

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )	氏名	柳 沢 俊 良
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目 リポソーム化ウシラクトフェリンの経口投与は関節リウマチの進行を抑制する			
論文審査担当者 主 査 教 授 吉 子 裕 二 印 審査委員 教 授 高 橋 一 郎 審査委員 教 授 兼 松 隆			
〔論文審査の要旨〕  <p>関節リウマチ(RA)は、全身の関節に炎症が起こり、関節の腫脹や疼痛を主訴とする自己免疫疾患で、進行すると関節の変形や機能障害を引き起こす。RAの病態は、関節における過度の炎症と骨破壊であり、その病態進行には、マクロファージ(MΦ)などの炎症細胞浸潤を伴う滑膜細胞の異常増殖いわゆるパンヌスから産生される tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)などの炎症性サイトカインが重要な役割を果たす。また、RAの発症には自己免疫応答を抑制する制御性T細胞(Treg)と促進するTh17細胞(Th17)のバランスの破綻が関与している。一方、ラクトフェリン(LF)は、唾液や母乳等に含まれる安全性の高い鉄結合性糖蛋白質である。LFは、抗炎症作用や免疫調節作用などの多くの生物学的活性を有する。リポソーム化ウシラクトフェリン(LbLF)は、ウシラクトフェリン(bLF)にリポソームを付加したもので、bLFの胃での消化・分解を抑制し、小腸での吸収率を高めた糖タンパク質である。広島大学医歯薬保健学研究院口腔顎顔面病理病態学研究室では、LPS誘導性歯周組織破壊ラットモデルに対し、LbLFを経口投与し、歯周組織の炎症抑制および骨吸収抑制効果を報告した。そこで、歯周炎と同様に、骨破壊を伴う炎症性疾患であるRAにもLbLFが応用できるのではないかと考え以下の検討を行った。</p> <p>実験 1. 6 週齢の RA モデル SKG マウスを 4 群にわけ、1 群を腹腔内にマンナン(RA 誘導剤)を投与後、15 週間飼育し RA 誘導群(RA 群)とした。もう 2 群は、RA を誘導する 1 週間前から 100mg/day/kg (LbLF100 群) ならびに 500mg/day/kg (LbLF500 群) となるように LbLF を 16 週間経口投与した。残りの 1 群を RA 非誘導群(Cont 群)とした。飼育期間中脚関節</p>			

の腫脹を Sakaguchi 法にてスコアリングした。飼育 16 週間後、脚組織を回収し、肉眼像、CT 像、HE 染色像および TNF- $\alpha$  の免疫組織学的局在を比較検討した。その結果、Cont 群と比較して、RA 群では脚関節の発赤・腫脹が明瞭に認められ、脚関節腫脹スコアも有意に増加した。CT 像では、著明な脚関節部骨破壊像が観察された。組織学的には、関節部のパンヌスの形成と破骨細胞性骨吸収が顕著にみられ、パンヌス内には TNF- $\alpha$  陽性の M $\Phi$  や滑膜細胞が多数観察された。一方、LbLF 投与群では、関節の発赤・腫脹が軽減し、脚関節腫脹スコアも有意に低下していた。CT 像では、脚関節部の骨破壊像が抑制され、組織学的にも、関節のパンヌス形成や破骨細胞性骨吸収が抑制されていた。さらに、パンヌスにおける TNF- $\alpha$  の発現は劇的に減少していた。これらの LbLF による抑制効果は濃度依存的であった。

実験 2. RA の病態進行に及ぼす bLF の抑制作用のメカニズムを明らかにするために、M $\Phi$  (THP1) や RA 患者由来滑膜細胞 (RASf) を用いて、TNF- $\alpha$  誘導性炎症性シグナルの発現に対する bLF の効果を検討した。その結果、THP1 や RASf への bLF 前投与は、TNF- $\alpha$  の誘導する NF- $\kappa$ B 経路の p65、I $\kappa$ B $\beta$  や MAPK 経路の p38、JNK のリン酸化を濃度依存的に抑制した。また、bLF 投与により、両細胞からの TNF- $\alpha$  産生量も有意に減少した。さらに、アダプタープロテイン/ユビキチンリガーゼである TRAF2 と bLF が結合することによって、TNF- $\alpha$  誘導性炎症性シグナルが抑制される可能性が示唆された。

実験 3. 実験 1 と同様に Cont 群、RA 群、LbLF500 群の 3 群を作り、5 週後の脾臓での Treg と Th17 のバランスの破綻に対する LbLF 経口投与の効果を FACS 解析にて検討した。その結果、LbLF500 群では、RA 群と比較して Th17 が有意に減少し、Treg が増加傾向を示した。また、bLF500 群では Th17/Treg 比は有意に減少し、Cont 群と同程度まで改善していた。

実験 4. 広島大学病院リウマチ・膠原病科を受診した RA 患者 20 人に LbLF 錠 (270mg/day) を 3 か月経口投与し、疾患活動性を評価する DAS28 値や血清中の C 反応性蛋白 (CRP) 値、IL-17 および TNF- $\alpha$  の濃度を測定した。その結果、LbLF 経口投与によって、DAS28 の値や CRP 値は減少傾向を示した。また、欧州リウマチ学会寛解基準による評価では、40% の患者に中等度ないし良好な改善反応が認められた。さらに、LbLF 投与後の血清中の TNF- $\alpha$  や IL-17 のレベルは投与前に比較して有意に減少していた。

本研究により、bLF はパンヌス構成細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制するとともに、Th17/Treg 比を改善することによって RA の病態進行を抑制することが明らかとなった。さらに、RA 患者への LbLF の経口投与は、血中の炎症性サイトカイン濃度を減少させ、RA の症状の改善に繋がるということが明らかとなった。よって、LbLF は RA の発症を予防し、病態の進行を抑える安全性の高い RA 予防・治療薬として臨床応用できる可能性が示唆された。

以上の結果から、本論文は LbLF の RA への応用のための基礎的なデータを提供し、口腔病理学ならびに関連歯科医学の発展に寄与するところが大きいと高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

