrations of LIGHT for 3 h, and real-time quantitative PCR was performed to determine levels of ICAM-1 mRNA expression. ICAM-1 surface expression on RA-FLS was detected by flow cytometry after stimulation with 10 ng/ml LIGHT for 24 h. All analyses were carried out on 4 RA-FLS lines; flow cytometry profiles of one representative result are shown. * $p < 0.05$.

ed with LIGHT (Figure 4C). Similar increases in VCAM-1 mRNA and protein expression were also seen when stimulated with LIGHT (data not shown). Moreover, we investigated whether knockdown of HVEM or LTBR suppressed this series of LIGHT-induced gene expression in RA-FLS. Compared with control siRNA, LTBR siRNA, but not HVEM siRNA, significantly decreased the expression of IL-8, MCP-1, and ICAM-1 mRNA induced by LIGHT (Figure 5). Similarly, LTBR siRNA decreased the LIGHT-induced expression of IL-1 β , IL-6, GM-CSF, RANTES, and MIP-1 α mRNA in FLS (data not shown).

Activation of NF- κ B in RA-FLS via LT β R by LIGHT. It is known that activation of NF- κ B has a key role in inflammatory disease²³. Several studies have shown that LIGHT activates the transcription factor NF- κ B in different cell types^{7,9,13,24-26}. To investigate the involvement of NF- κ B in LIGHT-induced gene expression, we examined the effect of the NF- κ B inhibitor PDTC on the expression of IL-8, MCP-1, and ICAM-1 by real-time quantitative PCR. PDTC completely abolished the LIGHT-induced expression of IL-8, MCP-1, and ICAM-1 (Figure 6A). The LIGHT-induced expression of IL-1 β , IL-6, GM-CSF, RANTES, and MIP-1 α mRNA in RA-FLS was also inhibited by PDTC treatment (data not shown). The concentration of PDTC used in these experiments had no cytotoxic effect, as demonstrated by cell viability studies using trypan blue exclusion, which showed that > 95% of cells remained viable over the entire period of the experiment (data not shown).

In the immunocytofluorescence analysis using anti-NF- κ B p65 mAb, enhanced nuclear translocation of NF- κ B p65 was observed in LIGHT-stimulated RA-FLS (Figure 6B). Further, Western blotting using anti-I κ B α mAb showed that I κ B α degradation was induced by LIGHT, and that I κ B α degradation was inhibited by LTBR siRNA, but not by HVEM siRNA (Figure 6C).

DISCUSSION

We observed that LIGHT, but not HEVM or LTBR, is overexpressed in the synovial tissues of patients with RA compared with those of patients with OA. The expression of LIGHT was not detected in RA-FLS, which comprise one of the major components of the RA synovium. RA synovium is histologically characterized by prominent infiltration of macrophages and lymphocytes²⁷. Although LIGHT has been supposed to be produced by activated T lymphocytes *in vitro*^{4,5}, a recent study reported that LIGHT was overexpressed in CD68-positive macrophages in RA synovial tissue compared with those in OA synovial tissue, and that expression levels of LIGHT were low in areas rich in lymphocytes¹⁹. Thus, macrophages rather than FLS and lymphocytes could be the major source of LIGHT in the RA synovium.

We further demonstrated that *in vitro*-cultured RA-FLS express HVEM and LTBR, which implies that RA-FLS are

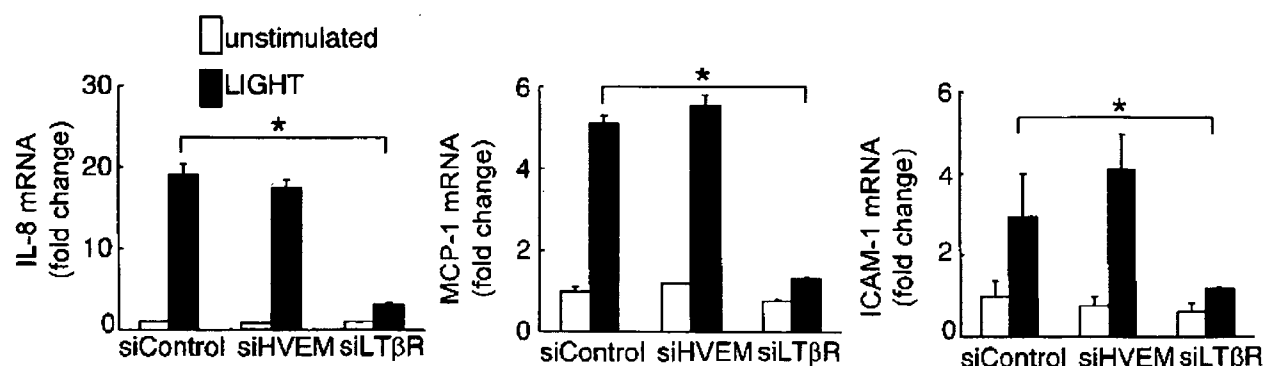


Figure 5. LIGHT-induced expression of IL-8, MCP-1, and ICAM-1 in RA-FLS via LTβR. RA-FLS were transfected with control, HVEM, or LTβR siRNA using Lipofectamine 2000. After 96 h incubation, cells were stimulated with 10 ng/ml LIGHT for an additional 3 h. Levels of IL-8, MCP-1, and ICAM-1 mRNA were analyzed by real-time quantitative PCR. Values are shown as means ± SD per fold change compared with controls. All analyses were carried out on 4 RA-FLS lines. *p < 0.05.

target cells of LIGHT. Indeed, we first showed that LIGHT had a stronger RA-FLS growth-promoting activity than PDGF, in lower concentrations. The proliferation of RA-FLS is one of the most critical pathological changes in RA. Thus, our findings suggest that increased expression of LIGHT might lead to the synovial hyperplasia of RA. Anticytokine therapies targeting TNF- α , IL-1 β , and IL-6 have been used to treat patients with RA, and it has been demonstrated that such treatments may suppress the accompanying bone destruction as well as the synovitis^{28,29}. In addition, recent studies have indicated that LIGHT reduces Fas-mediated apoptosis in FLS³⁰, that LIGHT may function as a mediator of bone resorption through the induction of osteoclastogenesis³¹, and that LTβR-Ig protein blocks the induction of experimental arthritis in mice¹⁸. Thus, a neutralizing antibody against LIGHT could be a useful tool for inhibition of synovial hyperplasia and bone destruction in RA.

The enhanced effects of LIGHT on RA-FLS proliferation were significantly inhibited by LTβR siRNA, but not by HVEM siRNA, suggesting that LTβR, rather than HVEM, is involved in the LIGHT-induced proliferation of RA-FLS. The exact mechanism by which LIGHT influences RA-FLS proliferation through LTβR is unknown. A potential mechanism underlying RA-FLS proliferation induced by LIGHT may involve cell-cycle regulators, including cyclin-dependent kinases (CDK). The mammal cell cycle is controlled by holoenzymes composed of a catalytic CDK and regulatory cyclin. The expression level of p21 was reduced in RA synovial linings and FLS compared with the level in patients with OA³². Overexpression of p21 or p16 by adenoviral-mediated delivery suppresses FLS growth *in vitro*^{33,34}. Further, LIGHT induces cell proliferation, downregulates the CDK inhibitors p21, p27 and p53, and inversely upregulates cyclin D and Rb hyperphosphorylation in vascular smooth muscle cells¹³. Thus, it is possible that LIGHT promotes FLS proliferation by shortening the cell cycle of FLS in RA. Wang, *et al* reported that LTβR-null mice show

reduced BrdU incorporation in dendritic cells³⁵. This supports our claim that LTβR signaling is involved in the proliferation of RA-FLS.

We observed that LIGHT also induces the production of inflammatory cytokines and chemokines and expression of adhesion molecules on RA-FLS. Inflammatory cytokines and chemokines induce the migration of cells and release of mediators of inflammation and angiogenesis, and could be involved in the pathogenesis of RA^{1,2,36}. The increased expression of ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules on activated endothelial cells enhances the recruitment of monocytes, lymphocytes, and neutrophils, leading to inflammation. These findings indicate that LIGHT might play an important role in inflammation in the synovial lining layer, as well as in its hyperplasia. A recent study revealed that LIGHT upregulates the expression of ICAM-1, VCAM-1, and IL-6 in RA-FLS via NF- κ B activation^{30,37}. Although these reports are consistent with our present results, it has not been clear which of 2 receptors is involved in the induction of these genes in FLS. Our knockdown analysis using siRNA revealed that LIGHT induces proliferation and gene expression by signaling via LTβR, but not HVEM. Braun, *et al* have shown that LTβR is expressed on RA-FLS, and that LTα1β2, a ligand for LTβR, induces expression of inflammatory cytokines, chemokines, and ICAM-1³⁸. This supports our claim that LTβR signaling is involved in the activation of RA-FLS. The NF- κ B transcription factor is certainly involved in cytokine- and chemokine-driven responses and is a point of convergence for several upstream proinflammatory pathways²³. Indeed, NF- κ B activation appears to be an important factor in RA, as the expression of NF- κ B is enhanced in lining cells^{39,40} and in the cartilage-pannus junction in the RA synovium⁴¹. In our study, treatment with PDTC blocked LIGHT-induced IL-8, MCP-1, and ICAM-1 expression, suggesting that the effects of LIGHT are mediated through NF- κ B. The involvement of NF- κ B in LIGHT-induced proinflammatory responses was further confirmed

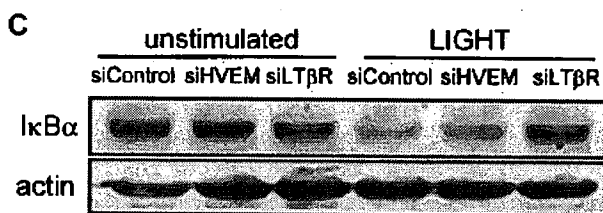
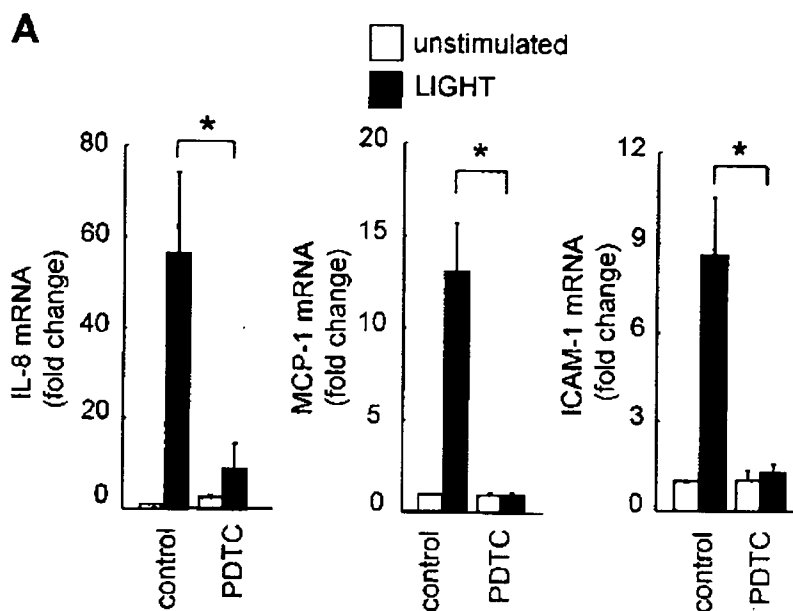


Figure 6. LIGHT-induced expression of IL-8, MCP-1, and ICAM-1 through NF-κB-mediated pathways. **A.** FLS were stimulated with 10 ng/ml LIGHT for 3 h with or without preincubation for 30 min with 30 μM PDTC. Levels of IL-8, MCP-1, and ICAM-1 mRNA were analyzed by real-time quantitative PCR. Values are shown as means ± SD per fold change compared with control. All analyses were carried out on 4 RA-FLS lines. **p* < 0.05. **B.** Immunofluorescence staining for NF-κB p65 in RA-FLS. Control in which primary antibodies were replaced with control IgG (left panel); unstimulated RA-FLS (middle); and RA-FLS stimulated with 10 ng/ml LIGHT for 30 min (right). Results are representative of 2 experiments using 2 FLS lines. **C.** 96 h after siRNA transfection, cells were stimulated with 10 ng/ml LIGHT for 40 min. IκBα degradation was analyzed by immunoblotting. Results are representative of 2 experiments using 2 RA-FLS lines.

by the LIGHT-induced nuclear translocation of NF-κB p65. Moreover, LIGHT induced IκBα degradation in RA-FLS, an effect that was inhibited by LTβR siRNA, but not by HVEM siRNA. These findings are consistent with studies showing

that LTβR ligation can lead to activation of NF-κB^{24,42-45}. However, it is unknown why LIGHT prefers the LTβR signaling pathway in RA-FLS, even though HVEM is also expressed on these cells.