

変形性関節症患者滑膜組織の A desintegrin and metalloprotease-10(ADAM-10) 発

現についての検討

昭和大学医学部整形外科学講座

山村 亮 豊島 洋一 稲垣 克記

昭和大学リウマチ膠原病内科

磯崎 健男

昭和大学江東豊洲病院リウマチ膠原病内科

笠間 毅

抄録：【目的】 A disintegrins and metalloproteinase(ADAM) family は 21 種類が同定されており、Osteoarthritis(OA) や Rheumatoid Arthritis(RA) の病勢に密接な関係があることが分かってきた。これまで OA 軟骨に関連した報告は数編あるものの、OA 滑膜組織や線維芽細胞に関連する報告は少ない。今回、滑膜組織と線維芽細胞での ADAM-10 発現調節とその機能解析を行った。

【方法】 1) 健常者 (NL) 群と OA 群の滑膜線維芽細胞を炎症性 cytokine(TNF- α) で刺激後に Western blotting を施行し、ADAM-10 発現の差を検討した。2) NL 血清(n=29) と OA 患者(n=16)血清中の ADAM-10 濃度を ELISA 法にて測定した。3) NL 群と OA 群の関節組織より分離培養した滑膜組織と滑膜線維芽細胞での ADAM-10 発現を免疫染色法で検討した。

【結果】 1) OA 群血清中の ADAM-10 は NL 群に比して有意に高値であった。(579 \pm 84pg/mL and 97 \pm 26, respectively, P<0.05) これは年齢・性別・BMI・高血圧の有無に関連性はなかった。さらに OA 血清での発現レベルは Kellgren-Lawrence grading scales(K-L)で病期が進行すると増加する傾向にあったが、末期である gradeIV では中等度の II-III 群に比較して低い傾向にあった。2) OA 滑膜線維芽細胞において、TNF- α 刺激により Western blotting を行ったところ、非刺激細胞よりも ADAM-10 発現が顕著であった。3) 滑膜組織・

線維芽細胞ともに、正常よりも OA で ADAM-10 発現が顕著であった。

【結論】 ADAM10 が OA 患者の血清と滑膜において、健常者と比較して高く発現していることが判明した。これは OA に対して ADAM-10 が炎症性変化進行に関与していることを示唆している。また、ADAM-10 は TNF- α 刺激下で滑膜組織に強く発現を認めており、ADAM-10 が炎症性 cytokine によって惹起されていることを示している。これらの結果は、OA と ADAM-10 との関連性が高く、細胞の増殖や炎症惹起に重要な役割を担っていることを示している。今後、ADAM-10 を抑制することが出来れば、OA の発症や進行の抑止に繋がる可能性も示唆された。

【キーワード】

ADAM-10, osteoarthritis, 滑膜組織、滑膜線維芽細胞

変形性関節症 (OA) は関節病での主たるものであり、関節軟骨の喪失と軟骨のリモデリング、滑膜の炎症によって特徴づけられている¹⁾。OA は膝、股、脊椎、手、足関節などの体重のかかるあらゆる関節の慢性的な疼痛や機能不全を引き起こす²⁻⁴⁾。病理学的に、OA の炎症細胞は滑膜組織 (synovial tissues ;STs) や骨組織のマクロファージである。これは tumor necrosis factor alpha (TNF- α) や interleukin-1 β などのサイトカインやケモカインを産生する⁵⁻¹⁰⁾。

A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) は細胞表面に様々なタンパクを発現させる役割を担っている^{11,12)}。ADAM-10 は ADAM ファミリーの一つであり、様々な酵素の shedding 因子として働く^{13,14)}。これは炎症や癌の発育、アレルギー反応のような種々の生理学上のプロセスに関わる役割があり¹⁵⁻¹⁸⁾、fractalkine/CX3CL1 や CXCL16 などの炎症性あるいは血管新生促進因子の血管内皮細胞表面からの切り離しに重要な酵素と考えられている¹⁹⁻²⁰⁾。これまでの研究で ADAM-10 は関節リウマチ (RA) に関与していると報告されている²¹⁾。しかしながら、OA 滑膜組織での ADAM-10 発現はまだ明確にはされていない。今

回われわれは、OA と ADAM-10 の関連性とその発現について、OA 患者と非 OA 患者の生体試料・組織を用いて検討した。

研究方法

患者

OA の滑膜は人工膝関節全置換術を施行した患者から術中に採取した。OA 膝は世界で最も使用されている Kellgren-Laurence grading scale (K-L)²⁴⁾ を用いて、grade II-IV に属するもののみ限定した。16 膝であり、この群を OA 群とした。正常滑膜は、前十字靭帯再建術や半月板切除術を施行した患者から術中採取した。29 膝であり、この群をコントロール群とした。これらの採取した滑膜組織は、免疫組織学的解析のために凍結保存とした。

細胞

線維芽細胞は、採取した滑膜組織から分離培養し実験に供した⁽²²⁾。分離した細胞は、10%FBS/RPMI1640 培地で six-well plate (BD Bioscience 社製)を用いて、各 well に 1×10^5 /ml として 37°C で培養した。一晚血清を free としたのち、TNF- α (R&D Systems 社製)にて刺激を行った。

Western blotting

24 時間 TNF- α (20 ng/ml)で刺激された細胞を用いたのちタンパクを抽出した。

タンパク濃度は Pierce bicinchoninic acid protein assay (Pierce 社製)を用いて測定し、同様の濃度になるように調節した。Western blotting はこれまでと同様に電気泳を Laemmli 法に準じて施行した²¹⁾。そしてタンパクを semi-dry transblotting apparatus(Bio-Rad 社製)を使用してセルロース膜に転写した。プロットは ADAM10 に対する Abcam 社製の抗体を使用した。タンパク量の確認をするために、 β -actin を用いて確認した (Sigma-Aldrich 社製)。

ELISA

OA 患者とコントロール群の血清中の ADAM10 濃度は MyBiosource 社製のキットを用いてプロトコール通りに測定した。検出域は 7.8pg/ml から 500pg/ml とし、最小検出量 1.95pg/ml であった。

免疫組織学的解析

組織は液体窒素を用いて凍結保存し、免疫ペルオキシダーゼ法を使用して染色した。滑膜組織と線維芽細胞は20分間アセトンで固定した。ペルオキシダーゼを3% H_2O_2 で5分間ブロックした。滑膜組織はPBSに5% goat serumと20%を加えて37°Cで1時間ブロッキングし、ブロッキングバッファーに rabbit anti-human ADAM-10 antibody (Abcam社製) 25 μ g/mlを加えて4°Cで一夜保管した。作成したスライドはPBSで洗浄し、ビオチン標識されたgoat anti-rabbit antibodyを200倍に

希釈したものに浸して37°Cで30分保管し、その後、ヘマトキシリンを用いて染色を施行した。

統計学的解析

$P < 0.05$ を有意差ありとし、統計解析はMann-Whitney testを用いた。

本研究は、昭和大学医学部 人を対象とする研究等に関する倫理委員会で承認されている(承認番号1674)

結果

炎症性サイトカインの刺激により滑膜線維芽細胞におけるADAM-10が惹起されるかをWestern blottingを施行した。蛋白レベルでのADAM-10発現は、非刺激のものと比較して、TNF- α 刺激下の滑膜線維芽細胞が有意に高かった (Figure 1)。

OA患者とNL群のADAM-10発現レベルをELISA法にて測定した。OA患者 (n=16) のADAM-10発現は、NL群 (n=29)と比較して有意に高値であった (579 ± 84 pg/ml and 97 ± 26 pg/ml, Figure 2A)。K-L分類IIおよびIII (n=9)でのADAM10発現はK-L分類IV (n = 7)よりも有意に高かった (728 ± 100 pg/ml and 387 ± 104 pg/ml, respectively, Figure 2B)。患者の特徴に関してはTable1の通りである。年齢・性別・BMIは結果に相関性を認めなかった (table1)。

	OA (n = 16)	Healthy controls (n = 29)
Age	78.6 ± 9.8	72.2 ± 7.4
Females (%)	14 (88%)	25 (86%)
BMI	24.0 ± 3.2	22.9 ± 2.8
K-L (II/III/IV)	(1/8/7)	

Table 1. Summary

of patient characteristics (mean ± SD)

免疫組織学的解析を行った。ADAM-10は滑膜細胞・線維芽細胞両方において、炎症性サイトカインの存在により発現が惹起された。ADAM-10陽性の細胞はOA滑膜組織内に観察された (Figure 3A and B)。さらにOA滑膜線維芽細胞にも発現していることが分かった (Figure 3C and D)。

考察

今回の研究で、OA患者の血清と滑膜組織にADAM-10が発現しており、健常者群と比較して有意に高いことが判明した。これらの結果は変形性膝関節症に

ADAM-10 が炎症性変化進行に関与していることを示唆している。ADAM-10 発現は、年齢・性別・BMI の有無には相関しなかった。興味深いことに、OA 血清での ADAM-10 発現レベルは KL 分類での grade II および III に高かったが、grade IV になると有意に低くなっていることが判明した。この結果は、滑膜の炎症は OA 初期～中期段階に最も強いことを示唆している。KL grade IV の段階になると、炎症よりも高度な関節内破壊のために物理的構造変化が主体となるために発現が低下するものと考えられる。以上のことより、ADAM-10 は OA 初期～中期の滑膜炎症性が高い状態で最も産生されることが示唆された。

OA は不可逆性の関節破壊が特徴であるが、種々の治療法が存在し、マトリックスマタルプロテアーゼや ADAM のようなアグリカンや II 型コラーゲ等が関与している。今回の研究で、われわれは、OA 滑膜線維芽細胞と滑膜細胞に ADAM-10 が多く発現していることを明らかにした。このことは、OA で ADAM-10 が滑膜線維芽細胞で産生されていることを示唆し、血清中の ADAM-10 はこれらの細胞から遊離しているものとする。ADAM と OA との関係性については、小宮らが OA と RA では ADAM-10 の RNA 量はほぼ変わらないと報告している²³⁾。一方、われわれは以前の研究で、正常滑膜細胞に比して OA 滑膜細胞のほうで ADAM-10 濃度が高かったことを報告した²¹⁾。今回われわれは OA 滑膜組織において、ADAM-10 が発現していることを示したが、さらに滑膜線維芽細胞のレベ

ルで実際に炎症性の病態がどのように関与しているかを検討するために、OA 滑膜線維芽細胞の ADAM-10 発現が炎症性サイトカインによって影響を受けるかを検討した。結果的には、TNF- α で刺激された OA 線維芽細胞は非刺激群に比べて ADAM-10 発現が増加していることを認め、炎症性サイトカインによる影響を受けていることが考えられた。以上の結果より、ADAM-10 は OA に対する炎症惹起の一因となっていることが推測された。

結論

ADAM-10 は OA 血清に発現しており、これは正常血清よりも有意に高発現していた。また、滑膜組織にも発現していた。さらに TNF- α 刺激下で滑膜組織にも高発現を認めた。OA の中でも炎症の強いと考えられる初期から中期にかけて ADAM-10 は高発現しているのに対して、末期には ADAM-10 の発現量は減少していた。これらの結果は、OA において ADAM-10 の重要性を示しており、ADAM-10 発現を抑えることが出来れば OA 進行の抑止に繋がる可能性も示唆している。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文献

- [1] Blalock D, Miller A, Tilley M, Wang J. Joint Instability and Osteoarthritis. Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord. 2015;8:15-23.
- [2] Mabey T, Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. World J Orthop. 2015;6:95-105.
- [3] Wang L, Guo L, Tian F, et al. T. Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms within ADAM12 and Risk of Knee Osteoarthritis in a Chinese Han Population. Biomed Res Int. 2015;2015:5 (2015/6/15 アクセス) <http://dx.doi.org/10.1155/2015/518643>.
- [4] Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB. Osteoarthritis a tale of three tissues. Bull

NYU Hosp Jt Dis. 2008;3:244-50.

[5] Brown RA, Weiss JB. Neovascularisation and its role in the osteoarthritis process. *Ann Rheum Dis* 1988;47:881-5.

[6] Franses RE, McWilliams DF, Mapp PI, et al. Osteochondral angiogenesis and increased protease inhibitor expression in OA. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18:563-71.

[7] Mapp PI, Walsh DA. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:390-8.

[8] Jovanovic D, Pelletier JP, Alaaeddine N, et al. Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritis synovium and synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998;6:40-49.

[9] Shingu M, Miyauchi S, Nagai Y, et al. The role of IL-4 and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation. *Br J Rheumatol*. 1995;34:101-106.

[10] Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:4076-80.

[11] Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 2008;29:258-89.

[12] Dreytmüller D, Pruessmeyer J, Groth E, et al. The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur J Cell Biol.* 2012;91:472-85.

[13] Yuan S, Lei S, Wu S. ADAM10 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma and contributes to the proliferation, invasion and migration of HepG2 cells. *Oncol Rep.* 2013;30:1715-22.

[14] Saftig P, Reiss K. A The 'Disintegrin And Metalloproteases' ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol.* 2011;90:527-35.

[15] Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, et al. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* 2008;102:1192-201.

[16] McCulloch DR, Akl P, Samarasinghe H, et al. Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP. *Clin Cancer Res.* 2004;10:314-23.

[17] Eichenauer DA, Simhadri VL, von Strandmann EP, et al. ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro. *Cancer Res* 2007;67:332-8.

[18] Weskamp G, Ford JW, Sturgill J, et al. ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat Immunol.* 2006;7:1293-8.

[19] Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, et al. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood.* 2003;102:1186-95.

[20] Giugliano PJ, Garton KJ, Wille PT, et al. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol.* 2004;172:3678-85.

[21] Isozaki T, Rabquer BJ, Ruth JH, et al. ADAM-10 is overexpressed in rheumatoid arthritis synovial tissue and mediates angiogenesis. *Arthritis Rheum.* 2013;65:98-108.

[22] Hanyuda M, Kasama T, Isozaki T, et al. Activated leucocytes express and secrete macrophage inflammatory protein-1alpha upon interaction with synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis via a beta2-integrin/ICAM-1 mechanism. *Rheumatology.* 2003;42(11):1390-7.

[23] Komiya K, Enomoto H, Inoki I, et al. Expression of ADAM15 in rheumatoid synovium: up-regulation by vascular endothelial growth factor and possible implications for angiogenesis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1158-73.

[24] 田中純一, 坪井寿一, 岡村博 中等度と重度の変形性膝関節症 (K-L 分類グ

レード 3 と 4) に対する保存療法の成績. 関東整形災害外科学会雑誌 2010;

41 (6) :387-391

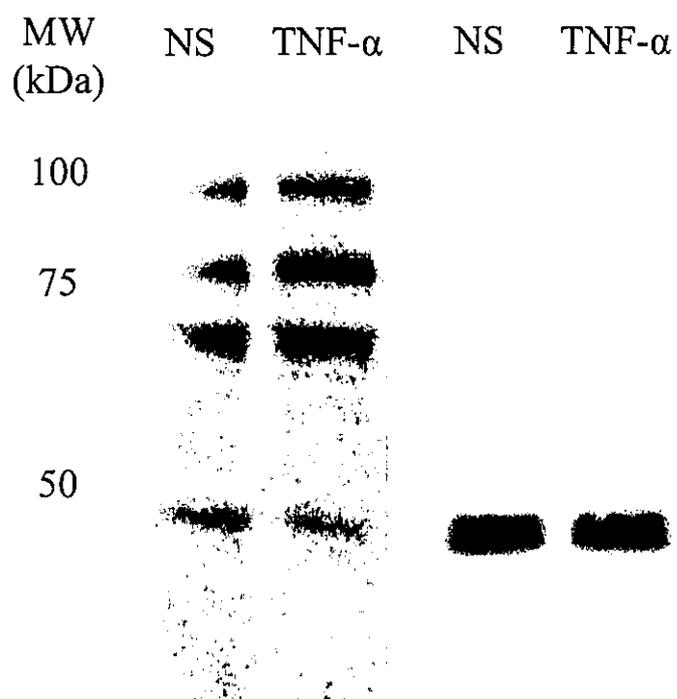


Figure 1.

ADAM-10 expression at the protein level was elevated in TNF- α -stimulated FLSs compared with unstimulated FLSs.

the mean concentration of ADAM-10 in the serum. A) Serum of OA patients contained more ADAM-10 than the serum of controls (mean \pm SEM: 579 \pm 84 pg/ml and 97 \pm 26 pg/ml, respectively, $p < 0.05$). B) ADAM-10 expression in K-L scales II and III was significantly higher than that in K-L scale IV (728 \pm 100 pg/ml and 387 \pm 104 pg/ml, respectively, $p < 0.05$) (n = number of patients)

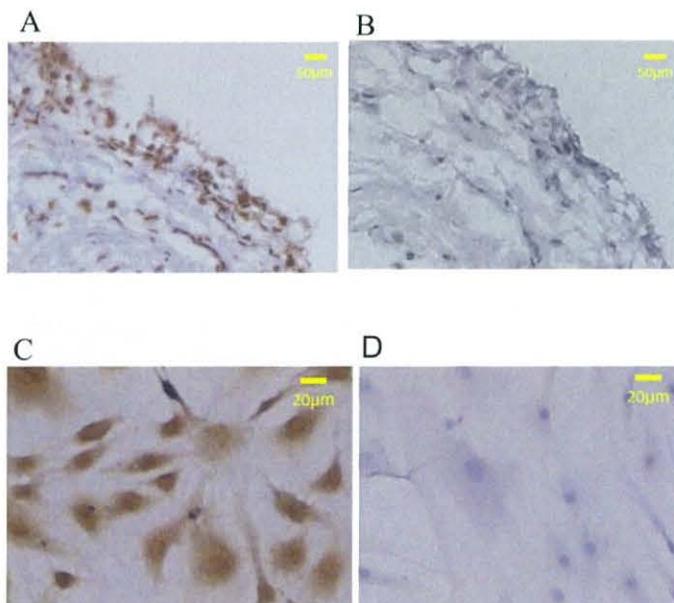


Figure 3.

ADAM-10 is expressed in OA STs and FLSs. [(A and B) Cryosections were stained for ADAM-10. Representative photomicrographs of synovial tissue (ST) samples from OA patients. (A) ADAM10 expression in ST lining cells. (B) Rabbit IgG as the negative

control. Original magnification, ×100. (C and D) Cultured OA FLS were stained for ADAM-10 (C) or rabbit IgG as the negative control (D)] Original magnification, ×400

A disintegrin and metalloprotease-10 is expressed in the synovial tissues of patients with osteoarthritis

Ryo Yamamura¹, Takeo Isozaki², Tsuyoshi Kasama^{2, 3}, Yoichi Toyoshima¹, and Katsunori Inagaki¹

¹Department of Orthopedics, Showa University School of Medicine, ²Division of Rheumatology, Department of Medicine, Showa University School of Medicine, and ³Department of Medicine, Showa University Koto Toyosu Hospital, Tokyo, Japan

Abstract

Background: A disintegrin and metalloprotease family proteins (ADAMs) are involved in numerous inflammatory conditions. We have previously shown that ADAM-10 is

overexpressed in rheumatoid arthritis (RA). However, the role of ADAM-10 inflammation associated with osteoarthritis (OA) is still unclear.

Materials and Methods: ADAM-10 in tumor necrosis factor- α (TNF- α)-treated OA FLS was measured using western blotting. ADAM-10 in OA and healthy control serum was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ADAM-10 in OA synovial tissues (ST) and fibroblast-like synoviocytes (FLS) were detected using immunohistochemistry.

Results: ADAM-10 expression was significantly higher in the serum of OA patients than in the serum of controls (579 ± 84 pg/ml and 97 ± 26 pg/ml, respectively). In addition, the expression of ADAM-10 in Kellgren–Lawrence grading scale (K-L scale) II and III in the serum of OA patients was significantly higher than that in K-L scale IV. ADAM-10 was expressed in OA ST lining cells and fibroblast-like synoviocytes (FLSs). Hence, ADAM-10 was overexpressed in tumor necrosis factor alpha-stimulated OA FLSs compared with untreated FLSs.

Conclusion: These data indicate that ADAM-10 plays a role in inflammatory changes in OA and suggest that targeting ADAM-10 provides a method for decreasing inflammation.

Keywords: ADAM-10, osteoarthritis, ST,FLS