

図1 関節の構造

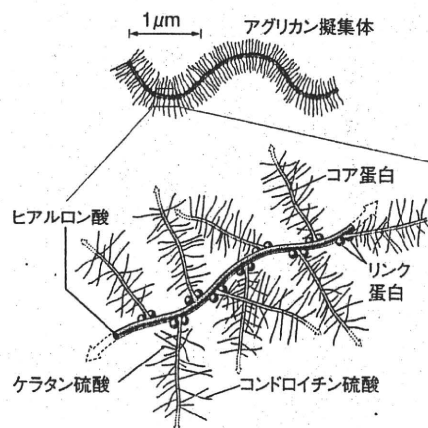


図2 プロテオグリカン凝集体の模式図

### 1-1-2 滑膜

滑膜は関節の内面を覆い、表層には1～2層から成る滑膜表層細胞が存在し、形態学的特徴からAマクロファージ型のA細胞と、線維芽細胞型のB細胞に区別されるが、このほかに中間型の細胞であるAB細胞の存在が指摘されている。滑膜の深部には脂肪組織がみられる。

### 1-1-3 滑液 (関節液)

滑液 (関節液) は血漿成分に滑膜細胞によって作られたヒアルロン酸蛋白複合体が加わったもので、pH 7.2～7.4、黄色透明で非常に粘稠度が高い。滑液は関節軟骨の摩擦を減少させ軟骨を栄養する。

### 1-1-4 関節の血管分布

関節を栄養する血管は、関節包の付着部あるいはその付近で軟骨下骨質に入る血管から分かれて関節を取り巻き、豊富な毛細血管網を形成する。

## 2 結合組織の生化学

正常ヒト関節 (滑膜関節) における構成要素、代謝およびその調節機構についての生化学的特徴を述べる。

### 2-1 関節軟骨

関節軟骨は前項で述べたように軟骨細胞と細胞外基質から成るが、主な構成成分は基質の3/4が水分である。残り1/4のうちII型コラーゲンが70%、プロテオグリカンが20%、残りがcartilage matrix protein (CMP)、コンドロカルシン、フィブロネクチンなどのマトリックスプロテインといわれている。

#### 2-1-1 コラーゲン

コラーゲンは生体を構成する全蛋白質の30%を占め、すべての組織に分布している。コラーゲン分子はポリペプチド鎖 (α鎖) を単位とし、3本鎖のヘリッ

クス構造を形成する。全アミノ酸残基 (X,Y) の約1/4はプロリン、ヒドロキシプロリンより成るが、コラーゲンに特徴的なアミノ酸残基としてヒドロキシリジンがある。軟骨を形成するコラーゲンはII型コラーゲンであり、分子量300で、プロテオグリカンとともに重力を支えるほか、軟骨に弾力性を与えている。軟骨を形成するコラーゲンとしては、ほかにIX型コラーゲンも知られている。

#### 2-1-2 プロテオグリカン

II型コラーゲンとともに軟骨基質を構成する重要な要素で、図2のように中心にコア蛋白をもち、これに多数のグリコサミノグリカン鎖が結合している (アグリカン)。分子量は100万～300万で、多くのプロテオグリカンはヒアルロン酸とリンク蛋白とが結合し巨大凝集体を形成する。この凝集体は陰性電荷をもち、荷重時に水の出し入れをすることにより粘弾性を発揮する。

- ①コア蛋白：コア蛋白は約2,000のアミノ酸から成り、3つの部分 (globular domain G1, G2, G3) から成る。G1領域は凝集体の形成時におけるヒアルロン酸とリンク蛋白との結合領域、G2領域はコア蛋白の中間部位でケラタン硫酸鎖とオリゴ糖鎖が多く結合している部分、G3はコア蛋白のC-末端部である。
- ②グリコサミノグリカン：コア蛋白に結合している多糖鎖をグリコサミノグリカンといい、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマトン硫酸が含まれる。コンドロイチン硫酸はN-アセチルガラクトサミンとD-グルクロン酸から成るポリマーで、陰性電荷をもち、これがプロテオグリカンの親水性に関与している。

表3 関節炎と関節症の分類

関節炎	関節リウマチ (RA)
	亜急性関節リウマチ (感染後リウマチ)
	リウマチ熱
	若年性関節リウマチ
	乾癬性関節炎
	結合組織病
	結晶沈着病 (痛風, 偽痛風)
	細菌感染症 (結核, 化膿性関節炎)
	ウイルス感染症
	真菌感染症
関節症	変形性関節症 (OA)
	血友病性関節症
	特異性骨壊死
	代謝性関節症 (ヘモクロマトーシス, 痛風症, 末端肥大症, アルカプトン尿症など)
	神経障害性関節症

血友病, 特異性骨壊死, 代謝性関節症を変形性関節症に区分したのは, 本来の原因は存在しながら二次的に変形性関節症を生じるためである。

- ③ヒアルロン酸: グリコサミノグリカンの一種で, N-アセチルグルコサミンと D-グルクロン酸の二糖単位が連続した構造をしているが硫酸基の結合がない。分子量は 400 万以上で, 関節運動の潤滑作用や荷重の緩衝作用などに役割を果たしている。
- ④リンク蛋白: グリコサミノグリカンを安定化させる蛋白であるが, 最近はこのリンク蛋白がヒアルロン酸と結合する性質を利用して, 血中や関節液中のヒアルロン酸濃度を測定する検査が行われている。

### 3 関節と結合組織の病理学

関節疾患は表3のようにさまざまな病因によって引き起こされるが, 一般には結合組織を標的とした膠原病, 自己免疫疾患によるものが多い。ここでは代表的な関節疾患である関節リウマチ (RA) と, 変形性関節症 (OA) についてとりあげる。

#### 3-1 関節リウマチ (RA) の組織像の特異性

RA は免疫異常を原因として発症する慢性炎症性疾患であるが, 最終的には関節の破壊と変形を引き起こす。病変を特徴づける組織像は, ①滑膜組織の絨毛性増殖, ②血管の新生, ③リンパ球を含む炎症性細胞の浸潤, ④軟骨・骨破壊である。

滑膜の炎症は bare area といわれる滑膜と軟骨の移行部付近から始まり, 経過とともにリンパ球, マクロファージ, 線維芽細胞様細胞など多彩な細胞がみられるようになる。滑膜の表層では細胞の多層化がみられ, 組織は絨毛状になる。浸潤した細胞はサイトカイン (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6), 増殖因子 (PDGF, VEGF),

接着因子 (ICAM-1, LFA-1), 破骨細胞分化因子 (RANKL) などを発現し, 炎症を持続させる。

#### 3-1-1 軟骨・骨破壊

滑膜に始まった炎症が, 肉芽組織 (パンヌス) となって軟骨組織を吸収して骨部に至る。骨破壊 (吸収) については, 破骨細胞以外にも線維芽細胞様細胞 や単球/マクロファージが関与しており, これらの細胞はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP), システインプロテアーゼなどの蛋白分解酵素を産生する。また最近では, ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif) などの関与も指摘されている。ADAMTS は MMP と同じドメインを有するが, このなかの ADAMTS-4,5 はアグリカナーゼ-1,2 と称されており, 変形性関節症 (OA) の軟骨破壊に対しては MMP より強力であるといわれている。

#### 3-2 変形性関節症 (OA)

変形性関節症 (OA) については, 加齢, ホルモン, 荷重, 循環障害, 外傷など, いくつかの因子があげられるが, 複数の因子の関与であるといわれている。関節軟骨は磨耗し, 象牙質といわれる骨の反応性肥厚がみられるようになる。滑膜組織は浮腫性で炎症性細胞の浸潤はほとんどみられない。

#### 3-3 RA 以外の膠原病による関節病変

RA 以外の膠原病では関節病変をしばしば合併するが, このときの滑膜炎はリンパ球浸潤や軽度の滑膜細胞の増殖など RA の病変像に類似するものの, その程度は軽く, 一般に関節破壊に至ることは少ない。

[澤井高志]

#### [文献]

- 井上 一: 関節の生理学と機能, IV. 関節の生理と機能。リウマチ学。東京: 同文書院; 1998, p.309.
- 吉田 渡, 澤井高志: 関節炎の基礎 (解剖学, 生化学)。ヒト関節炎。関節炎モデル。東京: 日本医学館; 2000, p.3.
- 澤井高志: 病理学的検査。越智隆弘 (編)。最新整形外科学大系 19, 関節リウマチと類縁疾患。東京: 中山書店; 2007, p.72.
- Ruddy S, Harris ED, Sledge CB (eds): Kelly's Textbook of Rheumatology, 6th edition. Philadelphia, London, New York, St Louis, Sydney, Toronto: WB Saunders; 2001.

## 膠原病・リウマチ性疾患の遺伝要因

### 1 膠原病, リウマチ性疾患における遺伝要因

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) を含めた膠原病, リウマチ性疾患の発症には, 遺伝的な背景があることが知られている。すなわち, 疾患の多発家系が存在すること, 一卵性双生児における発症の一致率が二卵性双生児のそれと比べて高いこと, 特定の標識遺伝子陽性者の頻度が健康対照集団と比較して患者集団で増加していること, 遺伝的に規定された動物モデルの存在などが遺伝的要因の関与を示唆する要素である。たとえば, RA の一卵性双生児の疾患一致率は, 最近の研究では 12~15% とされている。これに対して 50% の遺伝子を共有する二卵性双生児や兄弟での一致率は 2~4% とされている。一般の人口の有病率は 0.24~1% であり, したがって  $\lambda_{Mz}$  (一卵性双生児の相対危険率) は 12~62 であり,  $\lambda_s$  (同胞の相対危険率) は 2~17 と計算される。

家族集積性に関与する因子には, 感染の要素, 貧富, 環境要因などの影響もありうるが, これらを考慮に入れても遺伝的要因の関与は確実であるとされている。一卵性双生児の疾患一致率は, 各自自己免疫疾患でいたい 15~30% 程度であり, これらはそれほど高くない。しかし, 一致率が 12.3% のフィンランドのデータと 15.4% のイギリスのデータを用いて RA に対する遺伝的寄与を計算したところ, 約 60% が遺伝要因であったと報告されている。したがって, 発症一致率の程度は, 遺伝要因が弱いと解釈するのではなく, 非遺伝的要因も疾患の表現に大きく関与すると解釈したほうがよい。

遺伝要因に関しては, 特に RA を中心に主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC, ヒトでは HLA) が最も寄与度は大きいとされている。しかし, 病態形成に関する詳細なメカニズムはまだわかっていない。したがって, それ以外の非 HLA 領域の遺伝的要因の検索は, 病態の解明と新しい治療法の開発に重要であると期待されている。

### 2 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC)

免疫応答における MHC の重要性はすでに多くの報告がある。ヒトの MHC である HLA の遺伝子多型と自己免疫疾患との関連は, RA だけでなく強直性脊椎炎, Behçet 病, 1 型糖尿病, 全身性エリテマトーデス, 多発性硬化症など多くの疾患で報告がある。HLA のクラス I 分子, クラス II 分子は T 細胞に対して抗原を提示する機能があることから, これらの関連は比較

的理解しやすい面もある。RA における最大の単一遺伝要因は HLA であり, 遺伝学的な推計では, それが全遺伝要因の約 30% を説明できるとされている。

RA に関して関連を示すのは, クラス II 分子の HLA-DR1, DR4 である。さらに, DR 抗原の  $\beta$  鎖をコードする HLA-DRB1 の対立遺伝子の \*0101, \*0401, \*0404, \*0405 などが関連していることが明らかになっている。詳細な解析の結果, これらの対立遺伝子において超可変領域に相当する第 70~74 残基が共通の Q/KRRAA というアミノ酸配列 (shared epitope) であることが判明し, shared epitope 仮説が提唱された<sup>1)</sup>。これは抗原提示という面から, shared epitope をもつクラス II 分子が, RA の特異抗原を提示する可能性を示している。しかし, 最近の研究で必ずしも shared epitope の考え方だけで RA との関係が説明できるとは限らないことも議論されてきている。たとえば, アフリカ系アメリカ人やヒスパニックにおける RA 関連アレルは, このような shared epitope をもたないことや, 日本人・韓国人においては, \*0405 などに加えて, shared epitope をもたない \*0901 と RA の関係も報告されていることから, HLA-DR と連鎖不平衡にある HLA 領域の他の遺伝子多型が関与している可能性も示唆されている。

### 3 非 HLA 遺伝子解析の現状

HLA 以外の疾患関連遺伝子の検索は, 従来考えられないような病態の形成メカニズムや新しい治療法の開発などに重要な情報を提供することが期待されており, 現在, さかに行われている。研究方法の一つは, 病態に関連すると予想される候補遺伝子について, 疾患と対照での遺伝子多型の頻度を比較するという解析である。これに対して特定の候補遺伝子を決めずにゲノム全体をスクリーニングする方法は, 従来の病因, 病態論では想像できないような関連遺伝子を検出できる可能性があり, 原因が不明な疾患の研究に有用であると考えられている。まず, マイクロサテライトを用いた罹患同胞対連鎖解析が行われた。これは, 従来の遺伝疾患の解析で行われた家系を用いた連鎖解析の手法であり, 多因子疾患の場合, 家系の数の制限もあるので絞り込める範囲を十分に狭めることができないことがある。これに対して一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を用いて, 疾患群と対照群での頻度の差を解析する関連解析は, 集団全体の組換え情報が反映されるので, かなり狭い領域に責任遺伝子領域を特定できる可能性があり, 多因子疾患の遺伝子解析に適していることが明らかになってきた。これを利用して, ゲノム全体の SNP について関連解析

# Examination of *in vivo* gelatinolytic activity in rheumatoid arthritis synovial tissue using newly developed *in situ* zymography and image analyzer

W. Yoshida<sup>1</sup>, M. Uzuki<sup>2</sup>, J. Nishida<sup>3</sup>, T. Shimamura<sup>3</sup>, T. Sawai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedic Surgery, Iwate Prefectural Kamaishi Hospital, Kamaishi, Japan;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Iwate Medical University, School of Medicine, Morioka, Japan;

<sup>3</sup>Department of Orthopedic Surgery and Rheumatology, Iwate Medical University, School of Medicine, Morioka, Japan.

---

## Abstract

### Objective

The aim of this study was to examine *in vivo* gelatinolytic activity of rheumatoid arthritis (RA) synovium using a newly developed *in situ* zymography (ISZ) method and pathological image analyzer, and to evaluate the relationship between this activity and several features on RA.

---

### Methods

A total of 8 samples of synovium were obtained from RA patients during surgery, and 8 samples from osteoarthritis (OA) patients were examined as controls. Furthermore, total 14 samples of synovium were obtained for comparison among radiographical classifications as Larsen grade (4 cases of grade III, 5 cases of grade IV and 5 cases of grade V). These specimens were frozen with OCT compound immediately after surgery. Frozen sections were applied to a newly developed gelatin-coated FIZ film (Fuji Film Co. Tokyo, Japan) designed for use ISZ, and incubated at 37° C for 6 hours. Using an image analyzer (image processor for analytical pathology; IPAP), two variables were measured as indicators of *in vivo* gelatinolytic activity: optical density of gelatinolyzed area (ODG), and ratio of gelatinolyzed area (RGA). Also, we investigated the relationship between these indicators and the following variables: radiographic changes (Larsen grades), clinical data (C-reactive protein concentration), histological score of synovial tissue (modified Rooney's score), and expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 (assessed by immunohistochemistry).

---

### Results

RA synovium had significantly higher RGA and lower ODG than OA, indicating higher gelatinolytic activity in RA. Synovium from cases with Larsen grade IV or V had significantly lower ODG than cases with grade III, but there was no significant difference in RGA between grades. There was no significant correlation between gelatinolytic activity (ODG or RGA) and either CRP or modified Rooney's Histological Score. The results of ISZ indicate that the gelatinolyzed areas were mainly localized in the lining area, with a small amount scattered throughout the stroma. The results of immunohistochemistry indicate that MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 were expressed in areas of gelatinolysis.

---

### Conclusions

The present results indicate that *in vivo* gelatinolytic activity of synovium is stronger in RA than in OA. They also indicate that gelatinolytic activity of RA synovial cells is stronger in cases with Larsen grade IV or V than in cases with grade III, although the gelatinolyzed area is similar. Gelatinolytic activity, as indicated by optical density and the gelatinolyzed area, differed between regions, even within the same specimen, suggesting an imbalance between production of proteinases and their inhibitors. We believe that the present zymography method can contribute to the elucidation of biological enzymatic activity of RA synovium.

---

### Key words

Rheumatoid arthritis, *in situ* zymography, gelatinolytic activity.



Wataru Yoshida, MD, PhD  
 Miwa Uzuki, MD, PhD  
 Jun Nishida, MD, PhD  
 Tadashi Shimamura, MD, PhD  
 Takashi Sawai, MD, PhD, Professor

Please address correspondence and reprint requests to:

Prof. Takashi Sawai, MD, PhD,  
 Department of Pathology,  
 Iwate Medical University,  
 School of Medicine,  
 19-1 Uchimaru, Morioka,  
 Iwate 020-8505, Japan.

E-mail: tsawai@iwate-med.ac.jp

Received on December 1, 2008; accepted  
 in revised form on March 20, 2009.

© Copyright CLINICAL AND  
 EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2009.

#### Abbreviations:

ISZ: *in situ* zymography

IPAPA: image processor for analytical  
 pathology

ODG: optical density of gelatinolyzed  
 area

RGA: ratio of gelatinolyzed area

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, progressive disease characterized by inflammation and structural damage to the joint. However, in patients with arthritis, the development of joint destruction is unpredictable (1-3). The production of proteolytic enzymes by the inflamed synovium is thought to be critical in the pathogenesis of RA articular damage. In the absence of disease, these proteolytic enzymes are involved in normal tissue remodeling (4-6). There have been numerous studies of proteolytic enzymes, particularly matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), the latter being specific MMP inhibitors that form non-covalent, tight-binding complexes with active MMPs. MMPs and TIMPs are thought to play key roles in joint destruction (7-15). There is a great need to elucidate the proteolytic activity involved in the joint destruction of RA. Zymography is a valuable method for examining this activity, and its effectiveness has been assessed in several studies (16-18). However, most current zymography methods are used to qualitatively examine proteolytic activity, and are not adequate for histological evaluation or quantification. Consequently, little is currently known about the degree of *in vivo* histological proteolytic activity of RA synovium. The aim of the present study was to examine the distribution of *in vivo* gelatinolytic activity using a newly developed method of *in situ* zymography in which unfixed frozen tissues are applied to a gelatin-coated film, and to measure the degree of this activity as *in vivo* proteolytic activity of RA using a pathological digital-image analyzer.

In the present study, we compared *in vivo* gelatinolytic activity between synovium from RA and osteoarthritis (OA) patients, and compared activity among radiographic classifications of RA (Larsen grades). We evaluated the correlation of gelatinolytic activity with C-reactive protein concentration and histological inflammation of synovium (modified Rooney's score). Also, we examined the localization of cells expressing MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B), which degrade

components of the extracellular matrix with high specificity for denatured collagen (gelatin), and cells expressing their specific inhibitors TIMP-1 and TIMP-2, in order to examine the relationship between the localization of these cells and the distribution of gelatinolyzed areas, as determined by immunohistochemistry using serial sections.

## Materials and methods

### Patients and specimens

To compare RA and OA synovium, we examined 8 cases of RA and 8 cases of OA (Table I). These RA cases were classified as stage IV using the Steinbrocker system.

For comparison among RA cases with different radiographic appearances classified as Larsen grade, we examined 4 cases of grade III, 5 cases of grade IV, and 5 cases of grade V (Table II). We compared gelatinolytic activity among Larsen grades and evaluated the relation of gelatinolytic activity to Rooney's score, C-reactive protein concentration and expression of proteolytic enzymes (Table III). All RA cases were diagnosed according to the 1987 revised criteria of the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association). All synovial specimens were obtained during total knee replacement surgery, and the serum samples assayed for C-reactive protein concentration were obtained 1 day before the joint surgery. Examination of all specimens with informed consent from all patients was authorized by the Ethical Committee of Iwate Medical University.

### *In situ* zymography

To detect histologically the gelatinolytic activity of synovial tissue, we used a newly developed *in situ* zymography film (FIZ film; Fuji Film.Co. Tokyo,

**Table I.** Subjects for comparison between RA and OA.

	n	Age (years ± SD)
RA	8	55.8 ± 10.9
OA	8	71.9 ± 3.1

RA: rheumatoid arthritis; OA: osteoarthritis, and all RA cases were Stage IV.

Competing interests: none declared.

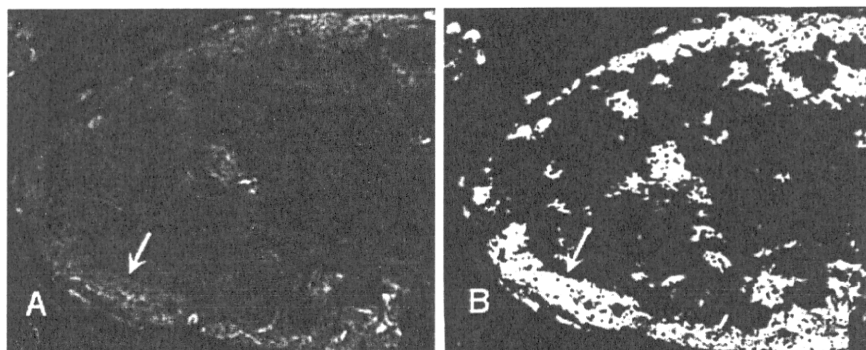
moderate, the initial score remained unchanged. If the infiltrate was considered mild or severe, the initial score was lowered or raised by 1 point, respectively.

**Focal aggregates of lymphocytes.** Focal aggregates of lymphocytes were defined as aggregates that were not intimately related to a synovial vessel or in which the perivascular cuff of lymphocytes was >10 cells in diameter. Scoring of focal aggregates was based on size, rather than the number of aggregates. Absence of focal aggregates was scored 0. As the diameter (measured as number of cells) of the focal aggregates increased, the score for the section increased accordingly. An aggregate with a diameter of >55 cells received the maximum score of 10.

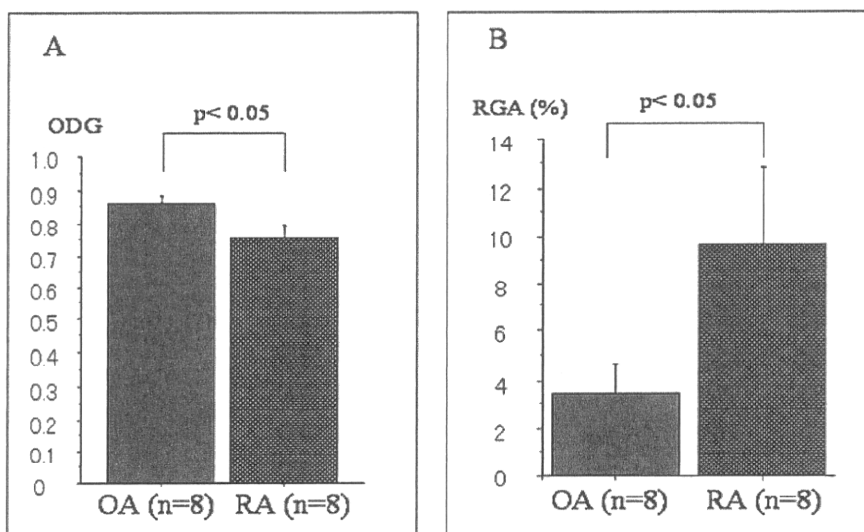
**Diffuse infiltrates of lymphocytes.** Lymphocytes that were not part of perivascular or focal aggregates were considered to be diffuse infiltrates. Quantification of diffuse infiltrates was relatively subjective. We estimated the percentage of cells per HPF that were lymphocytes, with higher percentages corresponding to higher scores. If the field was entirely occupied by lymphocytes, it was given a score of 10. If the percentage of infiltrating lymphocytes varied between HPFs, the score that corresponded to the predominant percentage was recorded.

**Immunohistochemistry**

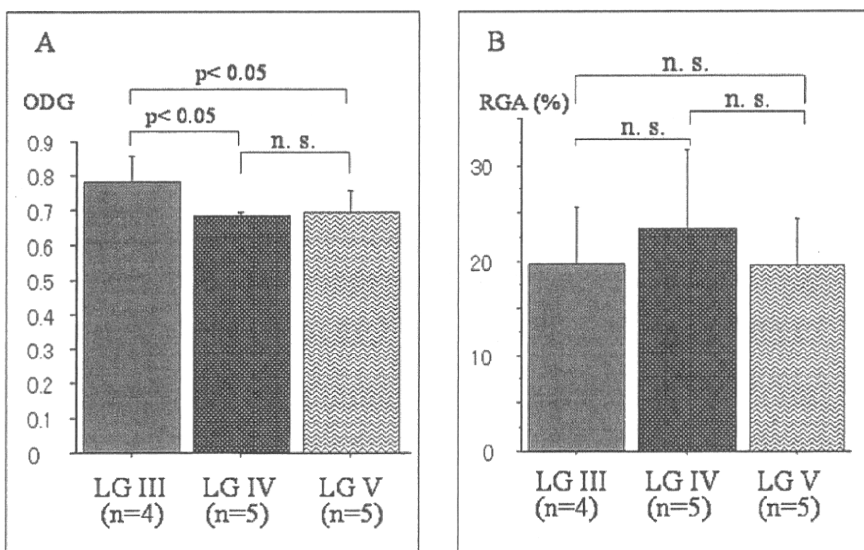
We assayed expression of gelatinase A (MMP-2), gelatinase B (MMP-9), TIMP-1 and TIMP-2 by immunohistochemistry using monoclonal antibodies (anti-MMP-2, -MMP-9, -TIMP-1, -TIMP-2; Fuji Chemistry, Tokyo, Japan). Frozen sections of synovial tissue (thickness, 4 μm) were embedded in OCT compound and fixed in 100% alcohol for 10 minutes. All sections were then washed with phosphate-buffered saline (PBS), followed by blocking of endogenous peroxidase activity with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes. Next, 10% normal goat serum was applied to the sections for 30 minutes, which were then reacted with primary antibodies at 4° for 24 hours.



**Fig. 1.** Arrow indicates the gelatinolyzed area of RA synovium (A) detected by *in situ* zymography. The arrow indicated pale area was recognized as the measurable region by IPAP analysis (B).



**Fig. 2.** Comparison with RA and OA synovium. RA synovium demonstrated significantly lower ODG (0.758±0.019) than OA (0.864±0.037) ( $p < 0.05$ , A). RA synovium demonstrated significantly higher RGA (9.7±3.1 %) than OA (3.5±1.1 %) ( $p < 0.05$ , B).



**Fig. 3.** Difference of gelatinolytic activity among Larsen grades. There was significant difference between grade III (0.781±0.075) and IV (0.679±0.016), III and V (0.691±0.064) in ODG ( $p < 0.05$ , A). However no significant difference was shown among Larsen grades in RGA (grade III; 19.8±5.8 %, grade IV; 23.4±8.2 %, grade V; 19.5±4.8%, B).

**Table II.** Characteristics of cases examined among RA cases.

Larsen grade	Number of cases	Age (years±SD)	CRP (mg/dl±SD)	Duration of disease (years ± SD)
III	4	50.0 ± 6.6	2.0 ± 2.5	19.0 ± 8.2
IV	5	52.8 ± 14.1	2.9 ± 1.7	14.8 ± 6.4
V	5	54.8 ± 19.7	2.9 ± 1.6	12.2 ± 5.2

Japan). This film is uniformly coated with cross-bridge gelatin at a thickness of 7 µm. All synovial specimens were embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Lab-Tek products, Elkhart, IN, USA) immediately after surgery. Then, 4-µm cryostat sections were cut and applied to the film, followed by washing with water for a few seconds. After incubation for 6 hours at 37°, the film was stained with 0.2% pansaou solution (which is commonly used for protein staining; Sigma, USA) for 3 minutes and fixed with 1% acetate for 5 minutes. After washing with water for 15 minutes, the film was stained with hematoxylin for nuclear staining. Gelatinolyzed areas caused by gelatinolytic activity of synovium were detected as pale areas, and non-gelatinolyzed areas were uniformly stained red.

#### Quantization of gelatinolytic activity by image analyzer

To quantify the degree of gelatinolytic activity, we used a digital image analyzer (image processor for analytical pathology, IPAP, Sumitomo Tech, Osaka, Japan), which combines a microscope, a CCD camera and an analyzing computer. For each pansaou-stained FIZ film, we measured two variables: optical density of gelatinolyzed area (ODG) and ratio of gelatinolyzed area

(RGA). ODG is the mean optical density of the red component at 50 random points in the gelatinolyzed area. RGA is the ratio of the gelatinolyzed area to the entire synovium. ODG and RGA were measured blindly at a magnification of ×4.

#### Histological score

For each case, we scored the degree of inflammation of RA synovium according to Rooney's histological score as local assessment (19). The scoring technique used for all 6 features is shown in Table III.

**Synoviocyte hyperplasia.** A normal synoviocyte monolayer was given a score of 0. As the depth of the synoviocyte lining layer increased, the score increased accordingly. If the cell depth of the section varied, the grade corresponding to the predominant cell depth was recorded.

**Fibrosis.** The degree of fibrosis was estimated as the amount of fibrous tissue that had replaced the normal loose connective tissue present beneath the synovial lining layer. All fields of the section were assessed. Sections containing <10% fibrous tissue in the sublining layers were considered normal and graded 0. As the percentage of fibrosis

in the section increased, the score increased accordingly, to a maximum of 10, which was equivalent to >80% fibrosis in the section.

**Proliferating blood vessels.** Endothelial cells forming a solid tube or enclosing a lumen were considered to constitute a vessel. If <4 vessels were observed per high-power field (HPF), the section was considered normal and was scored 0. As the number of vessels per HPF increased, the score increased accordingly, and >22 vessels per HPF was scored the maximum 10. If the number of vessels per HPF varied, the score corresponding to the predominant number of vessels per HPF was recorded.

**Perivascular infiltrates of lymphocytes.** Perivascular infiltrates were characterized as aggregates of lymphocytes that were contiguous with the vessel wall and were <10 cells in diameter. The final score for perivascular infiltrates was based on two factors: the number of vessels involved, and the diameter of the perivascular infiltrate. If no vessels were involved, the grade was 0. The greater the percentage of vessels surrounded by lymphocytes, the higher the score. The maximum grade of 10 corresponded to involvement of 100% of vessels. The diameter of the perivascular infiltrate was assessed and was graded as mild (2-4 cells in diameter), moderate (5-7 cells in diameter) or severe (8-10 cells in diameter). The number of vessels involved was the dominant variable and was the basis of the initial score. If the cellular infiltrate around the vessels was considered

**Table III.** Method of modified Rooney's scoring features in RA synovium.

	Score										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Synoviocyte hyperplasia*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10
Fibrosis†	<10	<15	<20	<25	<30	<40	<50	<60	<70	<80	>80
Proliferating blood vessels‡	0-3	4-5	6-7	8-9	10-11	12-13	14-15	16-17	18-19	20-22	>22
Perivascular infiltrates of lymphocytes§	<5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Focal aggregates of lymphocytes¶	11	15	20	25	30	35	40	45	50	55	>55
Diffuse infiltrates of lymphocytes¶	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

\*Predominant cell depth of synovial lining layer; †Percentage of fibrosis in subsynovial layer; ‡Number of vessels per high power field (HPF); §Percentage of vessels per HPF; ¶Number of cells in diameter; ¶Percentage of diffuse lymphocytes per HPF.

After washing with PBS, all sections were reacted at room temperature for 30 minutes with rabbit immunoglobulins conjugated to a peroxidase-labeled amino acid polymer (Histofine simplestain Multi Po, Nichirei, Tokyo, Japan), and finally were treated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co., USA). Negative control sections were reacted with normal mouse, rabbit and sheep serum instead of the primary antibody.

#### Statistical methods

Significance of the differences between the two groups was evaluated using Fisher's PLSD test, and correlation of gelatinolytic activity (ODG and RGA) with clinical assessment (C-reactive protein concentration) or the histological score (Rooney's score) was evaluated using Spearman's test.

#### Results

Gelatinolyzed areas detected by *in situ* zymography were chiefly localized at whole of the lining layer of RA synovium (Fig. 1A, gelatinolyzed pale area indicated by arrow) rather than in the stroma. All RA cases exhibited the same pattern of localization. The gelatinolyzed areas detected barely in OA synovium localized at the lining layer. The arrow indicated area (Fig. 1B) was considered suitable for measurement of ODG and RGA using the IPAP system as the gelatinolyzed area.

#### Comparison of gelatinolytic activity between RA and OA synovium

RA synovium had a significantly lower ODG ( $0.758 \pm 0.019$ ) than OA synovium ( $0.864 \pm 0.037$ ) (Fig. 2A: Comparison with RA and OA synovium in ODG;  $p < 0.05$ ). RA synovium had a significantly higher RGA ( $9.7 \pm 3.1\%$ ) than OA synovium ( $3.5 \pm 1.1\%$ ) (Fig. 2B: Comparison with RA and OA in RGA;  $p < 0.05$ ).

#### Comparison of gelatinolytic activity among Larsen grades

Grade III had a significantly higher ODG ( $0.781 \pm 0.075$ ) than grades IV ( $0.679 \pm 0.016$ ) and V ( $0.691 \pm 0.064$ ) (Fig. 3A: Comparison of ODG among Larsen grades;  $p < 0.05$ ). However

there was no significant difference in RGA among Larsen grades (grade III,  $19.8 \pm 5.8\%$ ; grade IV,  $23.4 \pm 8.2\%$ ; grade V,  $19.5 \pm 4.8\%$ ) (Fig. 3B: Comparison of RGA among Larsen grades).

#### Correlation of gelatinolytic activity with C-reactive protein (CRP) concentration and histological score.

There was no correlation of CRP concentration with ODG or RGA, and there was no correlation of modified Rooney's score with ODG or RGA. In addition, there was no significant difference between Larsen grades in C-reactive protein concentration or Rooney's score.

#### Relation between enzyme expression and gelatinolyzed area

In immunohistochemistry using serial sections, MMP-2 and MMP-9 were mainly expressed by fibroblast-like or macrophage-like cells of the synovial lining layer. These same cells also expressed TIMP-1 and TIMP-2. The distribution of cells expressing MMPs and TIMPs corresponded to the gelatinolyzed areas detected by zymography. Some cells expressing MMPs and TIMPs were also detected scattered throughout the non-gelatinolyzed area, but at a markedly lower concentration than in gelatinolyzed areas. There were no marked differences among Larsen grades in the distribution of cells expressing MMPs and TIMPs.

#### Discussion

There have been many studies of proteolytic activity, including gelatinolytic activity, using techniques including gelatin zymography (16-18, 20-23). *In situ* zymography was developed to determine the localization of proteolytic activity *in vivo* or histologically. However, *in situ* zymography has been restricted to qualitative analysis because of the inability to coat film with substrate at a sufficiently uniform thickness to allow precise quantification of *in vivo* proteolytic activity (24-28). The present *in situ* zymography method utilizes a film developed at Fuji Photo Film Co., Ltd, Tokyo, which is uniformly coated with a 7- $\mu$ m layer of gelatin and cross-linking agent. In sev-

eral studies, reproducible quantification of areas of gelatinolysis has been achieved using this film (29-31). The aim of the present study was to quantify histologically the degree of gelatinolytic activity of RA synovium using the IPAP image analyzer. The IPAP system, which consists of a microscope and computer, converts microscopic photographic images into digital images, measures optical density and counts cell numbers under various conditions (32). In the present study, we measured ODG and RGA of gelatinolyzed areas, using Ponsaou-stained FIZ films as background reference. ODG reflects the degree of gelatinolytic activity per cell. RGA reflects the number of gelatinolytic cells on the synovium.

In the present study, the gelatinolyzed areas detected by *in situ* zymography were primarily localized at the lining layer of the synovium and rather than in the stroma. This is consistent with the previous finding that many enzyme activators are present in the joint fluid, and that they stimulate enzyme production by synovial cells of the lining layer or activate these enzymes, playing a crucial role in the pathogenesis of articular damage (33, 34).

In the present study, RA synovium had significantly greater ODG and RGA than OA synovium, indicating that RA synovial cells have stronger *in vivo* gelatinolytic activity and RA synovial tissue contains more gelatinolytic cells.

In the present study, specimens with Larsen grade III had significantly higher ODG than grades IV and V, but there was no significant difference in RGA among Larsen grades. This suggests that the *in vivo* gelatinolytic activity of individual RA synovial cells is stronger at later stages of joint destruction, but that the number of gelatinolytic cells does not markedly increase.

In the present study, CRP concentration and histological score did not correlate with ODG, RGA or Larsen grade. This indicates that the levels of inflammatory variables such as CRP concentration and Rooney's score do not reflect the *in vivo* gelatinolytic activity of RA synovium or the degree of joint destruction. This suggests that the patho-physiologic mechanisms of joint

inflammation are partially independent from the mechanisms of joint destruction (3, 35-40). RA is a systemic or local inflammatory disease caused by disorders of the immune system, but the degree of joint destruction in RA appears to be more accurately reflected by the *in vivo* gelatinolytic activity of synovial cells than by markers of inflammation such as CRP concentration or histological score of synovium.

High MMP levels in arthritis are thought to result from increased production by inflamed joints (41). Gene expression of several MMPs has been observed in the synovial lining layer, in scattered cells in the sublining area, and in activated synovial endothelial cells. In the present study, gelatinolyzed areas were mainly localized at the lining layer of the synovium, and the gelatinolytic enzymes MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 were mainly expressed in these areas, as indicated by immunohistochemistry. These MMPs and TIMPs were also expressed, to a lesser degree, by cells scattered throughout non-gelatinolyzed areas. These results indicate that RA synovial cells simultaneously produce proteolytic enzymes and their inhibitors, and suggest that differences *in vivo* gelatinolytic activity among cells are due to imbalances in enzyme production of individual cells. That is, proteolytic enzyme production is greater than inhibitor production (positive balance) in the gelatinolyzed areas, and inhibitor production is greater than proteolytic enzyme production (negative balance) in the non-gelatinolyzed areas. This is consistent with the present finding that cases of joint destruction with Larsen grade IV or V have a more positive balance between MMPs and TIMPs than cases with grade III (6, 21, 40, 42-44).

### Conclusion

In the present study, we used *in situ* zymography and IPAP analysis to examine *in vivo* gelatinolytic activity of RA synovial tissue. This activity differed considerably among RA types, reflecting differences in the degree of joint destruction. The present results indicate that these differences in gelatinolytic activity are caused by differences

in the balance of enzyme production by RA synovial cells. The newly developed methods used in the present study can contribute to a better understanding of biological enzymatic activity of RA synovium.

### Authors' contributions

W. Yoshida, J. Nishida, T. Shimamura, and T. Sawai participated in the design of this study. W. Yoshida and M. Uzuki participated in the immunohistological study. W. Yoshida and T. Sawai participated in the *in situ* zymography, pathological analysis and statistical analysis. T. Sawai coordinated and helped to draft the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgments

We thank Akira Kurose MD, PhD and Masaaki Yoshida MD, PhD from Iwate Medical University.

### References

- CUNNANE G, FITZGERALD O, BEETON C *et al.*: Synovial tissue proteinase gene expression and joint erosions in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 1744-53.
- BALLARA S, TAYLOR PC, REUSCH P *et al.*: Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 2055-64.
- CUNNANE G, FITZGERALD O, BEETON C *et al.*: Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 2263-74.
- YATSUGI N, TSUKAZAKI T, OSAKI M *et al.*: Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. *J Orthop Sci* 2000, 5: 150-56.
- KIM HA, SONG YW: Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999, 42: 1528-37.
- MACNAUL KL, CHARTRAIN N, LARK M *et al.*: Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblast. *J Biol Chem* 1990, 265: 17238-45.
- KRANE SM, BYRNE MH, LAMEITRE V *et al.*: Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. *J Biol Chem* 1996, 271: 28509-15.
- KONTTINEN YT, SALO T, HANEMAAJER R *et al.*: Collagenase-3 (MMP-13) and its activators in rheumatoid arthritis: localization. *Matrix Biol* 1999, 18: 401-12.
- AHRENS D, KOCH AE, POPE RM *et al.*: Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996, 39: 1576-87.
- MAEDA S, SAWAI T, UZUKI M *et al.*: Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995, 54: 970-75.
- WILL H, HINZMANN B: cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem* 1995, 231: 602-8.
- VINCENTI MP, COON CI, MENGSHOL JA *et al.*: Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblast: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1). *Biochem J* 1998, 331: 341-46.
- KEISZER G, LAMBIRI I, NAGEL R *et al.*: Circulating levels of matrix metalloproteinase MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J Rheumatol* 1999, 26: 251-58.
- STRACKE JO, FOSANG AJ, LAST K *et al.*: Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Letters* 2000, 478: 52-6.
- BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WGI, BODDEN MK *et al.*: Matrix metalloproteinases: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993, 4: 197-250.
- SUN HB, NALIM R, YOKOTA H: Expression and activities of matrix metalloproteinases under oscillatory shear in IL-1-stimulated synovial cells. *Connect Tissue Res* 2003, 44: 42-9.
- HATTORI T, KAWAKI H, KUBOTA S *et al.*: Down regulation of a rheumatoid arthritis-related antigen (RA-A47) by ra-a47 antisense oligonucleotides induces inflammatory factors in chondrocytes. *J Cell Physiol* 2003 Oct, 197: 94-102.
- CHA HS, AHN KS, JEON CH *et al.*: Inhibitory effect of cyclo-oxygenase-2 inhibitor on the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol Int* 2003 Jul 26.
- ROONEY M, CONDELL D, QUINLAN W *et al.*: Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988, 31: 959-63.
- NAGAYA H, YAMAGATA T, YAMAGATA S *et al.*: Expression of synovial fluid and serum hyaluronidase activity as a joint marker in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients (by zymography). *Ann Rheum Dis* 1999, 58: 186-88.
- MORODOMI T, OGATA Y, SASAGURI Y *et al.*: Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma. *Biochem J* 1992, 285: 603-11.
- LE J, DAUCHOT P, PERROT J *et al.*: Quantitative zymography of matrix metalloproteinases by measuring hydroxyproline: Application to gelatinase A and B. *Electrophoresis* 1999, 20: 2824-29.



23. TAKEI I, TAKAGI M, SANTAVIRTA S *et al.*: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in joint fluid of the patients with loose artificial hip joints. *J Biomed Mater Res* 1999, 45: 175-83.
24. SENZAKI H, PAOLOCCI N, GLUZBAND YA *et al.*:  $\beta$ -Blockade prevents sustained metalloproteinase activation and diastolic stiffening induced by angiotensin II combined with evolving cardiac dysfunction. *Circ Res* 2000, 86: 807-15.
25. YI CF, GOSIEWSKA A, BURTIS D *et al.*: Incorporation of fluorescent enzyme substrates in agarose gel for in situ zymography. *Anal Biochem* 2001, 291: 27-33.
26. GALIS ZS, SUKHOVA GK, LIBBY P: Microscopic localization of active protease by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *FASEB J* 1995, 9: 974-80.
27. VIEILLARD-BARON A, FRISDAL E, EDDAHIBI S *et al.*: Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rat. *Circ Res* 2000, 87: 418-25.
28. GOODALL S, CROWTHER M, HEMINGWAY DM *et al.*: Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation* 2001, 104: 304-09.
29. IWATA H, YAMAMOTO M, NEMORI R *et al.*: Localization of gelatinolytic activity can be detected in breast cancer tissue by film in situ zymography. *Breast Cancer* 2001, 8: 111-15.
30. FURUYA M, ISHIKURA H, NEMORI R *et al.*: Clarification of the active gelatinolytic sites in human ovarian neoplasms using in situ zymography. *Hum Pathol* 2001, 32:163-8.
31. YAMANAKA H, MAKINO K, TAKIZAWA M *et al.*: Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 2000, 80: 677-87.
32. UZUKI M, WATANABE T, KATSURA Y *et al.*: Quantitative histochemical study of hyaluronic acid binding protein and the activity of uridine diphosphoglucose dehydrogenase in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999, 21: 75-80.
33. YOSHIHARA Y, NAKAMURA H, OBATA K *et al.*: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2000, 59: 455-61.
34. MATSUNO H, YUDOH K, WATANABE Y *et al.*: Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound fas ligand. *J Rheumatol* 2001, 28: 22-8.
35. LEHTINE JT, KAARELA K, KAUPPI MJ *et al.*: Valgus deformity and proximal subluxation of the rheumatoid elbow: a radiographic 15 year follow up study of 148 elbows. *Ann Rheum Dis* 2001, 60: 765-9.
36. ISHIGURO N, ITO T, MIYAZAKI K *et al.*: Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999, 26: 34-40.
37. ISHIGURO N, ITO T, OGUCHI T *et al.*: Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover and inflammation as revealed by analyses of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 2503-11.
38. ISHIGURO N, ITO T, OBATA K *et al.*: Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996, 23: 1599-1604.
39. EMERY P AND SALMON M: Early rheumatoid arthritis: time to aim for remission? *Ann Rheum Dis* 1995, 54: 944-47.
40. MILLIS AJ, HOYLE M, MCCUE HM *et al.*: Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase gene in aged human fibroblast. *Exp Cell Res* 1992, 201: 373-9.
41. KONTTINEN YT, AINOLA M, VALLEALA H *et al.*: Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999, 58: 691-97.
42. BURGER D, REZZONICO R, LI J *et al.*: Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes. *Arthritis Rheum* 1998, 41:1748-59.
43. JOVANOVIC DV, MARTEL-PELLETIER J, DI BATTISTA JA *et al.*: Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 1134-44.
44. MILTENBURG AM, LACRAZ S, WELGUS HG *et al.*: Immobilized anti-CD3 antibody activates T cell clones to induce the production of interstitial collagenase, but not tissue inhibitor of metalloproteinases, in monocytic THP-1 cells and dermal fibroblasts. *J Immunol* 1995 Mar 15, 154: 2655-6.

## 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<sup>1), 2)</sup>, 鎌滝章央<sup>1)</sup>, 及川伸也<sup>1), 2)</sup>,  
村上賢也<sup>1), 2)</sup>, 澤井高志<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医学部, 病理学講座: 先進機能病理学分野

<sup>2)</sup> 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<sup>1, 2)</sup>。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<sup>3)</sup>、滑膜の炎症と増殖、破骨細胞の分化<sup>4, 5)</sup>、蛋白分解酵素の放出<sup>6)</sup>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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>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<sup>8-14)</sup>。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<sup>15-18)</sup>、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<sup>19)</sup>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<sup>14, 20, 21)</sup>。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 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 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<sup>15, 16, 22, 23)</sup>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<sup>24, 25)</sup>、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<sup>26, 27)</sup>。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)<sup>28, 29)</sup>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<sup>28)</sup>。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<sup>30)</sup>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<sup>28)</sup>。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<sup>31, 32)</sup>、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 $\mu$ 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 デイスパーゼを含む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%CO<sub>2</sub>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 $\mu$ 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

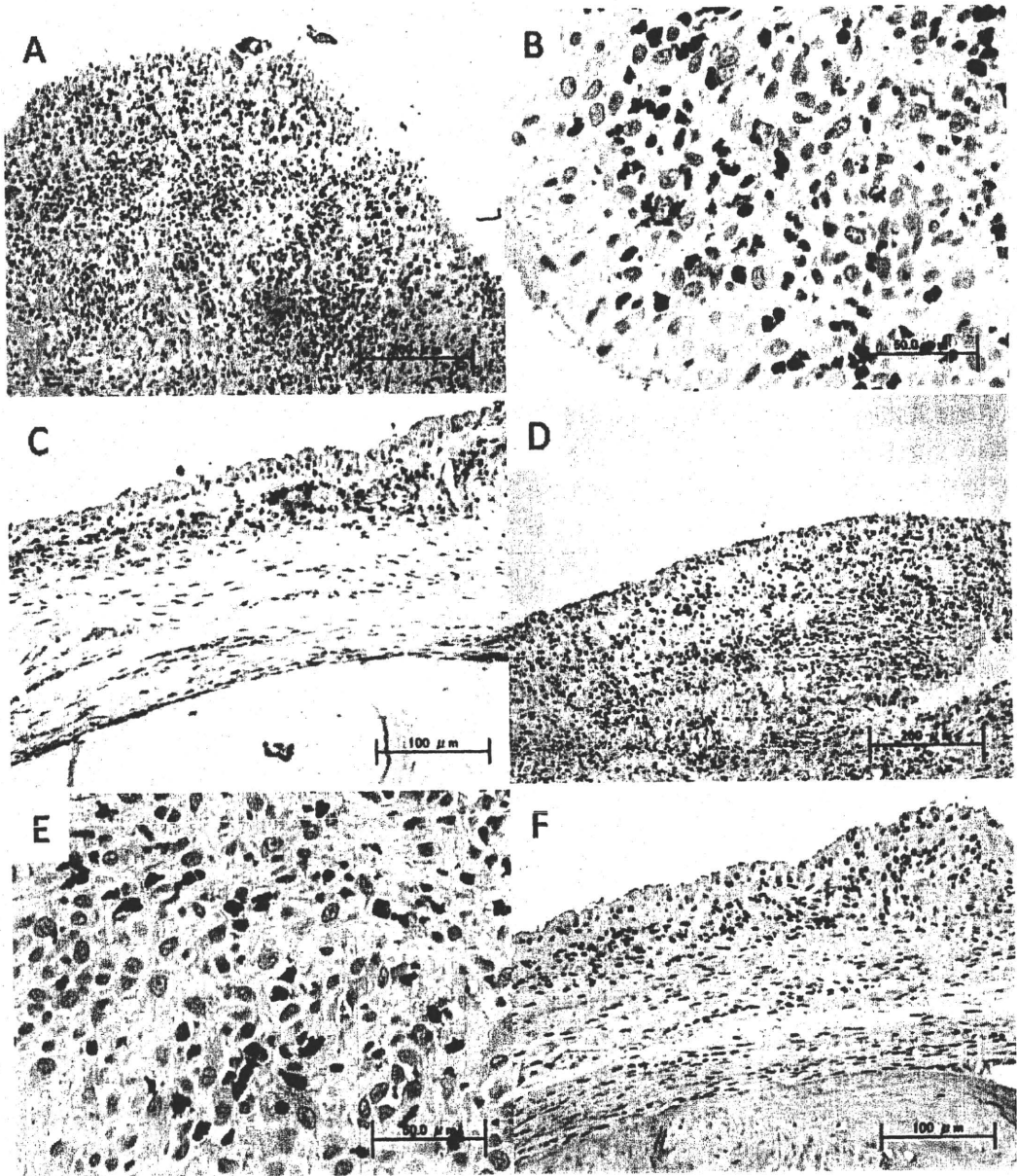


図1. RA 滑膜組織における ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現  
 一次抗体として ADAMTS-4 抗体と抗 ADAMTS-5 抗体を用い、ヘマトキシリンで対比染色を行った。滑膜表層、特に sublining layer において ADAMTS-4 (A, D) と ADAMTS-5 (B, E) の発現を認めた。パニヌスでも ADAMTS-4 と ADAMTS-5 の発現を認めた (C, F)。スケールバーは、(A) と (D) で 200 $\mu$ m、(B) と (E) で 50 $\mu$ m、(C) と (F) で 100 $\mu$ m を示している。

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



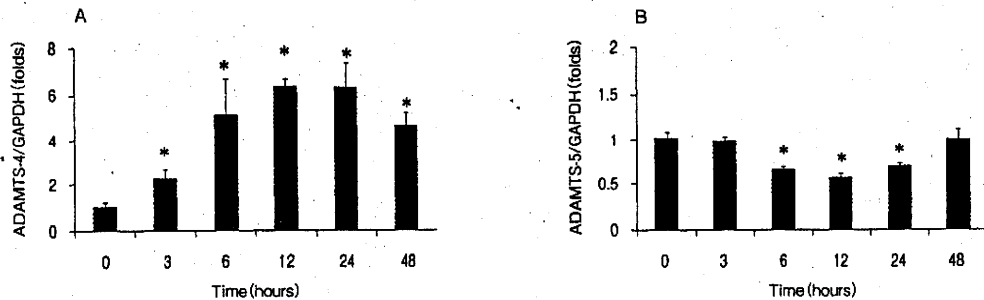


図2. RA患者由来のFLSにおけるIL-6/sIL-6R添加後のADAMTS-4とADAMTS-5の発現変化。

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Dunnett'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ヌスで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

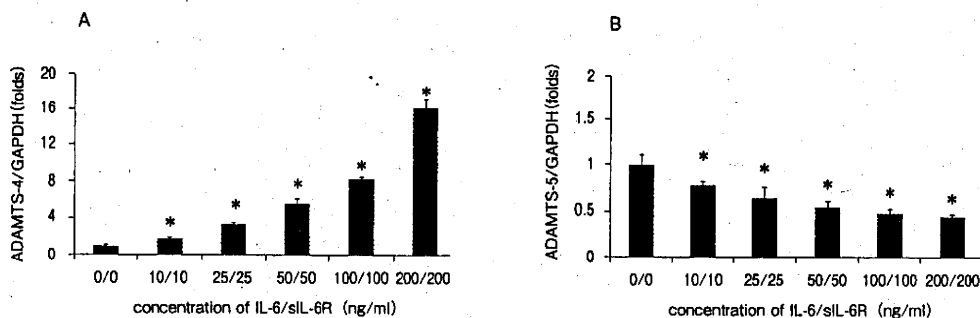


図3. IL-6/sIL-6R添加濃度によるADAMTS-4とADAMTS-5の発現の検討。IL-6とsIL-6Rをそれぞれ0~200ng/mlの濃度で添加し24時間培養した。IL-6/sIL-6R無添加のADAMTS-4またはADAMTS-5の発現レベルを1として相対値で示した。各値は3回行った培養結果の平均値を示しており、バーは標準偏差を示している。図で示した結果は3回独立して行った実験結果の代表例である。

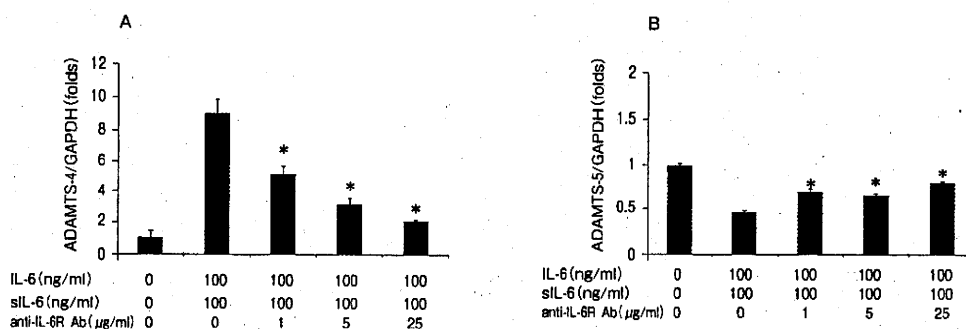


図4. 抗IL-6受容体抗体添加によるADAMTS-4とADAMTS-5の発現への影響。IL-6とsIL-6Rをそれぞれ100ng/mlの濃度で添加、同時に抗IL-6受容体抗体を0~25µg/mlの濃度で添加し培養した。IL-6/sIL-6R無添加のADAMTS-4またはADAMTS-5の発現レベルを1として相対値で示した。各値は3回行った培養結果の平均値を示しており、バーは標準偏差を示している。図で示した結果は3回独立して行った実験結果の代表例である。

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<sup>15-18)</sup>。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<sup>18)</sup>。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<sup>33-35)</sup>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 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 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<sup>15, 16, 22, 23)</sup>。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<sup>24, 25)</sup>。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<sup>31, 32)</sup>。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<sup>36, 37)</sup>とStantonら<sup>38)</sup>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<sup>16)</sup>。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者で、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 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<sup>15, 16, 22, 23)</sup>。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<sup>31, 32)</sup>。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<sup>39)</sup>、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<sup>40)</sup>。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- $\beta$ . *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- $\beta$  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 $\kappa$ B $\alpha$  into human osteoarthritis synovial fibroblasts demonstrates that several matrix metalloproteinases and aggrecanases are nuclear factor- $\kappa$ 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 TL-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- $\alpha$  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- $\alpha$  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<sup>1),2)</sup>, Akihisa KAMATAKI<sup>1)</sup>, Shinya OIKAWA<sup>1),2)</sup>,  
Kenya MURAKAMI<sup>1),2)</sup> and Takashi SAWAI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Pathology, Iwate Medical University,  
School of Medicine, Morioka, Japan

<sup>2)</sup> 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.