

Mechanisms of Articular Cartilage Destruction in an Antigen-Induced Arthritis Model Induced by Cationic Amidated Bovine Serum Albumin

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8008

陽イオン化牛血清アルブミン誘導関節炎における 関節軟骨破壊機序

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 野村 進教授)

山下直樹

(昭和63年1月7日受付)

慢性関節リウマチにおける関節破壊機序を解明するために、モルモットに抗原誘導型関節炎を作製し、この実験モデルにおける関節軟骨破壊機序を形態学および生化学的に検討した。アミド化により陽イオン化した牛血清アルブミン (aBSA) (pI=9.5) でモルモットを免疫し膝関節腔内に aBSA (0.5 mg) を注入することにより関節炎を誘導した。抗原注入後1日で好中球浸潤を伴う著しい滑膜炎がみられた。滑膜や軟骨下骨髄から遊走した好中球は関節軟骨に浸潤し、2週までに関節軟骨は破壊消失した。関節軟骨の破壊に際して、まずプロテオグリカンの脱落が起こり、次いでコラーゲン線維の消失がみられた。8週までに、破壊された関節軟骨と関節腔は滑膜や骨髄より増殖した肉芽組織によって置換され線維痕組織 (線維性強直) となり、12-20週では膝関節は最終的に軟骨性強直像を呈した。¹²⁵I-aBSA を用いたオートラジオグラフィと抗モルモット IgG による蛍光抗体法の所見から、抗原は静電的親和力により関節軟骨全層に捕捉されており、これが抗体との結合に必要な持続性の抗原 (planted antigen) として働いていることが確認された。抗原注入後1, 2週の膝関節から採取した滑膜と関節軟骨ホモジネートから [³H] 標識トランスフェリン分解活性が検出された。この蛋白分解酵素は阻害試験や pH 曲線の所見から中性セリンプロテイナーゼであり、プロテオグリカン分解活性を持つ好中球由来エラスターゼやカテプシン G と推定された。同試料中にコラゲナーゼ活性は検出できなかったが、ゼラチン分解活性の上昇が認められた。この酵素は 4-aminophenylmercuric acetate によって活性化され、EDTA によってその活性は阻害を受けることから中性金属依存性蛋白分解酵素であり、ゼラチンサブストレートゲル上の分子量より好中球由来ゼラチナーゼと考えられた。以上の実験データより、本実験モデルにおいては好中球由来の中性蛋白分解酵素がプロテオグリカンやコラーゲン線維を分解することにより関節軟骨破壊をきたすと考えられた。また、このことは慢性関節リウマチにおいても滑液中に浸出した好中球が関節軟骨の破壊に重要な役割を果している可能性を示唆している。

Key words antigen-induced arthritis, destruction of cartilage, neutral proteinase, rheumatoid arthritis

慢性関節リウマチは未知の抗原に対し抗体が産生され、この抗原-抗体複合体を起炎物質として慢性増殖性滑膜炎をきたし、その結果関節軟骨や骨および関節周囲組織の破壊を生じる疾患である。慢性関節リウマチはその病理発生上、1) 遺伝的素因、2) 未知の抗原と免疫異常、3) 化学伝達物質と増殖性滑膜炎、4) 関節軟骨破壊の4つのステップが存在すると考えられ

ている¹⁾。これらの各ステップを解明するために、これまで多くの実験モデルが考案され報告されてきた。それらを大別すると自然発症モデルと誘導型モデルに分けられる。後者では関節炎を誘導する方法として、1) 感染性病原体、2) 化学物質、3) 内分泌障害、4) 免疫学的手法、5) 物理的刺激があげられる²⁾。これらのうち、免疫学的手法を用いた関節炎は慢性関節リウマ

Abbreviations: (a) BSA, (amidated) bovine serum albumin; DIFP, diisopropyl fluorophosphate; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; [³H] Cm-Tf, [³H] carboxymethylated transferrin; N-EM, N-ethyl-

チが免疫学的機序を介して発症していることから特に有用なモデルとして注目されている。また、動物を免疫する物質としてアルブミンや免疫グロブリンなどの血漿蛋白、外来性異物の horseradish peroxidase、大腸菌や溶血性連鎖球菌などの細菌菌体成分、細胞間マトリックス構成成分の II 型コラーゲンおよびアジュバント、フェリチン、フィブリンなど種々様々な物質が用いられている²⁾³⁾。それぞれに長所と欠点があり、現在までのところの実験モデルも慢性関節リウマチの理想的モデルとはいえない³⁾。

一方、慢性関節リウマチの関節軟骨破壊機序に関しては、滑膜や関節軟骨組織由来の蛋白分解酵素、白血球や大食細胞由来の活性酸素、荷重による機械的負荷などが提唱されている。しかし、関節軟骨の破壊はその細胞間マトリックスの分解消失に伴って進行することから、蛋白分解酵素が主役を演じているものと考えられている¹⁾。関節軟骨の細胞間マトリックス分解酵素としてエラスターゼ⁴⁾⁵⁾やカテプシン G⁴⁾⁶⁾などのセリンプロテナーゼ、カテプシン B⁷⁾⁸⁾や D⁸⁾⁹⁾などのアスパラギン酸プロテナーゼおよびコラゲナーゼ¹⁰⁾¹¹⁾、ゼラチナーゼ¹²⁾¹³⁾、matrix metalloproteinase³⁾¹⁴⁾ (stromelysin)¹⁵⁾などの金属依存性蛋白分解酵素が報告されている。しかし、慢性関節リウマチにおいてこれらのどの酵素が細胞間マトリックス分解に大きな役割を果しているかについては明らかではない。

著者は慢性関節リウマチの関節軟骨破壊機序を解明する目的で van den Berg らの方法¹⁶⁾に従って関節軟骨の著しい破壊を生じる抗原誘導型関節炎を作製し、本実験モデルにおける関節炎の病理発生と関節軟骨破壊機序を病理形態学と生化学的手段を用いて検討した。同時に、この実験モデルにおける関節軟骨破壊機序と慢性関節リウマチのそれとの関連性について考察した。

材料および方法

I. アミド化牛血清アルブミン (aBSA) 誘導関節炎の作製

1. aBSA の調整

電気泳動上分子量 68,000 の単一バンドとしてみられる BSA (Sigma Chem. Co., U.S.A.) を Danon らの方法¹⁷⁾に準じてアミド化した。即ち BSA 溶液 (50 mg/ml) を 30% 1-ethyl-3(3 dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (Sigma Chem. Co., U.

S.A.) と混合し pH 6.5 に調整後、アミド基供与体として 0.02% の N,N-dimethyl-1,3-propandiamine (BDH Chem., England) を加え室温で 6 時間反応させ、次いでこの反応液を蒸留水に対して透析後、凍結乾燥した。aBSA を等電点泳動すると等電点は約 9.5 に泳動されたのに対し、BSA は 4.5 に認められた (図 1)。このことは aBSA は生理的 pH では陽イオン化状態にあることを示している。

2. 関節炎の誘導と抗体価の検討

実験動物として幼若モルモット (ハートレー系, メス, 200-300 g) を使用した。aBSA を生理的食塩水で 10 mg/ml 溶液とし、等容の Freund 完全アジュバント (DIFCO Lab., U.S.A.) と混合しエマルジョンを作製後、モルモット背部皮内に 0.25 ml (1.25 mg/匹) ずつ注射した。注射 10 日後ブースター注射として同量の抗原を背部皮内に注射し、10 日後 ELISA 法により血清抗体価を測定した。血清抗体価の測定後、手術的に両側膝関節包を露出し、一側膝関節腔内に aBSA (0.5

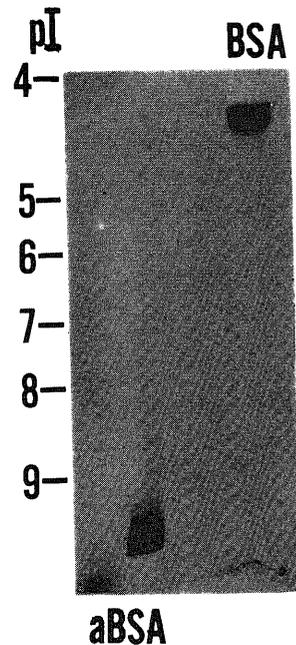


Fig. 1. Isoelectric focusing of BSA and aBSA on a gel with pH range from 3.5 to 9.5. The pI of aBSA is approximately 9.5, whereas that of native BSA is 4.5.

maleimide; NH₂-Ph-Hg-Ac, p-aminophenylmercuric acetate; Pep. A, pepstatin A; PMSF, phenylmethane sulfonyl fluoride; pI, isoelectric point; SDS, sodium dodecyl sulfate; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase.

mg)を注入して関節炎を誘導した。対照として対側膝関節腔に同量の生理的食塩水または卵白アルブミン(0.5 mg)を注入した。関節炎誘導後、動物屠殺時に心臓穿刺により採血し、血清抗体価の推移をELISA法により検討した。

II. 病理形態学的検索

1. 光顕的観察

関節炎誘導1日-20週後に、エーテル麻酔下で動物を屠殺し膝関節部を摘出した。材料を中性ホルマリン液で固定後0.5 M EDTA (pH 7.5)で脱灰し、正中および脛骨外側顆中央を通る矢状面で縦割した。パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン(H. E.)染色、アルシアン青染色(pH 2.5)およびアザン染色を行い観察した。対照群の膝関節についても同様の方法で観察を行った。

2. 電顕的観察

抗原注射1日-8週後の膝関節を2.5%グルタルアルデヒドと2%オスミウム酸で2重固定後、脱水、エポン812包埋し、電顕的に検索した。また、ルテニウムレッド(R.R.)染色により関節軟骨プロテオグリカンの変化を観察した。

3. 抗原と抗体の関節組織における局在

抗原をFrakerらの方法¹⁸⁾に従って¹²⁵Iでラベルした。¹²⁵I-aBSA (0.5 mg)を3匹のモルモットの両膝関節腔内に注入し、1日、3日、1週後に膝関節を摘出した。この材料につきパラフィン切片を作製し、脱パラフィン後、乳剤(サクラNR-M2)に軽く浸漬してから暗箱内(4°C)で2-4週間露出後、抗原の局在を光顕的オートラジオグラフィーで検索した。また抗体の局在を関節炎誘導1日、3日、1週、2週後の試料に対して、ウサギ抗モルモットIgGを用いた蛍光抗体直接法で観察した。

III. 生化学的検討

1. 酵素活性の測定

抗原注入3日-8週後に膝関節滑膜組織と大腿骨、脛骨および膝蓋骨より関節軟骨を採取し、緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.4/0.15 M NaCl/10 mM CaCl₂/0.02% NaN₃)で十分洗浄後、0.05% Brij 35を含む同緩衝液と混和しテフロン製ホモジナイザーでホモジネートを作製した。さらにそのホモジネートを超音波処理後、遠心してその上清を得た。この上清中の蛋白濃度をLowry¹⁹⁾法で測定した。このホモジネート上清につきトランスフェリン分解活性、ゼラチナーゼ活性およびコラゲナーゼ活性を測定した。トランスフェリン分解活性はOkadaらの方法¹⁴⁾に従い³H]標識カルボキシメチル化トランスフェリン(³H]Cm-Tf)を基質として、上清と37°Cで反応後、3.3%トリクロロ酢

酸に可溶性のトランスフェリン分解産物の放射活性を測定した。ゼラチナーゼとコラゲナーゼ活性は1 mM p-aminophenylmercuric acetate (NH₂-Ph-Hg-Ac)の存在および非存在下でそれぞれCawstonら²⁰⁾とHarrisら²¹⁾の方法に従って測定した。モルモット皮膚よりI型コラーゲンを精製し、Gisslowらの方法²²⁾により¹⁴C-acetic anhydride (Amersham)で標識し放射性コラーゲンを作製した。¹⁴C-ゼラチンは¹⁴Cコラーゲンを60°C, 30分間熱処理することにより作製した。

1単位のトランスフェリン分解活性、ゼラチナーゼおよびコラゲナーゼ活性とはそれぞれの基質を37°Cにおいて1分間に1μg分解することを意味する。またホモジネート上清中の各酵素活性は1 mg蛋白あたりの各基質分解活性で表わした。

酵素活性値は分散が大きいと考えられたため、Wilcoxon rank sum testを用いて検定した。

2. トランスフェリン分解酵素活性の阻害試験

関節炎誘導2週の滑膜と関節軟骨ホモジネートのうち高い酵素活性を示した材料につき阻害試験を行った。ホモジネート(10 μl)を同量の2 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), 2 mM diisopropyl fluorophosphate (DIFP), 20 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 5 mM N-ethylmaleimide (N-EM)および1 mM pepstatin A (pep. A)と室温で30分反応後、10 μlの³H]Cm-Tfを加えて37°C, 1時間アッセイした。阻害剤の溶媒と反応させた試料の活性を100%として阻害活性を表わした。

3. トランスフェリン分解酵素のpH曲線

トランスフェリン分解活性の高い滑膜ホモジネートを関節炎誘導1, 2, 4週のものから1検体(10 μl)ずつとり1 M 酢酸緩衝液(pH 3.5-6.0), 1 M カコジル酸緩衝液(pH 5.5-7.5), 1 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.0-9.0)および1 M グリシン水酸化ナトリウム緩衝液(pH 8.5-11.0)と混和後37°Cで1時間³H]Cm-Tfアッセイを行い至適pHを検討した。

4. SDS-ゼラチンサブストレートゲル

Hibbsらの方法²³⁾に従い、ゼラチン(0.5 mg/ml)を含むポリアクリルアミドゲルを作製した。滑膜と関節軟骨ホモジネート上清を4°Cで非還元状態で電気泳動した。ゲルを緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5/1 μM ZnCl₂/10 mM CaCl₂/2.5% Triton X)で洗浄後37°Cで反応し、ゼラチンの分解パターンを調べた。またモルモット末梢血からJanoffらの方法²⁴⁾に従って好中球を分離し、そのホモジネートを対照としてゼラチンサブストレートゲルに泳動し、両者の分解パター

ンを比較した。ゼラチンサブストレートゲルでは SDS 処理や電気泳動中に活性化が生じるため、NH₂-Ph-Hg-Ac 処理は不必要であった。

関節炎誘導 1 週の滑膜組織と好中球ホモジネートをゼラチンサブストレートゲルに泳動後、前述の各種蛋白分解酵素阻害剤を含む緩衝液中で反応させ、ゼラチン分解活性の阻害試験を行った。

成 績

I. 抗体価の推移

動物を抗原で免疫すると免疫したすべての動物で aBSA に対する高い抗体価 (2¹² 希釈で 1.68±0.27, mean±S.D.) が確認された。屠殺時に得られた関節炎誘導 3 日-20 週の血清中にも依然として高力価の抗 aBSA 抗体が持続的に存在することが観察された (表 1)。

II. 病理形態学的所見

対照群では全く関節炎の発生は認められなかったのに対し、aBSA 注入群ではほぼ全例に著しい関節炎が観察された。

1. 関節炎誘導後 1-5 日

関節腔へ抗原を注入すると 1 日目ですでに滑膜に好中球を主体とする炎症性細胞浸潤がみられた。好中球浸潤は 3 日目ではさらに強くなり滑膜表層細胞は脱落し、関節腔は好中球やフィブリンを主体とする浸出物で満たされた (図 2)。関節軟骨表層部ではその基質内への好中球浸潤像がしばしば観察された。また関節軟骨は所々で石灰化層を除く軟骨全層がアルシアン青染色陰性となり、関節軟骨からのプロテオグリカンの脱落が示唆された。

2. 関節炎誘導 1-2 週

この時期で最も目立つ所見は関節軟骨の著しい破壊であった (図 3, 4)。滑膜より浸潤した好中球は関節軟骨表層のみならず、さらに深層へと浸潤を示した (図 4)。また好中球は滑膜組織のみならず関節軟骨直下の骨髄からも浸潤し、軟骨の石灰化層は主としてこれらの好中球によって破壊された。関節軟骨への著明な好中球浸潤に伴って軟骨細胞の変性、壊死と細胞間マトリックスの破壊が認められた (図 4)。このような

部位の軟骨はアルシアン青染色で全く染色されないが、アザン染色は陽性を示した。滑膜組織には好中球と少数の小円形細胞および大食細胞浸潤のほか線維芽細胞や毛細血管の増生が認められ、関節腔内の浸出物中への侵入が観察された。また関節軟骨直下の骨髄中には好中球浸潤のみならず破骨細胞様の巨細胞と線維芽細胞および毛細血管の増生がみられ、軟骨の破壊消失した部位では滑膜と同様関節腔の浸出物中へと侵入を示した。

電顕的には分葉核を持ち偽足様突起と多数の貪食空胞を有する好中球の軟骨細胞間マトリックス中への浸



Fig. 2. Knee joint of a guinea-pig 3 days after intra-articular injection of aBSA. Marked inflammation of the synovium and exudative materials in the joint cavity are seen. F, femur; T, tibia. H. E. stain. ×30.

Table 1. Immuno-status at various times pre-antigen challenge (0 day) and after the challenge (3 days, 1, 2, 4, 8, 12, 20 weeks).

	0d(n=17)	3d(n=3)	1w(n=4)	2w(n=3)	4w(n=2)	8w(n=3)	12w(n=3)	20w(n=3)
mean±SD*	1.68±0.27	1.92±0.06	1.92±0.06	1.84±0.12	1.98±0.02	1.74±0.18	1.55±0.04	1.24±0.20

* The mean±SD is expressed as absorbance values at 405 nm at 2¹² serum dilution.

潤像がしばしば観察された。このような部位ではコラーゲン線維は疎開を示すが、好中球によるコラーゲン線維の貪食像は認められなかった (図 5)。ルテニウ

ムレッド染色では、R.R. 陽性粒子とフィラメントからなるプロテオグリカンの網状構造の消失が認められた (図 6a, b)。また関節軟骨中へ浸潤した好中球や表層の

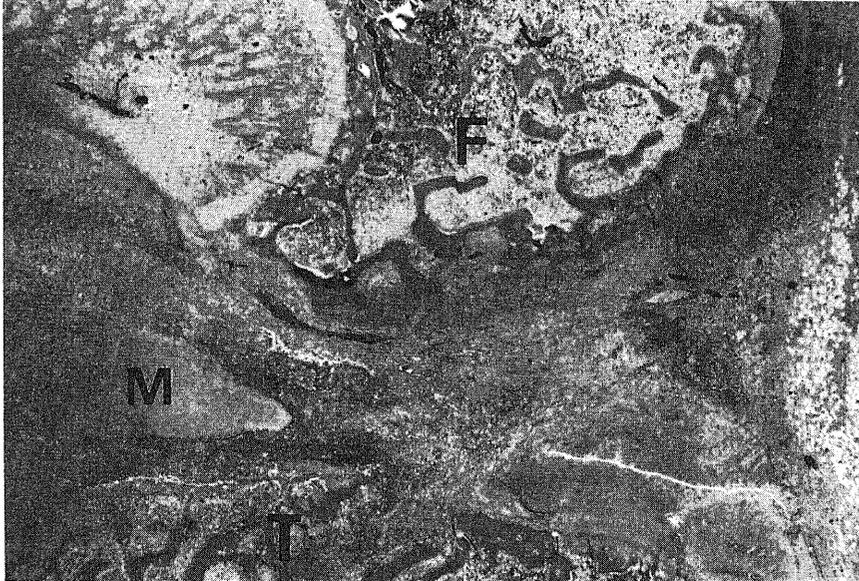


Fig. 3. Knee joint of a guinea-pig 1 week after the antigen injection, showing marked destruction of articular cartilage of both femur (F) and tibia (T). Joint cavity is filled with exudative materials. M, meniscus. H. E. stain. $\times 37$.

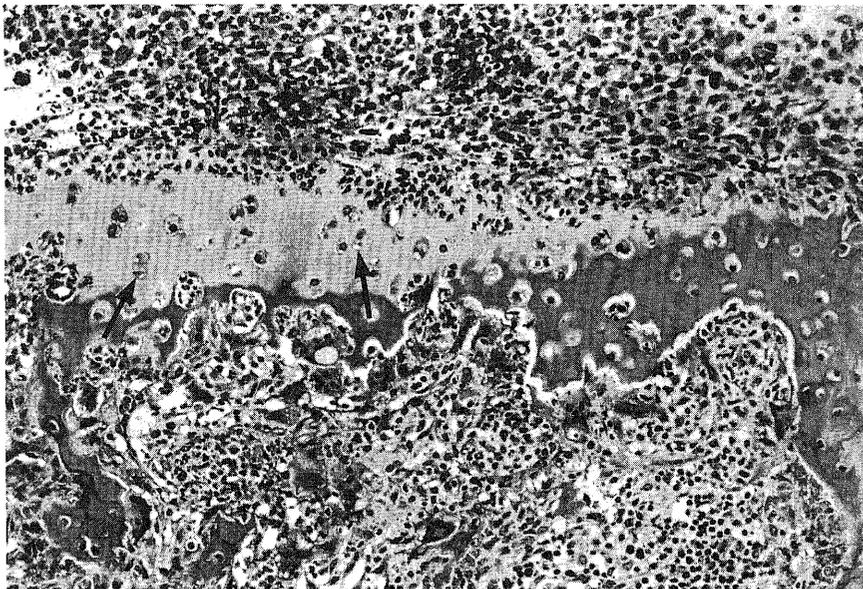


Fig. 4. Articular cartilage of femur from an animal 1 week after the injection. The cartilage is infiltrated by many neutrophils from both joint cavity and bone marrow. Note degradation of extracellular matrix of cartilage and degeneration and necrosis of chondrocytes (arrows). H. E. stain. $\times 330$.

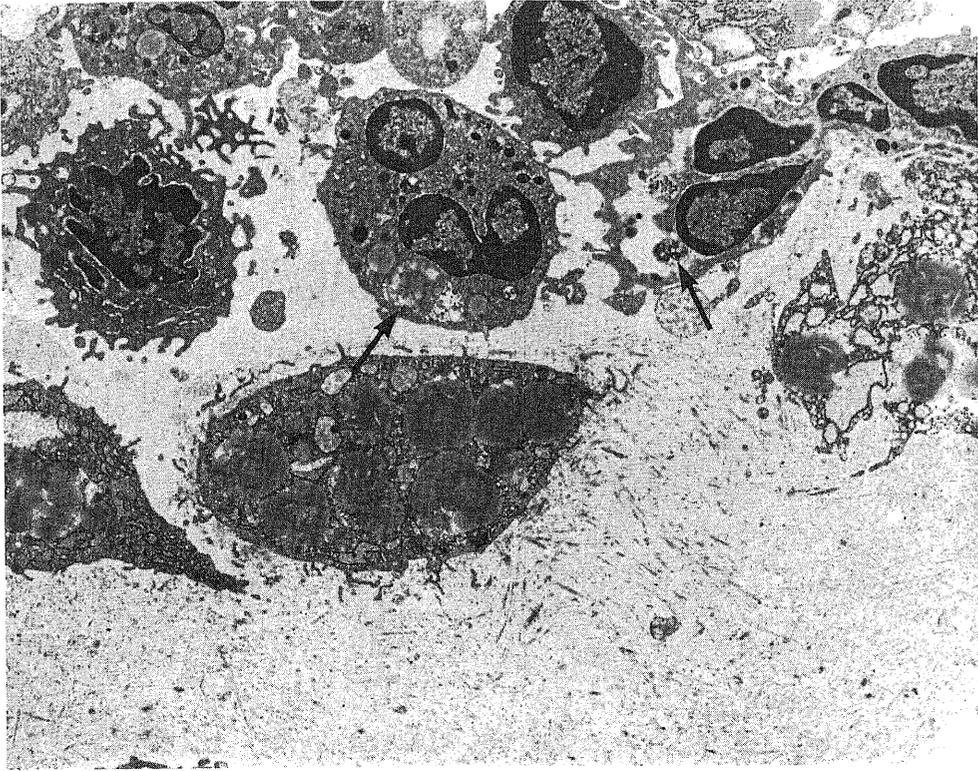


Fig. 5. Electron micrograph of articular cartilage from a guinea-pig 1 week after the injection. Neutrophils infiltrated in joint cavity contain many phagocytic vacuoles (arrows) and collagen fibers of articular cartilage are loosely arranged. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 4,600$.

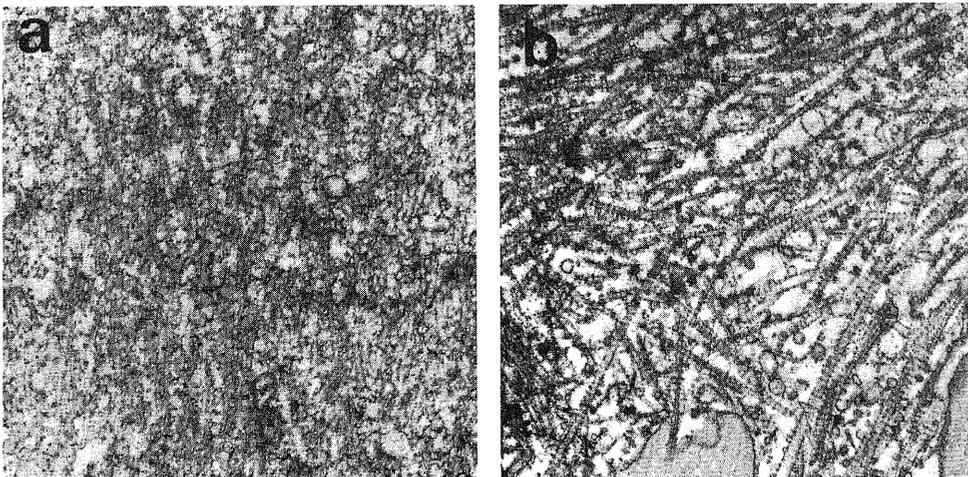


Fig. 6a, b. Electron micrographs of the extracellular matrix of articular cartilage stained with ruthenium red. a) Normal cartilage shows collagen fibers embedded in abundant ruthenium red-positive particles and filaments. $\times 26,000$. b) Cartilage from an arthritic animal 1 week after the antigen challenge, showing disappearance of ruthenium red-positive networks. $\times 12,500$.

軟骨細胞周囲には、幅 170–200 nm の太いコラーゲン線維が時々認められた (図 7)。

3. 関節炎誘導 3–8 週

この時期になると大腿骨、脛骨および膝蓋骨の関節軟骨は大部分破壊消失した。本来関節軟骨が存在していた部位は滑膜組織や骨髄より関節腔側へと侵入増生した肉芽組織により置換され、関節腔はほとんどの部分で消失を示した (図 8a)。3 週ではこの肉芽組織中にはなお好中球や大食細胞の浸潤と血管増生がみられた。しかし 4 週以降は、炎症性細胞はほとんどみられなくなり、血管も減少し、線維芽細胞の著明な増生により線維性癒痕組織へとかわった (図 8a)。また、この線維組織は大腿骨や脛骨の骨梁に接した部位より軟骨化生を生じた (図 8b)。

4. 関節炎誘導 12–20 週

大腿骨、脛骨および膝蓋骨の本来の関節軟骨はほとんどの部位で破壊消失した。これらの骨は軟骨性組織で結合され、関節腔は消失し軟骨性強直像を呈した (図 9)。

III. 抗原と抗体の局在

抗原の局在を ^{125}I -aBSA を用いた光顕的オートラジオグラフィで検討すると、関節炎誘導 1–3 日目では

石灰化層を含む関節軟骨全層、ことに深層の軟骨細胞周囲が強くラベルされた (図 10a)。特に膝蓋骨とそれに対向する大腿骨および脛骨辺縁部の関節軟骨に銀粒子が高密度に存在した。また滑膜や関節内靭帯にも少数の銀粒子が認められた。抗原注入 1 週後関節炎の進行に伴いプロテオグリカンの脱落が生じると銀粒子も著減した。しかし残存する軟骨には依然少数ながらラベルが認められた (図 10b)。

抗モルモット IgG を用いた蛍光抗体法では抗体は関節炎誘導 1–3 日後では関節軟骨表層部と滑膜組織中に局在した (図 10c)。1–2 週後の材料では、関節軟骨の破壊に伴い抗体はさらに深層にまで認められた (図 10b)。

IV. 生化学的所見

1. 滑膜および関節軟骨ホモジネートのトランスフェリン分解酵素活性

これらの組織ホモジネート上清中のトランスフェリン分解酵素活性の結果を図 11 に示す。Wilcoxon rank sum test を用いて酵素活性値を検定すると、未処置正常滑膜ホモジネートに対し、形態学的に炎症性細胞浸潤の著しい 1、2 週の滑膜で有意な酵素活性値の上昇がみられた。また滑膜における炎症性細胞浸潤

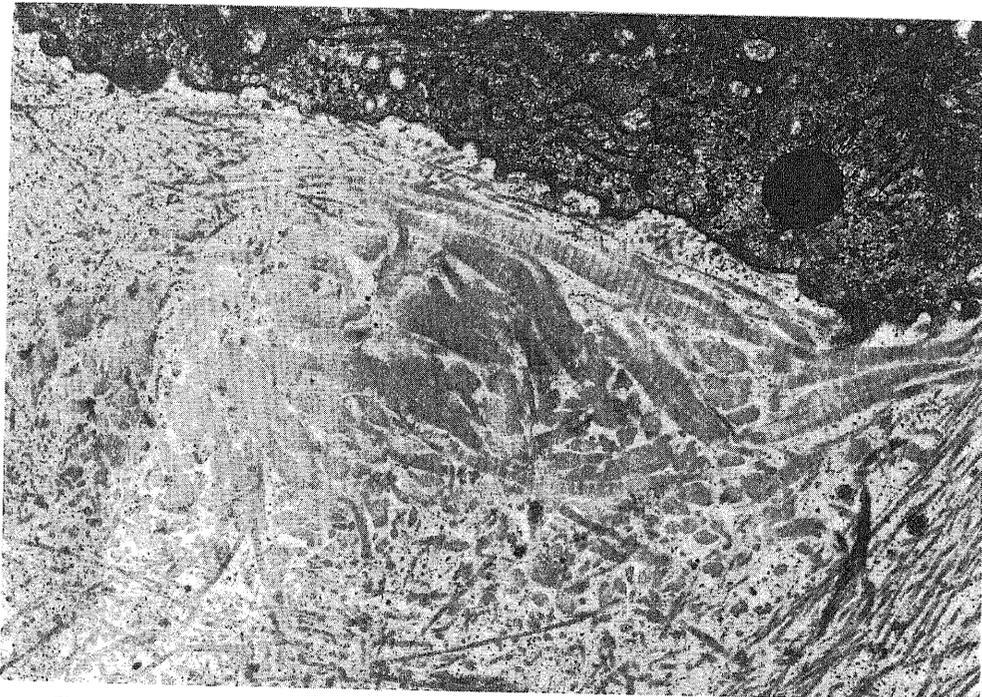


Fig. 7. Electron micrograph of articular cartilage from an arthritic animal 1 week after the injection, showing giant collagen fibers around a chondrocyte. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 19,800$.

が消退し増殖性変化を示す8週のマテリアルでは有意差はみられなかった(図11a)。関節軟骨ホモジネート中のトランスフェリン分解酵素活性もほぼ同様の所見で、対照群に対して1, 2週のマテリアルで酵素活性は有意に高値を示した(図11b)。関節炎誘導4週以降では関節軟骨は多くの動物で破壊消失したためマテリアルの採取が不可能であった。

関節炎誘導2週の滑膜と関節軟骨ホモジネート中のトランスフェリン分解酵素活性に対する各種阻害剤の影響は両試料でほぼ同様であった。図12に示すように、トランスフェリン分解活性はDIFPとPMSFによって全活性の10-20%にまで強く阻害された。EDTAによっても同様に阻害された。しかしN-EMとpepstatin Aでは全く阻害されなかった。

関節炎誘導1, 2, 4週の滑膜ホモジネートを用いてそのトランスフェリン分解活性のpH曲線を検討したところ、その至適pHはいずれの試料においても7.5-8.5と中性域に認められた。

2.ゼラチン分解酵素活性

¹⁴C 標識ゼラチンを基質として滑膜と関節軟骨ホモ

ジネート上清中のゼラチン分解活性を検討した。図13aに示すように滑膜のゼラチン分解活性はNH₂-Ph-Hg-Ac存在下でアッセイすると対照群と比較して関節炎誘導1週のマテリアルで有意に高い酵素活性を示した。8週ではその活性値は正常化した。NH₂-Ph-Hg-Acの存在しない状態ではその活性に差異はみられなかった。軟骨ホモジネートでは1週のマテリアルでNH₂-Ph-Hg-Acで活性化され、有意に高い酵素活性がみられた(図13b)。

ゼラチン分解酵素の分子量をSDS-ゼラチンサブストレートゲルで検討した。関節炎誘導3日から8週まで経時的に採取された滑膜と関節軟骨のすべてのホモジネートおよびモルモット末梢血好中球ホモジネートをゼラチンサブストレートゲルに電気泳動しゼラチンの分解パターンを比較した。滑膜ホモジネートでは3日, 1週, 2週のマテリアルでゼラチンを分解する数本の主なバンドが認められた。これらのうち分子量200 kDa, 125 kDaおよび94 kDaの高分子のバンドは好中球ホモジネート中にみられるそれとほぼ同一であった(図14a)。分子量76 kDaと72 kDaのバンドは1週以降の

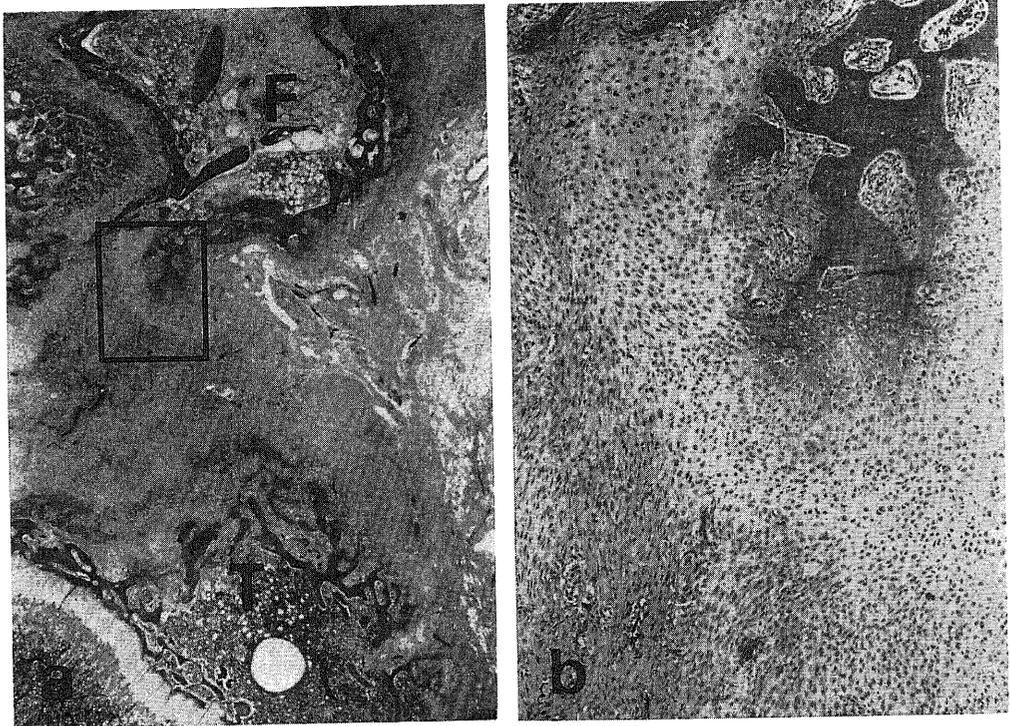


Fig. 8a, b. Knee joint of an arthritic animal 4 weeks after the challenge, showing fibrous ankylosis of femoro-tibial joint (a). F, femur; T, tibia. H. E. stain. $\times 30$. b) High power view of the area enclosed by a black rectangle in Fig. 8a. Note cartilaginous metaplasia around bone trabeculae. H. E. stain. $\times 140$.

材料で出現し 8 週のマテリアルにおいても認められた。正常滑膜ではゼラチン分解活性はみられなかった。関節軟骨でも 3 日, 1, 2 週のマテリアルで滑膜でみられたとほぼ同様のゼラチン分解パターンが観察された (図 14b)。

1 週のマテリアルホモジネートと好中球ホモジネートのゼラチン分解活性は EDTA によって阻害されたが PMSF, N-EM, pepstatin A では阻害をうけなかった。

3. コラゲナーゼ活性

関節炎誘導 3 日-8 週までの滑膜と 3 日-2 週までの関節軟骨ホモジネート上清につき、 ^{14}C 標識コラーゲン分解活性を $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$ の存在および非存在下で検討したが、どちらのマテリアルにおいてもコラゲナーゼ活性は検出されなかった。

考 察

抗原誘導型関節炎は抗原を注入した局所に関節炎を確実に誘導することが可能な点ですぐれている。しかしこの実験モデルでは注入された抗原が速やかに関節から血中へ吸収されるため、慢性かつ破壊性の関節炎を作製することはきわめて困難とされている²⁵⁾⁻²⁷⁾。血管を欠く関節軟骨は異物排泄能が低く抗原捕捉が可能なことから、1984 年、van den Berg ら¹⁶⁾はアミド化した aBSA を用いて慢性の抗原誘導型関節炎の作製に成功した。本研究では彼らの方法に準じ関節軟骨の

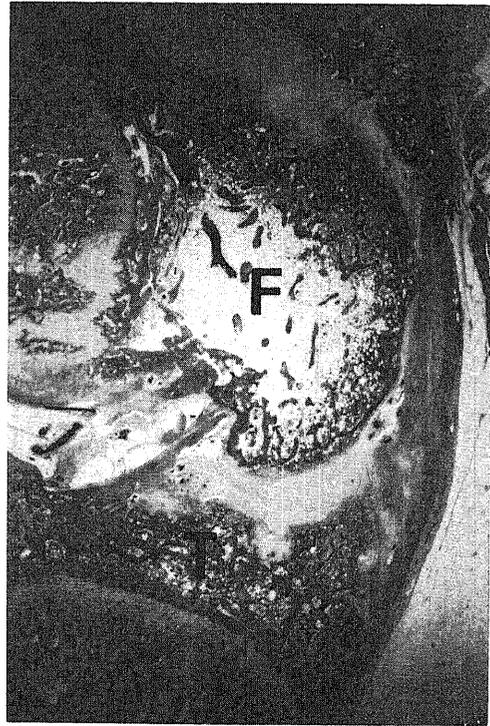


Fig. 9. Knee joint of an arthritic animal 16 weeks after the antigen injection. Complete cartilaginous ankylosis of femoro-patellar and femoro-tibial joints is seen. F, femur; P, patella; T, tibia. H. E. stain. $\times 14$.

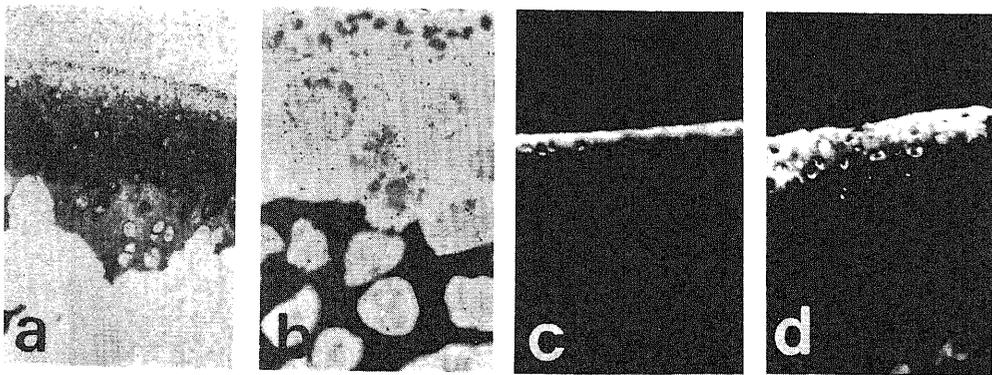


Fig. 10a-d. Localization of antigen (^{125}I -aBSA) and antibody (IgG) in articular cartilage of arthritic animals. a) Autoradiograph of articular cartilage from an arthritic animal 1 day after intra-articular injection of ^{125}I -aBSA. Note the labeling throughout whole zones of articular cartilage, especially around chondrocytes in the deep zone. Toluidine blue stain. $\times 250$. b) Autoradiograph of degrading articular cartilage 1 week after the challenge. Labeling is decreased, but still present in the cartilage. Toluidine blue stain. $\times 660$. c) d) Immunohistochemical localization of IgG in articular cartilage from arthritic animals 3 days (c) and 1 week (d) after the challenge. Bright immunofluorescence was seen in the superficial zone (c) and the deep zone (d). $\times 160$.

著しい破壊をきたす関節炎を発生せしめた。オートラジオグラフィーの所見から、注入された aBSA は石灰化層を含む関節軟骨全層に認められ、ことにプロテオグリカンの豊富な深層の軟骨細胞周囲に著しい沈着を示した。また、関節軟骨の破壊に伴ないプロテオグリカンが減少すると銀粒子のラベルの程度も低下した。aBSA の等電点は約 9.5 であることから、本実験モデルでは陽イオン化した抗原が静電的親和力によりプロテオグリカンに捕捉されることが著しい関節軟骨破壊をきたす原因と考えられる。関節軟骨表層部には抗原のみならず抗体 (IgG) も局在することが蛍光抗体法により証明された。抗原-抗体複合体は血管から好中球を遊走させ、その複合体を好中球が貪食処理することはよく知られている²⁸⁾。これらのことから、本実験モデルでは関節軟骨表層部で形成された抗原-抗体複

合体が好中球を遊走し、これらの好中球が関節軟骨破壊に重要な役割を果しているものと思われる。

関節軟骨の修復反応は障害の深さによって異なるとされている。障害が関節軟骨表層に限局する場合は滑膜-関節軟骨移行部の未分化間葉系細胞の増殖とその軟骨表面への延長により修復がおくとされている²⁹⁾。一方、破壊が関節軟骨全層を越え軟骨下骨に及んだ場合は、主として骨髄より増殖した間葉系細胞がその修復に関与すると考えられている³⁰⁾。本実験においては、障害は明らかに軟骨下骨にまで及んでおり、骨髄で増殖した未分化間葉系細胞や、関節腔内の浸出物に対して増生した滑膜からの肉芽組織がその修復に関与していた。4週以降では肉芽組織は癒痕化し、さらに軟骨化生により最終的に軟骨性強直を示した。軟骨化生は残存した骨梁に近接した部位より始まること

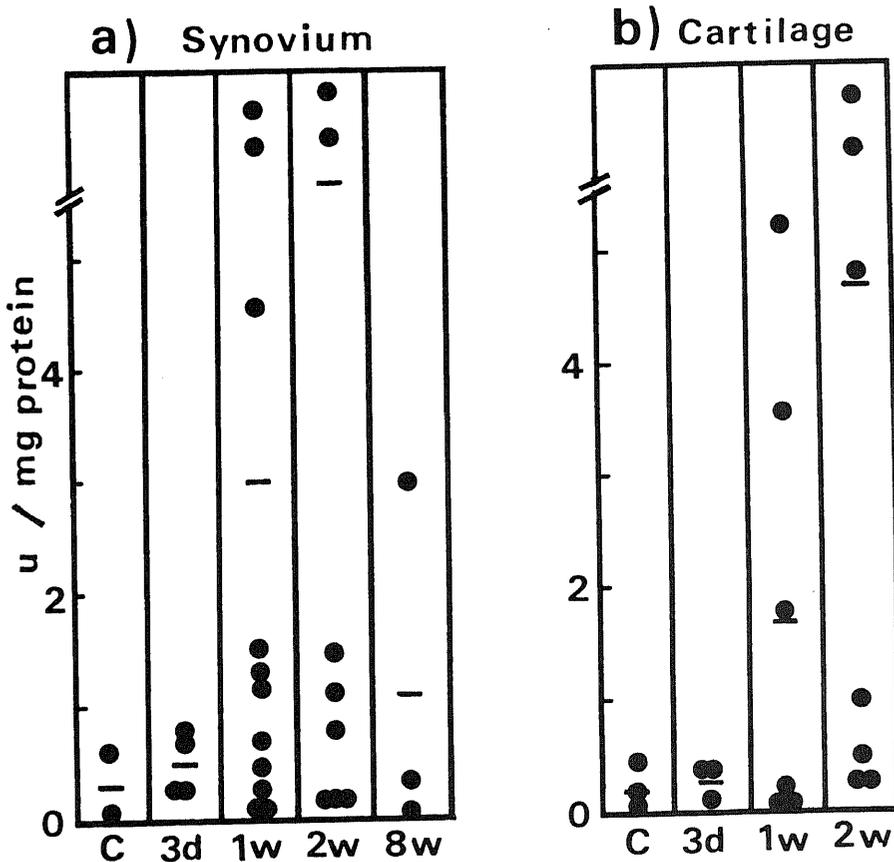


Fig. 11. [³H] Cm-Tf-degrading activity of synovium (a) and articular cartilage (b). Supernatant fluid (10 μ l) of homogenates from synovium and cartilage was incubated with an equal volume of [³H] Cm-Tf (30 μ g) for 1h at 37°C. One unit of Cm-Tf-degrading activity was defined as the production of 1 μ g Cm-Tf fragments soluble in 3.3% (W/V) trichloroacetic acid in 1 min at 37°C. C, control; -, mean value.

は興味深い所見である。骨には骨形成因子が存在し、この因子が周囲組織を軟骨化生へと誘導することが知られているので³¹⁾、本実験の軟骨化生も骨由来のこの因子の作用によるのかもしれない。

関節軟骨の細胞間マトリックスは主としてプロテオグリカンとコラーゲン線維から構成される。慢性関節リウマチをはじめとする種々の関節疾患においては、まずプロテオグリカンの脱落が起こり、次いでコラーゲン線維の分解消失により関節軟骨の破壊が進行すると報告されている³²⁾。本実験モデルにおいても、関節炎誘導早期にコラーゲン線維の消失に先立ちプロテオグリカンの脱落が観察された。関節軟骨プロテオグリカンを *in vitro* で分解する酵素としてはカテプシン B や D などの酸性水解酵素^{7)~9)}のほか、金属依存性蛋白分解酵素¹⁴⁾やセリンプロテイナーゼ^{4)~6)}の中性プロテイナーゼが報告されている。しかし、プロテオグリカンの分解は主として細胞外で行われ、関節軟骨の細胞外液の pH は炎症時においても中性域にあることが知られているので、生体内においては中性プロテイナーゼがプロテオグリカン分解に主役を演じていると考えられている。

本研究においては、滑膜組織と関節軟骨ホモジネート中にトランスフェリンを分解する酵素活性が関節軟骨破壊の著しい時期に一致して高値を示した。³⁾[³H] Cm-Tf アッセイは非特異的な中性プロテイナーゼ活性を検出するアッセイであるが、プロテオグリカンを分解する金属依存性蛋白分解酵素である matrix metalloproteinase 3 はこの基質に対し強い基質特異性があることが知られている¹⁴⁾。滑膜由来トランスフェリン分解活性の至適 pH は 7.5-8.5 であり、その活性は DIFP と PMSF で著しく阻害されることから中性セリンプロテイナーゼの一種と考えられる。EDTA でも活性の阻害がみられることから、その活性保持に Ca²⁺ などの金属イオンが必要なのかもしれない。本酵素の細胞起源や既知のプロテイナーゼとの異同については明らかでないが、滑膜や関節軟骨への好中球浸潤の著しい時期に一致して活性の高値がみられることから、本酵素はプロテオグリカン分解能を有する好中球由来のエラスターゼやカテプシン G に相当するものと推定される。

関節軟骨に存在するコラーゲンには II, IX, X, XI 型コラーゲンが区別されている。これらのうち関節軟

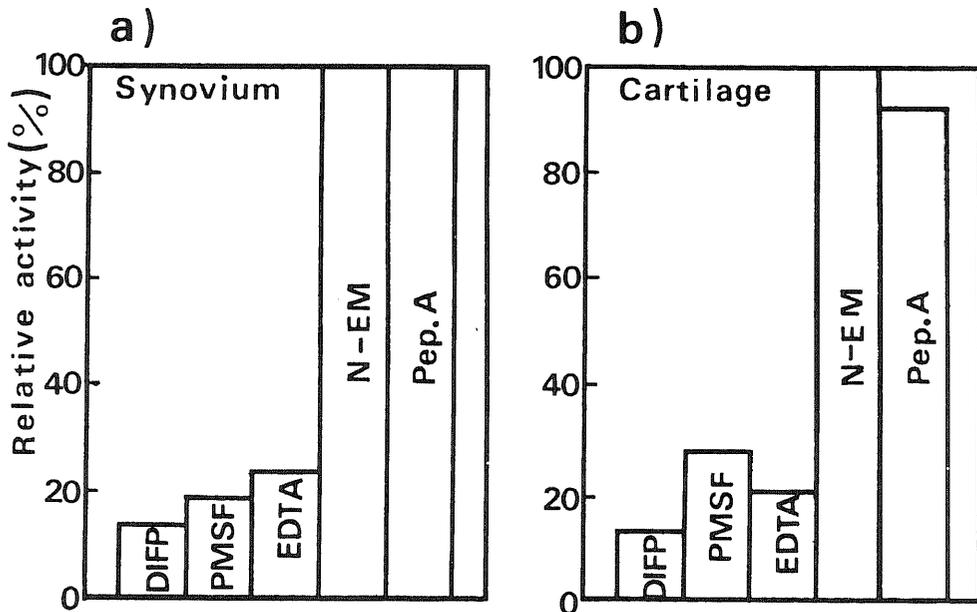


Fig. 12. Inhibition studies of [³H] Cm-Tf-degrading activity of synovium (a) and cartilage (b). Equal volumes (10 μ l) of supernatant fluid from synovial or cartilagenous homogenates and inhibitors were mixed and incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15 N NaCl/10 mM CaCl₂/0.05% Brij 35/0.02% NaN₃ at room temperature for 30 min. The residual enzymic activity was then assayed against [³H] Cm-Tf at 37°C for 1 h. DIFP, diisopropyl fluorophosphate (2 mM); PMSF, phenylmethane sulfonyl fluoride (2 mM); N-EM, N-ethylmaleimide (1 mM); Pep. A, pepstatin A (1 mM).

骨の主要コラーゲンであるII型コラーゲンは軟骨コラーゲンの約80%を占め、電顕的に直径30-120 nmの細い線維を形成している。生体内においてII型コラーゲンはコラーゲナーゼやエラスターゼによる限定分解後、体温による熱変性でゼラチン化し、さらにゼラチナーゼをはじめとする種々の中性プロテイナーゼが作用して分解処理されると考えられている³³⁾³⁴⁾。本実験では電顕的にコラーゲン線維の貪食や細胞内での分解を示す所見は得られなかったことから、コラーゲン線維の分解は細胞外において中性プロテイナーゼの作用によって行われると考えられる。コラーゲナーゼ活性は検出されなかったが、ゼラチン分解活性は滑膜や関節軟骨ホモジネートの多くの試料で高い活性が認められた。ゼラチナーゼ活性は、潜在型金属依存性蛋白分解酵素のコラーゲナーゼ¹⁰⁾¹¹⁾、ゼラチナーゼ¹²⁾¹³⁾や

matrix metalloproteinase 3¹⁴⁾ (stromelysin)¹⁵⁾の活性化剤であるNH₂-Ph-Hg-Acの存在下で高値を示し、未処理試料では低値であった。また、その活性はEDTAによってのみ阻害されることから金属依存性蛋白分解酵素であると結論される。この酵素はゼラチンサブストレートゲル上少なくとも数本のバンドとして観察されたが、それらは分子量200 kDa, 125 kDa, 94 kDaの高分子のものと76 kDa, 72 kDaの酵素に大別された。高分子の酵素は好中球ホモジネートのそれとほぼ一致することと、精製された好中球ゼラチナーゼは非還元状態で同様の3本のバンドに泳動されること²³⁾から高分子の酵素は好中球由来ゼラチナーゼと考えられる。一方、低分子のゼラチン分解活性は線維芽細胞¹²⁾や骨組織由来のゼラチナーゼ¹³⁾とその分子量は類似していた。

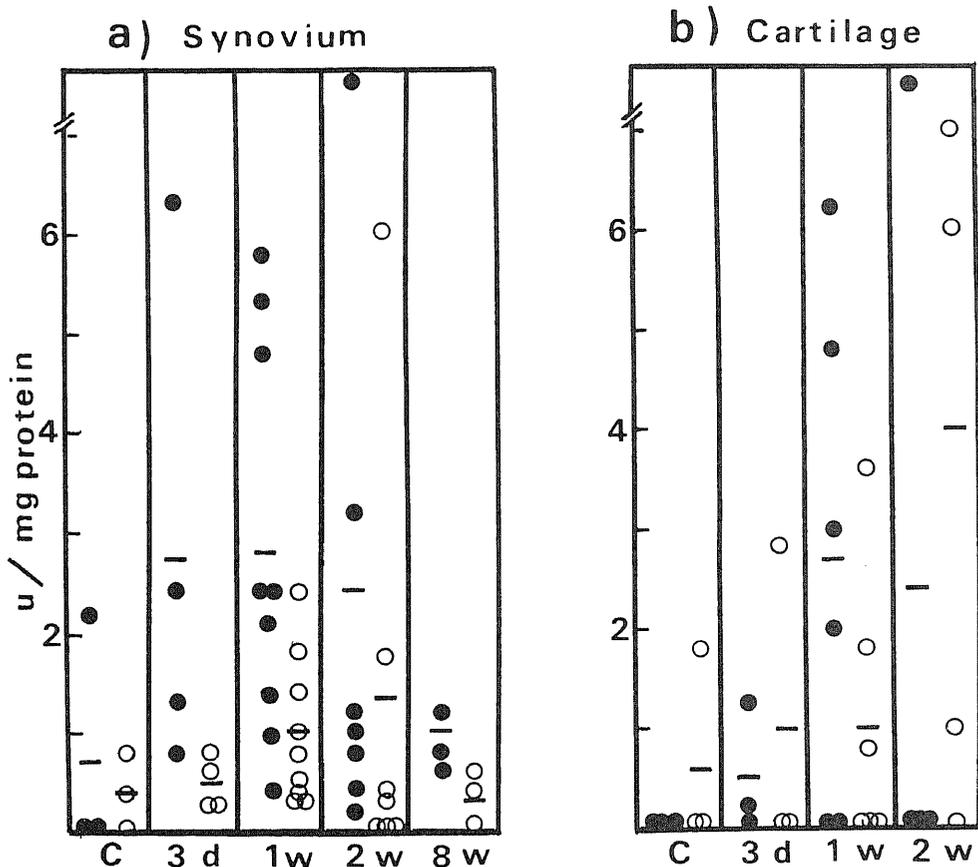


Fig. 13. Gelatinolytic activity of synovium (a) and articular cartilage (b). Supernatant fluid (10 μ l) from synovial (a) cartilagenous (b) homogenates was incubated with [¹⁴C] gelatin (150 μ g) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15 M NaCl/10 mM CaCl₂/0.05% Brij 35/0.02% NaN₂ with (●) or without (○) 1 mM NH₂-Ph-Hg-Ac (200 μ l total volume) for 17 h at 37°C. One unit of gelatinolytic activity digested 1 μ g of gelatin/min at 37°C.

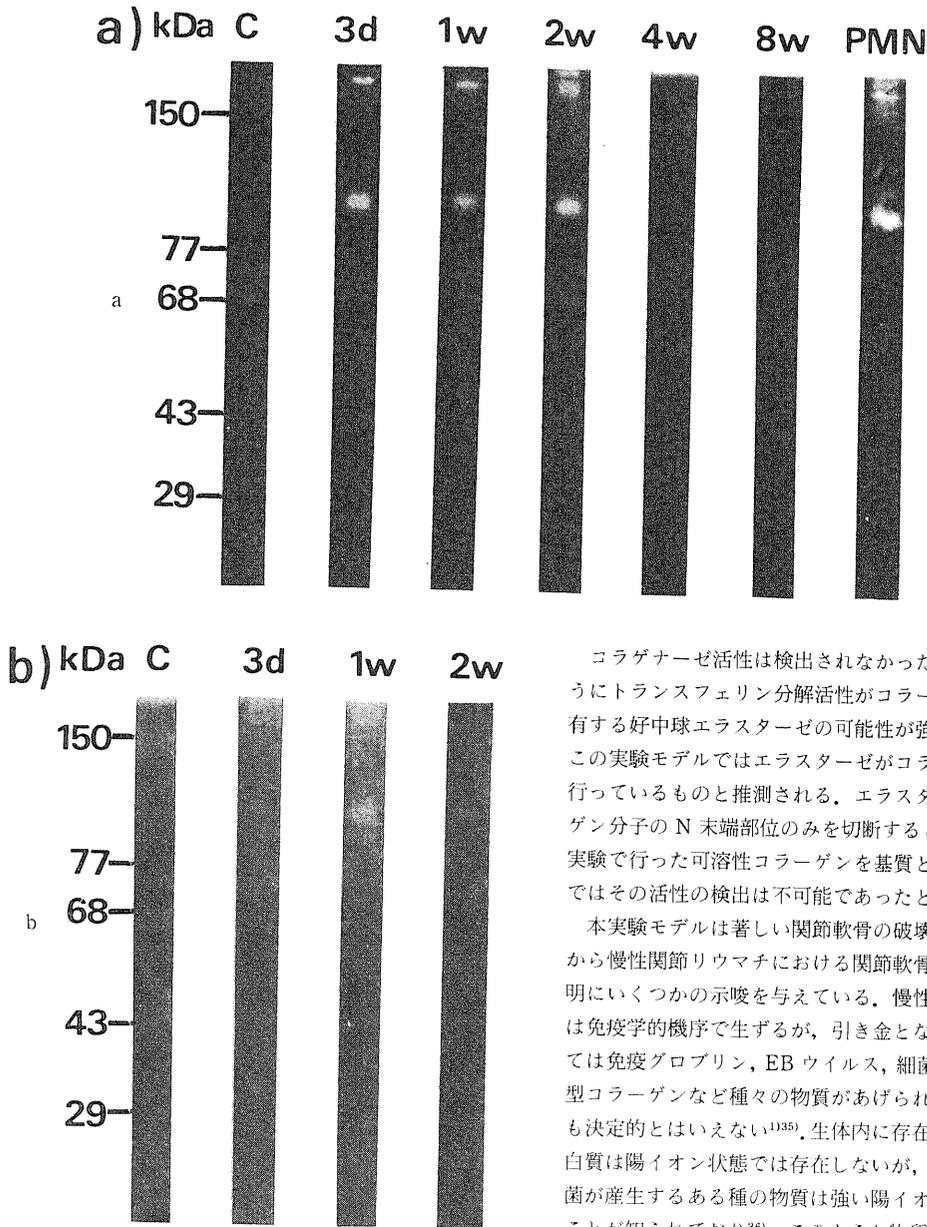


Fig. 14a, b. SDS-gelatin substrate gel electrophoresis. Supernatant fluid of homogenates from synovium (a) and cartilage (b) were electrophoresed under the unreduced conditions on 10% SDS-polyacrylamide gel containing gelatin (0.5 mg/ml) at 4°C. The gel was washed with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/1 μ M ZnCl₂/10 mM CaCl₂/2.5% Triton X and incubated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/1 μ M ZnCl₂/10 mM CaCl₂/1% Triton X/0.02% NaN₃ at 37°C for 18 h. Protein markers are immunoglobulin (150 kDa), transferrin (77 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), ovalbumin (43 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa).

コラゲナーゼ活性は検出されなかったが、前述のようにトランスフェリン分解活性がコラーゲン分解能も有する好中球エラスターゼの可能性が強いことから、この実験モデルではエラスターゼがコラーゲン分解を行っているものと推測される。エラスターゼはコラーゲン分子の N 末端部位のみを切断すること³⁴⁾から、本実験で行った可溶性コラーゲンを基質としたアッセイではその活性の検出は不可能であったと考えられる。

本実験モデルは著しい関節軟骨の破壊をきたすことから慢性関節リウマチにおける関節軟骨破壊機序の解明にいくつかの示唆を与えている。慢性関節リウマチは免疫学的機序で生ずるが、引き金となる抗原については免疫グロブリン、EB ウイルス、細菌菌体成分、II 型コラーゲンなど種々の物質があげられておりいずれも決定的とはいえない³⁵⁾。生体内に存在する多くの蛋白質は陽イオン状態では存在しないが、溶血性連鎖球菌が産生するある種の物質は強い陽イオン状態にあることが知られており³⁶⁾、このような物質が抗原となりうる可能性は否定できない。また、全身性エリテマトーデスの抗 DNA 抗体が、負電荷をもつプロテオグリカンと交差反応するという報告³⁷⁾は慢性関節リウマチ患者の抗核抗体にも同様の性質が存在する可能性を示唆している。これらの抗原や抗体が慢性関節リウマチ患者において存在する場合には、本実験モデルと同様、関節軟骨における持続性の抗原抗体反応によって軟骨の著しい破壊消失をきたすと考えられる。慢性関節リウマチにおける好中球の役割についてはいくつかの報告がみられるが³⁸⁾、好中球浸潤が滑膜に軽度であるこ

とからこれまでその役割についてはあまり注目されていない。しかし、本実験モデルは好中球がその中性プロテイナーゼの作用によって関節軟骨を短時間で破壊することを示しており、慢性関節リウマチ患者の関節液中に出現した多数の好中球³⁰⁾が関節軟骨破壊に重要な役割を果す可能性を示唆している。

結 論

アミド化により陽イオン化した aBSA を抗原としてモルモットに関節炎を誘導し、関節軟骨破壊機序を病理形態学と生化学的手法を用いて検討した。

1. 関節炎誘導 1 日で好中球浸潤を伴う滑膜炎がおこり、1-2 週で関節軟骨は表層部と骨髄側より著しい好中球浸潤をうけ、2 週までにはほぼ完全に破壊消失した。3-4 週後では破壊された関節軟骨と関節腔は肉芽組織により置換され、膝関節は線維性強直を経て関節炎誘導 12-20 週後に軟骨性強直像を呈した。

2. 抗原はプロテオグリカンとの静電的親和力により関節軟骨全層に捕捉され、軟骨破壊の進行した 1 週の方法でもなお少量残存することが ¹²⁵I-aBSA を用いたオートラジオグラフィーで示された。抗体は関節軟骨表層に局在することが蛍光抗体法で観察された。このことより関節軟骨表層部で形成された抗原-抗体複合体が起炎物質となり好中球を遊走させると考えられた。また、関節軟骨への抗原の捕捉が軟骨の完全破壊をきたす原因と考えられた。

3. 関節炎誘導 1, 2 週の滑膜と関節軟骨ホモジネート上清中にトランスフェリン分解活性が、1 週の滑膜と 1 週の関節軟骨ホモジネート上清中にゼラチン分解活性が検出された。トランスフェリン分解酵素活性は阻害試験と pH 曲線などによりセリンプロテイナーゼの一種と考えられ、好中球由来のエラスターゼやカテプシン G と推定された。ゼラチン分解活性は金属依存性蛋白分解酵素でゼラチンサブストレートゲル上の分子量より好中球由来のゼラチナーゼと考えられた。

以上の所見より、本実験モデルでは好中球が主役を演じており、好中球由来の中性プロテイナーゼによるプロテオグリカンやコラーゲン線維の分解によって関節軟骨の破壊消失が生ずると考えられた。

謝 辞

稿を終るに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部整形外科野村進教授並びに第一病理中西功教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり当初より直接御指導いただき、終始御懇篤なる御助言や御教示を仰ぎました金沢大学医療技術短期大学病理岡田保典助教授に深謝致します。また、研究に御協力頂き

した第一病理諸兄、並びに教室員の皆様に感謝致します。

文 献

- 1) Harris, E. D., Jr.: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **182**, 14-23 (1984).
- 2) Gardner, D. L.: The experimental production of arthritis: a review. *Ann. Rheum. Dis.*, **19**, 297-317 (1960).
- 3) 小泉富美朝: リウマチの実験モデル. *リウマチ*, **20**, 371-382 (1980).
- 4) Barrett, A. J.: The possible role of neutrophil proteinases in damage to articular cartilage. *Agents and Actions*, **8**, 11-18 (1978).
- 5) Kleesiek, K., Reinards, R. & Greiling, H.: Effect of granulocyte elastase on the metabolism of proteoglycans in inflammatory joint diseases. *In* H. Tschesche (ed.), *Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion*, p25-51, Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, 1986.
- 6) Keiser, H., Greenwald, R. A., Feinstein, G. & Janoff, A.: Degradation of cartilage proteoglycan by human leukocyte neutral proteases-a model of joint injury. II. Degradation of isolated bovine nasal cartilage proteoglycan. *J. Clin. Invest.*, **57**, 625-632 (1976).
- 7) Burleigh, M. C., Barrett, A. J. & Lazarus, G. S.: Cathepsin B1. A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem. J.*, **137**, 387-398 (1974).
- 8) Morrison, R. I. G., Barrett, A. J., Dingle, J. T. & Prior, D.: Cathepsin B1 and D. Action on human cartilage proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 411-419 (1973).
- 9) Woessner, J. F., Jr.: Purification of cathepsin D from cartilage and uterus and its action on the protein-polysaccharide complex of cartilage. *J. Biol. Chem.*, **248**, 1634-1642 (1973).
- 10) Evanson, J. M., Jeffrey, J. J. & Krane, S. M.: Studies on collagenase from rheumatoid synovium in tissue culture. *J. Clin. Invest.*, **47**, 2639-2651 (1968).
- 11) Woolley, D. E., Glanville, R. W., Crossley, M. J. & Evanson, J. M.: Purification of rheumatoid synovial collagenase and its action on soluble and insoluble collagen. *Eur. J. Biochem.*, **54**, 611-622 (1975).

- 12) Seltzer, J. L., Adams, S. A., Grant, G. A. & Eisen, A. Z.: Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J. Biol. Chem.*, **256**, 4662-4668 (1981).
- 13) Murphy, G., McAlpine, C. G., Poll, C. T. & Reynolds, J. J.: Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and type IV and V collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, **831**, 49-58 (1985).
- 14) Okada, Y., Nagase, H. & Harris, E. D., Jr.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14245-15255 (1986).
- 15) Chin, J. R., Murphy, G. & Werb, Z.: Stromelysin, a connective tissue-degrading metallo-endopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12367-12376 (1985).
- 16) van den Berg, W. B., van de Putte, L. B. A., Zwarts, W. A. & Joosten, L. A. B.: Electrical charge of the antigen determines intraarticular antigen handling and chronicity arthritis in mice. *J. Clin. Invest.*, **74**, 1850-1859 (1984).
- 17) Danon, D., Goldstein, L., Marikovsky, Y. & Skutelsky, E.: Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surface. *J. Ultrastruct. Res.*, **38**, 500-510 (1972).
- 18) Fraker, P. J. & Speck, J. C., Jr.: Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 849-857 (1978).
- 19) Hartree, E. F.: Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427 (1972).
- 20) Cawston, T. E. & Barrett, A. J.: A rapid and reproducible assay for collagenase using [1-¹⁴C] acetylated collagen. *Anal. Biochem.*, **99**, 340-345 (1979).
- 21) Harris, E. D., Jr. & Krane, S. M.: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 566-576 (1972).
- 22) Gisslow, M. T. & McBride, B. C.: A rapid sensitive collagenase assay. *Anal. Biochem.*, **68**, 70-78 (1975).
- 23) Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. K. & Mainardi, C. L.: Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2493-2500 (1985).
- 24) Janoff, A. & Scherer, J.: Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, **128**, 1137-1155 (1968).
- 25) Cooke, T. D., Hurd, E. R., Ziff, M. & Jasin, H. F.: The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen induced arthritis. *J. Exp. Med.*, **135**, 323-338 (1972).
- 26) Ohno, O., Takeishi, H. & Cooke, T. D.: Pathogenesis of chronic inflammation in experimental ferritin-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, **21**, 81-91 (1978).
- 27) van den Berg, W. B., van Beusekom, H. J., van de Putte, L. B. A., Zwarts, W. A. & der Sluis M.: Antigen handling in antigen-induced arthritis in mice. *Am. J. Pathol.*, **108**, 9-16 (1982).
- 28) Goetzl, E. L.: Cellular components of inflammation: Granulocytes. *In* W. N. Kelley, E. D. Harris, Jr., S. Ruddy & C. B. Sledge (eds.), *Textbook of Rheumatology*, vol.1, p120-135, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Tronto, 1981.
- 29) Moriizumi, T., Yamashita, N. & Okada, Y.: Papain-induced changes in the guinea pig knee joint with special reference to cartilage healing. *Virchows Arch. [Cell Pathol]*, **51**, 461-474 (1986).
- 30) Salter, R. B., Simmonds, D. F., Malcolm, B. W., Rumble, E. J., MacMichael, D. & Clements, N. D.: The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. *J. Bone Joint Surg.*, **62A**, 1232-1251 (1980).
- 31) Urist, M. R.: The origin of cartilage: Investigations in quest of chondrogenic DNA. *In* B. K. Hall (ed.), *Cartilage*, vol.2, p1-85, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1983.
- 32) Hamerman, D.: Cartilage changes in the rheumatoid joint. *Clin. Orthop.*, **64**, 91-97 (1969).
- 33) Harris, E. D., Jr. & Krane, S. M.: Collage-

nases. *New Engl. J. Med.*, **291**, 557-661 (1974).

34) Barrett, A. J. & Saklatvala, J. : Proteinases in joint disease. *In* W. N. Kelly, E. D. Harris, Jr., S. Ruddy & C. B. Sledge (eds.), *Textbook of Rheumatology*. p195-209, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1981.

35) Zvaifler, N. J. : Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *In* D. J. McCarty (ed.), *Arthritis and allied conditions*, 10th ed. p557-570, Lea & Febiger, Philadelphia, 1985.

36) Malamud, D. & Drysdale, J. W. : Isoelectric points of proteins: a table. *Anal. Biochem.*, **86**, 620-

647 (1978).

37) Faaber, P., Capel, P. J. A., Rijke, G. P. M., Vierwinden, G., van de Putte, L. B. A. & Koene, R. A. P. : Cross-reactivity of anti-DNA antibodies with proteoglycans. *Clin. Exp. Immunol.*, **55**, 502-508 (1984).

38) Schumacher, H. R. : Synovial fluid analysis. *In* W. N. Kelley, E. D. Harris, Jr., S. Ruddy & C. B. Sledge (eds.), *Textbook of Rheumatology*, vol.1, p568-579, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Tronto, 1981.

Mechanisms of Articular Cartilage Destruction in an Antigen-Induced Arthritis Model Induced by Cationic Amidated Bovine Serum Albumin Naoki Yamashita, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **97**, 97—113 (1988)

Key words : antigen-induced arthritis, destruction of cartilage, neutral proteinase, rheumatoid arthritis

Abstract

In order to better understand mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis, antigen-induced arthritis in guinea-pigs was developed and the mechanisms of articular cartilage destruction in this model were examined morphologically and biochemically. Arthritic animals were prepared by injecting charge-modified cationic amidated bovine serum albumin (pI=9.5) (aBSA, 0.5 mg) into knee joints of guinea-pigs immunized with aBSA. Marked synovitis with polymorphonuclear leukocyte infiltration started within 1 day after challenge. Neutrophils migrated from synovium and subchondral bone marrow infiltrated into articular cartilage and the cartilage was completely destroyed by 2 weeks. During the destruction of articular cartilage, proteoglycans were initially depleted and then collagen fibers disappeared. Granulation tissue derived from inflamed synovium and bone marrow replaced the destroyed cartilage and joint space, and it was turned to fibrous scarring tissue (fibrous ankylosis) by 8 weeks. Finally, the knee joint developed cartilagenous ankylosis within 12-20 weeks. Autoradiography using ¹²⁵I-aBSA and immunolocalization study of IgG demonstrated that the antigen is trapped in whole zones of articular cartilage by electrostatic binding and serves as planted antigen for the attachment of antibodies. [³H] carboxymethylated transferrin-degrading activity was detected in homogenates of arthritic synovium and cartilage from knee joints 1 and 2 weeks after the challenge. Inhibition study and pH curve indicated that the proteinase is a neutral serine proteinase and considered to be neutrophil elastase and/or cathepsin G, both of which can degrade proteoglycans. A measurable amount of gelatinolytic activity was also detected in the same samples, although they contained no collagenase activity. The enzyme was activated with 4-aminophenylmercuric acetate and inhibited with EDTA, indicating a neutral metalloproteinase. The data of SDS-gelatin substrate gel showed that the metalloproteinase is neutrophil gelatinase.

The results of this present study indicate that neutral proteinases derived from polymorphonuclear leukocytes are responsible for the destruction of articular cartilage by degrading proteoglycans and collagens, and suggest the possibility that in rheumatoid arthritis neutrophils infiltrated into synovial fluid may play an important role in the destruction of articular cartilage.