



ウシ関節軟骨細胞の一酸化窒素（NO）産生に及ぼす トロンビンの影響

良原, 久浩

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-07-02

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2510

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002510>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



ウシ関節軟骨細胞の一酸化窒素 (NO) 産生に及ぼす トロンビンの影響

良原久浩

神戸大学医学部病理学第一教室
(指導：伊東 宏教授)
連絡先：良原 久浩
神戸大学医学部整形外科学教室
兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1
電話番号：078-382-5985

(平成13年12月28日受付)

【要約】

凝固因子であるトロンビンは止血・血栓形成ばかりでなく、炎症や器官発生、組織修復において様々な生理的作用を示す。近年、慢性関節リウマチ (RA) 患者の関節液に高濃度のトロンビン-アンチトロンビン III 複合体が存在することや、トロンビンが滑膜細胞の増殖を促進することから、RAの病態形成にトロンビンが関与していると考えられている。そこでトロンビンによる関節軟骨破壊の機序を解明する目的で、関節破壊の重要な因子である関節軟骨の一酸化窒素 (NO) 産生に及ぼすトロンビンの影響を検討した。ウシ関節軟骨細胞を 1 U/ml のトロンビンで刺激すると有意な NO 産生の増加と iNOS mRNA の発現増強が認められた。一方、このトロンビンによる NO 産生と iNOS mRNA の発現増加は、核内転写因子 NF- κ B の活性化阻害剤である PDTC 存在下 (100 μ M) で完全に抑制された。また、トロンビン受容体のひとつである protease-activated receptor-1 (PAR-1) のアゴニストを用いてウシ関節軟骨細胞を刺激したが、NO 産生には影響がなかった。以上のことからトロンビンによる関節軟骨細胞の NO 産生刺激には NF- κ B の活性化が重要であり、iNOS mRNA 発現レベルで調節を受けていることが明らかとなった。さらに、このトロンビンによる関節軟骨細胞の NO 産生調節はトロンビン受容体 (PAR-1) 以外の受容体を介して行われている可能性がある。

【緒言】

凝固系IIa 因子、トロンビン (Thrombin) は止血・血栓形成ばかりでなく血圧調節や器官発生、組織修復において様々な生理的作用を示すが、慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) 患者の関節液に高濃度のトロンビンが存在することから、トロンビンが慢性関節炎における関節破壊に関与している可能性がある^(1, 2)。この関節軟骨の破壊機序には、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase; MMP) を中心とする蛋白分解酵素による軟骨基質の酵素的破壊と、活性酸素や一酸化窒素 (Nitric oxide; NO) による軟骨基質の力学的特性の劣化、あるいは軟骨細胞の直接的な障害を介した非酵素的破壊がある。

さて、トロンビンはセリン系蛋白分解酵素であり、*in vitro* において関節軟骨の細胞外基質を分解することから⁽³⁾、関節軟骨の酵素的破壊に関与している可能性がある。また、トロンビンは神経膠細胞に作用し NO 産生を促進することから⁽⁴⁾、トロンビンが関節構成組織や細胞に作用し、NO を介した慢性関節炎における関節軟骨の非酵素的破壊に関与している可能性が大きい。

そこで本研究では、慢性炎症下での関節軟骨の破壊機序を解明する目的で、NO 産生細胞のひとつである関節軟骨細胞からの NO 産生に対するトロンビンの作用を細胞培養系を用いて検討した。

【材料と方法】

1. ウシ関節軟骨細胞の培養

キーワード：関節軟骨細胞, トロンビン, 一酸化窒素, 炎症性サイトカイン, 関節破壊

ウシのリスフラン関節より無菌的に採取した関節軟骨片から0.1%コラゲナーゼ (Washington Biochemical Corp., Freehold, NJ) 処理にて得られた関節軟骨細胞を10%仔牛血清 (GIBCO, Grand Island, NY) を含む Dubecco's modified Eagle's medium (GIBCO, Grand Island, NY) を用いて単層培養した⁽⁵⁾(細胞密度; 1.2×10^5 個/cm²)。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^(6, 7)。37°C, 5%CO₂の条件下で培養器内に12時間から24時間静置後, 培養プレート底面に関節軟骨細胞が付着したことを確認し, 以下の実験に供した。

2. ウシ関節軟骨細胞の NO 産生に及ぼすトロンビンおよびトロンビン受容体アゴニストの作用の検討

細胞から産生された NO は培養液中で瞬時亜硝酸イオン (NO₂⁻:nitrite) に酸化されるため, 培養液中の NO 濃度を直接測定することは困難である。そこで Griess 法を用いて培養液中の nitrite 濃度を測定し⁽⁸⁾, 関節軟骨細胞からの NO 産生の指標とした。

24穴培養プレートに播種した関節軟骨細胞 (1.2×10^5 個/cm²)に種々の濃度のトロンビン (SIGMA, St. Louis, MO) あるいはトロンビン受容体アゴニスト (TRA; CALMIOCHEM-NOVABIOCHEM CORP., San Diego, CA) を添加し48時間培養後, 培養液中の nitrite 濃度を測定した。また, この nitrite が関節軟骨細胞から産生された NO 由来であるか否かを確認する目的で, NO 産生酵素のひとつである誘導型 NO 産生酵素 (inducible nitric oxide synthase; iNOS) の阻害剤, N^G-モノメチル-L-アルギニン (L-NMMA; SIGMA, St. Louis, MO) の存在下でトロンビンによる関節軟骨細胞の刺激実験を行い培養液中の nitrite 濃度を測定した。

さらに, トロンビン刺激による軟骨細胞の NO 産生過程における核内転写因子の役割を検討する目的で, 核内転写因子のひとつである nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性化阻害作用を示す pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC; SIGMA, St. Louis, MO) を培養液中にトロンビンと同時に添加し, 関節軟骨細胞からの NO 産生の変化を検討した。

3. Riversetranscription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いた関節軟骨細胞の iNOS mRNA 発現の検討

関節軟骨細胞の NO 産生は転写レベルでの iNOS の発現調節を介して行われている⁽⁹⁾。そこで RT-PCR 法を用いてトロンビン刺激による関節軟骨細胞からの NO 産生過程における iNOS mRNA の発現の

有無を検討した。

1.2×10^5 個/cm²の細胞密度で6穴培養プレートに播種した関節軟骨細胞に種々の濃度のトロンビンを添加し6時間培養後, 細胞から RNeasy Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて total RNA を分離した。また, 同様に PDTC 存在下にトロンビン刺激を行い6時間培養後, total RNA を分離した。この total RNA から oligo d(T) プライマー (Perkin Elmer, Foster City, CA) を用いて逆転写された cDNA を鋳型に, 各遺伝子に特異的なプライマーを用いて 3-step PCR 法を行った。増幅された cDNA は1.5%アガロースゲル内で電気泳動後, エチジウムブロマイド染色し紫外線透視下に発現強度を観察した。

一般に細胞内に構成的に発現されている GAPDH mRNA 由来 cDNA の蛍光強度を内部コントロールとし, 各条件下における iNOS mRNA 由来 cDNA の蛍光強度を比較検討した。なお, PCR 法に用いたプライマーは以下の通りである⁽¹⁰⁾。

ウシ iNOS プライマー

sense:5'-GTGGAAGCAGTAACAAAGGAG-3'

antisense:5'-CTGCCATCTGGCATCTGGTAG-3'

ウシ GAPDH プライマー

sense:5'-TTCCAGTATGATTCCACCCAC-3'

antisense:5'-AGGGATGATATTCTGGGCAGC-3'

4. 統計学的解析

関節軟骨細胞の NO 産生量は独立した6検体の平均値を unpaired Student's t-test を用いて検定し, $p < 0.01$ を統計学的有意差ありとした。

【結果】

1. ウシ関節軟骨細胞の NO 産生に及ぼすトロンビンの影響

関節軟骨細胞の NO 産生に及ぼすトロンビンの作用を検討するために, 培養液中に0.IU/mlから最大10 U/mlのトロンビンを添加し48時間培養したところ, 添加したトロンビン濃度に依存して培養液中の nitrite 濃度は増加し, 1U/ml以上のトロンビン添加により有意な nitrite 濃度の上昇を認めた (図1)。

関節軟骨細胞では主として iNOS により NO 産生が行われる。そこでトロンビン刺激による軟骨細胞培養液中の nitrite 濃度の上昇が, iNOS を介した NO 産生によるものか否かを検討する目的で, iNOS の基質であるアルギニンの誘導體であり, iNOS の酵素活性を拮抗阻害する L-NMMA の存在下で同様の実験を行った。その結果, L-NMMA 非存在下で観察され

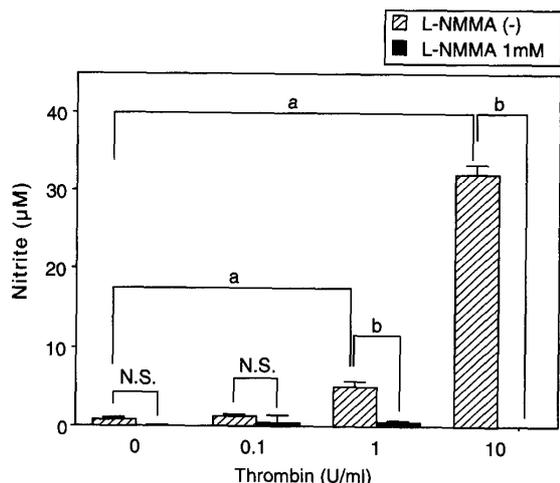


図1 ウシ関節軟骨細胞のNO産生に及ぼすトロンビンの影響

最大10U/mlのトロンビン刺激により培養液中のnitrite濃度は増加し、1U/ml以上のトロンビン添加により有意なnitrite濃度の上昇を認めた(NS=not significant; a: $P<0.01$ vs. control; b: $P<0.01$ vs. thrombin treated cells with L-NMMA)。

たトロンビン刺激による培養液中のnitrite濃度の上昇は、トロンビンと同時に1mMのL-NMMAを添加することにより完全に阻害された(図1)。すなわち、トロンビン刺激による軟骨細胞培養液中のnitrite濃度の上昇は、iNOSに存在した軟骨細胞のNO産生促進によるものであることが明らかとなった。

さて、トロンビンは複数のトロンビン受容体を介して細胞内にシグナルを伝達している⁽¹¹⁾。そこで、トロンビン受容体のひとつであるprotease-activated receptor-1 (PAR-1)のアゴニストであるTRAを軟骨細胞の培養系に添加し、軟骨細胞のNO産生に及ぼす影響を検討した。トロンビンにより関節軟骨細胞からのNO産生は増加していたが、トロンビン受容体アゴニストであるTRAを最大100 μ Mまで添加しても、軟骨細胞培養液中のnitrite濃度は非添加群と比較してほとんど変化しなかった(表)。すなわち、トロンビンは関節軟骨細胞のNO産生を増強させるが、その過程にトロンビン受容体のひとつであるPAR-1は関与していない可能性が大きい。

表 ウシ関節軟骨細胞のNO産生に及ぼすトロンビンおよびトロンビン受容体アゴニスト(TRA)の影響

Thrombin (U/ml)	Nitrite (μ M)	P	TRA (μ M)	Nitrite (μ M)	P
0	0.82 \pm 0.22	-	0	0.82 \pm 0.22	-
0.1	1.2 \pm 0.25	NS	1	0.61 \pm 0.18	NS
1	5.1 \pm 0.67	**	10	0.33 \pm 0.20	NS
10	32 \pm 1.3	**	100	0.30 \pm 0.14	NS

(NS=not significant; **: $P<0.01$ vs. control)。

2. 関節軟骨細胞のiNOS mRNA誘導に及ぼすトロンビンの影響

炎症性サイトカイン刺激による関節軟骨細胞のiNOS活性の亢進は、転写レベルでの調節を受けている。同様にトロンビン刺激による関節軟骨細胞のiNOS誘導に依存したNO産生促進もiNOS mRNAの発現調節を介している可能性がある。そこでトロンビン存在下での関節軟骨細胞のiNOS mRNAの発現をRT-PCR法を用いて検討した。

関節軟骨細胞をトロンビン刺激下に6時間培養後、得られたtotal RNAから逆転写したcDNAを増幅したところ、内部コントロールであるGAPDH mRNAは最大10U/mlのトロンビンを添加してもその発現量に大きな変化は認めなかったが、iNOS mRNAの発現量は添加したトロンビンの濃度に依存して明らかに増強されていた(図2)。

すなわち、トロンビン刺激による関節軟骨細胞からのNO産生は、iNOS mRNAの発現調節を受けたiNOSに依存している可能性が示された。

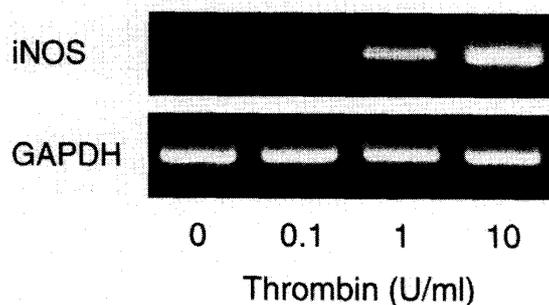


図2 関節軟骨細胞のiNOS mRNA誘導に及ぼすトロンビンの影響

ウシ関節軟骨細胞をトロンビン刺激下に6時間培養するとiNOS mRNAの発現はトロンビンの濃度に依存して明らかに増強されていた。

3. トロンビンによる関節軟骨細胞からのNO産生における核内転写因子NF- κ Bの役割

IL-1などのサイトカインの細胞内へのシグナル伝達機構においてactive protein-1 (AP-1)やNF- κ Bなどの様々な核内転写因子が同定されている。IL-1刺激下における関節軟骨細胞のiNOS mRNA発現調節

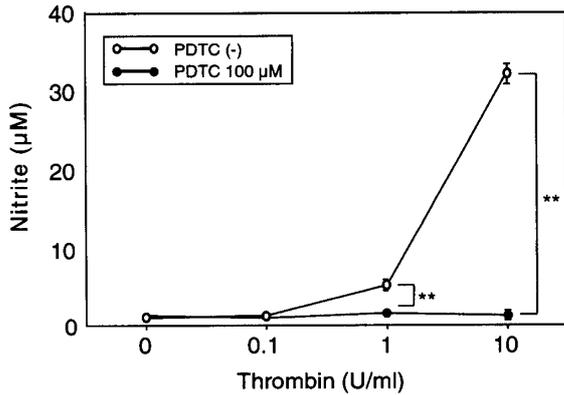


図3 NF- κ B 活性化阻害剤 PDTC 存在下における関節軟骨細胞の NO 産生に及ぼすトロンビンの影響

100 μ M PDTC を同時に添加するとトロンビンによる関節軟骨細胞培養液中の nitrite 濃度の上昇は完全に抑制された (** $P < 0.01$ vs. thrombin treated cells without PDTC)。

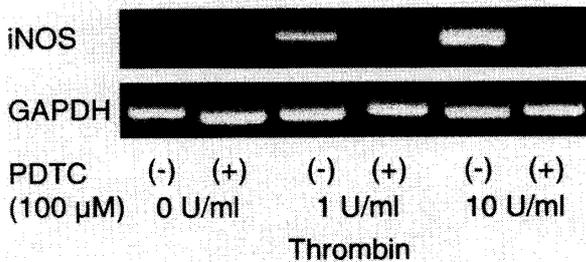


図4 NF- κ B 活性化阻害剤 PDTC 存在下における関節軟骨細胞の iNOS mRNA 発現に及ぼすトロンビンの影響

1U/ml あるいは10U/ml のトロンビン刺激により誘導される関節軟骨細胞の iNOS mRNA 発現は、100 μ M PDTC の同時に添加により明らかに抑制された。

には、この NF- κ B が重要な役割を演じていることから⁽¹²⁾、トロンビン刺激による関節軟骨細胞からの NO 産生増加にも NF- κ B の関与が考えられる。そこで NF- κ B の活性化阻害剤である PDTC 存在下で、関節軟骨細胞の NO 産生および iNOS mRNA 発現の及ぼすトロンビンの影響を検討した。

まず、100 μ M PDTC を同時に添加することにより、トロンビンによる関節軟骨細胞培養液中の nitrite 濃度の上昇は完全に抑制された (図3)。また、軟骨細胞の iNOS mRNA 発現に及ぼす PDTC の作用を検討したところ、1U/ml あるいは10U/ml のトロンビン刺激 (6 時間) により誘導される関節軟骨細胞の iNOS mRNA 発現は、100 μ M PDTC の同時に添加により明らかに抑制されていた (図4)。

すなわち、トロンビン刺激による関節軟骨細胞の

iNOS mRNA の発現増強および iNOS に依存する NO 産生の促進は、細胞内情報伝達機構として核内転写因子 NF- κ B の活性化を介している可能性が示された。

【考 察】

セリン系蛋白分解酵素であるトロンピンは血小板やリンパ球、好中球などの細胞表面でプロトロンビンより転換され、凝固系の IIa 因子としてフィブリノーゲンをフィブリンに転換するばかりでなく、血小板の粘着、凝集あるいは血管の収縮などを引き起こし、血液凝固や血栓形成といった血液凝固カスケード反応において重要な役割を演じている。さらにトロンピンは血液凝固反応以外にも血管内皮細胞や平滑筋細胞、神経細胞などを活性化し血圧調節や血管新生あるいは器官形成、組織修復、炎症、動脈硬化、発癌、アルツハイマー病など様々な生理学的あるいは病理学的な現象に関与している^(11, 13-17)。

さて、RA は滑膜増殖を特徴とする慢性肉芽腫性炎症であるが、健常人や変形性関節症患者と比較して RA 患者の関節液中でトロンピン-アンチトロンピン III 複合体が有意に増加していることから^(1, 2)、RA の病態形成にトロンピンが何らかの役割を演じていると考えられる。

この点について、トロンピンが血管内皮細胞の細胞間隙を開大し血管透過性を亢進させることや⁽¹⁸⁾、血管内皮細胞表面上の接着分子の発現を増強し炎症細胞の血管内皮細胞への接着や局所への遊走を促進することから^(19, 20)、トロンピンが RA 滑膜炎を維持あるいは増悪させていると考えられる。また、トロンピンが滑膜細胞の IL-6, granulocyte colony stimulating factor 産生を促進すること⁽²¹⁾や、血小板由来成長因子産生を介して滑膜細胞の増殖 (パンヌス形成) を刺激すること⁽¹⁾から、RA の病態形成にトロンピンが重要な役割を演じている可能性が大きい⁽¹⁴⁾。さらに、トロンピンはセリン系蛋白分解酵素として軟骨基質の主要成分であるプロテオグリカンの分解、遊離を促進したり⁽³⁾、軟骨細胞に作用し MMP の合成を促進することにより^(22, 23)、関節軟骨の酵素的破壊に関与していると考えられる。

さて、炎症下での関節軟骨の破壊機序には前述した軟骨基質の酵素的破壊に加えて、NO による軟骨細胞の直接的な障害も重要である。関節軟骨の機械的特性を維持するために関節軟骨細胞は 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、炎症局所で産生される高濃度の NO は関節軟骨細胞の細

胞外基質産生を抑制したり⁽²⁴⁾、関節軟骨細胞の細胞死を誘導する結果⁽²⁵⁾、関節軟骨基質の潤滑あるいは荷重分散といった力学的機能を劣化させる。一方、実験関節炎モデルに iNOS 阻害剤を投与すると、NO 産生抑制の結果、抗炎症作用が認められ関節軟骨の破壊が抑制される⁽²⁶⁾。これまでトロンビンも種々の細胞において NO 産生を調節することが報告されていることから、炎症下における関節軟骨の NO を介した非酵素的破壊にもトロンビンが関与している可能性が大きい。

本研究において、我々はトロンビンが関節軟骨細胞に作用し iNOS mRNA の発現調節を介して NO 産生の亢進を引き起こすことを明らかにした。また、このトロンビンによる関節軟骨細胞の NO 産生調節は、細胞内情報伝達機構として核内転写因子 NF- κ B の活性化を介している可能性を示した。

トロンビンによる NO 産生調節機構には、トロンビン受容体を介した直接的な血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の NO 産生抑制と、トロンビンによるこれらの細胞のエンドセリン産生促進を介した間接的な単球からの NO 産生促進があり、トロンビンは NO の生理的作用である血管拡張作用や血小板凝集作用を利用して、血圧や血小板凝集を調節している^(11, 27)。一方、神経膠細胞は中枢神経系における免疫担当細胞として、頭部外傷などの炎症刺激により炎症性サイトカインやプロスタノイドを産生しその病態に重要な役割を演じているが、トロンビンはこの神経膠細胞にも作用し、NO 産生を促進することが報告されている⁽⁴⁾。

トロンビンは蛋白分解酵素としてトロンビン受容体の N 末端を分解することにより細胞を活性化するが、このトロンビン受容体は 7 回膜貫通型 G 蛋白共役受容体に属し蛋白分解酵素により活性化されるため protease-activated receptor (PAR) と呼ばれる。PAR のうちトロンビン受容体である PAR-1, -3, -4 は様々な細胞膜上に発現しているが⁽⁴¹⁾、滑膜細胞や軟骨細胞上に PAR が発現しているか否か明らかではなく、そのサブタイプも同定されていない。しかし、滑膜細胞や軟骨細胞と同じ間葉系細胞である線維芽細胞や骨芽細胞あるいは単球などには PAR-1 が発現していることから、滑膜細胞や軟骨細胞表面上にも PAR-1 が発現している可能性はある。

PAR-1 を介した細胞内へのシグナル伝達機構としてはトロンビンが作用する細胞や活性化される反応によって異なるが、Src ファミリーチロシンリン酸化酵素の活性化、フォスファチジルイノシトール 3 リン酸 (IP₃) リン酸化酵素の活性化、mitogen-activated protein kinase (MAPKs) の活性化などがある⁽⁴¹⁾。

トロンビンによる神経膠細胞からの NO 産生促進

については、阻害物質を用いた検討から、トロンビンによる神経膠細胞の細胞内情報伝達機構として蛋白リン酸化酵素 C (PKC), MAPK, 核内転写因子 NF- κ B の活性化が同定されている⁽⁴⁾。また、神経膠細胞表面には PAR-1 の存在が報告されているが、PAR-1 を選択的に活性化するとされるトロンビン受容体アゴニスト (TRA)⁽²⁸⁾を用いた検討から、トロンビンによる神経膠細胞の NO 産生促進には PAR-1 ではなく、近年、筋芽細胞や線維芽細胞において同定された non-PAR トロンビン受容体の関与も示唆されている⁽²⁹⁾。

今回の我々の検討でも PDTc の添加によりトロンビンによる関節軟骨細胞からの NO 産生、iNOS mRNA の発現がともに抑制されたことから、トロンビン刺激による関節軟骨細胞の NO 産生には核内転写因子 NF- κ B の活性化が重要であると考えられた。しかし、神経膠細胞と同じくトロンビン受容体アゴニスト (TRA) をトロンビンの代わりに用いても関節軟骨細胞の NO 産生は促進されなかった。すなわち、関節軟骨細胞でも神経膠細胞と同様に non-PAR トロンビン受容体が存在している可能性がある。また、トロンビンが直接、転写因子の活性化や発現に影響するという報告⁽³⁰⁾もある。

本研究では、トロンビンによる関節軟骨細胞からの NO 産生における PKC や MAPK の関与については検討を行っていない。また、関節軟骨細胞表面に PAR-1 が存在するか否か、あるいは non-PAR トロンビン受容体が存在するか否かについても不明であり、今後詳細な検討が必要である。しかし今回の検討では、トロンビンが関節軟骨細胞の NO 産生を促進することから、慢性炎症下における関節軟骨の破壊において酵素的破壊ばかりでなく非酵素的破壊においても重要な役割を演じていることが明らかとなった。

【結 語】

1. トロンビンはウシ関節軟骨細胞の iNOS mRNA の転写調節を介して NO 産生を促進していた。この NO 産生促進にはトロンビン受容体である PAR-1 は関与していないと推察された。
2. トロンビンが関節軟骨細胞の NO 産生を促進し、関節軟骨の破壊に重要な役割を演じている可能性が示された。

【謝 辞】

この研究に対して多くのご教示を頂いた整形外科講座の佐浦隆一先生に深甚なる謝意を表します。

【文 献】

1. Ohba, T., Takase, Y., Ohhara, M., Kasukawa, R.: Thrombin in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis mediates proliferation of synovial fibroblast-like cells by induction of platelet derived growth factor. *J. Rheumatol.* 23: 1505-1511, 1996.
2. Nakano, S., Ikata, T., Kinoshita, I., Kanematsu, J., Yasuoka, S.: Characteristics of the protease activity in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17: 161-170, 1999.
3. Furmaniak-Kazmierczak, E., Cooke, T.D., Manuel, R., Scudamore, A., Hoogendorn, H., Giles, A.R., Nesheim, M.: Studies of thrombin-induced proteoglycan release in the degradation of human and bovine cartilage. *J. Clin. Invest.* 94: 472-480, 1994.
4. Ryu, J., Pyo, H., Jou, I., Joe, E.: Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 275: 29955-29959, 2000.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R.: Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138, 1982.
9. 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.
10. 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.
11. Strukova, S.M.: Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biochemistry (Mosc.)* 66: 8-18, 2001.
12. Amin, A.R., DiCesare, P.E., Vyas, P., Attur, M., Tzeng, E., Billiar, T.R., Stuchin, S.A., Abramson, S.B.: The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 182: 2097-2102, 1995.
13. Carney, D.H., Redin, W., McCroskey, L.: Role of high-affinity thrombin receptors in postclotting cellular effects of thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.* 18: 91-103, 1992.
14. Morris, R., Winyard, P.G., Blake, D.R., Morris, C.J.: Thrombin in inflammation and healing: relevance to rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 53: 72-79, 1994.
15. Glusa, E., Paintz, M., Bretschneider, E.: Relaxant and contractile responses of porcine pulmonary arteries to thrombin and thrombin receptor activating peptides. *Semin. Thromb. Hemost.* 22: 261-265, 1996.
16. Grand, R.J., Turnell, A.S., Grabham, P.W.: Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem. J.* 15: 313 (Pt2) 353-368, 1996.
17. Henrikson, K.P., Salazar, S.L., Fenton, J.W., Pentecost, B.T.: Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br. J. Cancer* 79: 401-406, 1999.
18. Rabiet, M.J., Plantier, J.L., Rival, Y., Genoux, Y., Lampugnani, M.G., Dejama, E.: Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 16: 488-496, 1996.
19. Smith, C.W., Anderson, D.C.: PMN adhesion and extravasation as a paradigm for tumor cell dissemination. *Cancer Metastasis Rev.* 10: 61-78, 1991.
20. Kaplanski, G., Marin, V., Fabrigoule, M.,

- Boulay, V., Benoliel, A.M., Bongrand, P., Kaplanski, S., Farnarier, C.: Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood* 92: 1259-1267, 1998.
21. Shin, H., Kitajima, I., Nakajima, T., Shao, Q., Tokioka, T., Takasaki, I., Hanyu, N., Kubo, T., Maruyama, I.: Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- κ B activation in synovial fibroblasts. *Ann. Rheum. Dis.* 58: 55-60, 1999.
22. Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J.J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanishi, I., Salvesen, G., Nagase, H.: Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur. J. Biochem.* 194: 721-730, 1990.
23. Tamburro, A., Zanni, M., Mariani, B., Peracchia, F., Donati, M.B., Rotilio, D.: Thrombin induces the synthesis of stromelysin 1 (MMP-3): a novel effect of thrombin on extracellular matrix degradation. *Fibrinolysis And Proteolysis* 11: 251-257, 1997.
24. 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.
25. Blanco, F.J., Ochs, R.L., Schwarz, H., Lotz, M.: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 146: 75-85, 1995.
26. 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.
27. Eto, M., Barandier, C., Rathgeb, L., Kozai, T., Joch, H., Yang, Z., Luscher, T.F.: Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ. Res.* 89: 583-590, 2001.
28. Sabo, T., Gurwitz, D., Motola, L., Brodt, P., Barak, R., Elhanaty, E.: Structure-activity studies of the thrombin receptor activating peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 604-610, 1992.
29. Sower, L.E., Payne, D.A., Meyers, R. Carney, D.H.: Thrombin peptide, TP508, induces differential gene expression in fibroblasts through a nonproteolytic activation pathway. *Exp. Cell. Res.* 247: 422-431, 1999.
30. Edmead, C., Kanthou, C., Benzakour, O.: Thrombin activates transcription factors sp1, NF- κ B, and CREB: importance of the use of phosphatase inhibitors during nuclear protein extraction for the assessment of transcription factor DNA-binding activities. *Anal. Biochem.* 275: 180-186, 1999.

Effect of thrombin on nitric oxide synthesis of bovine articular chondrocytes in vitro

Hisahiro Yoshihara

First Department of Pathology, Kobe University School of Medicine

Clinically, thrombin (Tb) -antithrombin III complex levels in the synovial fluid of rheumatoid arthritis (RA) patients reported to be markedly elevated. It was shown that Tb induces the release of proteoglycans from articular cartilage, stimulates proliferation of synovial fibroblast-like cells. These findings, therefore, suggest that Tb plays an important role in propagation of inflammation and cartilage degradation in RA. Nitric oxide (NO), which is implicated in the pathophysiology of the arthritis, is reported to reduce the extracellular matrix synthesis of chondrocytes such as proteoglycan and type-II collagen in articular cartilage. Also NO induces the articular chondrocyte apoptosis. These should cause the deterioration of functional property of the cartilage matrix. Therefore, in order to examine the role of Tb for evidence of cartilage degradation in inflammatory process, it was determined whether Tb induces the NO synthesis of articular chondrocyte *in vitro*. When articular chondrocytes were cultured with Tb for 48h incubation, promotion of NO generation was observed in a dose dependent fashion. Over 1 U/ml of Tb induced significant increase of NO synthesis in the articular chondrocyte monolayer culture. When using RT-PCR to detect the expression of mRNA, the intensity of amplified PCR products from iNOS mRNA correlated to the concentration of Tb induced NO generation. It is reported that intracellular signal transduction of Tb is mediated by nuclear factor kappa B (NF- κ B), and 100 μ M of PDTC completely inhibited NO generation of articular chondrocytes and also reduced iNOS gene transcription by Tb. However, Tb receptor agonist specific for PAR-1 receptor had little effect on NO generation of articular chondrocytes. Thus, it is suggested that regulates NO synthesis transcriptionally by the activation of NF- κ B in articular chondrocytes through a PAR-1 independent pathway, which suggest that Tb may play an important role in cartilage degradation in inflammatory process.