

原 著

関節リウマチ滑膜病変における A disintegrin and metalloprotease (ADAM)-15 の役割：血管新生の側面からの検討

昭和大学医学部内科学講座（リウマチ・膠原病内科学部門）

西見慎一郎* 磯崎 健男 笠間 毅

昭和大学医学部整形外科学講座

稲垣 克記

抄録：A disintegrin and metalloprotease (ADAM) family はメタロプロテアーゼの一つとして RA の滑膜組織での発現が報告されている。RA 滑膜病変における ADAM-15 の血管新生における役割について検討を行った。① RA 患者血清と関節液中の ADAM-15 濃度を ELISA 法にて測定した。また、免疫染色法にて、RA 滑膜組織中の ADAM-15 の発現を検討した。②ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVECs) を siRNA 法にて ADAM-15 の発現を抑制し、上清中のサイトカイン (epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide (ENA)-78/CXCL5, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1) の産生、細胞形態変化および単球の接着能を検討した。RA 関節液を HUVEC の培養液に添加し、Matrigel assay 法にて管腔形成能を、adhesion assay 法にて THP-1 細胞の HUVEC に対する接着能の検討を行った。① RA における血清中 ADAM-15 の濃度は健常人 (NL) に比較して有意に高値であり (RA 500 ± 21 pg/ml, NL 390 ± 29 pg/ml, $p < 0.05$)、抗リウマチ薬 (トシリズマブ) の加療にて 24 週後、54 週後の血清中の ADAM-15 の濃度は有意に低下していた。関節液中では高発現しており、免疫染色にて滑膜組織の血管で ADAM-15 の発現を認めた。② ADAM-15 を siRNA 法で抑制することにより HUVEC の ENA-78/CXCL5, ICAM-1 の産生は低下し、Matrigel assay 法では管腔形成数の低下、Adhesion assay では、THP-1 の接着の低下が認められた。ADAM-15 は RA 患者の血清中および関節液中に存在し、疾患活動性に関連している可能性がある。RA 滑膜組織では血管壁に発現していることが確認され、内皮細胞のサイトカインの産生や血管新生現象を促進し病変形成に関与している可能性が示唆された。

キーワード：関節リウマチ, ADAM-15

緒 言

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は関節滑膜の慢性炎症により軟骨を破壊し、機能を低下させる疾患である¹⁾。RA の滑膜組織では血管新生とリンパ球や単球などの炎症性細胞浸潤のために増殖性変化が生じる。RA の病態形成には tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-6 などのサイトカインも大きく関与している^{2,3)}。RA の治療は、経口抗リウマチ薬が第一選択薬であるが、複数の経口抗リウマチ薬を用いても寛解導入に至ら

ない症例には、近年、TNF- α や IL-6 を治療のターゲットにした生物学的製剤が開発されており、劇的な治療の効果を遂げつつある⁴⁻⁷⁾。しかし、これらのサイトカインの抑制治療を行っても治療の効果が得られない症例も散見される。

血管新生は RA だけでなく、創傷の修復などにも関与している。血管新生には内皮細胞の増殖、遊走、接着、管腔形成といったプロセスが必要であり、これらの過程には fibroblast growth factor や vascular endothelial growth factor (VEGF) が関与している⁸⁾。また単球系細胞が内皮細胞に接着し

*責任著者

組織内に移行することで内皮細胞をはじめとした細胞遊走を引き起こすと考えられている。その他、interleukin (IL)-8/CXCL8 や fractalkine/CX3CL1 などの多くの炎症性因子が血管新生因子として同定されており、RA 組織や関節液中に存在することが報告されている^{9,10)}。病理学的には滑膜表層細胞の重層化、炎症細胞の浸潤、血管新生が特徴的な所見であり、血管新生は滑膜炎の強さと比例して増強される。RA 滑膜では、自律的に VEGF が産生されており産生された、VEGF は A disintegrin and metalloprotease (ADAM) family により細胞表面から切り離された可溶性 VEGF になることが報告されている¹¹⁾。これらの血管新生因子も病態の進行において重要な役割を担っており、いくつかは治療のターゲットとして利用されている¹²⁾。

ADAM family はメタロプロテアーゼ構造とディスインテグリン構造の2つの異なる機能領域を持つ蛋白であり、現在 30 種類以上が同定されている¹³⁾。ADAM family は細胞表面からサイトカインをはじめとする多くの炎症性因子を切り離す酵素として重要な役割を担っている^{14,15)}。そのうち ADAM-15 は分子量約 90 kDa の蛋白であり、細胞接着、遊走に関与している。また、血管内皮細胞でも発現が確認されており、ADAM-15 ノックアウトマウスでは血管新生が抑制されることも報告されている¹⁶⁾。これまでに ADAM-15 が発現される疾患として、乳癌や前立腺癌等の悪性腫瘍が報告され、癌細胞の細胞接着、遊走、血管新生といった観点から主に転移に関与していることが示唆されている¹⁷⁾。RA の治療の中心となる TNF- α が細胞内で産生されたのち血中もしくは組織中へ可溶性 TNF- α として分泌されることに ADAM-17 が関与しており、われわれも RA 血清中に ADAM-17 が高発現していることを報告している¹⁸⁾。また、ADAM-10 は RA 滑膜組織での発現が確認されており、血管内皮細胞の遊走や炎症性サイトカインの産生に深く関与している¹⁹⁾。一方、他の ADAM family と RA の関連については ADAM-15 が滑膜組織において mRNA レベルでの発現上昇として報告されているものの、その病態の解析は十分に検討されていない²⁰⁾。今回、われわれは RA 滑膜における ADAM-15 の発現とその役割について、血管新生の面より解析を行った。

研究方法

1. 患者検体サンプル

2008 年から 2012 年までの間に昭和大学病院にて、RA または変形性関節症 (osteoarthritis : OA) と診断された患者の検体を用いた。RA 滑膜組織は人工関節置換にて得られた組織を実験に供した。21 例 (女性 20 例, 男性 1 例) のトシリズマブで加療した RA 患者血清を用いた。RA 患者血清は治療前、治療 12 週後、24 週後、52 週後に採取した。なお、トシリズマブは抗 IL-6 受容体抗体で、IL-6 の作用を抑制し免疫抑制効果を示す分子標的治療薬である。また RA と OA の関節液は患者より穿刺により得られたものを使用した。健常人 (NL) 検体に関しては、ボランティアにより提供されたものを用いた。なお、本研究は昭和大学医学部医の倫理委員会で承認され、文書にて同意を得た患者の検体を用いた (承認番号 : 1892)。

2. 細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) は Lonza (Walkersville, MD) から購入し、培養液は Lonza より購入した成長因子 (EGF, bFGF, IGF, VEGF) を添加した 5% FBS を含んだ内皮細胞培養液を用いて培養を行った。細胞刺激については、前日に 0.1% FBS/EBM-2 へ変更し、実験当日に TNF- α 20 ng/ml (R & D Systems, MN) で 24 時間刺激を行った。THP-1 cells (human acute monocytic leukaemia cell line) は American Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入し、10% FBS/RPMI 1,640 medium (Thermo Fisher Sci, Waltham, MA) にて培養を行った。

3. 免疫染色

RA 滑膜における ADAM-15 の発現を調べるために、免疫染色を行った。RA 滑膜組織は -80°C で保存したものを 10 μm で薄切し、スライドに貼り付けたものを用いた。RA 滑膜組織を PBS で洗浄後に 4°C のアセトンで 20 分間固定した。スライドは 20% FBS と 5% goat serum で 60 分間ブロッキングを行った。その後、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の rabbit anti-ADAM-15 抗体 (Abcam, Cambridge, MA) もしくは control IgG (rabbit IgG) を 1 次抗体として 4°C 下で overnight させた。翌日 PBS で洗浄後、Biotinylated goat anti-rabbit IgG を 2 次抗体として 60 分間反応

させた。ABC 試薬を各切片に添加して 37°C で 30 分間反応させた。再度 PBS で洗浄し、その後 DAB で反応させた。最後にヘマトキシリンを用いて対比染色を行った。

4. HUVEC の ADAM-15 の抑制

ADAM-15 の RA への役割を検討するために、HUVEC に ADAM-15 short interfering RNA (siRNA) を組み込んで実験を行った。ADAM-15 siRNA および control siRNA は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) より購入したものを最終的に 50 nM に調整して用いた。

HUVEC を 6-well plates に 1×10^5 cells/well に調節して使用した。ADAM-15 もしくは control siRNA を TransIT-TKO transfection reagent (Mirus, Madison, WI) にて調節し HUVEC に組み込んだ。ADAM-15 のノックダウンの確認は Western blotting 法を用いて行った。

5. ELISA

RA 患者血清および HUVEC 上清中の ADAM-15, epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide (ENA)-78/CXCL5 および intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 の測定は R & D Duo kit (R & D Systems) を用いて同社のプロトコールに従って行った。簡潔に述べると、96 well plate に capture antibody として mouse anti-human ADAM-15, ENA-78/CXCL5 および ICAM-1 antibody をコートした。翌日、血清、関節液もしくは細胞上清とともにリコンビナント蛋白をスタンダードとして加えた。Biotinylated mouse anti-human ADAM-15, ENA-78/CXCL5 もしくは ICAM-1 antibody を detection antibody として用いた。Streptavidin-peroxidase 法を用いて、TMB にて発色させた。吸光度は 450 nm とした。

6. Matrigel assay

ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC を 8 well Labtek chamber slide に入れた Matrigel (150 μ l/well) 上に 1.8×10^4 個/well で播種し、5 名の RA 患者から得られた関節液を遠心し上清を 100 倍希釈となるように添加して 8 時間培養し検討を行った。管腔形成数や管腔間橋数は別の実験者がブラインド下に対物 100 倍にて 1 well あたりランダムに 3 か所でカウントを行った。なお、細胞管腔間橋は細胞と細胞が 1:1 でつながっているものと定義し、細胞管腔はそれらがつながり、円を形成したものとした。

7. Adhesion assay

ADAM-15 siRNA もしくは control siRNA を組み込んだ HUVEC への THP-1 の接着能を評価するために、96 well plate に HUVEC 4.0×10^3 個/well を培養し、20 ng/ml の TNF- α で 24 時間刺激をした。THP-1 を Calcein AM fluorescent dye (Life Technologies, 5 μ M) で蛍光化し、 1×10^5 /well の濃度にて HUVEC 上で、37°C、30 分間反応させた。PBS で洗浄後、absorbance (吸光度 485/528 nm) で測定し、control siRNA との比率を求めた。

8. 血清 ADAM-15 の濃度と RA 疾患活動性

RA 血清中の ADAM-15 の濃度と RA の疾患活動性との相関を見るために disease activity score (DAS) 28 を用いて検討を行った。なお、DAS 28 は主要 28 関節についての腫脹・圧痛、患者全般的評価 (10 cm visual analogue scale : VAS)、赤血球沈降速度を用いて計算する RA の疾患活動性評価の指標である。

9. 統計

各データは Student's *t*-test を用いて検討し、データは mean \pm SEM として、*p* 値は 0.05 未満を有意差ありとして示した。血清 ADAM-15 濃度と DAS 28 との相関関係に関してはピアソンの相関係数の検定を用いた。

結 果

1. 患者背景

21 例の RA 患者背景を Table 1 に示す。平均年齢は 51.7 \pm 3.43 歳であり、性別は男性 1 例、女性 20 例であった。RA の平均罹患年数は 7.3 \pm 1.9 年であり、DAS 28 の平均値は 4.83 \pm 0.29 であった。

2. 血清と関節液中の ADAM-15 濃度

RA 患者血清では、NL と比較して有意に ADAM-15 の濃度は高値であった (RA 500 \pm 21 pg/ml, NL

Table 1 患者背景

症例数 (女性 : 男性)	20 : 1
性別 (女性)	20
年齢 (年)	51.7 \pm 3.43
罹患年数 (年)	7.3 \pm 1.9
DAS 28	4.83 \pm 0.29

* DAS 28 : disease activity score 28

390 ± 29 pg/ml, $p < 0.05$, Fig. 1A). また, 関節液中の ADAM-15 は RA 患者関節液では, OA と比較して有意に高値であった (RA 619 ± 53 pg/ml, OA 328 ± 39 pg/ml, $p < 0.05$, Fig. 1B). さらに, トシリズマブ加療後の血清 ADAM-15 濃度は 24 週, また 54 週にわたって有意に低下していた (治療前 500 ± 21 pg/ml, 24 週 432 ± 22 pg/ml, 54 週 434 ± 22 pg/ml, $p < 0.05$, Fig. 1C). 血清 ADAM-15 濃度と DAS 28 は相関しなかった.

3. RA 滑膜組織および HUVEC における ADAM-15 の発現

RA 滑膜組織における ADAM-15 の発現を調べるために, 免疫染色を行った. ADAM-15 は滑膜組織

血管の内皮細胞と血管周細胞の細胞質に発現していることが確認できた (Fig. 2A, B, C).

4. 血管内皮細胞における ADAM-15 の細胞接着への役割

ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC では, control siRNA を組み込んだ HUVEC に比べて, THP-1 細胞の接着能は有意に低下していた (TNF- α 非添加: control siRNA 3539 ± 623, ADAM-15 siRNA 1914 ± 281, $p < 0.05$, Fig. 3B) (TNF- α 添加: control siRNA 9435 ± 1085, ADAM-15 siRNA 5659 ± 1084, $p < 0.05$, Fig. 3B).

5. 血管内皮細胞における ADAM-15 の管腔形成への役割

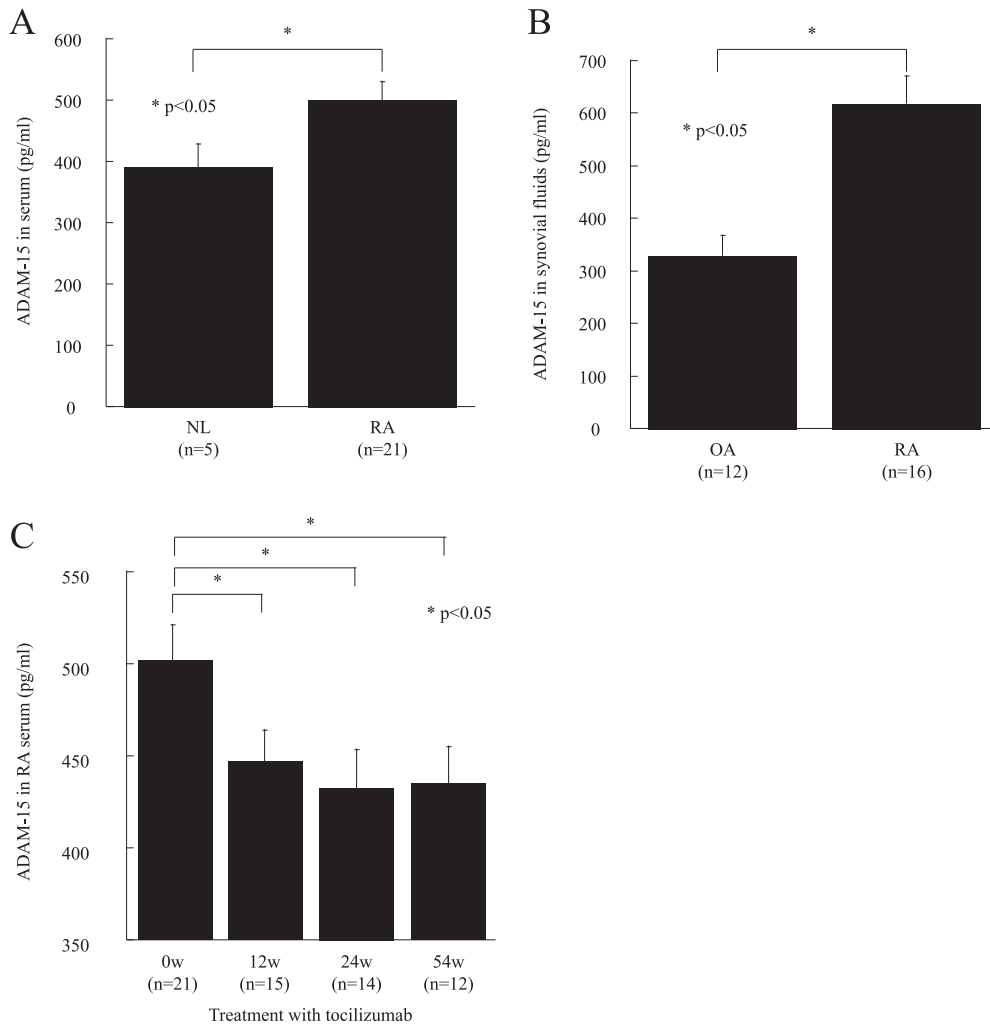


Fig. 1 血清および関節液における ADAM-15 の発現

A: RA 血清中には, NL と比較して ADAM-15 は有意に上昇していた.

B: RA 関節液中には, OA と比較して ADAM-15 は有意に上昇していた.

C: ADAM-15 は RA の治療によって, 血清中の濃度は低下していった (n = 患者数).

ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC では、RA 関節液添加条件下における管腔形成数は、control と比較して有意に低下していた (control 3.78 ± 0.62 , ADAM-15 siRNA 0.60 ± 0.18 , $p < 0.05$, Fig. 4A, B, C). 同様に ADAM-15 siRNA を組み

込んだ HUVEC では、RA 関節液添加条件下における細胞間橋数も、control と比較して有意に低下していた (control 13.8 ± 1.62 , ADAM-15 siRNA 6.80 ± 0.71 , $p < 0.05$, Fig. 4D). ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC では、RA 関節液添加した条件

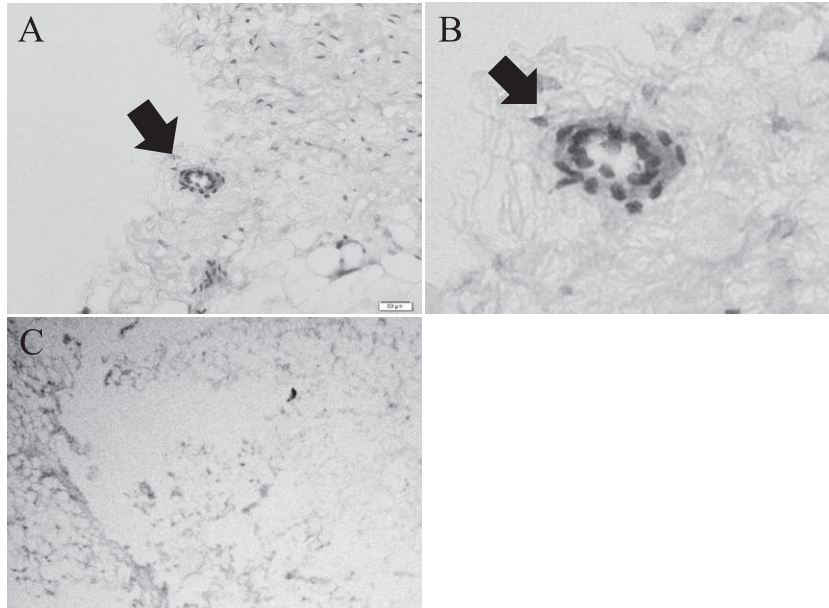


Fig. 2 RA 滑膜組織における ADM-15 の発現

- A : anti-ADAM-15 抗体、血管内皮や周細胞の細胞質に一致して、ADAM-15 の発現を認める (対物 200 倍).
 B : A の強拡大 (対物 400 倍).
 C : OA 組織の血管では陰性 (対物 200 倍).

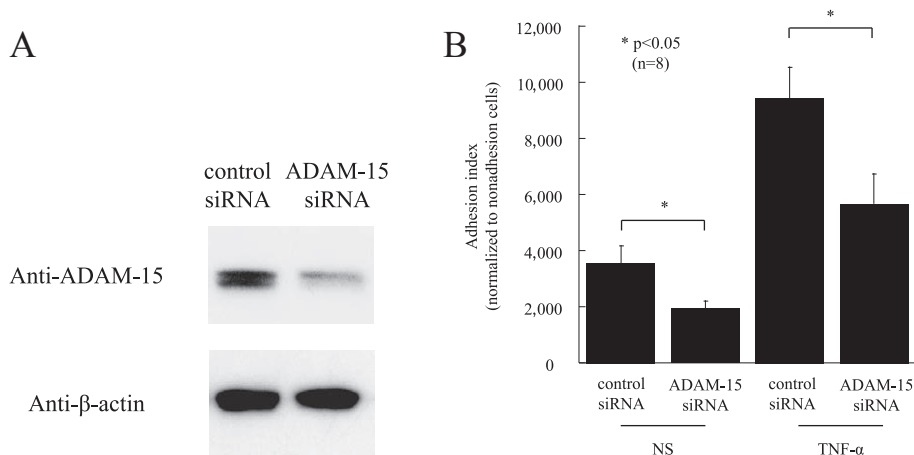


Fig. 3 HUVEC における ADAM-15 の抑制と接着における役割

- A : ADAM-15 の抑制について Western blotting にて確認した。
 B : control siRNA を組み込んだものと比較して、ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC では THP-1 の接着能は低下していた。また、TNF- α の刺激によっても同様に ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC では、control siRNA を組み込んだ HUVEC に比較して THP-1 の接着能は低下していた (n = well 数).

下における細胞間橋数は、非添加の場合に比べて有意に高値であった ($p < 0.05$).

6. ADAM-15抑制によるサイトカイン産生

ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC に、TNF- α 20 ng/ml で刺激した細胞上清中の ENA-78/CXCL5 および ICAM-1 は、control siRNA を組み込んだ HUVEC 上清と比較して、有意に低下していた。ENA-78/CXCL5 については、control siRNA と ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC 上清で、それぞれ 83 ± 5 pg/ml, 0 ± 0 pg/ml, $p < 0.05$ であった (Fig. 5A)。また、ICAM-1 については、control siRNA と ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC 上清で、それぞれ $1,845 \pm 11$ pg/ml, 164 ± 3 pg/ml, $p < 0.05$ であった (Fig. 5B)。

考 察

本研究は RA の臨床検体を用いて、ADAM-15 について RA の血清や関節液、また滑膜組織に発現していることを確認した最初の報告である。これまで ADAM-15 は主に悪性腫瘍領域での発現について多くの報告があった。Lorenzatti Hiles らは膀胱がんにおける ADAM-15 との関係で、進行がんや転移を来す患者ではがん組織における ADAM-15 mRNA が、非進行がんと比較して有意に高値であることを報告している²¹⁾。また、彼らは ADAM-15 の抑制にて進行が抑制されたと述べている。Dong らは肺がんの進行にとっても ADAM-15 の発現が転移において重要であることを報告している²²⁾。これらの報告からは、悪性腫瘍の進行において、サイトカインの細胞表面からの切断を介した転移について特に大

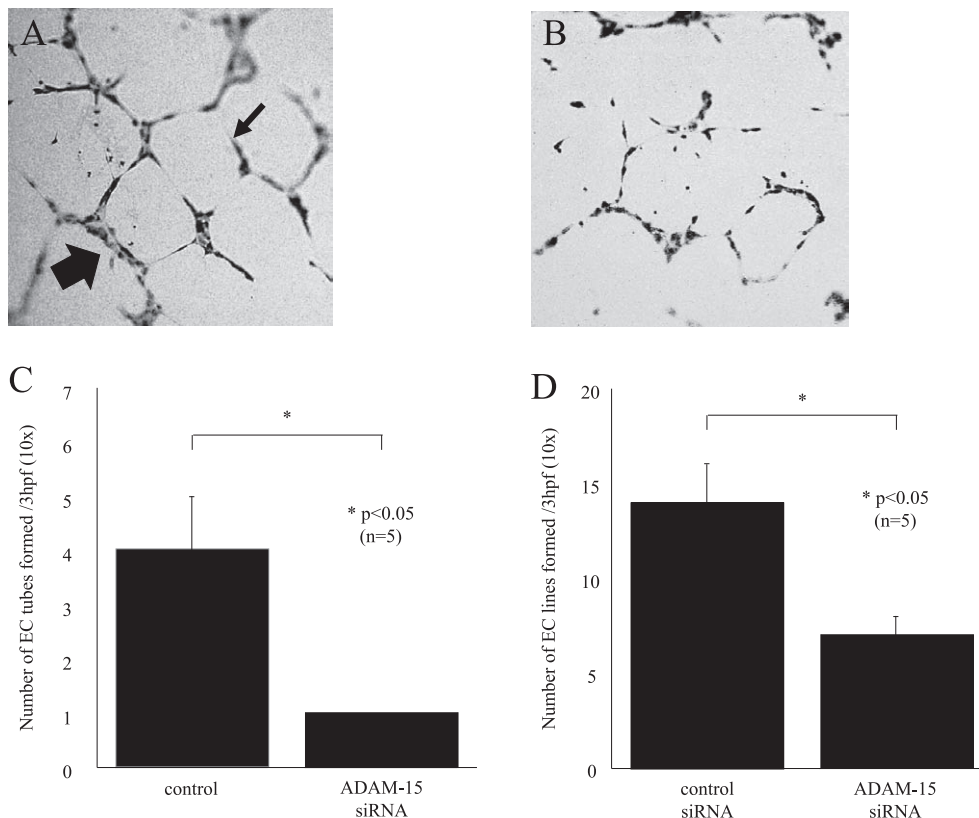


Fig. 4 Matrigel assay 法による RA 関節液添加時の HUVEC の管腔形成と細胞間橋形成の比較
 A : control siRNA を組み込んだ HUVEC の管腔形成 (太矢印は管腔形成, 細矢印は間橋形成).
 B : ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC の管腔形成.
 C : ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC の管腔形成数は control siRNA を組み込んだ HUVEC の管腔形成数よりも有意に低下していた。
 D : ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC の間橋形成数は control siRNA を組み込んだ HUVEC の間橋形成数よりも有意に低下していた (n = 患者数) (対物 100 倍)。

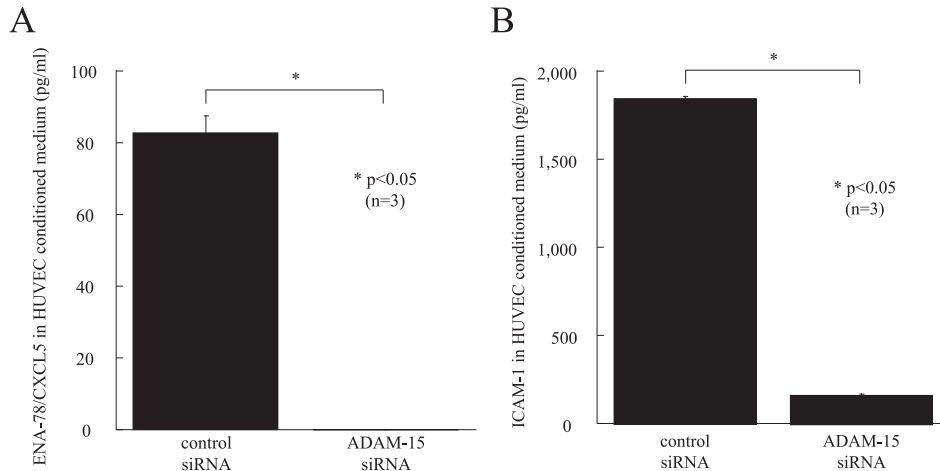


Fig. 5 ADAM-15 抑制によるサイトカインの産生への影響

A : 培養上清中の ENA-78/CXCL5 濃度は, control siRNA と ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC 上清でそれぞれ, 83 ± 5 pg/ml, 0 ± 0 pg/ml, p < 0.05 であった.

B : 培養上清中の ICAM-1 濃度は, control siRNA と ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC 上清でそれぞれ, 1,845 ± 11 pg/ml, 164 ± 3 pg/ml, p < 0.05 であった (n = 患者数).

きな役割を果たしていることが示唆されている。一方で, RA と ADAM-15 の発現の関連では, Komiya らは ADAM-15 mRNA の発現が OA 滑膜組織よりも RA 滑膜組織において高発現しており, 血管内皮細胞において VEGF の刺激により ADAM-15 の発現が亢進していることを示している²⁰⁾。われわれも, RA 滑膜組織において, 同様に蛋白レベルで ADAM-15 が滑膜組織の血管内皮細胞に発現していることを確認した。これらの結果より, ADAM-15 は滑膜組織血管内皮細胞において, 炎症に関係するサイトカインの調整に関与している可能性が示唆された。さらに, 血清や関節液にも存在すること, トシリズマブの治療によって血清 ADAM-15 が低下することは, ADAM-15 が血清中, 関節液中で高発現しており, ADAM-15 がサイトカインの放出を介して RA の病態悪化に関与していると考えられた。

血管新生の面からも本研究では新たな結果をもたらした。HUVEC において ADAM-15 は発現しており, siRNA 法にて ADAM-15 を抑制することで Matrigel での管腔形成は抑制された。ENA-78/CXCL5 は好中球の浸潤や血管新生に関与するケモカインであり, RA の関節液や滑膜組織で産生される²³⁾。ICAM-1 は細胞間相互作用を司る接着分子の一つで, 活性化リンパ球の内皮細胞への接着に関与する。今回,

ADAM-15 siRNA を組み込んだ HUVEC で, TNF- α 刺激下において, 細胞上清中の ENA-78/CXCL5 および ICAM-1 の濃度が低下していた。以上の結果より, ADAM-15 は ENA-78/CXCL5 および ICAM-1 の発現を調整し血管新生に関与している可能性が示唆された。

これらの結果をまとめると ADAM-15 は RA の血清や関節液に高発現しており, RA 滑膜組織では, 血管内皮や周細胞に存在することが確認された。また, 血清中の ADAM-15 は RA の治療により低下していくことから, 病勢を反映している可能性が示唆された。さらに, 血管内皮細胞での ADAM-15 発現の抑制により, サイトカインの産生低下を介しての血管新生の抑制が確認された。本研究の結果が, RA をはじめとする自己免疫疾患の病態の解明と治療の開発に役立つことが期待される。

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) Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388:2023-2038. Erratum in: *Lancet*. 2016;388:1984.
- 2) Kunkel SL, Lukacs N, Kasama T, et al. The role of chemokines in inflammatory joint disease. *J Leukoc Biol*. 1996;59:6-12.

- 3) Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001;344:907-916.
- 4) Thiolat A, Semerano L, Pers YM, *et al*. Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39 + regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:273-283.
- 5) Ducreux J, Durez P, Galant C, *et al*. Global molecular effects of tocilizumab therapy in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:15-23.
- 6) Yazici Y, Yazici H. Trial of etanercept and methotrexate with radiographic and patient outcomes two-year clinical and radiographic results: comment on the article by van der Heijde *et al*. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3061-3062.
- 7) Halpern MT, Cifaldi MA, Kvien TK. Impact of adalimumab on work participation in rheumatoid arthritis: comparison of an open-label extension study and a registry-based control group. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:930-937.
- 8) Hudlicka O. Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation*. 1998;5:7-23.
- 9) Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, *et al*. Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1994;93:921-928.
- 10) Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, *et al*. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992;258:1798-1801.
- 11) Weskamp G, Mendelson K, Swendeman S, *et al*. Pathological neovascularization is reduced by inactivation of ADAM17 in endothelial cells but not in pericytes. *Circ Res*. 2010;106:932-940.
- 12) Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438:932-936.
- 13) Rose-John S. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacol Res*. 2013;71:19-22.
- 14) Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 2008;29:258-289.
- 15) Rocks N, Paulissen G, El Hour M, *et al*. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie*. 2008;90:369-379.
- 16) Marezky T, Blobel CP, Guaiquil V. Characterization of oxygen-induced retinopathy in mice carrying an inactivating point mutation in the catalytic site of ADAM15. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:6774-6782.
- 17) Kuefer R, Day KC, Kleer CG, *et al*. ADAM15 disintegrin is associated with aggressive prostate and breast cancer disease. *Neoplasia*. 2006;8:319-329.
- 18) Umemura M, Isozaki T, Ishii S, *et al*. Reduction of serum ADAM17 level accompanied with decreased cytokines after abatacept therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Biomed Sci*. 2014;10:229-235.
- 19) 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.
- 20) 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-R1173.
- 21) Lorenzatti Hiles G, Bucheit A, Rubin JR, *et al*. ADAM15 is functionally associated with the metastatic progression of human bladder cancer. *PLoS One*. 2016;11:e0150138. (2017 Dec 1) <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150138>
- 22) Dong DD, Zhou H, Li G. ADAM15 targets MMP9 activity to promote lung cancer cell invasion. *Oncol Rep*. 2015;34:2451-2460.
- 23) Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, *et al*. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J Clin Invest*. 1994;94:1012-1018.

A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE 15, ADAM-15, EXPRESSED ON
RHEUMATOID ARTHRITIS SYNOVIAL TISSUE ENDOTHELIAL CELLS,
MEDIATES ANGIOGENESIS

Shinichiro NISHIMI, Takeo ISOZAKI and Tsuyoshi KASAMA

Department of Medicine, Division of Rheumatology, Showa University School of Medicine

Katsunori INAGAKI

Department of Orthopedic Surgery, Showa University School of Medicine

Abstract —A disintegrin and metalloprotease 15 (ADAM-15) is expressed in several malignancies. However, the relationship between ADAM-15 and rheumatoid arthritis (RA) is still unclear. In this study, we investigated the role of ADAM-15 in RA angiogenesis. RA and normal (NL) serum, and in the same way, RA and osteoarthritis (OA) synovial fluids were obtained from RA patients and control patients. ADAM-15 expression was determined in serum and synovial fluid from RA and NL using ELISA. To determine ADAM-15 expression in RA synovial tissues, immunohistochemistry was performed. To determine the role of ADAM-15 in RA, cytokines in ADAM-15 siRNA-treated human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) was measured. Then, in order to confirm the role of angiogenesis, we did Matrigel assays *in vitro*. Finally, to determine whether ADAM-15 mediates adhesion to ECs, we performed *in vitro* adhesion assays. ADAM-15 in RA serum was significantly higher compared with NL and it was significantly higher in RA compared with OA synovial fluids. ADAM-15 is expressed on the endothelial cell in RA synovial tissues. ENA-78/CXCL5 and ICAM-1 in TNF- α -stimulated ADAM-15 siRNA-transfected HUVEC conditioned medium were decreased compared with in TNF- α -stimulated control siRNA-transfected HUVEC conditioned medium. ADAM-15 siRNA-treated HUVECs had a decreased EC line and tube formed in response to RA synovial fluids compared with non-treated HUVECs. Adhesion index of ADAM-15 siRNA transfected HUVECs was significantly decreased compared with adhesion index of control siRNA transfected HUVECs. These data show ADAM-15 plays a role in RA angiogenesis, suggesting that ADAM-15 may be a potential target in inflammatory diseases such as RA.

Key words: rheumatoid arthritis, ADAM-15

[受付 : 12 月 22 日, 2017, 受理 : 1 月 11 日, 2018]