



ウシ関節軟骨細胞の一酸化窒素およびプロスタグランディンE₂産生に及ぼすインターロイキン-4の影響

下村, 隆敏

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 61(4):115-122

(Issue Date)

2001-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00044703>



ウシ関節軟骨細胞の一酸化窒素およびプロスタグランジンE₂産生に 及ぼすインターロイキン-4の影響

下 村 隆 敏

神戸大学医学部病理学第一教室(指導:伊東 宏教授)

連絡先:下 村 隆 敏

神戸大学医学部整形外科教室

兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1

TEL: (078)341-7451, FAX: (078)351-6930

(平成12年12月25日受付)

【要 約】

Interleukin-4(IL-4) はヒト単球に作用しIL-1やIL-6などの炎症性サイトカインの産生を抑制する抗炎症作用を有するサイトカインであるが、関節軟骨細胞に作用してストロメリン(MMP-3)の産生を抑制することから関節軟骨破壊に対して防御的に作用する可能性が報告されている。

近年、IL-1 α などの炎症性サイトカインの刺激により軟骨細胞から産生される一酸化窒素(Nitric oxide: NO) やプロスタグランジンE₂ (PGE₂)が炎症下における軟骨破壊に重要な役割を演じていることが報告されているが、これらの炎症メディエーター産生に対するIL-4の作用は明かでない。そこで培養関節軟骨細胞を用いて、軟骨細胞のNOおよびPGE₂産生に及ぼすIL-4の影響を検討した。

ウシ関節軟骨細胞に100U/mlのIL-1 α を添加し48時間培養すると、関節軟骨細胞のNOおよびPGE₂産生はともに増強していた。さらにこの培養系にIL-4を添加したところ、100ng/mlのIL-4によりNO産生は抑制された。またRT-PCRを用いた検討から、このIL-1 α およびIL-4によるNO産生は誘導型NO産生酵素(iNOS)mRNAの転写レベルで調節されていることが明かとなった。

一方、IL-4により関節軟骨細胞のIL-1 α 誘導PGE₂産生は相乗的に増加していたが、内因性NOの産生抑制によりPGE₂産生が促進されたことから、IL-4同時添加によるPGE₂産生増強はIL-4によるNO産生抑制の結果生じたものと考えられた。

以上より、IL-4は炎症下ではIL-1などの炎症刺激による関節軟骨細胞からのNOやPGE₂産生を調節することにより関節軟骨の破壊を調節している可能性が大きい。

【緒 言】

慢性関節リウマチ(Rheumatoid arthritis; RA)や変形性関節症(Osteoarthritis; OA)などの慢性炎症性関節疾患では関節軟骨が破壊されることにより、変形や疼痛あるいは可動域制限などの機能障害が生じ、日常生活動作が制限される。この関節軟骨の破壊では滑膜細胞や滑膜組織に浸潤した炎症細胞から産生されるインターロイキン-1(IL-1)や腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor; TNF)などの炎症性サイトカインが重要な役割を演じている^(1, 2)。関節軟骨破壊の病理学的機序として関節軟骨基質の産生抑制やマトロプロテアーゼによる基質破壊など種々のメカニズムが報告されているが、近年、滑膜組織や軟骨組織から産生される一酸化窒素(Nitric oxide; NO)の役割が重要視されてきている^(3, 4)。

NOはNO産生酵素(NO synthase; NOS)の存在下にL-アルギニンより産生される多機能分子であり、当初は血管内皮細胞由来血管拡張因子(EDRF)として同定されていたが、種々の細胞がNOを産生することから細胞間および細胞内情報伝達分子として非常に重要な役割を有していることが明かとなってきた。

関節炎におけるNOの役割としては、OAやRAの関節軟骨細胞で発現する誘導型NOS(iNOS)が産生する大量のNOが軟骨細胞のアグリカン産生を抑制したり⁽⁴⁾マトロプロテアーゼの活性化を行うことが報告されている⁽⁵⁾。また、NOが軟骨細胞の細胞死を誘導することにより、関節軟骨の変性を促す機序も示されている。

さてIL-4はB細胞増殖因子として報告されたTh2細胞から産生される20kDaの糖蛋白である⁽⁶⁾が、マク

キーワード: 関節軟骨細胞, インターロイキン-4, 抗炎症性サイトカイン, 一酸化窒素, プロスタグランジンE₂, 関節破壊

ロファージからのIL-1やTNF産生を抑制することから^(7,8)、近年IL-4の抗炎症作用が注目されてきている。そこで本研究では、IL-4による関節軟骨の破壊抑制の可能性を検討する目的で、IL-1 α 刺激によるウシ関節軟骨細胞のNO産生に及ぼすIL-4の影響を検討した。同時に、重要な炎症性メディエーターであるプロスタグランジンE₂(PGE₂)産生に及ぼすIL-4の作用についても検討した。

【方 法】

1. ウシ関節軟骨細胞の培養

牛リスフラン関節より無菌的に採取した関節軟骨を0.1%コラゲナーゼ(Washington Biochemical Corp., Freehold, NJ)で処理し、関節軟骨細胞を単離した。得られた関節軟骨細胞は10%仔ウシ血清(FBS; GIBCO, Grand Island, NY)を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY)を用いて、各実験に用いられる培養プレート内で高密度(1.2×10^5 cells/cm²)単層培養を行った⁽⁹⁾。この初代高密度単層培養法では関節軟骨細胞の形質が最長14日間維持されることが報告されている^(10,11)。播種した関節軟骨細胞が培養プレート底面に付着したことを確認した後、以下の実験に供した。

2. ウシ関節軟骨細胞からのNO産生の測定

NOの産生はNOが培養液中で酸化されて生じる亜硝酸イオンをGriess法を用いて測定し、関節軟骨細胞からのNO産生量の指標とした。

24穴培養プレートに 1.2×10^5 cells/cm²の細胞密度で播種した初代関節軟骨細胞を24時間培養後、FBSを含まないDMEMに培養液を交換し100U/mlのIL-1 α (Genzyme, Boston, MA)刺激下に培養した。この刺激系では添加したIL-1 α の濃度に依存してNO産生が増加することが明かとなっている。そこでこの系に種々の濃度のIL-4 (Genzyme, Boston, MA)を添加し、48時間培養後の培養液中の亜硝酸イオン濃度を測定することにより、関節軟骨細胞のNO産生に及ぼすIL-4の影響を検討した。

3. ウシ関節軟骨細胞からのPGE₂産生の測定

関節軟骨細胞からのPGE₂産生量はNO産生と同様の条件で実験を行い、ELISA法(NEOGEN, Lexington, KY)を用いて培養液中のPGE₂量を測定した。これは試料中のPGE₂による、抗PGE₂抗体で前処置されたプレートに対する酵素結合標品PGE₂の結合阻害率から、試料中のPGE₂量を測定する測定キットであり、最小検出限界は100pg/mlである。

1.2×10^5 cells/cm²の細胞密度で24穴培養プレートに播種した初代関節軟骨細胞を24時間培養後、FBSを含まないDMEMに培養液を交換し100U/mlのIL-1 α 刺激下に培養した。この系に種々の濃度のIL-4を同時に添加し、48時間培養後の培養液中のPGE₂濃度を測定することにより、関節軟骨細胞のPGE₂産生に及ぼすIL-4の影響を検討した。

4. 関節軟骨細胞からのmRNAの分離とRiv- er- setranscription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いたinducible NO synthase (iNOS) mRNAおよびcyclooxygenase (COX) mRNA発現の半定量

関節軟骨細胞のiNOSおよびCOX-1、COX-2 mRNAの発現量を検討する目的で、関節軟骨細胞からmRNAを分離し、それぞれに特異的なプライマーを用いてRT-PCR法を行った。内部コントロールとしてGAPDHmRNAの発現をRT-PCR法にて検出した。 1.2×10^5 cells/cm²の細胞密度で6穴培養プレートに播種した初代関節軟骨細胞を24時間培養後、FBSを含まないDMEMに培養液を交換し100U/mlのIL-1 α 刺激下に培養した。この系に種々の濃度のIL-4を同時に添加し6時間培養後、関節軟骨細胞からRNeasy Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA)を用いてtotalRNAを分離した。このtotalRNAからoligo d(T) primer (Perkin Elmer, Foster City, CA)を用いて逆転写されたcDNAを鋳型として3-step PCR法を行いcDNAを増幅した。増幅されたcDNAは1.5%アガロースゲル内で電気泳動により分離され、エチジウムブロマイド染色後、紫外線透視下に評価した。PCR法に用いたPrimerは以下の通りである。

ウシiNOSプライマー⁽¹²⁾

sence: 5'-GTGGAAGCAGTAACAAAGGAG-3'
antisence: 5'-CTGCCATCTGGCATCTGGTAG-3'

ウシCOX-1 プライマー⁽¹³⁾

sence: 5'-CATGGCGATGCGGTTGC-3'
antisence: 5'-TCCAACCTTATCCCCAGCC-3'

ウシCOX-2 プライマー⁽¹³⁾

sence: 5'-TCCAGATCACATTTGATTGACA-3'
antisence: 5'-TCTTTGACTGTGGGAGGATACA-3'

ウシGAPDH プライマー⁽¹²⁾

sence: 5'-TTCCAGTATGATTCCACCCAC-3'
ntisence: 5'-AGGGATGATATTCTGGGCAGC-3'

5. 統計学的解析

統計学的解析はunpaired Student's t-testを用いて独立した6検体の平均値を検定し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

【結 果】

1. IL-1 α により誘導されるウシ関節軟骨細胞のNO産生に及ぼすIL-4の影響

まず、ウシ関節軟骨細胞のNO産生に及ぼすIL-1 α およびIL-4の影響を検討した。これまで報告されているように、100U/mlのIL-1 α 存在下に48時間培養すると、関節軟骨細胞のNO産生量の指標となる培養液中のNitrite量はIL-1 α 非存在下と比較して明らかに増加していた(図1)。次に、この系に最大100ng/mlのIL-4を添加したところ、添加したIL-4の濃度に依存して関節軟骨細胞からのNO産生は抑制された。一方、IL-1 α 非存在下でも関節軟骨細胞は少量のNOを産生しているが、IL-1 α 非存在下で関節軟骨細胞の培養系に最大100ng/mlのIL-4を添加してもNO産生には明かな影響を与えていなかった。すなわち、IL-4はIL-1 α によって誘導されるウシ関節軟骨細胞のNO産生を抑制していることが明らかとなった。

一般にNOはNO産生酵素であるNOSの存在下にL-アルギニンから産生される。このNOSには3種類の異性体が同定されているが、マクロファージや軟骨細胞などが炎症性サイトカインの刺激により産生するNOは誘導型酵素であるiNOSの発現により調節されている。そこで、IL-4によるIL-1 α 誘導ウシ関節軟骨細胞のNO産生抑制が、iNOSの発現調節を介して行われているかどうかを検討した。

ウシ関節軟骨細胞を100U/mlのIL-1 α 存在下で6時間培養したところ、iNOSmRNAはIL-1 α 非存在下と比較して明らかに増幅されていた(図2)。一方、この系に最大100ng/mlのIL-4を添加したところ、添加したIL-4の濃度に依存して関節軟骨細胞のiNOSmRNAの誘

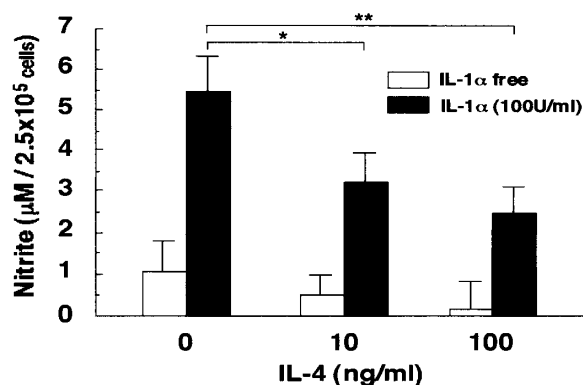


図1. IL-1 α により誘導されるウシ関節軟骨細胞のNO産生に及ぼすIL-4の影響: 100U/mlのIL-1 α 存在下に48時間培養すると培養液中のNitrite量はIL-1 α 非存在下と比較して明らかに増加していた。次に最大100ng/mlのIL-4を添加したところ、添加したIL-4の濃度に依存して関節軟骨細胞からNO産生は抑制された(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ vs. control)。

導は抑制されていた。すなわち、IL-4はIL-1 α によって誘導されるウシ関節軟骨細胞のNO産生をmRNA転写レベルで抑制していることが明らかとなった。

2. IL-1 α より誘導されるウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生に及ぼすIL-4の影響

PGE₂は炎症性サイトカイン刺激により滑膜細胞や関節軟骨で産生される炎症性メディエーターのひとつであり、関節炎の病態に重要な役割を演じている。そこで、ウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生に及ぼすIL-1 α およびIL-4の影響を検討した。100U/mlのIL-1 α 存在下にウシ関節軟骨細胞を48時間培養すると、培養液中のPGE₂量はIL-1 α 非存在下と比較して明らかに増加していた(図3)。

COX-1				
COX-2				
iNOS				
GAPDH				
IL-1 α (u/ml)	0	100	100	100
IL-4 (ng/ml)	0	0	10	100

図2. IL-1 α により誘導されるウシ関節軟骨細胞のiNOSmRNAおよびCOXmRNA発現に及ぼすIL-4の影響: ウシ関節軟骨細胞を100U/mlのIL-1 α 存在下で6時間培養したところ、iNOSmRNAはIL-1 α 非存在下と比較して明らかに増幅されていた。一方、この系に最大100ng/mlのIL-4を添加したところ、添加したIL-4の濃度に依存して関節軟骨細胞のiNOSmRNAの誘導は抑制されていた。

同様に100U/mlのIL-1 α 存在下でウシ関節軟骨細胞を6時間培養したところ、構成的に発現されるCOX-1mRNAの発現には影響しなかったが誘導型酵素であるCOX-2mRNAはIL-1 α 非存在下と比較して明らかに増幅されていた。さらにこの系にIL-4を添加したところ、添加したIL-4の濃度に依存して関節軟骨細胞のCOX-2mRNA誘導は促進されていた。

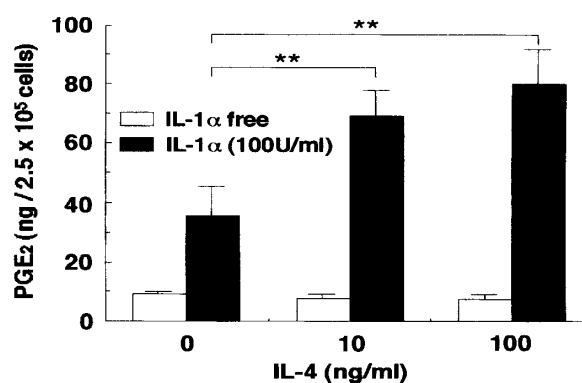


図3. IL-1 α により誘導されるウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生に及ぼすIL-4の影響: 100U/mlのIL-1 α 存在下にウシ関節軟骨細胞を48時間培養すると、培養液中のPGE₂量はIL-1 α 非存在下と比較して明らかに増加していた。この系に最大100ng/mlのIL-4を添加したところ、添加したIL-4の濃度に依存してIL-1 α 存在下に誘導される関節軟骨細胞からのPGE₂産生が相乗的に増強された。

次に、この系に最大100ng/mlのIL-4を添加したところ、IL-1 α 非存在下では最大100ng/mlのIL-4を添加してもPGE₂産生には影響を与えなかったが、IL-1 α 存在下では添加したIL-4の濃度に依存して関節軟骨細胞からのPGE₂産生が相乗的に増強された。すなわち、IL-4はIL-1 α によって誘導されるウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生を促進していることが示された。

PGE₂はPGE₂産生酵素であるCOXの存在下にアラキドン酸から産生される。このCOXには2種類の異性体が同定されているが、マクロファージや軟骨細胞などが炎症性サイトカインの刺激により産生するPGE₂は誘導型酵素であるCOX-2の発現により調節されている。そこで、IL-4によるIL-1 α 誘導ウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生促進が、COX-2の発現調節を介して行われているかどうかを検討した。

ウシ関節軟骨細胞を100U/mlのIL-1 α 存在下で6時間培養したところ、COX-2mRNAはIL-1 α 非存在下と比較して明らかに増幅されていた(図2)。一方、この系に最大100ng/mlのIL-4を添加したところ、添加したIL-4の濃度に依存して関節軟骨細胞のCOX-2 mRNAの誘導は促進されていた。

3. IL-1 α により誘導されるウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生に及ぼすNOの影響

これまで、IL-4はヒト単球やRA由来滑膜線維芽細胞のPGE₂産生を抑制する結果、抗炎症作用を発現すると報告されている。しかし、今回の検討ではIL-4はウシ関節軟骨細胞のIL-1 α によるNO産生を抑制したが、逆にPGE₂産生は促進していた。

ウシ関節軟骨細胞のIL-1 α によるNO産生は外因性のPGE₂添加により相乗的に増強されることが報告されている⁽¹⁴⁾。もし、IL-1 α によるPGE₂産生をIL-4が

直接的に転写レベルで促進していると仮定すれば、産生された内因性PGE₂によりウシ関節軟骨細胞のNO産生はむしろ増強されるはずである。そこで、ウシ関節軟骨細胞のPGE₂とNO産生に及ぼすIL-4の作用を詳細に検討する目的でウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生に及ぼすNOの直接的な影響を検討した。

図4に示すように100U/mlのIL-1 α 存在下にウシ関節軟骨細胞を48時間培養すると、培養液中のPGE₂量はIL-1 α 非存在下と比較して明らかに増加していた。内因性NOを除外するために、この培養系にiNOS阻害剤であるN^G-methyl-L-Arginine(L-NMMA)を同時に添加したところ、IL-1 α 存在下で観察されるウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生は0.5mMのL-NMMA添加により相乗的に増強された。

すなわち、ウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生は内因性NOにより調節されていることから、IL-4添加によるIL-1 α 存在下でのウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生増強は、IL-4によるCOX-2mRNAの転写レベルの調節ではなく、IL-4による内因性NOの直接的な産生抑制の結果生じている可能性が大きいと考えられる。

【考 察】

IL-4は最初、抗IgM抗体で刺激されたB細胞の増殖を誘導する因子(B cell growth factor1)あるいはリポポリサッカライド(LPS)で刺激されたマウスB細胞のIgG1産生を誘導する因子(B cell differentiation factor γ)として報告されたが、その後、B細胞以外にも作用する多機能性サイトカインであることから1987年にIL-4と命名された。IL-4は主にはTh2細胞から産生されI型アレルギーの誘導に重要な役割を演じているほか、抗腫瘍作用や抗炎症作用を示すことが報告されている。

これまでのところIL-4による抗炎症作用の発現機序として、IL-4がLPS刺激によるヒト単球のIL-1、IL-6やTNF産生を抑制すること^(1, 8)やIL-1受容体アンタゴニストや可溶性TNFレセプターの産生を促進することが報告されている^(15, 16)。また、in vitroにおいてIL-4がRA由来滑膜細胞のIL-1やTNF産生を抑制したりあるいはCOX-2mRNAの転写を阻害することによりPGE₂産生を抑制することも明らかにされている^{(15)~(19)}。

すなわちRAをはじめとする慢性関節炎疾患では関節炎局所においてIL-1やTNFなどの炎症性サイトカインの産生が増加している一方、IL-4などの抗炎症性サイトカインの産生が低下していることから、IL-1やTNFの autocrineな産生増加やCOX-2の過剰発現が

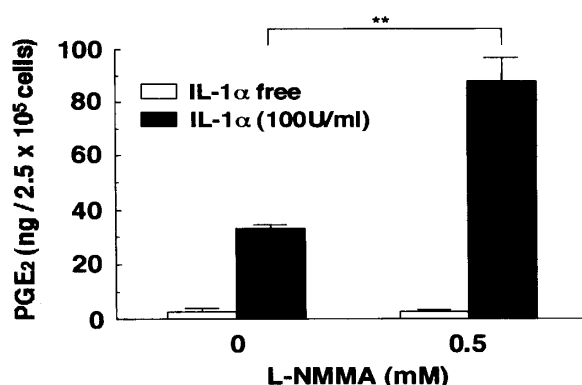


図4. IL-1 α により誘導されるウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生に及ぼすNOの影響：ウシ関節軟骨細胞を100U/mlのIL-1 α 存在下に48時間培養すると培養液中のPGE₂量はIL-1 α 非存在下と比較して増加していた。そして、この系にiNOS阻害剤であるL-NMMAを同時に添加したところ、0.5mMのL-NMMA添加によりIL-1 α 存在下で観察されるウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生は相乗的に増強された(* p <0.01, vs. control)。

生じ、炎症が遷延化したり関節破壊が進行したりする可能性が大きい。逆に、臨床的にはIL-4などの抗炎症性サイトカインを関節炎局所に投与することにより慢性関節炎疾患の経過を変えたりあるいは組織破壊を抑制できると考えられる。

実際、実験的炎症性腸疾患モデル動物にIL-4遺伝子を導入することにより治療的効果が得られたと報告されている⁽²⁰⁾。また、アデノウイルスベクターを用いたIL-4遺伝子の導入により実験関節炎における関節軟骨破壊が抑制されたとの報告もある⁽²¹⁾。

さて、NOは炎症性サイトカインであるIL-1やTNFなどの刺激により種々の細胞から産生されるが、このNOは炎症下における組織破壊に重要な役割を演じている⁽²²⁾。関節軟骨細胞は関節軟骨の機械的特性を維持するためにⅡ型コラーゲンやアグリカンなどの細胞外基質を産生しているが、IL-1は軟骨細胞のNO産生を介して細胞外基質産生を抑制している⁽⁴⁾。また、NOは軟骨基質の破壊に重要な酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の活性化に関与していることが報告されている⁽⁵⁾。さらに、OA患者由来の軟骨細胞ではiNOSが高頻度で発現していることや外因性のNOが関節軟骨細胞の細胞死を誘導することから⁽²³⁾、NOが直接的に関節軟骨の変性、破壊にかかわっている可能性が示唆されている。

一方、iNOSノックアウトマウスを用いた実験関節炎モデルにおける検討では、IL-1による細胞外基質の産生抑制や分解が、iNOS遺伝子のノックアウトにより阻害されることが報告されている⁽²⁴⁾。また、実験関節炎モデルにiNOS阻害剤を投与すると抗炎症作用が発現したり関節軟骨の破壊が抑制されることも明らかとなっている⁽²⁵⁾。以上のことから慢性炎症下における関節破壊にNOが重要な役割を演じていることは明かであり、NO産生の抑制はOAやRAにおける関節破壊に対して治療的重要性を持っている。

本研究において、我々はIL-1 α により誘導されるウシ関節軟骨細胞のNO産生がIL-4添加によりiNOS mRNA転写レベルで抑制されることを明らかにした。このような結果は炎症性腸疾患やヒト由来肺上皮細胞において報告されている⁽²⁶⁾が軟骨細胞についてはこれまでのところ報告がない。すなわち、IL-4は関節炎局所で引き起こされるIL-1による軟骨細胞からのNO産生をiNOS転写レベルで抑制し、関節軟骨破壊を抑制するものと考えられる。

一方、今回の検討では、IL-4はIL-1 α により誘導されるウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生をCOX-2mRNA転写レベルで促進していた。しかしL-NMMAを用いた内因性NO産生抑制の結果と合わせると、IL-4によ

るIL-1 α 誘導ウシ関節軟骨細胞のPGE₂産生増強はIL-4によるウシ関節軟骨細胞の内因性NO産生抑制の二次的变化と考えられる。

RA滑膜細胞ではIL-4によりCOX-2mRNAの転写が阻害されることが報告されている⁽²⁷⁾が、これは用いた細胞種の違いによるものと考えられる。また、アデノウイルスベクターを用いてIL-4遺伝子を導入した実験関節炎組織では、関節軟骨の破壊は抑制されていたが、関節炎の炎症の程度はコントロールと比較して差がなかったかあるいはむしろ増強していたことから、IL-4によるPGE₂産生増強の結果、血管透過性が亢進し腫脹が増悪したと考えても矛盾しない。また、IL-1やTNFにより滑膜細胞や軟骨細胞がPGE₂を大量に産生することは報告されているがPGE₂の軟骨細胞に対する作用については不明な点が多い。PGE₂は血管新生因子として滑膜細胞に作用するが、軟骨細胞に対しては軟骨基質産生を促進する塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の産生を促進したり、軟骨細胞に直接作用してアグリカン産生を促進するなど、同化作用を有することも報告されている⁽²⁸⁾。

IL-4によるウシ関節軟骨細胞からのPGE₂産生促進とPGE₂の軟骨細胞に対する直接的な作用についてはさらに詳細な検討が必要であるが、以上よりIL-4は炎症性サイトカイン刺激による関節軟骨細胞のNO産生を低下させることにより関節軟骨破壊を抑制することが明かとなり、関節炎治療においては局所的に発現させたIL-4が関節軟骨保護作用を示す可能性が示唆された。

【結 語】

1. ウシ関節軟骨細胞を用いてPGE₂およびNO産生に及ぼすIL-4の影響を検討した。
2. IL-4はIL-1 α により誘導されるウシ関節軟骨細胞のiNOS mRNAの転写阻害を介してNO産生を抑制していた。また、このNO産生抑制の結果、ウシ関節軟骨細胞のCOX-2mRNA転写が促進しPGE₂産生が増加していた。
3. IL-4は関節軟骨細胞のNO産生を低下させることにより関節炎における関節軟骨破壊を抑制する可能性が明かとなった。

【謝 辞】

この研究に対して多くのご教示を頂いた整形外科学講座の水野耕作教授と佐浦隆一先生に深甚なる謝意を表します。

【文 献】

- 1) Chu, C. Q., Field, M., Feldmann, M., Maini, R. N.: Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34:1125-1132, 1991.
- 2) Nouri, A. M., Panayi, G. S., Goodman, S. M.: Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. I. The presence of interleukin-1 in synovial fluids. *Clin. Exp. Immunol.* 55:295-302, 1984.
- 3) Palmer, R. M., Hickery, M. S., Charles, I. G., Moncada, S., Bayliss, M. T.: Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193:398-405, 1993.
- 4) Taskiran, D., Stefanovic-Racic, M., Georgescu, H., Evans, C.: Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:142-148, 1994.
- 5) Murrell, G. A., Jang, D., Williams, R. J.: Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206:15-21, 1995.
- 6) Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T., Paul, W. E.: Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J. Exp. Med.* 155:914-923, 1982.
- 7) Essner, R., Rhoades, K., McBride, W. H., Morton, D. L., Economou, J. S.: IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J. Immunol.* 142:3857-3861, 1989.
- 8) Briolay, J., Dechanet, J., Blanchard, D., Banchereau, J., Miossec, P.: Interleukin-4 inhibits polyclonal immunoglobulin secretion and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *J. Clin. Immunol.* 12:36-44, 1992.
- 9) Saura, R., Uno, K., Satsuma, S., Kurz, E. U., Scudamore, R. A., Cooke, T. D.: Mechanisms of cartilage degradation in inflammatory arthritis : interaction between chondrocytes and immunoglobulin G. *J. Rheumatol.* 20:336-343, 1993.
- 10) Kuettner, K. E., Pauli, B. U., Gall, G., Memoli, V. A., Schenk, R. K.: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J. Cell Biol.* 93:743-750, 1982.
- 11) Kuettner, K. E., Memoli, V. A., Pauli, B. U., Wrobel, N. C., Thonar, E. J., Daniel, J. C.: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *J. Cell Biol.* 93:751-757, 1982.
- 12) Adler, H., Frech, B., Thöny, M., Pfister, H., Peterhans, E., Jungi, W. T.: Inducible nitric oxide synthase in cattle. *J. Immunol.* 154:4710-4718, 1995.
- 13) Asselin, E., Drolet, P., Fortier, M. A.: Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F₂ alpha production in endometrial epithelial cells in vitro : role of cyclooxygenase-2. *Endocrinology.* 138:4798-4805, 1997.
- 14) Onga, T., Saura, R., Mizuno, K., Itoh, H.: Effect of prostaglandin E₂ on nitric oxide synthesis in articular chondrocytes. *Kobe J. Med. Sci.* in press. 2000.
- 15) Hart, P. H., Ahern, M. J., Jones, C. A., Jones, K. L., Smith, M. D., Finlay-Jones, J. J.: Synovial fluid macrophages and blood monocytes differ in their response to IL-4. *J. Immunol.* 6:3370-3380, 1993.
- 16) Yeh, L. A., Augustine, A. J., Lee, P., Riviere, L. R., Sheldon, A.: Interleukin-4, an inhibitor of cartilage breakdown in bovine articular cartilage explants. *J. Rheumatol.* 22:1740-1746, 1995.
- 17) Shingu, M., Miyauchi, S., Nagai, Y., Yasutake, C., Horie, K.: The role of IL-4 and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation. *Br. J. Rheumatol.* 34:101-106, 1995.
- 18) Nemoto, O., Yamada, H., Kikuchi, T., Shinmei, M., Obata, K., Sato, H., Seiki, M.: Suppression of matrix metalloproteinase-3 synthesis by interleukin-4 in human articular chondrocytes. *J. Rheumatol.* 24:1774-1779, 1997.
- 19) Borghaei, R. C., Rawlings, P. L. Jr., Mochan,

- E.: Interleukin-4 suppression of interleukin-1-induced transcription of collagenase (MMP-1) and stromelysin 1 (MMP-3) in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 41:1398-1406, 1998.
- 20) Hogaboam, C. M., Vallance, B. A., Kumar, A., Addison, C. L., Graham, F. L., Gauldie, J., Collins, S. M.: Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 100:2766-2776, 1997.
- 21) Lubberts, E., Joosten, L. A., van Den Bersselaar, L., Helsen, M. M., Bakker, A. C., van Meurs, J. B., Graham, F. L., Richards, C. D., van Den Berg, W. B.: Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction. *J. Immunol.* 163:4546-4556, 1999.
- 22) Stefanovic-Racic, M., Stadler, J., Evans, C. H.: Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum.* 36:1036-1044, 1993.
- 23) Blanco, F. J., Ochs, R. L., Schwarz, H., Lotz, M.: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 146:75-85, 1995.
- 24) Van de Loo, F. A. J., Arntz, O. J., van Enkevort, F. H. J., van Lent, P. L. E. M., van den Berg, W. B.: Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosan-induced gonarthrosis in NOS2-deficient mice and in antiinterleukin-1-treated wild-type mice with unabated joint inflammation. *Arthritis Rheum.* 41:634-646, 1998.
- 25) Stefanovic-Racic, M., Meyers, K., Meschter, C., Coffey, J. W., Hoffman, R. A., Evans, C. H.: N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Rheum.* 37:1062-1069, 1994.
- 26) Berkman, N., Robichaud, A., Robbins, R. A., Roesems, G., Haddad, E. B., Barnes, P. J., Chung, K. F.: Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 and interleukin-13 in human lung epithelial cells. *Immunology.* 89:363-367, 1996.
- 27) Sugiyama, E., Taki, H., Kuroda, A., Mino, T., Yamashita, N., Kobayashi, M.: Interleukin-4 inhibits prostaglandin E₂ production by freshly prepared adherent rheumatoid synovial cells via inhibition of biosynthesis and gene expression of cyclo-oxygenase II but not of cyclo-oxygenase I. *Ann. Rheum. Dis.* 55:375-382, 1996.
- 28) Lowe, G. N., Fu, Y. H., McDougall, S., Polendo, R., Williams, A., Benya, P. D., Hahn, T. J.: Effects of prostaglandins on deoxyribonucleic acid and aggrecan synthesis in the RCJ 3.1C5.18 chondrocyte cell line: role of second messengers. *Endocrinology.* 137:2208-2216, 1996.

Effect of Interleukin-4 on intracellular nitric oxide and prostaglandin E₂ synthesis in bovine articular chondrocytes.

Takatoshi Shimomura

First Department of Pathology, Kobe University School of Medicine

ABSTRACT

Destruction of articular cartilage is the major problem common to chronic arthritis, such as osteoarthritis or rheumatoid arthritis. In these diseases, proinflammatory cytokines such as interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor alpha are produced in large amounts and they are major contributors to the degradation of articular cartilage in inflammatory arthritis. One of the mechanisms by which cytokines elicit their proinflammatory effects is by the stimulation of the production of nitric oxide (NO). Nitric oxide is a multifunctional messenger molecule generated by a family of enzymes termed NO synthase (NOS). In response to inflammatory cytokines, the inducible form of NOS in chondrocyte releases high levels of NO and it may mediate suppression of cartilage proteoglycan synthesis and activate matrix metalloproteinase enzymes responsible for proteoglycan degradation in articular cartilage.

Recently, it has been described an potential antiinflammatory effect of IL-4, which is a T cell derived 20 kDa glycoprotein originally described as a B cell growth and differentiation factor. For instance, IL-4 can inhibit the production of inflammatory cytokines in activated human monocytes and it has a potent inhibitory effect on cartilage degradation caused by inflammatory cytokines.

In the present study, IL-4 is shown to inhibit IL-1 α -stimulated NO production from bovine articular chondrocytes. This inhibition of NO production, at least in part, seems to be the result of transcriptional regulation of iNOS mRNA by IL-4. It was also shown that IL-4 augmented IL-1 α -stimulated PGE₂ synthesis indirectly through the inhibition of NO synthesis in bovine chondrocytes, whereas it inhibits PGE₂ synthesis in human synovial fibroblasts. In conclusion, these in vitro data show that IL-4 may have a suppressive effect on IL-1 α -induced cartilage destruction through reduction of NO synthesis, which suggests IL-4 could have a therapeutic potential in vivo.