第６号様式

論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称	博　士　（　　　医学　　　）	氏名	茂久田　翔
学位授与の要件	学位規則第４条第①・２項該当		

論　文　題　目

The proto-oncogene survivin splice variant 2B is induced by PDGF and leads to cell proliferation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte.

（関節リウマチ由来滑膜繊維芽細胞のサバイビンスプライスバリアント 2B は、PDGF によって誘導され、細胞増殖を促進する。）

論文審査担当者

主　　査	教授	木村　浩彰
審査委員	教授	秀　　道広
審査委員	准教授	安達　伸生

〔論文審査の要旨〕

関節リウマチ(RA)は、全身の滑膜増殖と関節周囲の骨軟骨破壊を特徴する炎症性疾患である。リウマチ性関節炎において、滑膜繊維芽細胞（fibroblast-like synoviocytes: FLS）は、増殖能、IL-6 産生能、及び、骨破壊のエフェクター細胞である破骨細胞を誘導する分子 RANKL の発現能などに優れ、RA 滑膜病変の中心的な役割を担うとされている。2005 年、RA 患者の血液中にアポトーシスの抑制や細胞周期の調節に関わるサバイビンという蛋白が検出されることが報告された。その後、651 名の早期 RA 患者を対象とした臨床試験において、サバイビンは関節破壊の独立した危険因子であることが報告され、疫学的にも RA の病態に重要な因子であることが示唆された。しかしながら、サバイビンは RA のみならず、加齢性病変である変形性関節炎（OA）でも発現が認められ、両者に明らかな違いは認められないという報告も複数存在し、RA におけるサバイビンの発現、及び、その機能については未解明の部分が多い。そこでまず ELISA と免疫組織化学により血清および滑膜組織におけるサバイビンの発現を確認したところ、RA では OA と比較して血清サバイビン濃度が高値であった。一方、滑膜組織では RA と OA いずれも FLS（CD55 陽性細胞）及び血管内皮細胞に強い発現が認められ、特異性は低いと考えられた。サバイビンは BIRC5 という一つの遺伝子によりコードされるが、代替スプライシングにより機能の異なる数種類の蛋白を発現し（代替スプライシング)、ヒトでは野生型（WT）を含む５種類以上のバリアントの

存在が報告されている。そこで滑膜全組織の RNA を抽出して各バリアントの RT-PCR を行ったところ、3 種類のサバイビンバリアント（WT、2B、ΔEx3）が検出された。リアルタイム PCR によりそれらの発現量を比較すると、RA では OA に比べて WT 及び 2B の発現レベルが有意に高値であった。また、免疫組織化学的には、滑膜表層の細胞、特に FLS にサバイビン 2B の発現があり、RA では OA と比べて圧倒的に多くの細胞で発現していた。一方、ΔEx3 は RA と OA のいずれも主に血管内皮細胞で発現が認められた。以上より、RA 滑膜では主に FLS がサバイビン 2B を発現し、サバイビン 2B はバリアントを区別しないサバイビン発現と比べてより特異的なマーカーになり得ると考えられた。次に、RA-FLS を培養してサバイビンの発現を調べたところ、継代 3 代目付近でウエスタンブロットでの検出感度以下にまで発現量が低下した。そこで、FLS がサバイビン発現を維持する為には何らかの外的刺激が必要である、という仮説を立て、発現を亢進させる因子を検索したところ、PDGF が RA-FLS のサバイビン WT 及び 2B の発現を亢進することが判明した。次に、RA-FLS におけるサバイビンの機能を解析する為、全 BIRC5 を抑制する RNA と、サバイビン 2B のみを特異的に抑制する RNA の 2 種類の siRNA を用いて、PDGF 刺激された RA-FLS の生存細胞数、Ki-67 陽性細胞比率、Annexin V によるアポトーシス細胞比率を検討した。その結果、サバイビン 2B を特異的に抑制した場合のみ生存細胞数が減少した。また、サバイビン 2B の抑制は Ki-67 陽性細胞数の減少とアポトーシス細胞の増加をもたらした。さらに、RA-FLS に Nucleofection を用いてサバイビン 2B を過剰発現させたところ、生存細胞数の増加、Ki-67 陽性細胞数の増加、アポトーシス細胞の減少を認めたことから、サバイビン 2B は RA-FLS の細胞増殖に重要な役割を担うと考えられた。さらに、サバイビン 2B に特異的な抗体を用いて ELISA により血清中のサバイビン 2B を測定したところ、RA 患者血清で高い値が検出され、サバイビン 2B 高値群では低値群と比較して RA の疾患活動性指標が高値であった。よって、血清中のサバイビン 2B は、RA の診断及び病勢把握のマーカーとなる可能性が示唆された。

以上の結果から、本論文はサバイビン 2B が RA の病態の中心的細胞である FLS の増殖を制御し、その血清・組織における発現量は臨床的に有用な RA のマーカーたり得ることを示しており、関節リウマチの新規臨床検査薬及び新規治療薬の発展に貢献するところが大きい。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。