



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1606号
学位記番号	第1141号
氏名	立松 尚衛
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	<p>Mithramycin has inhibitory effects on gliostatin and matrix metalloproteinases expression induced by gliostatin in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes</p> <p>(関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞においてミスラマイシンはグリオスタチンによって誘導されたグリオスタチンとマトリックスメタロプロテイナーゼ発現を抑制する)</p> <p>Modern Rheumatology. 2017 Jul 25 (Published online)</p>
論文審査担当者	主査： 和田 郁雄 副査： 山崎 小百合, 大塚 隆信

論文内容の要旨

【目的】関節リウマチ (RA)では、増殖した滑膜組織から tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin-1 (IL-1)などの炎症性サイトカインや軟骨マトリックス分子を分解する matrix metalloproteinases (MMPs)が産生され、骨軟骨破壊が引き起こされる。私共の研究室では gliostatin (GLS)は thymidine phosphorylase 活性をもち、血管新生作用、起炎症作用を有すること、RA 患者の関節液中には高濃度に GLS が存在しており、血清 GLS 濃度は RA の病勢を反映することを報告している。また、ウサギを用いた実験において、GLS を関節内に投与することにより、RA と酷似した関節炎が惹起されること、RA 線維芽細胞様滑膜細胞 (FLSs)を用いた実験系にて、GLS は TNF- α や IL-1 β により誘導され、GLS は MMPs の発現を誘導することを確認している。さらに、GLS プロモーター領域は 7 つの Sp1 結合部位を有しており、TNF- α よって誘導された GLS は Sp1 阻害剤にて抑制されることを見出した。GLS によって RA 滑膜から誘導される MMPs を抑制することは RA 治療において有用と考えられ、本研究では RAFLSs において GLS によって誘導された MMPs の発現が、Sp1 阻害剤である mithramycin (MIT)によって抑制されるかを検討する。

【方法】RA 患者の人工関節全置換術または関節鏡下滑膜切除術時に採取した活動性を有する滑膜組織を初代培養した。術後同日に初代培養を行い 3~6 継代した細胞を用いて実験を行った。GLS 刺激による MMP-1, -2, -3, -9, -13 発現量の変化と、MIT と thymidine phosphorylase inhibitor による抑制効果を検討するため、GLS と MMPs mRNA を RT-PCR を用いて測定した。GLS タンパク量は細胞破砕液を使用し、MMP-1, -3, -13 タンパク量は細胞培養上清を使用し enzyme immunoassay を用いて測定した。MMP-2, -9 タンパク量は細胞破砕液を使用し gelatin zymography を用いて測定した。siRNA を用いて Sp1 発現をノックダウンし GLS と MMPs 発現の変化を検討した。Sp1 発現は western blot 法を用いて解析した。

【結果】GLS によって GLS と MMP-1, -3, -9, -13 は mRNA レベルおよびタンパクレベルで発現が有意に誘導された。また、MIT により GLS によって誘導された GLS と MMP-1, -3, -9, -13 の発現は有意に抑制された。GLS と MIT は MMP-2 の発現には影響を与えなかった。GLS によって誘導された GLS と MMPs 発現は thymidine phosphorylase inhibitor では抑制されなかった。GLS により細胞全体ではタンパクレベルで Sp1 発現に変化は認めなかったが、核内の Sp1 は有意に増加し、この核内の Sp1 は MIT で有意に抑制された。GLS によって誘導された GLS は Sp1 siRNA を用いて有意に抑制されたが、MMPs 発現の抑制に有意差は認めなかった。

【考察】RAFLSs において GLS によって誘導された GLS と MMP-1, -3, -9, -13 の発現は MIT で抑制された。Sp1 siRNA を用いた実験において MMPs 発現に有意な抑制効果は認めず、GLS で誘導された MMP-1, -3, -9, -13 に対して MIT は Sp1 阻害以外の効果を有することが示唆された。thymidine phosphorylase inhibitor を用いた実験より GLS による GLS と MMPs 発現誘導に thymidine phosphorylase 活性は関与しないことが解明した。*in vivo*, *in vitro* の実験において MMPs を抑制することで血管新生と軟骨破壊が抑制されることが報告されており、本研究によって MIT が RA において血管新生阻害作用と軟骨破壊阻害作用を有することが示唆された。GLS と MMPs は RA の病態形成に関与しており、MIT がこの GLS を阻害し、さらに MMPs を抑制することから、MIT が新たな抗 RA 薬となる可能性が見出された。

論文審査の結果の要旨

【目的】関節リウマチ (RA)では、増殖した滑膜組織から炎症性サイトカインや matrix metalloproteinases (MMPs)が産生され、骨軟骨破壊が引き起こされる。グリオスタチン (GLS) は RA 病態形成に関与することが報告されている。RA 線維芽細胞様滑膜細胞 (FLSs)において、GLS は TNF- α 、IL-1 β 及び GLS により誘導され、GLS は MMPs 発現を誘導する。さらに、TNF- α によって誘導された GLS は Sp1 阻害にて抑制される。本研究では RAFLSs において GLS によって誘導された GLS と MMPs の発現が、Sp1 阻害剤であるミスラマイシン (MIT)によって抑制されるかを検討した。

【方法】RA 患者の人工関節全置換術または関節鏡下滑膜切除術時に採取した滑膜組織から培養した FLSs を用いて実験を行った。GLS 刺激による MMP-1, -2, -3, -9, -13 発現量の変化と、MIT または thymidine phosphorylase 阻害剤 (TPI)による抑制効果を検討するため、GLS と MMPs mRNA を RT-PCR 法を用いて測定した。GLS と MMP-1, -3, -13 タンパク量は EIA 法を用いて、MMP-2, -9 タンパク量は gelatin zymography 法を用いて測定した。siRNA を用いて Sp1 発現をノックダウンし GLS と MMPs 発現の変化を検討した。

【結果】GLS 刺激によって GLS と MMP-1, -3, -9, -13 発現が有意に誘導された。また GLS によって誘導された GLS と MMP-1, -3, -9, -13 発現は MIT により有意に抑制されたが、TPI では抑制されなかった。GLS により核内 Sp1 は有意に増加し、この核内 Sp1 は MIT で有意に抑制された。GLS によって誘導された GLS は Sp1 siRNA を用いて有意に抑制されたが、MMPs 発現の抑制に有意差は認めなかった。

【考察】RAFLSs において GLS が誘導した GLS と MMP-1, -3, -9, -13 の発現は MIT で抑制された。Sp1 siRNA を用いた実験において MMPs 発現に有意な抑制効果は認めず、GLS で誘導された MMPs に対して MIT は Sp1 阻害以外の効果を有することが示唆された。TPI を用いた実験より GLS による GLS と MMPs 発現誘導に thymidine phosphorylase 酵素活性は関与しない。in vivo, in vitro の実験において MMPs を抑制することで血管新生と軟骨破壊が抑制されることが報告されており、本研究によって MIT が RA において血管新生阻害作用と軟骨破壊阻害作用を有することが示唆され、新たな RA 治療薬となる可能性が見出された。

【審査の内容】主査の和田教授より、GLS 遺伝子発現に関連する疾患、MIT の臨床応用の可能性について、MMPs 測定方法の詳細や MMPs 発現の解釈について等の 12 項目、第 1 副査の山崎教授より、細胞培養手順や実験手法の詳細について、RA および変形性関節症における GLS 発現についての等の 10 項目、第 2 副査の大塚教授より、RA 患者の windows of opportunity、treat to target、生物学的製剤の副作用についての 3 項目の質問があった。これらの質問に対して、申請者からおおむね適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究は RA 線維芽細胞様滑膜細胞において GLS と MMPs 発現に対する MIT の抑制効果を解析し、RA の新規治療法への手がかりを与える新しい知見である。よって、本論文著者は、博士 (医学) の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者 主査 和田郁雄

副査 山崎小百合 大塚隆信