

Collagenase in Rheumatoid Synovial Tissue A Study of Its Immunolocalization and Degradation of Collagen Fibrils

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/2297/8140

慢性関節リウマチ滑膜組織におけるコラゲナーゼ

—その局在とコラーゲン線維分解に関する研究—

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 野村 進教授)

菅 原 洋 一 郎

(平成1年8月28日受付)

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) におけるコラーゲン線維分解機序を解明する目的で RA 滑膜組織におけるコラゲナーゼの局在を免疫組織学的に検索し、次いでヌードマウス移植 RA 滑膜組織におけるコラーゲン線維の分解を形態学的及び生化学的に検討した。オクタローニ法, 免疫沈降法, Western blot 法により検定されたコラゲナーゼに対する特異抗体を用いて RA 滑膜組織ならびに正常滑膜組織を免疫染色すると, コラゲナーゼは RA 滑膜組織を $1 \mu\text{M}$ モネンシンで1時間以上処理した場合のみ滑膜表層細胞に限局して認められた。このことはコラゲナーゼが RA 滑膜組織の表層細胞によって合成・分泌され, 細胞内に貯蔵されることなく持続性に分泌されることを示唆している。RA 滑膜をヌードマウス皮下に移植すると, 移植1~2週後には滑膜表層細胞直下のコラーゲン線維が細線維へと分解した。これらの移植片ではコラゲナーゼの合成・分泌が認められ, 免疫組織学的に滑膜表層細胞にコラゲナーゼが陽性であった。従って, 移植片における細胞外コラーゲン線維の分解には RA 滑膜表層細胞由来のコラゲナーゼが関与すると考えられた。細胞外コラーゲン線維の崩壊に加えて, 移植滑膜深層の線維芽細胞中にコラーゲン線維を含む空胞が認められた。また, これらのコラーゲン線維の一部には分解像が観察された。以上の所見は, コラゲナーゼ活性の上昇した生体内の組織におけるコラーゲン線維の分解が細胞内と細胞外の2つのプロセスによって進行するというを示唆している。

Key words rheumatoid arthritis, synovial tissue, collagenase, degradation of collagen fibrils

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は, 抗原-抗体複合体を起炎物質として多発性の慢性増殖性滑膜炎を生じ, 関節軟骨や骨及び関節周囲組織の破壊をきたす疾患である。一般に, 関節軟骨の破壊には (1)軟骨細胞外マトリックスの分解亢進 (2)細胞外マトリックスの合成低下 (3)軟骨細胞壊死, の3つの因子が関与すると考えられる。これらのうち, RA においては蛋白分解酵素による細胞外マトリックスの分解が関節軟骨の破壊に主要な役割を果たすと考えられている。

関節軟骨における細胞外マトリックスの主要構成成分はコラーゲンとプロテオグリカンである。RA 関節軟骨においては, プロテオグリカンの脱落に始まり,

コラーゲンの分解・消失により軟骨破壊が完了する¹⁾。プロテオグリカン分解酵素として matrix metalloproteinase 3 (MMP-3)²⁾ や好中球由来エラスターゼやカテプシンG³⁾などが知られており, RA 関節局所にこれら酵素が局在すると報告されている^{4,5)}。一方, コラーゲンは3本の α 鎖が三重らせん構造を示す構造蛋白で, 現在までにI~XII種のコラーゲン分子種が区別されている⁶⁾。これらのうち, I, II, III型コラーゲンは線維性コラーゲンと呼ばれ, 一般に種々の蛋白分解酵素には抵抗性でコラゲナーゼによって特異的に分解される。従って, これらコラーゲンの分解にはコラゲナーゼは必須な酵素である。実際, 関節破壊の著名な RA 患者の関節液⁷⁾や RA 滑膜組織培養

Abbreviations: ABC, avidin-biotin peroxidase complex; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FITC, Fluorescein isothiocyanate; H·E, hematoxylin-eosin; IL-1, interleukin 1; MMP-3, matrix metalloproteinase3; Mr, molecular weight; PAGE,

液⁹⁹⁾中にはコラゲナーゼ活性が検出されている。また、RA の関節軟骨-パンヌス境界部の細胞外マトリックスにコラゲナーゼが局在することが免疫組織化学的に証明されている¹⁰⁾。しかし、コラゲナーゼが滑膜組織のどの細胞に由来するかに関しては、これまで全く報告がみられない。また、I~III型コラーゲンは生体内ではコラーゲン線維として存在するが、コラーゲン線維の分解に関する知見はこれまできわめて少ない。RA においては、パンヌス細胞にコラーゲン線維の貧食がみられるという報告¹¹⁾があるにすぎない。

本研究においては、RA 滑膜組織においてコラゲナーゼを合成・分泌する細胞を、コラゲナーゼに対する特異抗体を用いて免疫組織学的に同定し、次いでRA 滑膜組織をヌードマウス皮下組織内に移植し、コラーゲン線維の分解過程をコラゲナーゼの局在とその活性との関係において検討した。

材料および方法

I. RA 滑膜組織および正常滑膜組織

RA 滑膜組織は、金沢大学医学部付属病院とその関連病院の RA 患者15症例より、人工関節置換術・滑膜切除術の際に採取した。対照として、靭体損傷と半月板損傷の膝関節、悪性骨巨細胞腫に対して行われた切断下肢の足関節および離断性骨軟骨炎の肘関節から採取した4例の組織学的に正常な滑膜組織を用いた。

II. 羊抗ヒトコラゲナーゼ抗体の特異性

抗体は、RA 滑膜細胞由来コラゲナーゼを羊に免疫することにより作製された。本抗体は、米国 Stanford 大学 Harris 教授 (California, USA) より供与を受けた。抗体の特異性についてはすでに検討済み (未発表) であるが、本実験においても以下の方法で再検討した。

1. ゲル内沈降反応法 (オクタローニ法)

50mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15M NaCl/0.01M CaCl₂/0.02% NaN₃ 緩衝液に溶解した1%寒天をガラスプレート上でゲル化させ、オクタローニプレートを作製した。10 μ l の抗血清と濃縮した RA 滑膜細胞培養液を用いて沈降線の出現を観察した。

2. 免疫沈降反応法

Nagase ら¹²⁾の方法に従い、コラゲナーゼを免疫沈降反応させた。 [³H] ロイシンで標識された RA 滑膜細胞培養液 (金沢大学医療技術短期大学部 岡田保典

博士より供与) 羊抗コラゲナーゼ血清を反応させた後、抗原-抗体複合体をプロテインA-セファロース CL-4B (シグマ社) に付着させ、この複合体を sodium dodecylsulfate (SDS)/polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 試料用緩衝液とともに煮沸することにより分離した。この試料を10% SDS/PAGE で電気泳動後、フルオログラフィーにより観察した。

3. イムノブロット法 (Western blot 法)

部分精製された活性型コラゲナーゼと濃縮された RA 滑膜細胞培養液 (岡田保典博士より供与) を10% SDS/PAGE で電気泳動し、ポリアクリルアミドゲルから蛋白をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を抗コラゲナーゼ IgGF (ab')₂ と反応させ、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC法) にて観察した。

III. RA 滑膜組織におけるコラゲナーゼの免疫組織学的局在

1. 抗コラゲナーゼ IgGF (ab')₂ の作製

マクロファージをはじめとする Fc レセプターを有する細胞との非特異的反応を防ぐ為に、IgGF (ab')₂ を以下の方法で作製した。羊抗ヒトコラゲナーゼ血清 (50ml) と末感作血清 (20ml) より硫酸沈殿法 (30% 飽和度) と 0.1M Tris-HCl, pH 8.0/0.02% NaN₃ 緩衝液で平衡化された DEAE-cellulose カラム (2.5 \times 6cm) により IgG を精製した。精製した IgG を 0.1M 酢酸緩衝液, pH 4.5 に透析後、ペプシン (重量比 1:50) (シグマ社) で 37 $^{\circ}$ C, 49時間消化した。ペプシンの作用をペプスタチン A で停止後、試料を phosphate buffer saline (PBS)/0.02% NaN₃ で平衡化した Ultrogel AcA44 カラム (1.5 \times 115cm) にかけて、各プロテインピークの蛋白を10%SDS/PAGE によって調べた後、IgGF (ab')₂ 分画分を集めアミコン限外濾過装置で 6.2mg/ml に濃縮した。

2. 間接蛍光抗体法

採取した RA 滑膜組織をできる限り速やかに約 3 \times 3 \times 3mm 大に細切し、Hembry¹³⁾ らの方法に従い 1 μ M モネンシンと 15% 牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Flow Laboratories) 液中で、10分、30分、1時間、2時間、3時間 器官培養した。対照として、モネンシンを含まない DMEM 培養液中で同時間培養した材料を用いた。培

polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffer saline; PMA, phorbol myristate acetate; RA, rheumatoid arthritis; SDS, sodium dodecyl sulfate; TNF α , tumor necrosis factor α

養後、試料を未固定で Tissue-Tek O.C.T. compound (Miles, USA) に包埋し凍結切片を作製した。この切片を PBS で十分洗浄後、羊抗コラゲナーゼ IgGF (ab)₂あるいは未感作羊 IgGF (ab)₂で2時間反応し、Fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識したヤギ抗羊 IgG 抗体と反応して蛍光顕微鏡で観察した。吸収試験は、抗体をコラゲナーゼ活性を含む培養液で希釈することで実施した。対照群の正常滑膜組織についても、RA 滑膜組織と同様の方法で処理し、間接蛍光抗体法によりコラゲナーゼの局在を検討した。また、上述の材料の一部を10%中性ホルマリン固定し、パラフィン切片につきヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin, H・E) 染色を実施し組織学的に観察した。

IV. RA 滑膜組織のヌードマウス皮下移植

1. RA 滑膜移植片の組織学および電子顕微鏡的観察

RA 滑膜組織を DMEM 液中で 3 × 3 × 3 mm 大に細切し、小切開を加えたヌードマウス背部皮下へ移植した。移植3日、1、2、3、4、5 週後にヌードマウ

スを屠殺し、移植片と皮膚を一塊として採取した。材料を10%ホルマリン固定後パラフィン切片につき H・E 染色で組織学的に観察した。また、電顕的には RA 滑膜移植片を速やかに細切し、2.5%グルタルアルデヒドと2%オスミウム酸二重固定後エボン包埋した。超薄切片を酢酸ウラニールと硝酸鉛染色し電子顕微鏡で観察した。

2. 移植片におけるコラゲナーゼと MMP-3 の局在
ヌードマウス移植3日、1、2、3、4 週後の移植片を 1 μM モネンシン3時間処理後未固定で凍結切片を作製し、コラゲナーゼの局在を観察した。また、抗 MMP-3 抗体⁹⁾ (金沢大学医療技術短期大学部 岡田保典博士より供与) を用いて、滑膜移植片における局在を上述の凍結切片とホルマリン固定後パラフィン切片につき、それぞれ蛍光抗体法と ABC 法で検討した。

3. コラゲナーゼ活性の測定

RA 滑膜組織とヌードマウス滑膜移植片を0.2%水

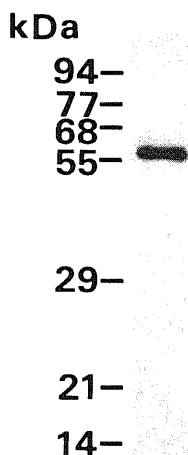


Fig.1. Immunoprecipitation from [³H] leucine-labeled culture medium from rheumatoid synovial cells with sheep anti-collagenase antiserum. The precursor form of collagenase (Molecular weight, Mr=53,000) immunoprecipitated from the culture medium using anti-collagenase antiserum and protein A-Sepharose CL-4B. The sample was run on 10% SDS/PAGE and fluorographed. The Mr of standard proteins are indicated to the left of the fluorograph.

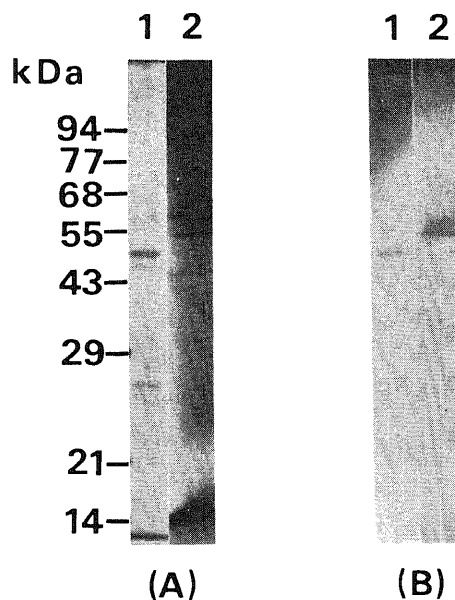


Fig.2. Western blotting. Partially purified active collagenase (lane 1) and concentrated culture medium from rheumatoid synovial cells (lane 2) were electrophoresed on 10% SDS (reducing) gel (A). Another set of samples were electrophoresed and transferred to nitrocellulose, and collagenase was visualized using anticollagenase IgG F(ab)₂ and a biotinated anti-sheep IgG antibody followed by an ABC method (B). The Mr of standard proteins are indicated to the left of the gel.

酸化ラクトアルブミンを含む無血清 DMEM 培養液中で48時間器官培養し、培養液中のコラゲナーゼ活性を ^{14}C 標識コラーゲンを基質として測定した。コラゲナーゼ活性の測定は、金属依存性蛋白分解酵素の活性化剤である 4-aminophenylmercuric acetate (最終濃度1.5mM) の存在、非存在下で行った。培養液採取後、Hinegardner¹⁴⁾の方法に従って組織の DNA 量を測定し、各試料におけるコラゲナーゼ活性を μg DNA あたりの活性として示した。また、RA 滑膜組織とヌードマウス移植片の一部を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 7.4/0.15M NaCl/10mM CaCl₂/0.02% NaN₃) で十分洗浄後、0.05% Brij35 を含む同緩衝液と混和シ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、上清中のコラゲナーゼ活性を測定した。1単位のコラゲナーゼ活性は基質を37°Cにおいて1分間に1 μg 分解することを意味する。

成 績

I. 抗コラゲナーゼ抗体の特異性

ゲル内沈降反応法では、抗コラゲナーゼ血清と培養液との間に単一の沈降線が観察された。また、 ^3H ロイシンによって標識された分泌蛋白を RA 滑膜細胞培養液から抗コラゲナーゼ抗体を用いて免疫沈降反応

を行うと、図1の如く分子量53,000蛋白バンドが認められた。さらに、イムノブロット法でニトロセルロース膜に転写された活性型コラゲナーゼ (分子量47,000と45,000) と培養液中の潜在型コラゲナーゼ (分子量56,000と53,000) が抗コラゲナーゼ抗体によって認識された (図2)。潜在型コラゲナーゼには分子量53,000と糖付加を受けた56,000の分子があり、通常後者はごく少量しか分泌されない。また、活性化によりこれらの潜在型酵素は分子量47,000と45,000に低分子化することが知られている¹⁵⁾。従って、これらの結果より本抗体は RA 滑膜細胞由来のコラゲナーゼに対して特異的であり、潜在型と活性型の両酵素と反応することが確認された。

II. RA 滑膜組織の組織学的観察

正常滑膜組織は、1~2層の滑膜表層細胞層と表層細胞下結合組織層 (表層細胞下層) から構成されており、炎症細胞浸潤はほとんど認められなかった。RA においては表層細胞は著しく過形成となり、表層細胞下層には著名な炎症細胞浸潤と血管の増生が認められた。炎症細胞は主としてリンパ球、形質細胞からなるが、少数のマクロファージや好中球も散見された。RA 滑膜組織をモネシン処理すると、大部分の滑膜表層細胞と表層細胞下層の線維芽細胞は空胞化を示した (図3)。しかし、その他の細胞には著変はみられな

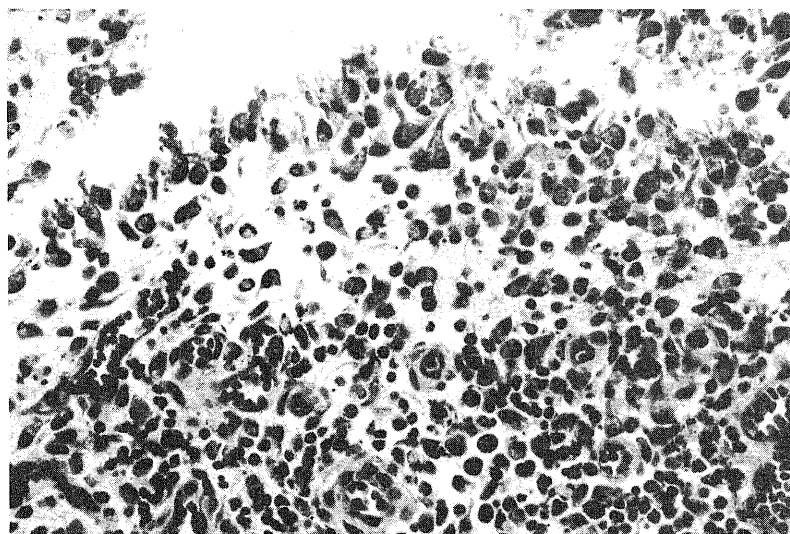


Fig. 3. Light micrograph of rheumatoid synovial tissue treated with 1 μM monensin for 3h showing hyperplastic synovial lining cells and lymphomononuclear cell infiltration in the sublining cell layer. Most of lining cells are vacuolated by the effects of monensin. H·E stain. $\times 310$.

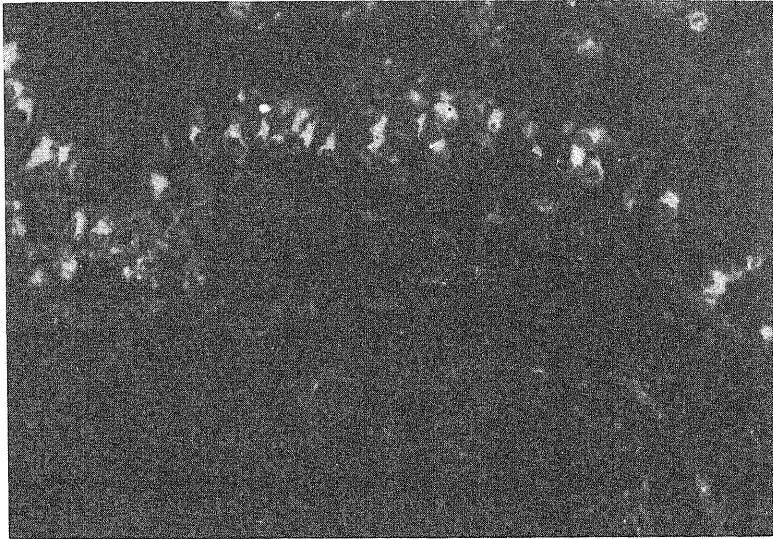


Fig. 4. Immunolocalization of collagenase in rheumatoid synovial tissue. The tissue was treated with 1μ M monensin for 3h and frozen sections were stained by a FITC-immunofluorescent method with anti-collagenase IgG F(ab)₂. Note positive immunofluorescence in hyperplastic synovial lining cells. $\times 280$.



Fig. 5. Light micrograph of rheumatoid synovial tissue 3 days after subcutaneous implantation in a nude mouse. Villous structure of the synovium remains unchanged. H·E stain. $\times 50$.

かった。

III. RA 滑膜組織におけるコラゲナーゼの局在

コラゲナーゼの蛍光は、モネンシン処理により空胞化した RA 滑膜表層細胞に局限してみられた (図 4)。滑膜表層細胞における蛍光は、モネンシン 2~3 時間処理では明瞭に認められたが、1 時間では弱く、10~30 分間処理及び未処理材料ではほとんど染色されなかった。コラゲナーゼは滑膜表層細胞内に局限してみられ、細胞間質にはどの材料においても染色されなかった。また、細胞内のコラゲナーゼに対する蛍光は吸収試験により消失した。未感作羊 IgGF (ab)₂ を用いた蛍光抗体法では、モネンシン 3 時間処理した RA 滑膜組織においても全く蛍光は認められなかった。また、正常滑膜組織では、モネンシン処理 (3 時間) 材料においてもコラゲナーゼの蛍光は全く観察されなかった。

IV. RA 滑膜組織のヌードマウス皮下移植

1. 肉眼的及び組織学的観察

RA 滑膜組織をヌードマウス皮下に移植すると、移植直後より皮膚の小隆起として観察された。この小隆起は移植後徐々に増大し、1~2 週で最も大きく、4 週以降は縮小し、5 週以降ほとんど認められなくなった。ヌードマウス皮下に生着した移植片には多数の血管侵入がみられるのに対し、生着しなかった移植片では血管侵入は認められなかった。

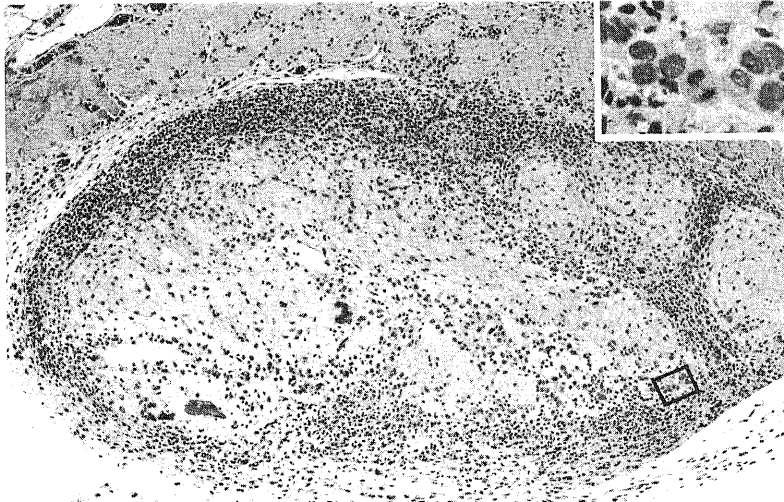


Fig. 6. Rheumatoid synovial implant 2 weeks after implantation. Synovial lining cells show stratiform arrangement and mitosis (inset). Note the dispersed collagen fiber bundles just beneath the synovial lining cells H•E stain. $\times 75$. Inset; H•E stain. $\times 400$.

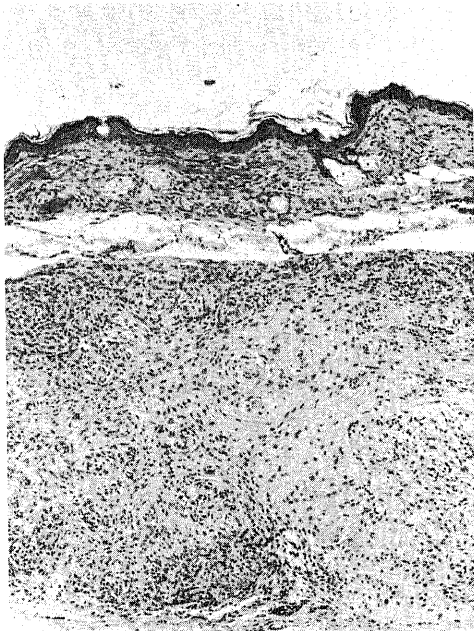


Fig. 7. Rheumatoid synovial implant 4 weeks after implantation. H•E stain. $\times 80$.

組織学的に、移植後3日では、RA滑膜組織は滑膜絨毛構造が明瞭にみられ、滑膜表層細胞層と表層細胞下層がはっきりと区別された(図5)。移植1~2週では、移植片周囲に不完全な線維性被膜が形成され、被膜側から移植片中へ多数の毛細血管侵入が観察された。移植片には層状に配列する明らかな滑膜表層細胞がみられ、まれに核分裂像が観察された(図6)。しかし、移植3日の材料と比較すると、滑膜絨毛構造は不明瞭となった。また、滑膜表層細胞直下のコラーゲン線維束には疎開がみられた(図6)。3~4週では、移植片は全体に縮小し絨毛構造は全く不明で、滑膜表層細胞は所々で島状に認められるにすぎなかった(図7)。毛細血管はかなり豊富で血管周囲にはコラーゲン線維束が認められた。

2. 電子顕微鏡的観察

RA滑膜表層細胞は、超微形態学的に異なる2種類の細胞、すなわち滑膜芽細胞(B細胞)と滑膜マクロファージ(A細胞)から構成されており、両者に明らかな形態学的移行は認められなかった。滑膜芽細胞は細胞突起に乏しく、豊富な粗面小胞体とゴルジ装置及び特異な分泌顆粒の存在によって特徴づけられた¹⁶⁾¹⁷⁾。一方、滑膜マクロファージは多数の偽足様突起を持ち、その胞体内には空胞やライソゾームが豊富にみられた¹⁶⁾¹⁷⁾。

ヌードマウス移植3日の材料では、滑膜表層細胞層にはこれらの細胞が同定されたが、1~2週では、滑

膜マクロファージは消失し大部分が滑膜芽細胞から構成されていた(図8)。移植1~2週のマテリアルで最も注目される所見は、表層細胞直下のコラーゲン線維に分解像がみられることと(図8, 9)、表層細胞下層の線維芽細胞胞体内にコラーゲン線維を含む空胞が観察されることである(図10)。コラーゲン線維の分解像は、組織学的にコラーゲン線維束の疎開部に一致して観察された。コラーゲン線維は、縦断面では細線維に解離し

てみられ、時々線維の長軸に対して斜走する微細な裂隙が認められた。横断面ではコラーゲン線維は辺縁部が微細な裂隙形成により虫食い状となっていた(図9)。一方、線維芽細胞胞体内のコラーゲン線維は、表層細胞下層深部の線維芽細胞に主として認められた。これらのコラーゲン線維は、線維芽細胞の空胞内に1~10数本含まれており、ほとんどの線維には明瞭な67nm横紋周期が存在した(図10)。しかし、一部の空



Fig. 8. Electron micrograph of rheumatoid synovial implant 2 weeks after implantation, showing a synovioblast (B-cell) with specific secretory granules (arrow heads) and extracellular degradation of collagen fibrils (arrows). Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 9,600$.

胞内では横紋の不明瞭化の他、長周期横紋線維や微細線維状物質への分解像が認められた(図10)。また、コラーゲン線維を入れた空胞周囲には、しばしば dense body (ライソゾーム) が近接して認められた。しかし、これらの細胞内線維を持つ線維芽細胞の周囲に存在するコラーゲン線維には細胞外分解像は観察されなかった(図10)。同様な細胞内コラーゲン線維は、滑膜移植片周囲の線維性被膜内の線維芽細胞にもごくまれに観察された。移植3~4週では、ヌードマウスより侵入した血管間に線維芽細胞とコラーゲン線維が観察されたが、細胞外でのコラーゲン線維の分解像や線維芽細胞内のコラーゲン線維はみられなかった。

3. RA 滑膜移植片におけるコラーゲナーゼと MMP-3 の局在

移植1~2週の方法では、コラーゲナーゼの蛍光は滑膜表層細胞に一致して認められた(図11)。3週の方法では、コラーゲナーゼは島状に存在する滑膜表層細胞に陽性であった。MMP-3 の局在もコラーゲナーゼのそれと全く同様で、移植1~2週の滑膜表層細胞に認められた(図12)。両酵素とも4週の方法では陰性であっ

た。また、未感作羊 IgGF (ab')₂ での免疫染色では蛍光は観察されなかった。

4. コラーゲナーゼ活性の検出

図13に示す如く、RA 滑膜組織は培養液中に多量のコラーゲナーゼを分泌していた。ヌードマウスへ移植後も、3日から3週までは移植前の約50~60%に相当するコラーゲナーゼを分泌した。しかし、4週では活性は全く検出されなくなった。これらの材料におけるコラーゲナーゼ活性は潜在型コラーゲナーゼで、その活性の検出には 4-aminophenylmercuric acetate 処理が必要であった。RA 滑膜組織及びヌードマウス移植片のホモジネートでは、コラーゲナーゼ活性は 4-aminophenylmercuric acetate 存在下においても全く検出されなかった。

考 察

関節を構成する関節軟骨、骨、関節包及び靭体に存在するコラーゲンの大部分は I~III 型の線維性コラーゲンであり、それぞれの組織の支持や弾性の付与に役立つ。従って、これらコラーゲンの分解は関節

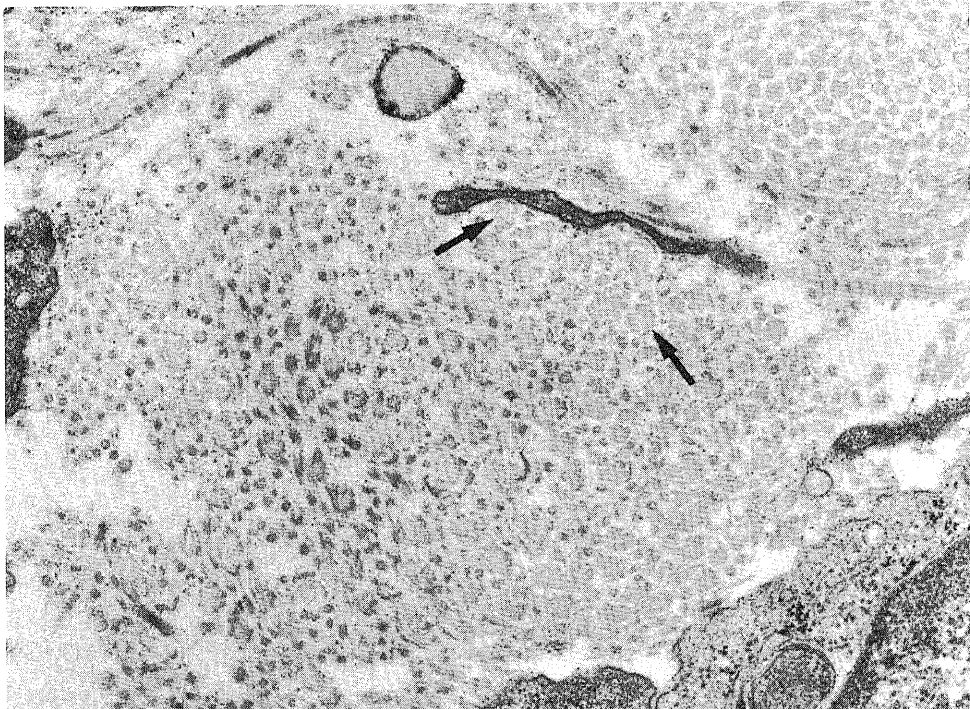


Fig. 9. Extracellular breakdown of collagen fibrils in rheumatoid synovial implant 2 weeks after implantation. Note the dissociation of collagen fibrils to microfibrils and irregular clefts of the fibrils in cross section (arrows). Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 27,000$.

の不可逆性の破壊へと誘導する。線維性コラーゲンは、その分子中の三重ラセン構造のために一般に蛋白分解酵素には抵抗性である。好中球由来のエラスターゼやカテプシンGは、アミノ基末端の非ラセン部を切断することによりその分解に関与すると考えられている¹⁸。しかし、これらコラーゲン分子を特異的に分解するのはコラゲナーゼであり、組織のコラーゲン分解に関与することは、コラーゲン分解の亢進した組織にコラゲナーゼ活性や局在がみられることから一般に支持されている¹⁹。RA においては、患者関節液⁷やRA 滑膜組織培養液^{8,9}中にコラゲナーゼ活性が検出されている。また、培養 RA 滑膜細胞²⁰や RA 軟骨-パンス境界部の細胞外マトリックス¹⁰にコラゲナーゼの局在が免疫組織学的に証明されている。しかし、これまで関節局所におけるコラゲナーゼ産生細胞に関しては全く報告がみられない。

本研究においては、滑膜をモネンシン処理すること

により RA 滑膜表層細胞がコラゲナーゼ合成・分泌細胞であることを初めて証明することができた。モネンシンはカルボキシイオノフォアで、リボゾームで合成された蛋白の分泌をゴルジ装置のレベルで阻害することが知られている^{21,22}。これまで、コラーゲンとフィブロネクチン²³、tissue inhibitor of metalloproteinases¹³、コラゲナーゼ^{24,25}及び MMP-3^{42,43}の細胞内における免疫組織化学的局在がモネンシン処理法の併用によって可能となっている。ウサギ滑膜細胞由来コラゲナーゼは、phorbtor myristate acetate (PMA) 刺激下でリボゾームで合成後粗面小胞体とゴルジ装置を經由して30分以内に培養液中に分泌されることが生化学的に証明されている¹²。本実験では、RA 滑膜コラゲナーゼの蛍光はモネンシン未処理材料では全く認められず、1時間以上の処理で明瞭に観察された。このことは、上述の生化学的データとよく一致し、コラゲナーゼがゴルジ装置を經由後細胞内に貯蔵されること

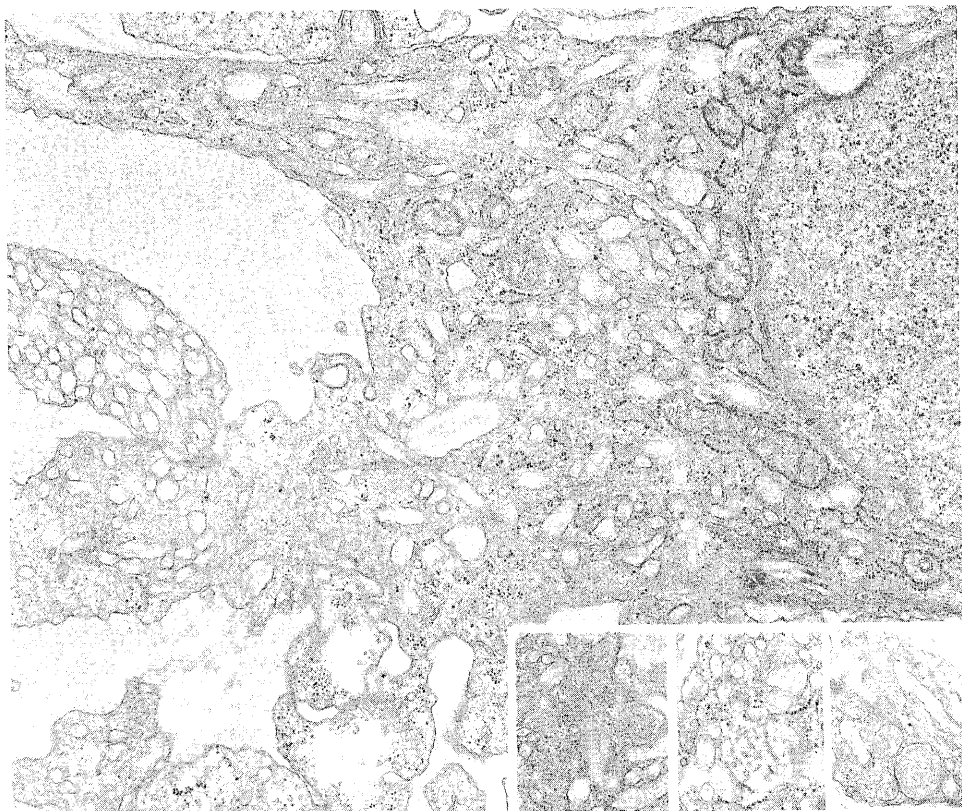


Fig.10. Portion of a fibroblast in sublining cell layer of rheumatoid synovial implant 2 weeks after implantation. The cytoplasm is occupied by many vacuoles containing collagen fibrils. Inset shows various degradation patterns of collagen fibers in the vacuoles. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 13,200$.

なく持続性に分泌されることを示している。

コラゲナーゼの合成刺激因子には、PMA²⁶⁾、コルヒチン²⁷⁾、サイトカラシンB²⁸⁾、鉄化合物²⁹⁾、substance P³⁰⁾、インターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1)³¹⁾および tumor necrosis factor α (TNF α)³²⁾などが報告されている。これらは、いずれも培養細胞を用いて得られたデータであり、RA 滑膜組織におけるその調節因子についてはなお明らかではない。本実験では、コラゲナーゼの蛍光は炎症細胞浸潤の全くない正常滑膜ではみられず、著しい炎症細胞浸潤を示す RA 滑膜の表層細胞に観察された。IL-1 や TNF α などのサイトカインはマクロファージなどの炎症細胞に由来することから³³⁾、RA 滑膜においてはこれらのサイトカインがコラゲナーゼの合成刺激因子として作用すると推定される。

コラゲナーゼはI~III型コラーゲン分子をアミノ基末端から3/4の部位で特異的に切断することはよく知られているが¹⁹⁾、多数のコラーゲン分子の重合したコラーゲン線維に対してどのように作用するかに関して

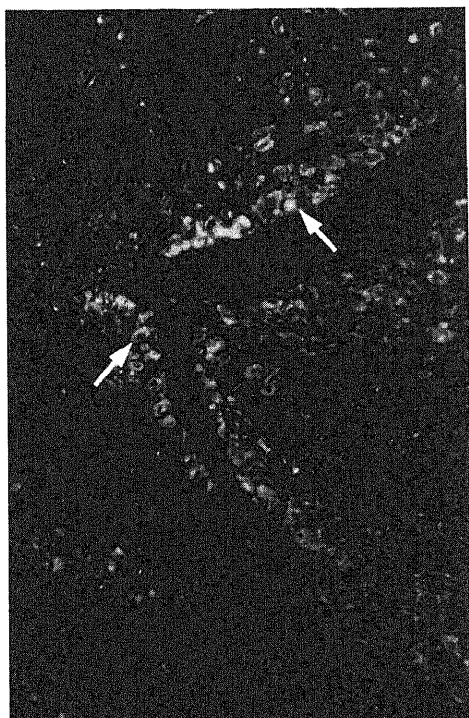


Fig. 11. Immunolocalization of collagenase in rheumatoid synovial implant 2 weeks after implantation. Note that synovial lining cells have positive FITC-immunofluorescence (arrows). $\times 190$.

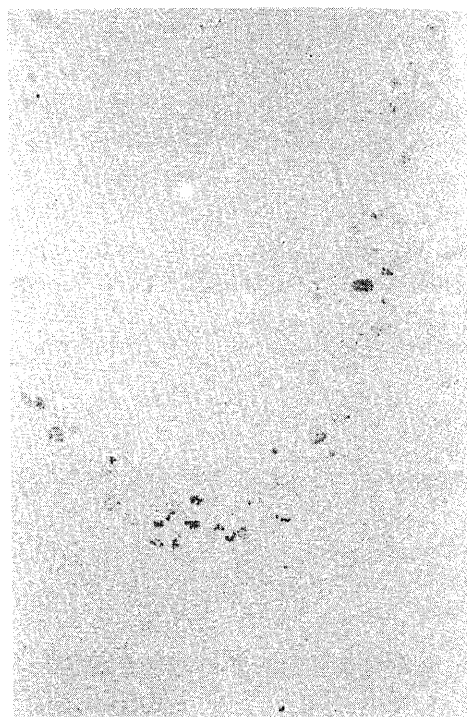


Fig. 12. Immunolocalization of MMP-3 in rheumatoid synovial implant 2 weeks after implantation. MMP-3 is localized in synovial lining cells by ABC method. $\times 140$.

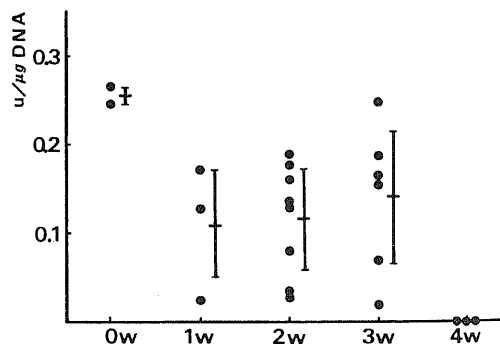


Fig. 13. Collagenase activity in culture media from rheumatoid synovial tissue (0 week) and rheumatoid synovial implants in nude mice 1 to 4 weeks after implantation. A portion of culture medium (20μ l) was assayed using 14 C-collagen in the presence of 1.5 mM 4-aminophenylmercuric acetate for 3-12 h at 37°C . Each bar represents mean \pm SD.

は十分解明されていない。これまで生体内のコラーゲン線維の分解には(1)細胞外でのコラゲナーゼによる分解と(2)細胞によるコラーゲン線維の貪食、の2つのプロセスが存在すると Woessner³⁰⁾ や Harris & Krane¹⁹⁾ によって指摘されている。これらのうち、細胞外コラーゲン線維の分解に関しては、壊死性鞏膜炎³⁰⁾ や牛血清あるいは卵白アルブミン誘導角膜炎^{30,37)} で詳しく観察されている。これらの報告では、コラーゲン線維は膨張性変化や斜走する裂隙形成を経て細線維へと分解するとされている。しかし、このようなコラーゲン線維の分解酵素に関してはいかなるデータも記載されていない。一方、Fell ら³⁸⁾ はブタ滑膜を器官培養し、コラーゲン線維の分解とコラゲナーゼ活性との関係について初めて検討したが、彼らの報告ではコラーゲン線維は細線維に分解されるという記載のみで線維自体の変化については十分観察されていない。本実験においては、コラゲナーゼを持続性に分泌する RA 滑膜を移植することにより、コラーゲン線維に対するコラゲナーゼの作用を観察した。その結果、移植1~2週後の滑膜移植片中にコラーゲン線維の虫食い状変化が認められた。このような線維は、滑膜表層細胞直下の表層細胞下層のコラーゲン線維にみられ、組織学的にコラーゲン線維束の疎開を示す部位に一致した。滑膜移植片によるコラゲナーゼの分泌は移植後3週までみられ、蛍光抗体法により移植滑膜においても表層細胞がコラゲナーゼ合成・分泌細胞であることが確かめられた。これらのデータは前述の虫食い状のコラーゲン線維がコラゲナーゼの作用による分解像である可能性を強く示唆している。

RA 滑膜移植片にはコラーゲン線維の細胞外での分解と並行して、空腔内コラーゲン線維をもつ線維芽細胞の出現が認められた。細胞内コラーゲン線維は、生理的および病的組織^{39,40)}、培養組織⁴¹⁾ および退縮期の妊娠子宮⁴²⁻⁴⁴⁾ など多くの報告がみられる。これらの報告では、コラーゲン線維はマクロファージ⁴²⁻⁴⁴⁾、子宮平滑筋細胞⁴⁵⁾ あるいは線維芽細胞³⁹⁻⁴¹⁾ の空腔内に観察されている。マクロファージはコラーゲンを合成しないことから、マクロファージ胞体内のコラーゲン線維は貪食によるコラーゲン線維の分解過程と考えられている。一方、線維芽細胞内のそれはコラーゲン線維の貪食処理という意見³⁹⁻⁴¹⁾ と、過剰に合成されたコラーゲンの細胞内消化という説⁴⁶⁾ が対立している。しかし、現在の所、コラーゲン線維の貪食を支持する意見が支配的である^{11,39-41)}。本実験においても、細胞内コラーゲン線維は、(1)細胞外でのコラーゲン線維の分解時期に一致して出現すること(2)移植 RA 滑膜組織は

最終的に消失し、同組織で活発なコラーゲン合成は行われないこと(3)空腔内のコラーゲン線維に横紋の不明瞭化や細線維への解離など明らかな分解像がみられること(4)線維芽細胞にはコラーゲン線維貪食能が実証されていること⁴⁵⁾ から線維芽細胞によるコラーゲン線維の貪食と推定される。

細胞外のコラーゲン線維が線維芽細胞に貪食されるためには、線維に何らかの変性が起こることが必要と考えられる。しかし、本研究の検索の範囲では、他の報告⁴²⁾ と同様、細胞内コラーゲン線維を有する線維芽細胞周囲の線維に特別な構造的変化を認めることができなかった。線維芽細胞が貪食すべきコラーゲン線維を認識する機序は不明であるが、コラーゲン線維周囲のプロテオグリカンの分解による線維表面構造の変化が貪食の引き金になる可能性が考えられる。本実験においては、移植滑膜細胞から分泌される MMP-3 にプロテオグリカン分解能があること⁷⁾ から、本酵素の作用によるプロテオグリカンの消失がその貪食に関与すると想像される。

RA 関節組織においては、パンヌス-関節軟骨境界部の細胞外マトリックスにコラゲナーゼの局在が報告されており¹⁰⁾、パンヌス細胞にはコラーゲン線維の貪食像が観察されている¹¹⁾。これらの所見より、パンヌス-軟骨境界部においてはコラーゲン線維の分解・吸収が行われていると信じられている。しかし、RA 滑膜組織にはいずれの所見も観察されず、これまでそのような報告もみられない。このことは、おそらくコラゲナーゼや MMP-3 などの酵素は関節腔へと方向性をもって分泌されるためと推定される。実際、RA 患者の関節液中に多量の潜在型コラゲナーゼ活性が検出されること⁷⁾ は上記の仮説とよく一致する。これに対して、RA 滑膜をヌードマウスに移植すると前述のようにコラーゲン線維の分解がみられるのは、おそらく移植により滑膜表層細胞の極性が失われ、方向性をもった酵素の分泌が不可能になるためと推定される。コラーゲン線維の分解は表層細胞と表層細胞下層の構造が不明瞭となる移植後1~2週の間のみみられることはそのことを支持している。

結 論

RA 滑膜及び正常滑膜組織におけるコラゲナーゼの免疫組織化学的局在と、ヌードマウス移植 RA 滑膜組織におけるコラーゲン線維の分解機序を検討し、以下の結果を得た。

1. 抗コラゲナーゼ抗体は、オクトローニ法、免疫沈降法、イムノプロット法の各データよりコラゲナー

ぜに特異的であり、潜在型と活性型の両酵素を認識することが示された。

2. コラゲナーゼに対する蛍光は、モネンシン処理したRA滑膜組織の表層細胞に局限して観察された。しかし、正常滑膜組織ではモネンシン処理材料でも蛍光は陰性であった。

3. RA滑膜組織をヌードマウス皮下へ移植すると、移植1～2週の方法で表層細胞下層のコラーゲン線維が細線維へと分解するのが観察された。これらの移植片では、滑膜表層細胞によるコラゲナーゼの産生が免疫組織化学およびコラーゲンを基質とするアッセイにより証明された。従ってこれらの細胞外コラーゲン線維の分解に滑膜細胞由来のコラゲナーゼが関与すると考えられた。

4. 移植1～2週のRA滑膜移植片では表層細胞下層深部に空胞内コラーゲン線維をもつ線維芽細胞の出現が認められた。これらの細胞内コラーゲン線維には明らかな空胞内での分解像がみられた。

以上のデータはコラゲナーゼがRA滑膜表層細胞によって細胞内に貯蔵されることなく持続性に分泌されることを示すとともに、コラゲナーゼ活性の上昇した組織においてはコラーゲン線維が細胞外と細胞内の2つのプロセスで分解されることを示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師野村進教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導、御協力を戴きました富田勝郎助教授と本研究を直接御指導、御教示頂きました金沢大学医療技術短期大学岡田保典助教授に心より謝意を表します。さらに、本稿の御校閲を賜りました金沢大学医学部第一病理学教室中西功夫教授、ならびに御助言、御協力を頂いた金沢大学医学部整形外科学教室非常勤講師宗広志平博士ならびに第一病理学教室教室員の方々から心より感謝いたします。

文 献

- 1) Hamerman, D.: Cartilage changes in the rheumatoid joint. *Clin. Orthop.*, **64**, 91-97 (1969).
- 2) Okada, Y., Nagase, H. & Harris, E. D., Jr.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14245-14255 (1986).
- 3) Keiser, H., Greenwald, R. A., Feinstein, G. & Janoff, A.: Degradation of cartilage proteoglycan by human leukocyte granule neutral proteases—a model of joint injury. II. Degradation of isolated bovine nasal cartilage proteoglycan. *J. Clin. Invest.*, **57**, 625-632 (1976).
- 4) Okada, Y., Takeuchi, N., Tomita, K., Nakanishi, I. & Nagase, H.: Immunolocalization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B-cell): correlation to rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, (1989). in press.
- 5) Velvart, M. & Fehr, K.: Degradation in vivo of articular cartilage in rheumatoid arthritis and juvenile chronic arthritis by cathepsin G and elastase from polymorphonuclear leukocytes. *Rheumatol. Int.*, **7**, 195-202 (1987).
- 6) 永井 裕: コラーゲンの構造と機能. 生体の科学, **39**, 260-265 (1988).
- 7) Harris, E. D., Jr., DiBona, D. R. & Krane, S. M.: Collagenases in human synovial fluid. *J. Clin. Invest.*, **48**, 2104-2113 (1969).
- 8) 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).
- 9) Harris, E. D., Jr., Cohen, G. L. & Krane, S. M.: Synovial collagenase: Its presence in culture from joint disease of diverse etiology. *Arthritis Rheum.*, **12**, 92-102 (1969).
- 10) Woolley, D. E., Crosley, M. J. & Evanson, J. M.: Collagenase at sites of cartilage erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis rheum.*, **20**, 1231-1239 (1977).
- 11) Harris, E. D., Jr., Glauert, A. M. & Murley, A. H. G.: Intracellular collagen fibers at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **20**, 657-665 (1977).
- 12) Nagase, H., Brinckerhoff, C. E., Vater, C. A. & Harris, E. D., Jr.: Biosynthesis and secretion of procollagenase by rabbit synovial fibroblasts. *Biochem. J.*, **214**, 281-288 (1983).
- 13) Hembry, R. M., Murphy, G. & Reynolds, J. J.: Immunolocalization of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in human cell. *J. Cell Sci.*, **73**, 105-119 (1985).
- 14) Hinegardner, R. T.: An improved fluorometric assay for DNA. *Anal. Biochem.*, **39**, 197-201 (1971).
- 15) Ito, A. & Nagase, H.: Evidence that human

- rheumatoid synovial matrix metalloproteinase 3 is an endogenous activator of procollagenase. *Arch. Biophys. Biochem.*, **267**, 211-216 (1988).
- 16) **Okada, Y., Nakanishi, I. & Kajikawa, K.** : Ultrastructure of the mouse synovial membrane: development and organization of the extracellular matrix. *Arthritis Rheum.*, **24**, 835-843 (1981).
- 17) **Okada, Y., Nakanishi, I., Munehiro, C., Umeda, S., Ichizen, H. & Masuda, S.** : The presence of siderosomes in synovioblasts (B-cells) of chronic spontaneous hemarthrosis. Histologic, electron microscopic, and roentgenographic electron microanalysis studies of three cases. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **108**, 968-972 (1984).
- 18) **Barrett, A. J.** : The possible role of neutrophil proteinases in damage to articular cartilage. *Agents Actions*, **8**, 11-18 (1978).
- 19) **Harris, E. D., Jr. & Krane, S. M.** : Collagenases. *New Engl. J. Med.*, **291**, 557-661 (1974).
- 20) **Woolley, D. E., Harris, E. D., Jr., Mainardi, C. L. & Brinckerhoff, C. E.** : Collagenase immunolocalization in cultures of rheumatoid synovial cells. *Science*, **200**, 773-775 (1978).
- 21) **Tartakoff, A. M.** : Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell*, **32**, 1026-1029 (1983).
- 22) **Morré, D. J., Morré, D. M., Mollenhauer, H. H. & Reutter, W.** : Golgi apparatus cisternae of monensin-treated cells accumulate in the cytoplasm of liver slices. *Eur. J. Cell Biol.*, **43**, 235-242 (1987).
- 23) **Ledger, P. W., Uchida, N. & Tanzer, M. L.** : Immunocytochemical localization of procollagen and fibronectin in human fibroblasts: Effects of the monovalent ionophore, monensin. *J. Cell Biol.*, **87**, 663-671 (1980).
- 24) **Murphy, G., Hembry, R. M. & Reynolds, J. J.** : Characterization of a specific antiserum to rabbit stromelysin and demonstration of the synthesis of collagenase and stromelysin by stimulated rabbit articular chondrocytes. *Collagen Rel. Res.*, **6**, 351-364 (1986).
- 25) **Hembry, R. M., Murphy, G., Gawston, T. E., Dingle, J. T. & Reynolds, J. J.** : Characterization of a specific antiserum for mammalian collagenase from several species: immunolocalization of collagenase in rabbit chondrocytes and uterus. *J. Cell Sci.*, **81**, 105-123 (1986).
- 26) **Brinckerhoff, C. E., McMillar, R. M., Fahey, J. V. & Harris, E. D., Jr.** : Collagenase production by synovial fibroblasts treated with phorbol myristate acetate. *Arthritis Rheum.*, **22**, 1109-1116 (1979).
- 27) **Harris, E. D., Jr. & Krane, S. M.** : Effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.*, **14**, 669-684 (1971).
- 28) **Harris, E. D., Jr., Reynolds, J. J. & Werb, Z.** : Cytochalasin B increases collagenase production by cells in vitro. *Nature*, **257**, 243-244 (1975).
- 29) **Okazaki, I., Brinckerhoff, C. E., Sinclair, J. F., Sinclair, P. R., Bonkowsky, H. L. & Harris, E. D., Jr.** : Iron increases collagenase production by rabbit synovial fibroblasts. *J. Lab. Clin. Med.*, **97**, 396-402 (1981).
- 30) **Lotz, M., Carson, D. A. & Vanghan, J. H.** : Substance P activation of rheumatoid synovial cells: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science*, **235**, 893-895 (1987).
- 31) **Dayer, J. M., Russel, R. G. G. & Krane, S. M.** : Collagenase production by rheumatoid synovial cells: stimulation by a human lymphocyte factor. *Science*, **195**, 181-183 (1977).
- 32) **Dayer, J. M., Bentler, B. & Cerami, A.** : Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.*, **162**, 2163-2168 (1985).
- 33) **Vlassara, H., Brownlee, M., Manogue, K. R., Dinarello, C. A. & Pasagian, A.** : Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science*, **240**, 1546-1548 (1988).
- 34) **Woessner, J. F., Jr.** : Mammalian collagenases. *Clin. Orthop.*, **96**, 310-326 (1973).
- 35) **Young, R. D. & Watson, P. G.** : Microscopical studies of necrotising scleritis. II. Collagen degradation in the scleral stroma. *Brit. J. Ophthalmol.*, **68**, 781-789 (1984).
- 36) **Mohos, S. C. & Wagner, B. M.** : Damage to collagen in corneal immune injury. Observation of connective tissue structure. *Arch. Pathol.*, **88**, 3-20

(1969).

37) Young, R. D., Hembry, R. M., Watson, P. G. & Dingle, J. T.: Ultrastructural studies of corneal collagen during the development of experimental scleritis in rabbits. *Diag. Histopathol.*, **4**, 199-207 (1981).

38) Fell, H. B., Reynolds, J. J., Lawrence, C. E., Bagga, M. R. & Glanert, A. M.: The promotion and inhibition of collagenbreakdown in organ cultures of pig synovium: The requirement for serum components and the involvement of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate (cAMP). *Collagen Rel. Res.*, **6**, 51-75 (1986).

39) Marchi, F. & Leblond, C. P.: Collagen biogenesis and assembly into fibrils as shown by ultrastructural and ³H-proline radioautographic studies on the fibroblasts of the rat foot pad. *Am. J. Anat.*, **168**, 167-197 (1983).

40) McGaw, W. T. & Ten Cate, A. R.: A role for collagen phagocytosis by fibroblasts in scar remodeling: an ultrastructural stereologic study. *J. Invest. Dermatol.*, **81**, 375-378 (1983).

41) Everts, V., Beertsen, W. & Tigchelaar-Gutter, W.: The digestion of phagocytosed collagen is inhibited by the proteinase inhibitors leupeptin and E-64. *Collagen Rel. Res.*, **5**, 315-336 (1985).

42) Parakkal, P. F.: Involvement of macrophage in collagen resorption. *J. Cell Biol.*, **41**, 345-354 (1969).

43) Jurnkova, Z. & Milenkov, C.: Involvement of smooth muscle cells in collagen degradation in the postpartum uterus. *Virchows Arch. Cell Pathol.*, **37**, 237-244 (1981).

44) Henell, F., Ericsson, J. L. E. & Glaumann, H.: An electron microscopic study of the postpartum involution of the rat uterus. With a note on apparent crinophagy of collagen. *Virchows Arch. Cell Pathol.*, **42**, 271-287 (1983).

45) Svoboda, E. L. A., Brunette, D. M. & Melcher, A. H.: In vitro phagocytosis of exogenous collagen by fibroblasts from the periodontal ligament: an electron microscopic study. *J. Anat.*, **128**, 301-314 (1979).

Collagenase in Rheumatoid Synovial Tissue. A Study of Its Immunolocalization and Degradation of Collagen Fibrils Yoichiro Sugawara, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **98**, 897—911 (1989)

Key words rheumatoid arthritis, synovial tissue collagenase, degradation of collagen fibrils

Abstract

In order to study degradation mechanisms of collagen fibrils in rheumatoid arthritis, collagenase was immunolocalized in rheumatoid synovium and the degradation of collagen fibrils in rheumatoid synovium implanted in nude mice was examined morphologically and biochemically. Using an antibody against rheumatoid synovial collagenase that was shown to be monospecific to collagenase according to the data from Ouchterlony assay, immunoprecipitation and Western blotting, collagenase was immunolocalized in rheumatoid synovial lining cells only under the treatment of the synovium with 1 μ M monensin for more than 1 h. This indicates that collagenase is synthesized and secreted continuously without storage by synovial lining cells in rheumatoid synovium. When rheumatoid synovium was implanted into subcutaneous tissue of nude mice, extracellular breakdown of collagen fibrils into microfibrils was observed in the sublining cell layer just beneath the synovial lining cells of 1- and 2- week-implants. Production of collagenase by synovial

lining cells of the implants was demonstrated by the collagenase assay and immunolocalization technique. Therefore, it was suggested that collagenase may be implicated in the extracellular digestion of the collagen fibrils. In addition to the extracellular degradation of collagen fibrils, fibroblasts located deep in the sublining cell layer had many vacuoles containing collagen fibrils, some of which showed degradative changes. These findings suggest that collagen fibrils in the tissue with increased amounts of collagenase activity are digested by both extracellular and intracellular processes.