

平成 22 年度末で厚生労働科学研究主任研究者を終了するにあたり、RA 研究の 1 つの到達点として当研究班の発表内容を簡略に整理してみました。今までの研究を進める過程で御力を頂いた多くの方々に御礼の気持ちをこめて報告書を作らねばと思いましたが、「医師でなくても分かる報告書を」と言われたこともあり分かり易くまとめようと努めましたが、内容を盛り込むと難しいものになってしまいました。

今までの研究を進める過程で、多方面から多くの方々にお世話になりました。心より御礼を申し上げます。

2010 年 11 月 主任研究者 越智隆弘
大阪市天王寺区北山町 10-31
大阪警察病院 院長

本報告書に引用した発表論文

- 1) Tanabe S, Ochi T, Ono K. Chronic polyarthritis in inbred C3H/He mice after systemic administration of allogeneic thymocytes. *J Rheumatol.* 1981;8:895-901.
- 2) Ochi T, Yonemasu K, Iwase R, Sasaki T, Tsuyama K, Ono K. Serum C1q levels as a prognostic guide to articular erosions in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1984;27:883-7.
- 3) Ochi T, Iwase R, Yonemasu K, Matsukawa M, Yoneda M, Yukioka M, Ono K. Natural course of joint destruction and fluctuation of serum C1q levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:37-43.
- 4) Ochi T, Hakomori S, Adachi M, Owaki H, Okamura M, Ono Y, Yamasaki K, Fujimoto M, Wakitani S, Ono K. The presence of a myeloid cell population showing strong reactivity with monoclonal antibody directed to difucosyl type 2 chain in epiphyseal bone marrow adjacent to joints affected with rheumatoid arthritis (RA) and its absence in the corresponding normal bone marrow. *J Rheumatol.* 1988;15:1609-15.
- 5) Wakitani S, Sakamuro D, Ochi T, Owaki H, Fujimoto M, Ono K. Polymorphonuclear cell factor found in patients with rheumatoid arthritis. *Biomed Res.* 1988;9:395-399.
- 6) Fujimoto M, Ochi T, Owaki H, Wakitani S, Suzuki R, Takai M, Ono K. Elevated activity of interleukin-1, -2, and -3 in the bone marrow of collagen-induced arthritic rats. *Biomed Res.* 1988;9:401-407.
- 7) Owaki H, Ochi T, Yamasaki K, Yukawa K, Wakitani S, Okamura M, Ono K. Elevated activity of myeloid growth factor in bone marrow adjacent to joints affected by rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1989;16:572-7.

- 8) Owaki H, Yukawa K, Ochi T, Shimaoka Y, Ono K. Facs analysis of myeloid differentiation stages in epiphyseal bone marrow, adjacent to joints affected with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1991;20:91-7.
- 9) Ochi T, Iwase R, Kimura T, Hirooka A, Masada K, Owaki H, Wakitani S, Murata N, Ono K. Effect of early synovectomy on the course of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1991;18:1794-8.
- 10) Hayashida K, Ochi T, Fujimoto M, Owaki H, Shimaoka Y, Ono K, Matsumoto K. Bone marrow changes in adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. Interleukin-1 and interleukin-6 activity and abnormal myelopoiesis. *Arthritis Rheum.* 1992;35:241-5.
- 11) Kaisho T, Oritani K, Ishikawa J, Tanabe M, Muraoka O, Ochi T, Hirano T. Human bone marrow stromal cell lines from myeloma and rheumatoid arthritis that can support murine pre-B cell growth. *J Immunol.* 1992;149:4088-95.
- 12) Fujimoto M, Hayashida K, Ochi T, Shimaoka Y, Ono K. Fluctuation of interleukin-1 and -6 activity in bone marrow serum in collagen-induced arthritis in rats. *Biomed Res.* 1992; 13:243-251.
- 13) Ochi T, Hakomori S, Fujimoto M, Okamura M, Owaki H, Wakitani S, Shimaoka Y, Hayashida K, Tomita T, Kawamura S, Ono K. Therapeutic effect of intradermal injections with difucosyl lactosamine (dimeric Le^x) on patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1993;20:2038-45.
- 14) Kaisho T, Ishikawa J, Oritani K, Inazawa J, Tomizawa H, Muraoka O, Ochi T, Hirano T. BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 ;91:5325-9.
- 15) Tanabe M, Ochi T, Tomita T, Suzuki R, Sakata T, Shimaoka Y, Nakagawa S, Ono K. Remarkable elevation of interleukin 6 and interleukin 8 levels in the bone marrow serum of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1994;21:830-5.
- 16) Tomita T, Kashiwagi S, Shimaoka Y, Ikawa T, Tanabe M, Nakagawa S, Denno K, Owaki H, Ochi T. Phenotypic characteristics of bone marrow cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1994;21:1608-1614.
- 17) Wakitani S, Owaki H, Ochi T, Ono K. Elevated interleukin-1 level in polymorphonuclear cells accumulating in bone marrow adjacent to the affected joint with severe rheumatoid arthritis. *Jpn J Rheumatol.* 1994;21:830-835.
- 18) Hirohata S, Yanagida T, Koda M, Koiwa M, Yoshino S, Ochi T. Selective induction of IgM rheumatoid factors by CD14+ monocyte-lineage cells generated from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38:384-8.

- 19) Ishikawa J, Kaisho T, Tomizawa H, Lee BO, Kobune Y, Inazawa J, Oritani K, Itoh M, Ochi T, Ishihara K, et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics*. 1995;26:527-34.
- 20) Oda T, Fujiwara K, Yonenobu K, Azuma B, Ochi T. Natural course of cervical spine lesions in rheumatoid arthritis. *Spine*. 1995;15:1128-35.
- 21) Hirooka A, Wakitani S, Yoneda M, Ochi T. Shoulder destruction in rheumatoid arthritis. Classification and prognostic signs in 83 patients followed 5-23 years. *Acta Orthop Scand*. 1996;67:258-63.
- 22) Nakagawa S, Toritsuka Y, Wakitani S, Denno K, Tomita T, Owaki H, Kimura T, Shino K, Ochi T. Bone marrow stromal cells contribute to synovial cell proliferation in rats with collagen induced arthritis. *J Rheumatol*. 1996;23:2098-103.
- 23) Hirohata S, Yanagida T, Itoh K, Nakamura H, Yoshino S, Tomita T, Ochi T. Accelerated generation of CD14+ monocyte-lineage cells from the bone marrow of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 1996;39:836-843.
- 24) Bung Ok Lee, Ishikawa K, Denno K, Kobune Y, Itoh M, Muraoka O, Kaisho T, Sasaki T, Ochi T, Hirano T. Elevated Levels of the Soluble form of bone marrow stromal cell antigen 1 in the sera of patients with severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:629-637.
- 25) Tomita T, Shimaoka Y, Kashiwagi N, Hashimoto H, Kawamura S, Lee SB, Nakagawa S, Shiho O, Hayashida K, Ochi T. Enhanced expression of CD14 antigen on myeloid lineage cells derived from the bone marrow of patients with severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1997;24:465-9.
- 26) Wakitani S, Murata N, Toda Y, Ogawa R, Kaneshige T, Nishimura Y, Ochi T. The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese. *Br J Rheumatol*. 1997;36:630-6.
- 27) Fujiwara K, Yonenobu K, Ochi T. Natural history of upper cervical lesions in rheumatoid arthritis. *J Spinal Disord*. 1997;10:275-81.
- 28) Hirohata S, Yanagida T, Hashimoto H, Tomita T, Ochi T, Nakamura H, Yoshino S. Differential influences of gold sodium thiomalate and bucillamine on the generation of CD14+ monocyte-lineage cells from bone marrow of rheumatoid arthritis patients. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;84:290-5.
- 29) Toritsuka Y, Nakamura N, Lee SB, Hashimoto J, Yasui N, Shino K, Ochi T. Osteoclastogenesis in iliac bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1997;24:1690-6.

- 30) Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med.* 1997 15:186:2045-50.
- 31) Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, Tomita T, Hayashida K, Takeuchi E, Kaneko M, Takano H, Nagata S, Ochi T Soluble fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:657-662.
- 32) Wakitani S, Imoto K, Murata N, Oonishi H, Ochi T, Yoneda M. An association between the natural course of shoulder joint destruction in rheumatoid arthritis and HLA-DRB1*0405 in Japanese patients. *Scand J Rheumatol.* 1998;27:146-8.
- 33) Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T, Ishihara K, Suzuki R, Toyosaki T, Ochi T, Lipsky PE. Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells. *J Clin Invest.* 1998;102:606-18.
- 34) Fujiwara K, Fujimoto M, Owaki H, Kono J, Nakase T, Yonenobu K, Ochi T. Cervical lesions related to the systemic progression in rheumatoid arthritis. *Spine.* 1998;23:2052-6.
- 35) Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Kaneko M, Takano H, Hashimoto H, Sugamoto K, Suzuki R, Ochi T. Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:221-8.
- 36) Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, Oku H, Kaneko M, Takano H, Sugamoto K, Ohzono K, Suzuki R, Ochi T. Establishment of nurse-like stromal cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: indication of characteristic bone marrow microenvironment in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 1999;38:854-63.
- 37) Tomoko Toyosaki-Maeda, Yuji Tsuruta, Takaji Matsutani, Takeshi Yoshioka, Tetsuya Tomita, Ryuji Suzuki, Takahiro Ochi Presence of rheumatoid arthritis (RA) synovial autoantigen recognized by T cells in RA joints. *Jap J Rheumatol.* 1999;9:313–324.
- 38) Hirohata S, Yanagida T, Hashimoto H, Tomita T, Ochi T. Suppressive influences of methotrexate on the generation of CD14(+) monocyte-lineage cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol.* 1999;91:84-9.
- 39) Hirohata S, Yanagida T, Nakamura H, Yoshino S, Tomita T, Ochi T. Bone marrow CD34+ progenitor cells from rheumatoid arthritis patients support spontaneous transformation of peripheral blood B cells from healthy individuals. *Rheumatol Int.* 2000;19:153-9.
- 40) Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T, Lipsky PE. Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism. *J Immunol.* 2000;164:1110-6.

- 41) Shi K, Tomita T, Hayashida K, Owaki H, Ochi T. Foot deformities in rheumatoid arthritis and relevance of disease severity. *J Rheumatol.* 2000;27:84-9.
- 42) Shi K, Hayashida K, Kaneko M, Hashimoto J, Tomita T, Lipsky PE, Yoshikawa H, Ochi T. Lymphoid Chemokine B Cell Attracting Chemokine (BCA)-1 (CXCL13) Is Expressed in Germinal Center of Ectopic Lymphoid Follicles within the Synovium of Chronic Arthritis Patients. *J Immunol.* 2001;166:650-5.
- 43) Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Iton T, Suzuki R, Ochi T. Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis research.* 2001 ;3:306-10.
- 44) Hirohata S, Yamaguchi T, Nagai T, Sawada T, Nakamura H, Yoshino S, Tomita T, Ochi T. Induction of fibroblast-like cells from CD34 progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Journal of Leukocyte Biology* 2001;70:413-21.
- 45) Hayashida K, Nanki T, Girschick H, Yavuz S, Ochi T, Lipsky PE. Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Res.* 2001;3:118-26.
- 46) Takeuchi E, Tanaka T, Umemoto E, Tomita T, Shi K, Takahi K, Suzuki R, Ochi T, Miyasaka M. VLA-4-dependent and -independent pathways in cell contact-induced proinflammatory cytokine production by synovial nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res* 2002;4:R10 (DOI 10.1186/ar593).
- 47) Hirohata S, Yanagida T, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Bone marrow CD34+ progenitor cells stimulated with stem cell factor and GM-CSF have the capacity to activate IgD+ B cells through direct cellular interaction. *J Leukoc Biol.* 2002 ;71:987-95.
- 48) Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, Hashimoto J, Suzuki R, Yoshikawa H, Ochi T. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2003 ;62:196-203.
- 49) Takano H, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Maeda-Tanimura M, Tsuboi H, Takeuchi E, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Myoui A, Yoshikawa H, Takahashi T, Suzuki R, Ochi T. Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive cells in the synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatology.* 2004;43:435-41.
- 50) Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, Kunugiza Y, Hashimoto H, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization. *Arthritis Rheum.* 2004 ;50:3888-96.

- 51) Tanaka K, Mori T, Juji T, Suzuki S, Watanabe J, Goto A, Shiobara N, Yamane S, Fukui N, Suzui R, Ochi T. Production of interleukin-6 and interleukin-8 by nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients after stimulation with monocyte. *Mod Rheumatol* 2005 15:415-422.
- 52) Tsuboi H, Udagawa N, Hashimoto J, Yoshikawa H, Takahashi N, Ochi T. Nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis support the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor production. *Arthritis Rheum* .2005 ;52:3819-28.
- 53) Nakamura-Kikuoka S, Takahi K, Tsuboi H, Toyosaki-Maeda T, Maeda-Tanimura M, Wakasa C, Kikuchi N, Norioka S, Iwasaki M, Matsutani T, Itoh T, Yamane S, Takemoto H, Tsuruta Y, Shimaoka Y, Yukioka M, Suzuki R, Ochi T. Limited VH gene usage in B-cell clones established with nurse-like cells from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2006;45:549-57.
- 54) Hirohata S, Miura Y, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T, Chiorazzi N. Enhanced expression of mRNA for nuclear factor kappaB1 (p50) in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R54.
- 55) Nakamura N, Shimaoka Y, Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Zhao H, Fujimori A, Yabuta N, Nagamori I, Tanigawa A, Sato J, Oda T, Hayashida K, Suzuki R, Yukioka M, Nojima H, Ochi T. Isolation and expression profiling of genes upregulated in bone marrow-derived mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *DNA Res*. 2006 ;13:169-83.
- 56) Yamasaki S, Yagishita N, Sasaki T, Nakazawa M, Kato Y, Yamadera T, Bae E, Toriyama S, Ikeda R, Zhang L, Fujitani K, Yoo E, Tsuchimochi K, Ohta T, Araya N, Fujita H, Aratani S, Eguchi K, Komiya S, Maruyama I, Higashi N, Sato M, Senoo H, Ochi T, Yokoyama S, Amano T, Kim J, Gay S, Fukamizu A, Nishioka K, Tanaka K, Nakajima T. Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. *EMBO J*. 2007;26:113-22.
- 57) Ochi T, Yoshikawa H, Toyosaki-Maeda T, Lipsky PE. Mesenchymal stromal cells. Nurse-like cells reside in the synovial tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:201.
- 58) Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor. *J Rheumatol*. 2008;35:960-8.

- 59) Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. *J Inflamm.* 2008;5:5.
- 60) Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology.* 2008 Nov 14.
- 61) Ebina K, Oshima K, Matsuda M, Fukuhara A, Maeda K, Kihara S, Hashimoto J, Ochi T, Banda NK, Yoshikawa H, Shimomura I. Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 ;37:186-91.
- 62) Ebina K, Fukuhara A, Ando W, Hirao M, Koga T, Oshima K, Matsuda M, Maeda K, Nakamura T, Ochi T, Shimomura I, Yoshikawa H, Hashimoto J. Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint destruction. *Clin Rheumatol.* 2009;28:445-51.
- 63) Take Y, Nakata K, Hashimoto J, Tsuboi H, Nishimoto N, Ochi T, Yoshikawa H. Specifically modified osteopontin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes supports interaction with B cells and enhances production of interleukin-6. *Arthritis Rheum.* 2009 ;60:3591-601.
- 64) H. Lee, H. Sugino, C. Aoki, Y. Adachi, Y. Shimaoka, T. Ochi, N. Nishimoto. Abnormal gene expressions in the immune response and cell cycle networks of bone marrow cells from patients with rheumatoid arthritis as revealed by DNA microarray analysis. *EULAR 2010 – SCIE – 991 (Abstract)*

関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対する
IL-6 刺激による蛋白分解酵素 ADAMTS-4 と
ADAMTS-5 の発現の変化の解析

三又義訓^{1), 2)}, 鎌滝章央¹⁾, 及川伸也^{1), 2)},
村上賢也^{1), 2)}, 澤井高志¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 病理学講座: 先進機能病理学分野

²⁾ 岩手医科大学医学部, 整形外科科学講座

(Received on January 13, 2010 & Accepted on January 27, 2010)

要旨

軟骨の細胞外基質であるアグリカンの分解酵素 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 は軟骨だけでなく滑膜組織でも発現している. IL-6 刺激による関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) での ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現への影響を解析した. 免疫染色により RA 患者滑膜組織における発現部位を確認したところ, 滑膜表層とパンヌスに ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の両方の発現が認

められた. RA 滑膜組織から FLS を調製し, FLS での発現量の変化を real-time PCR 法で解析した結果, IL-6 刺激により ADAMTS-4 の発現量は増加し, ADAMTS-5 の発現量は微減した. また, 抗 IL-6 受容体抗体を同時に添加することにより, 各々の変化は抑制された. これらの結果から, ヒト RA 滑膜組織において IL-6 刺激により ADAMTS-4 の発現が亢進し, 軟骨破壊に関与している可能性が示された.

Key words : ADAMTS-4, ADAMTS-5, IL-6,
fibroblast-like synoviocytes (FLS)

I. 緒 言

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は滑膜組織の炎症と増殖, それに引き続く骨や軟骨組織の破壊によって特徴づけられる全身性の炎症性疾患であり, 関節破壊により不可逆的な機能障害を生じ, ADL の著しい低下を来すことがある^{1, 2)}. 骨組織や軟骨組織に浸潤した増殖滑膜はパンヌスと呼ばれ, パンヌスはリンパ球をはじめとする炎症性細胞や線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) などで形成された炎症性の肉芽組織である. FLS は RA の病態形成において様々な役割を果たしており³⁾, 滑膜の炎症と増殖, 破骨細胞の分化^{4, 5)}, 蛋白分解酵素の放出⁶⁾ 等に関与している.

関節軟骨は軟骨細胞とその周囲を取り囲む軟骨基質から構成され, 軟骨細胞は軟骨基質を合成, 代謝することで軟骨組織の恒常性を維持している⁷⁾. 軟骨基質は主に II 型コラーゲンから構成され, II 型コラーゲンが梁の役目を果たし, その間にプロテオグリカンやヒアルロン酸が存在し水分を保持している. 関節軟骨では主なプロテオグリカンはアグリカンであり, 関節軟骨の破壊はアグリカンから始まるが, アグリカン分解には主に matrix metalloproteinase (MMP) と a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) の 2 種類の蛋白分解酵素が関与している. ADAMTS は, 分泌型メタロプロテアーゼに属する多機能タンパ

クで、活性中心に Zn^{2+} を含んでいる。1997年に久野ら⁸⁾によってADAMTS-1が初めて同定されて以来、これまでに19種類のADAMTS遺伝子が同定されており、それらのうち、ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, 15, 16, 18はアグリカン分子中のG1, G2間のinterglobular domainの373番グルタミン酸と374番アラニンの間でアグリカンコア蛋白を分解する酵素として働いているためアグリカナーゼファミリーと呼ばれている⁸⁻¹⁴⁾。特にADAMTS-4とADAMTS-5はRA患者や変形性関節症(osteoarthritis, OA)患者の軟骨組織や滑膜組織において高度に発現しており¹⁵⁻¹⁸⁾、また*in vitro*の実験でこれらの酵素の阻害によってアグリカン分解が阻害された¹⁹⁾ことからアグリカン分解に深く関与していると考えられている。以前はMMP-3がアグリカン分解酵素として重要視されていたが、関節液中にADAMTS-4とADAMTS-5によるアグリカン断片が確認されたこと、また、MMP-3に先立ってアグリカンを分解していることが報告され、近年ADAMTS-4とADAMTS-5が注目されるようになった^{14, 20, 21)}。これまでにヒト滑膜組織を用いて、ADAMTS-4とADAMTS-5の発現に対するIL-1 β , TNF- α , TGF- β 等のサイトカインによる影響を調べた研究がいくつか報告されている^{15, 16, 22, 23)}が、IL-6による影響を調べた研究は未だ報告されていない。

IL-6は多彩な機能を有するサイトカインであり免疫反応や炎症において重要な働きをしている。IL-6はRA患者の血清および関節液中に最も豊富に存在する炎症性サイトカインの一つであり^{24, 25)}、RAにおいてはFLSでの蛋白分解酵素や血管新生因子の産生を亢進し、RANKLの発現を促すことが知られている。IL-6のシグナルはIL-6とIL-6受容体との結合後に分子量130kDaの糖蛋白であるgp130が会合することで細胞内に伝達される^{26, 27)}。IL-6受容体には細胞膜上に存

在する膜型IL-6受容体(membrane bound IL-6 receptor, mIL-6R)と血清、関節液中に存在する可溶性IL-6受容体(soluble IL-6 receptor, sIL-6R)^{28, 29)}の2種類が存在し、sIL-6RはIL-6受容体切断酵素によるmIL-6Rの切断、または、選択的スプライシングにより生じる²⁸⁾。sIL-6Rは関節リウマチ患者だけでなく健常者の血清、関節液、尿中³⁰⁾にも存在し、mIL-6Rと同様にIL-6の受容体として働き、IL-6と複合体を形成して細胞膜上でgp130と会合することで細胞内にシグナルが伝達される²⁸⁾。近年、臨床試験で抗IL-6受容体抗体のRA治療での有効性を述べた報告が増加しており^{31, 32)}、RAの病態形成におけるIL-6の役割が注目されている。

今回われわれは、RAにおける軟骨破壊の機序を解明するためにRA患者由来のFLSに対するIL-6刺激による蛋白分解酵素ADAMTS-4とADAMTS-5の発現への影響を解析した。

II. 研究材料および方法

1. RA滑膜組織

本研究は岩手医科大学倫理委員会の承認と書面による患者の同意を得て採取した検体を使用した。対象は、1987年にアメリカリウマチ学会により提唱されたRA診断基準を満足する患者(16例:年齢42~79歳、平均62.5歳、男性5例、女性11例)であり、試料として人工関節置換術を行われた際にRA患者から採取された組織を用いた。

2. 免疫組織化学

採取した滑膜組織は速やかに4%パラホルムアルデヒド/10mMリン酸緩衝食塩水(phosphate buffer saline, PBS)で2時間固定し、99.5%エタノールで脱水、脱脂後、パラフィンで包埋した。骨を含む組織は、固定後、4℃で10%EDTA(pH 7.2-7.4)による低温脱灰を行った後にパラフィンで包埋し

た。

厚さ2 μ mの薄切切片を脱パラフィンした後、内因性ペルオキシダーゼを除去するために0.3%過酸化水素水/メタノールで処理した。非特異的抗体の結合を阻止するために10%正常ヤギ血清(Histofine; Nichirei, Tokyo)で処理後、一次抗体を切片に滴下し4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。一次抗体としてポリクローナルウサギ抗ADAMTS-4抗体(Acris Antibodies, Herford, Germany)とポリクローナルウサギ抗ADAMTS-5抗体(Acris Antibodies, Herford, Germany)を用い、抗ADAMTS-4抗体はPBSで1/500に希釈し、抗ADAMTS-5抗体は1/250に希釈して使用した。二次抗体としてビオチン標識抗ウサギIgG抗体(Histofine; Nichirei, Tokyo)を用い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Histofine; Nichirei, Tokyo)を反応させ、DAB発色(Wako, Osaka)で検出した。対比染色としてヘマトキシリンを用いた。

3. 細胞培養

採取した滑膜組織は速やかに無菌的にハサミで細切し、1mg/ml I型コラゲナーゼと1mg/ml ディスパーゼを含むRPMI-1640を用いて37 $^{\circ}$ Cで45分間処理した。細胞懸濁液をセルストレーナーで濾過後、遠心分離し、得られた細胞を10%ウシ胎児血清(fetal calf serum, FCS)を含むDMEMで37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件下で培養した。浮遊細胞を除き、接着細胞が80%コンフルエントに到達したところでトリプシン処理で細胞を剥離して継代しFLSを得た。細胞は3代で実験に供した。本研究では3名のRA患者より採取した滑膜組織からFLSを調製し、それぞれ独立して実験に用いた。

4. IL-6とsIL-6Rによる刺激

6ウェル組織培養プレートにFLSを播種し10%FCSと抗生剤(100IU/ml penicillin, 100IU/ml streptomycin, 100IU/

ml gentamycin)を含むDMEMで培養した。1%FCSを含むDMEMでFLSを24時間培養した後、サイトカインを以下の条件で添加した。(1)1%FCSを含むDMEMにIL-6(R & D systems, Minnesota, USA)とsIL-6R(R & D systems, Minnesota, USA)をそれぞれ100ng/mlの濃度で添加し0, 3, 6, 12, 24, 48時間培養後に細胞を回収した。(2)1%FCSを含むDMEMにIL-6とsIL-6Rをそれぞれ0, 10, 25, 50, 100, 200ng/mlの濃度で添加し24時間培養後に細胞を回収した。(3)1%FCSを含むDMEMにIL-6とsIL-6Rを100ng/mlの濃度で、さらに抗IL-6受容体抗体(Chugai pharmaceutical corporation, Shizuoka)を0, 1, 5, 25 μ g/mlの濃度で同時に添加し24時間培養後に細胞を回収した。

5. RNA抽出とcDNA合成

TRIzol Reagent(Life technologies, Carlsbad, USA)を用いてFLSからtotal RNAを抽出した。マニュアルに従いHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Life technologies, Carlsbad, USA)とrandom primers(Life technologies, Carlsbad, USA)を用いてGene Amp PCR system 9700(Life technologies, Carlsbad, USA)でtotal RNAを逆転写しcDNAを合成した。25 $^{\circ}$ Cで10分、37 $^{\circ}$ Cで120分、85 $^{\circ}$ Cで5秒の温度条件で行った。

6. real-time PCR

FLSにおけるADAMTS-4 mRNAとADAMTS-5 mRNAの発現レベルをApplied Biosystem 7500 real-time PCR system(Life technologies, Carlsbad, USA)で解析した。GAPDH mRNAの発現レベルを同時に測定し、それを内部標準とした。TaqMan Universal Master Mix(Life technologies, Carlsbad, USA), TaqMan Gene Expression Assay(Life technologies, Carlsbad, USA), 各サンプルのcDNA

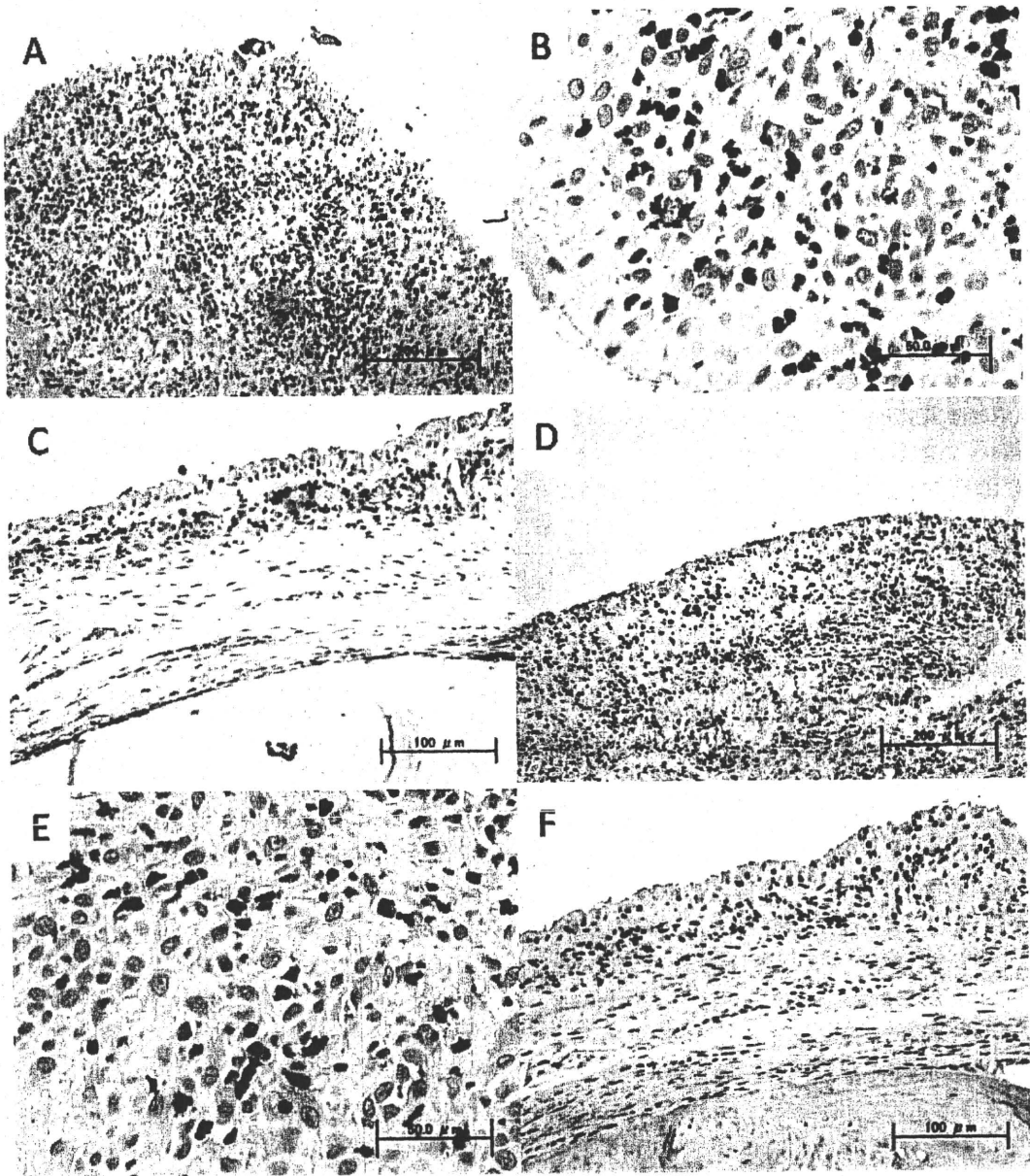


図1. RA 滑膜組織における ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現
 一次抗体として ADAMTS-4 抗体と抗 ADAMTS-5 抗体を用い、ヘマトキシリンで対比染色を行った。滑膜表層、特に sublining layer において ADAMTS-4 (A, D) と ADAMTS-5 (B, E) の発現を認めた。パックスでも ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現を認めた (C, F)。スケールバーは、(A) と (D) で 200 μ m、(B) と (E) で 50 μ m、(C) と (F) で 100 μ m を示している。

を混合して反応液を作製した。TaqMan Gene expression Assay のアッセイ ID は、GAPDH が Hs00266705_g1, ADAMTS-4

が Hs00943031_g1, ADAMTS-5 が Hs00199841_m1 である。PCR の温度条件は、50 $^{\circ}$ C で 2 分、95 $^{\circ}$ C で 10 分の初期段階に引き

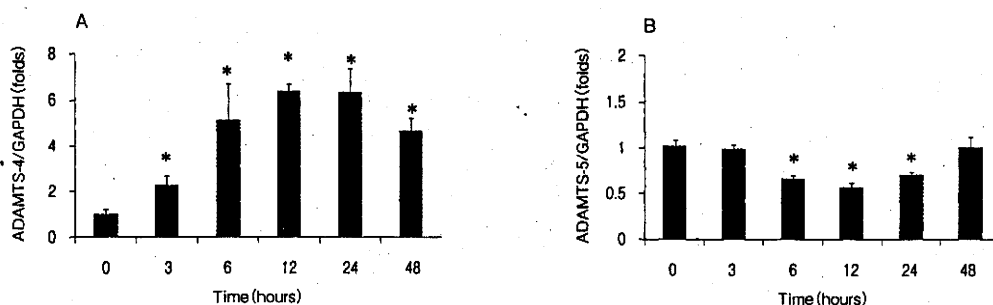


図2. RA患者由来のFLSにおけるIL-6/sIL-6R添加後のADAMTS-4とADAMTS-5の発現変化。

IL-6とsIL-6Rをそれぞれ100ng/mlの濃度で添加し0～48時間培養した。IL-6/sIL-6R無添加のADAMTS-4またはADAMTS-5の発現レベルを1として相対値で示した。各値は3回行った培養結果の平均値を示しており、バーは標準偏差を示している。図で示した結果は3回独立して行った実験結果の代表例である。

続いて95℃で15秒、60℃で1分の2段階の反応を40サイクル行った。解析結果は $\Delta\Delta$ Ct法を用いて算出した。

7. 統計処理

有意差検定にはDunnnett's testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

III. 結果

1. RA滑膜組織におけるADAMTS-4とADAMTS-5の発現

RA患者の滑膜組織におけるADAMTS-4とADAMTS-5の発現と局在を調べるために免疫染色を行った。炎症に増殖・多層化した滑膜の表層部分(intima)と骨に浸潤しているパンスでADAMTS-4とADAMTS-5の発現が認められた(図1A-F)。ADAMTS-4とADAMTS-5の発現は滑膜表層部の最表層であるsuperficial lining layerよりもやや深層のsublining layerで顕著であった。これに対して滑膜深層(subintima, deep layer)、リンパ濾胞ではいずれも発現は認められなかった。

2. RA患者由来のFLSにおけるIL-6/sIL-6R添加後のADAMTS-4とADAMTS-5の発現変化

RA患者由来のFLSにおけるADAMTS-

4とADAMTS-5の発現に対するIL-6の影響を調べるためにIL-6とsIL-6R添加後のADAMTS-4とADAMTS-5のmRNA発現レベルをreal-time PCR法で解析した。IL-6を添加する際にはその作用を高めるためにsIL-6Rを等量添加した。初めにFLSにIL-6/sIL-6Rを添加し0～48時間培養した。IL-6/sIL-6R添加後ADAMTS-4の発現量は経時的に増加し、12時間でピークとなった(mean \pm SD 6.42 \pm 1.49倍)(図2A)。一方ADAMTS-5の発現量は経時的に若干減少し、12時間で最低値を示した(mean \pm SD 0.55 \pm 0.04倍)(図2B)。次に、FLSにIL-6とsIL-6Rをそれぞれ0～200ng/mlの濃度で添加し24時間培養した。ADAMTS-4の発現量は濃度依存的に増加し、IL-6/sIL-6R 200/200ng/ml添加時にピークとなった(mean \pm SD 16.3 \pm 0.93倍)(図3A)。ADAMTS-5の発現量は濃度依存的に若干減少し、IL-6/sIL-6R 200/200ng/ml添加時に最低値を示した(mean \pm SD 0.46 \pm 0.02倍)(図3B)。

3. 抗IL-6受容体抗体添加によるADAMTS-4とADAMTS-5の発現への影響

ADAMTS-4とADAMTS-5の発現量の変化がIL-6/sIL-6Rによることを確認す

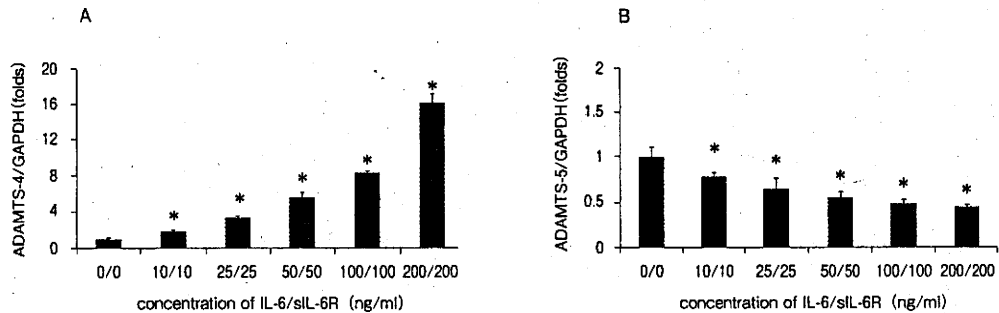


図3. IL-6/sIL-6R 添加濃度による ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現の検討.
IL-6 と sIL-6R をそれぞれ 0 ~ 200 ng/ml の濃度で添加し 24 時間培養した. IL-6/sIL-6R 無添加の ADAMTS-4 または ADAMTS-5 の発現レベルを 1 として相対値で示した. 各値は 3 回行った培養結果の平均値を示しており, バーは標準偏差を示している. 図で示した結果は 3 回独立して行った実験結果の代表例である.

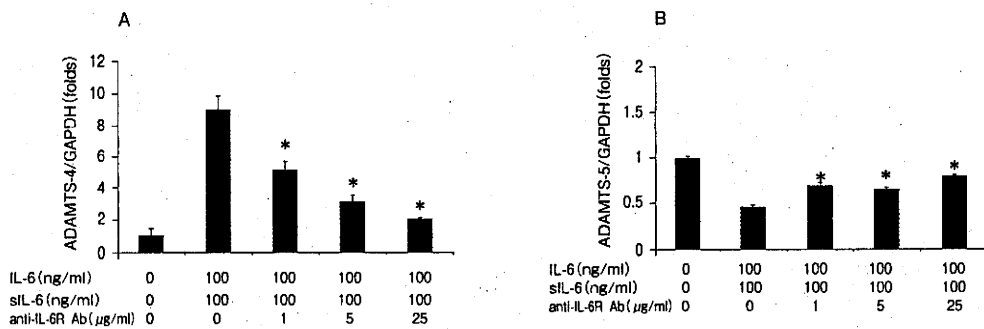


図4. 抗 IL-6 受容体抗体添加による ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現への影響
IL-6 と sIL-6R をそれぞれ 100 ng/ml の濃度で添加, 同時に抗 IL-6 受容体抗体を 0 ~ 25 μg/ml の濃度で添加し培養した. IL-6/sIL-6R 無添加の ADAMTS-4 または ADAMTS-5 の発現レベルを 1 として相対値で示した. 各値は 3 回行った培養結果の平均値を示しており, バーは標準偏差を示している. 図で示した結果は 3 回独立して行った実験結果の代表例である.

るために IL-6/sIL-6R を添加する際に抗 IL-6 受容体抗体を同時に添加して検討した. ADAMTS-4 の発現量は IL-6/sIL-6R のみを添加した群 (mean ± SD 9.04 ± 0.86 倍) と比べて抗 IL-6 受容体抗体も添加した群では抗体濃度に依存して減少し, IL-6/sIL-6R 無添加の発現レベルに近づいた (mean ± SD 2.07 ± 0.07 倍) (図 4A). 同様に, IL-6/sIL-6R の添加により減少した ADAMTS-5 の発現量 (mean ± SD 0.46 ± 0.02 倍) は抗 IL-6 受容体抗体の濃度に依存して増加し, IL-6/sIL-6R 無添加の発現レベルに近づいた (mean ± SD 0.79 ± 0.01 倍) (図 4B).

IV. 考 察

ADAMTS-4 と ADAMTS-5 はともに OA や RA 患者の軟骨組織と滑膜組織で高度に発現していることが報告されている¹⁵⁻¹⁸⁾. しかし, これまでにヒト滑膜組織における ADAMTS-5 の発現を組織学的に調べたという報告は, 我々の知る限り 1 報のみで, ADAMTS-4 の発現に関する報告は現在のところ見られない¹⁸⁾. そこで今回ヒト滑膜組織における ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現と局在を免疫組織化学的手法を用いて調べた. 免疫染色の結果 ADAMTS-4 と ADAMTS-5 はともに滑膜表層 (intima) と

パンヌスで発現しており、深層 (subintima) では発現を認めなかった。滑膜組織における ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現様式は MMP-3 の発現³³⁻³⁵⁾ に類似していたが、MMP-3 の発現部位が増殖滑膜の最表層である superficial lining layer であるのに対し、ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現部位は superficial lining layer よりもやや深部の sublining layer で目立った。滑膜表層は炎症性サイトカインに富む関節液に近接しており、パンヌスは炎症性細胞を多数含んでいるため、サイトカインの影響を受けやすい環境にあることが ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現と関連していることが考えられる。

これまでにヒト滑膜組織を用いて、ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現に対する IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 等のサイトカインによる影響を調べた研究報告は散見される^{15, 16, 22, 23)}。しかし、ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現に対する IL-6 による影響については未だ報告されていない。IL-6 は炎症により産生が亢進されるため OA 患者に比べて RA 患者の血清および関節液中では高濃度で存在する^{24, 25)}。近年、臨床試験で抗 IL-6 受容体抗体の有効性を述べた報告が増加するようになり、RA の病態形成における IL-6 の役割が注目されている^{31, 32)}。そこで本研究では我々は IL-6 が RA 患者由来の FLS における ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現に及ぼす影響を real-time PCR 法で調べた。IL-6 添加により ADAMTS-4 の発現量は濃度依存的に増加したが、ADAMTS-5 の発現量は濃度依存的に若干減少した。これまでに ADAMTS-4 と ADAMTS-5 のどちらの酵素がアグリカン分解における主要酵素であるかを調べた研究は多数報告されている。Gleason ら^{36, 37)} と Stanton ら³⁸⁾ が ADAMTS-5 欠損マウスを用いた実験的関節炎で骨びらんが抑制されることを発表して以来、ADAMTS-5 が軟骨破壊の主要酵素とし

て注目されている。しかし、ヒトとマウスでは発現が異なることが報告されるようになり、現在ではヒトにおいては ADAMTS-4 も重要であることが示されている¹⁶⁾。これまでに行われたサイトカインによる ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現への影響を調べた研究では、ヒト滑膜線維芽細胞と軟骨細胞の両方で、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β によって ADAMTS-4 の発現は亢進し、ADAMTS-5 の発現量は変化しないことが報告されている^{15, 16, 22, 23)}。つまり、これまでの報告と本研究の結果からもヒト滑膜組織、軟骨組織において ADAMTS-4 の発現はサイトカインによって亢進するが、ADAMTS-5 は亢進しない傾向が示された。このことから、ヒトの RA の軟骨破壊ではサイトカインによって発現が亢進する ADAMTS-4 が優位である可能性が高いと思われる。

現在、複数の臨床試験で抗 IL-6 受容体抗体が明らかに RA の疾患活動性を低下させ、RA 患者の症状を緩和させ、関節破壊の抑制効果を有することが証明されている^{31, 32)}。橋爪らは IL-6 が FLS における破骨細胞を活性化させる重要なリガンドである RANKL の発現を誘導することを報告しており³⁹⁾、また、Roland らは *in vitro* と *in vivo* の実験で IL-6 受容体を阻害することで破骨細胞の形成自体が阻害されることを報告している⁴⁰⁾。本研究では FLS における ADAMTS-4 の発現量は IL-6/sIL-6R の存在下で抗 IL-6 受容体抗体の添加により抗体濃度に依存して減少し IL-6/sIL-6R 無添加の発現レベルに近づくことがわかった。従って、この結果により抗 IL-6 受容体抗体は骨破壊だけでなく軟骨破壊も抑制する効果を有する可能性が示された。

本研究では ADAMTS-5 の発現が IL-6/sIL-6R の添加により低下した。これまでの報告では ADAMTS-5 の発現はサイトカインによって不変であり、低下したという報告はない。そのため、3 種類の内部標準

(GAPDH, beta-actin, TBP) を用意し検討したが結果は同じであった。

本研究では ADAMTS-4 と ADAMTS-5 が RA 患者の滑膜表層部およびパンスで発現していることを確認し, さらに RA 患者由来の FLS で IL-6 刺激により ADAMTS-4 の発現が亢進することを明らかにした。これらの結果よりヒト RA 滑膜組織においては IL-6 の刺激により ADAMTS-4 の発現が亢進し,

軟骨破壊に関与している可能性が示された。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました岩手医科大学整形外科科学講座 嶋村 正教授に深く感謝申し上げます。また, 貴重な研究材料を提供して下さいました岩手医科大学付属病院, 国立病院機構盛岡病院, 岩手県立花巻厚生病院, 岩手県立久慈病院, 盛岡友愛病院, 松園第二病院に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Weyand CM and Goronzy JJ : Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Med Clin North Am* **81**, 29-55, 1997.
- 2) Rooney M, Condell D, Quinlan W, et al. : Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**, 956-963, 1988.
- 3) Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, et al. : Fibroblast biology : role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2**, 361-367, 2000.
- 4) Nakano K, Okada Y, Saito K, et al. : Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparin sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **50**, 2450-2458, 2004.
- 5) Wu Y, Liu J, Feng X, et al. : Synovial fibroblasts promote osteoclast formation by RANKL in a novel model of spontaneous erosive arthritis. *Arthritis Rheum* **52**, 3257-3268, 2005.
- 6) Abeles AM and Pillinger MH : The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis : cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **64**, 20-24, 2006.
- 7) Goldring MB and Marcu KB : Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* **11**, 224, 2009.
- 8) Kuno K, Kanada N, Nakashima E, et al. : Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* **272**, 556-562, 1997.
- 9) Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, et al. : Purification and cloning of aggrecanase-1 : A member of the ADAMTS family of proteins. *Science* **284**, 1664-1666, 1999.
- 10) Abbaszade I, Liu RQ, Yang F, et al. : Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* **274**, 23443-23450, 1999.
- 11) Zeng W, Corcoran C, Collins-Racie LA, et al. : Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 517-524, 2006.
- 12) Collins-Racie LA, Flannery CR, Zeng W, et al. : ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage. *Matrix Biol* **23**, 219-230, 2004.
- 13) Sandy JD, Neame PJ, Boynton RE, et al. : Catabolism of aggrecan in cartilage explants : Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *J Biol Chem* **266**, 8683-8685, 1991.
- 14) Lohmander LS, Neame PJ and Sandy JD : The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **36**, 1214-1222, 1993.
- 15) Bau B, Gebhard PM, Haag J, et al. : Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes *in vivo* and *in vitro*. *Arthritis Rheum* **46**, 2648-2657, 2002.
- 16) Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, et al. : Expression and regulation of aggrecanase in arthritis : the role of TGF- β . *J Immunol* **168**, 1405-1412, 2002.
- 17) Naito S, Shiomi T, Okada A, et al. : Expression of ADAMTS-4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol Int* **57**, 703-711, 2007.
- 18) Vankemmelbeke MN, Holen I, Wilson AG, et

- al. : Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. *Eur J Biochem* **268**, 1259-1268, 2001.
- 19) **Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, et al.** : Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* **277**, 22201-22208, 2002.
- 20) **Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ, et al.** : The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. *J Clin Invest* **89**, 1512-1516, 1992.
- 21) **Sandy JD and Verscharen C** : Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing *in vivo*. *Biochem J* **358**, 615-626, 2001.
- 22) **Moulharat N, Lesur C, Thomas M, et al.** : Effects of transforming growth factor- β on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes *in vitro*. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 296-305, 2004.
- 23) **Bondeson J, Lauder S, Wainwright S, et al.** : Adenoviral gene transfer of the endogenous inhibitor I κ B α into human osteoarthritis synovial fibroblasts demonstrates that several matrix metalloproteinases and aggrecanases are nuclear factor- κ B-dependent. *J Rheumatol* **34**, 523-533, 2007.
- 24) **Usón J, Balsa A, Pascual-Salcedo D, et al.** : Soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6 levels in serum and synovial fluid of patients with different arthropathies. *J Rheumatol* **24**, 2069-2075, 1997.
- 25) **Haussiau FA, Devogelaer JP, Damme JV, et al.** : Interleukine-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* **31**, 784-788, 1988.
- 26) **Hibi M, Murakami M, Saito M, et al.** : Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**, 1149-1157, 1990.
- 27) **Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, et al.** : IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* **260**, 1808-1810, 1993.
- 28) **Jones SA, Horiuchi S, Topley N, et al.** : The soluble interleukine 6 receptor : mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* **15**, 43-58, 2001.
- 29) **Desgeorges A, Gabay C, Silacci P, et al.** : Concentrations and origins of soluble interleukin 6 receptor- α in serum and synovial fluid. *J Rheumatol* **24**, 1510-1516, 1997.
- 30) **Novick D, Engelmann H, Wallach D, et al.** : Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Exp Med* **170**, 1409-1414, 1989.
- 31) **Nishimoto N, Hashimoto J, Miyasaka N, et al.** : Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI) : evidence of clinical and radiographic benefit from x ray reader-blinded randomized controlled trial of tocilizumab. *Ann Rheum Dis* **66**, 1162-1167, 2007.
- 32) **Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, et al.** : Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI) : significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol* **19**, 12-19, 2009.
- 33) **John PC, Robert L, Elaine FR, et al.** : Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium. *Am J Pathol* **135**, 1055-1064, 1989.
- 34) **Gary SF and Mary MP** : Stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* **140**, 1309-1314, 1992.
- 35) **Takashi S, Miwa U, Edward DH, et al.** : *In situ* hybridization of stromelysin mRNA in the synovial biopsies from rheumatoid arthritis. *Tohoku J Exp Med* **178**, 315-330, 1996.
- 36) **Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al.** : Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum* **50**, 2547-2558, 2004.
- 37) **Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al.** : Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* **434**, 644-648, 2005.
- 38) **Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al.** : ADAMTS-5 is the major aggrecanase in mouse cartilage *in vivo* and *in vitro*. *Nature* **434**, 648-652, 2005.
- 39) **Hashizume M, Hayakawa N and Mihara M** : IL-6 trans-signaling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- α and IL-17. *Rheumatology* **47**, 1635-1640, 2008.
- 40) **Roland A, Christina B, Gerhard K, et al.** : Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation *in vitro* and *in vivo*. *Arthritis Rheum* **60**, 2747-2756, 2009.

Analysis of expression of ADAMTS-4 and ADAMTS-5
in fibroblast-like synoviocytes from patients
with rheumatoid arthritis after IL-6 stimulation

Yoshikuni MIMATA ^{1), 2)}, Akihisa KAMATAKI ¹⁾, Shinya OIKAWA ^{1), 2)},
Kenya MURAKAMI ^{1), 2)} and Takashi SAWAI ¹⁾

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

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

(Received on January 13, 2010 & Accepted on January 27, 2010)

Abstract

Cleavage of aggrecan, a major proteoglycan in articular cartilage, is a first step of cartilage destruction in rheumatoid arthritis (RA) patients. Both ADAMTS-4 (aggrecanase-1) and ADAMTS-5 (aggrecanase-2) are expressed in RA synovium as well as cartilage. We analyzed the effect of IL-6 on the expression of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in fibroblast-like synoviocytes (FLS) from RA patients. We performed immunohistochemical staining to examine the expression and localization of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in RA synovium. In the lining layer of synovial membrane and pannus, expression of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 were mainly present. Expression levels of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 mRNA

in FLS after IL-6 stimulation were analyzed using real-time PCR. Expression of ADAMTS-4 mRNA in FLS was increased by IL-6, whereas expression of ADAMTS-5 mRNA was slightly decreased. Furthermore, the effect of anti-IL-6 receptor antibody on ADAMTS-4 and ADAMTS-5 mRNA expression in FLS in the presence of IL-6 was analyzed. Anti-IL-6 receptor antibody inhibited the effect of IL-6 on ADAMTS-4 and ADAMTS-5 mRNA in FLS. These results suggest that expression of ADAMTS-4 is increased by IL-6 in human RA synovium, and ADAMTS-4 may participate in destruction of cartilage.

関節リウマチ滑膜における Bv8 の発現

及川伸也^{1),2)}, 鎌滝章央¹⁾, 三又義訓^{1),2)},
村上賢也^{1),2)}, 澤井高志¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 病理学講座: 先進機能病理学分野

²⁾ 岩手医科大学医学部, 整形外科学講座

(Received on January 13, 2010 & Accepted on January 26, 2010)

要旨

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は破壊性関節炎を主体とした炎症性疾患である。RA の病理学的特徴のひとつに血管新生が挙げられ、その病態形成に重要な役割を担っている。Bv8/Prokineticin2 は多様な生理活性を持つタンパクであり血管新生因子としても機能する。本研究では、1) *in situ* hybridization や免疫組織化学染色で RA 滑膜組織における Bv8 の発現と局在を調べ、2) real-time PCR

で RA, 変形性膝関節症 (osteoarthritis; OA), 膝外傷後滑膜における Bv8 の mRNA 発現量を比較した。Bv8 は滑膜の sublining layer や深層に発現しており、発現細胞は細胞学的には多彩であった。また、Bv8 の発現量は RA 群で OA 群や外傷後群と比較して有意に高かった。これらの結果より、Bv8 が RA の病態に関与している可能性が示された。

Key words : Bv8, prokineticin, angiogenesis, rheumatoid arthritis

I. 緒 言

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は破壊性関節炎を主体とした炎症性疾患で、関節破壊によって関節機能が障害される疾患である。関節炎の本態は滑膜炎で、背景には自己免疫異常が関与していると言われている。病理学的には、滑膜細胞の多層化、炎症性細胞浸潤、軟骨・骨破壊、血管新生等の特徴がある。多層化した滑膜細胞やマクロファージ、T 細胞、B 細胞等の炎症性細胞により形成された増殖滑膜はパンヌスと呼ばれ、破骨細胞の活性化や蛋白分解酵素の分泌により軟骨・骨破壊を引き起こす。新生血管はパンヌスへの酸素や栄養分の供給路、炎症性細胞や炎症性サイトカインなどの到達路となることで、炎症を継続させパンヌスの増殖を支えている。RA 滑膜では VEGF, FGF, TGF- β , アンジオポエチンなど様々な血管

新生因子が高く発現しており¹⁻⁴⁾、RA の病態に関わっていることが知られている。さらに、関節炎モデルマウスを使った実験で新生血管の増生が関節炎の増悪と相関する^{5,6)}ことや、血管新生の阻害は炎症反応を減弱するだけでなく軟骨・骨破壊も抑制する⁷⁾ということも明らかにされている。以上のように、血管新生は RA の病態形成に極めて重要な役割を担っている^{1,8)}。そのため、RA における血管新生の機序を解明することは新しい治療開発のきっかけとなる可能性がある。

Bv8 は *Bombina variegata* というカエルの皮膚からの分泌物から分離された 8kDa のタンパクで、2001 年にヒトのホモログがクローニングされ Prokineticin 2 と名付けられた。ヒトの Bv8 は心臓や精巣、骨髄、リンパ組織、白血球などで高く発現している⁹⁾。生理活性としては最初にモルモットの小腸を

Table 1. Clinical information of RA patients

Subjects	Age/Gender	Disease duration (year)	Medications	CRP (mg/dl)
RA-1	60/F	no data	no data	no data
RA-2	67/F	22	none	no data
RA-3	56/F	11	no data	4.5
RA-4	51/F	18	MTX	5.1
RA-5	55/M	40	none	1.1
RA-6	77/F	25	MTX	0.3
RA-7R	46/F	9	PLS	4.1
RA-7L	46/F	9	PLS	1.5
RA-8	55/M	no data	BUC, PLS	0.1
RA-9	70/M	20	D-PC, PLS	5.9
RA-10	57/M	6	SASP	0.7
RA-11	76/F	20	MTX, PLS	1.3
RA-12	63/F	15	MTX, PLS	0.5
RA-13	80/F	no data	BUC	0.6
RA-14	71/F	10	ETN, SASP, PLS	0.7
RA-15	62/F	23	BUC, PLS	0.1
RA-16	69/F	23	PLS	7.4
RA-17	79/F	28	MTX, PLS	5.5

MTX: methotrexate, PLS: prednisolone, BUC: bucillamine, D-PC: D-penicillamine, SASP: salazosulfapyridine, ETN: etanercept

収縮させる機能が報告され, その後, 神経新生, サーカディアンリズムの調節, ホルモン放出, 血管新生などにも働くことが明らかにされている⁹⁾. 血管新生に関しては, 腫瘍の発達の際に Bv8 が腫瘍局所での血管新生を促進させる¹⁰⁾ことや, 腫瘍形成の早期の段階で Bv8 が血管新生を誘導する¹¹⁾ことが報告されている.

Bv8 と関節炎に関わる研究として, 関節炎モデルマウスの滑膜と骨髄に Bv8 が高く発現している¹²⁾という報告はあるものの, ヒトの RA と Bv8 との関連を示した報告はまだない. 本研究では RA 滑膜における Bv8 の発現と局在を解析することで, RA と Bv8 との関連を検討した.

II. 材料および方法

1. 対象

本研究は岩手医科大学倫理委員会の承認と患者の同意を得て採取した検体を使用し

た. 対象は RA (18 例: 年齢 46 ~ 80 歳, 平均 60.7 歳, 男性 4 例, 女性 14 例), 変形性膝関節症 (osteoarthritis; OA) (13 例: 年齢 72 ~ 84 歳, 平均 70.7 歳, 男性 1 例, 女性 12 例), 膝外傷後 (9 例: 年齢 14 ~ 52 歳, 平均 28.5 歳, 男性 5 例, 女性 4 例) 患者膝滑膜で, RA, OA 滑膜は人工膝関節全置換術, 膝外傷後滑膜は関節鏡視下手術の際に採取した. RA 滑膜は肉眼的に炎症の強い部分を採取した. RA 患者の罹病期間や臨床データは Table 1 に示す. RA 患者はすべてアメリカリウマチ学会の 1987 年改訂分類基準を満たしていた. OA 患者は Kellgren-Lawrence 分類 Grade III と IV であった. 膝外傷後患者は半月板損傷や, 前十字靭帯損傷により手術になった症例で, 受傷から手術までの期間は 2 ~ 12 ヶ月 (平均 4.8 ヶ月) であった. 手術時, 膝外傷後患者に関節水症等の関節炎を疑う所見は認められなかった. *in situ* hybridization 用, 免疫組織化学染色用の滑

膜組織は4%PFA/PBSで固定した後、パラフィン包埋し、4℃で保存した。RNA解析用の滑膜組織は採取直後にドライアイスで凍結し、RNA抽出時まで-80℃で保存した。

2. 方法

1) プローブ作製

プローブを作製するために、まずHL-60由来のcDNAを鋳型に用いBv8 DNA断片をPCRで増幅した。プライマーとしては以下の塩基配列のものを使用した。Forward; 5'-CGGGATCCTTGTGACAAGGACTCCCA A-3', reverse; 5'-CGGAATTCCTTGAAA GTTGAGGAAGCA-3'。PCR産物を*Bam*HIと*Eco*RIで制限酵素処理し、pSPT19ベクターにクローニングした後、塩基配列を確認した。得られたプラスミドを制限酵素処理したものを鋳型にDIG RNA labeling kit (Roche, Ltd., Basel, Switzerland)を用いてジゴキシゲニン標識RNAプローブを合成した。アンチセンス鎖合成にはSP6 RNAポリメラーゼを、センス鎖合成にはT7 RNAポリメラーゼを使用した。

2) *in situ* hybridization (ISH)

ISHではベンタナHXシステム ディスカバリー (Roche, Ltd.) とリボマップシステム (Roche, Ltd.) を使用した。プロトコールは標準的なものを使用し、プローブ濃度は50ng/slide、ハイブリダイゼーション条件は61℃、6時間とした。プローブを検出するために、1次抗体としてHRP標識抗DIG抗体 (Roche, Ltd.) を反応させ、2次抗体としてビオチン標識抗HRP抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA) を反応させた。Blue Map Kit (Roche, Ltd.) を用いてNBT/BCIPで発色した。対比染色はNuclear Fast Red (Roche, Ltd.) を使用した。

3) 免疫組織化学染色

パラフィン包埋した滑膜組織を2 μmに薄切し、組織切片を作製した。切片をキシ

レンとエタノールで脱パラフィンした後、0.3% H_2O_2 /メタノールで室温、30分処理し、10%ヤギ正常血清で室温、30分処理した。1次抗体としてProkineticin 2 Antibody (Novus Biologicals, Littleton, USA) を使用し、PBSで250倍に希釈して、切片に滴下した後4℃で一晩反応させた。その後、PBSで洗浄し2次抗体としてヒストファイン ビオチン標識抗ウサギIgG抗体 (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を室温で10分反応させ、ヒストファイン ベルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を室温で5分反応させた。DABで発色した後、メチルグリーンで対比染色した。

4) real-time PCR

TRIzol (Invitrogen, Carlsberg, USA) を使用して各滑膜組織からtotal RNAを抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsberg, USA) を用いてcDNAを合成した。逆転写反応はGene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) 使用し、25℃で10分、37℃で120分、85℃で5秒の反応条件で行なった。real-time PCRはTaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) とTaqMan Gene Expression Assays (Bv8; Hs01587689_m1) (Applied Biosystems) またはPre-Developed TaqMan Assay Reagents Human ACTB (Applied Biosystems) を用い、7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) で行なった。反応条件は、50℃で2分 (UNG activation)、95℃で10分 (AmpliTaq Gold activation)、95℃で15秒の後60℃で1分を50サイクル (Cycling condition) で行なった。1サンプルにつき2回測定を行ない、検量線法で発現量を検討した。内在性コントロール遺伝子としてβ-actinを使用した。

5) 統計学的検討

各滑膜におけるBv8の発現量の検討ではMann-Whitney's U test with Bonferroni 検