

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	倉信 達臣
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Activin A Expressed in Rheumatoid Synovial Cells Downregulates TNF α -Induced CXCL10 Expression and Osteoclastogenesis. (関節リウマチ滑膜細胞に発現する Activin A は TNF α による CXCL10 発現と RANKL によるヒト破骨細胞分化誘導を抑制する。)			
論文審査担当者			
主 査	教授	保田 朋波流	印
審査委員	教授	安達 伸生	
審査委員	准教授	鎌田 英明	
〔論文審査の結果の要旨〕 .			
<p>研究の背景：関節リウマチ(RA)は関節滑膜を主座とする慢性炎症性疾患であるが、進行性の関節破壊を引き起こし、日常生活動作や生活の質を著しく低下させる。この関節破壊には炎症性滑膜細胞から過剰産生される炎症性サイトカインと関節局所で増殖する破骨細胞が病態に深く関与している。activin A は卵巣刺激ホルモンの合成分泌調節を調節する因子として発見されたペプチドで、TGF-β スーパーファミリーに属する。近年、activin A が RA 滑膜に高発現していること、マクロファージなどの炎症細胞によるサイトカイン産生や破骨細胞分化に対して様々な作用を示すことが報告されている。そこで本研究では、RA の病態における activin A の関与を明らかにするために、RA 滑膜細胞における activin A の発現調節機構と滑膜細胞の炎症性サイトカイン、ケモカインの産生およびヒト破骨細胞分化に対する activin A の作用について検討した。</p> <p>方法と結果：最初に RA 滑膜細胞における activin A の発現調節機構について検討した。RA 滑膜細胞の調整は、RA 患者の手術時に得られて滑膜をコラゲナーゼ処理し、細胞を単離した上で、24 時間培養。デッシュ付着細胞を 2～3 継代して実験に使用した。サブコンフルエントの RA 滑膜細胞培養系に IL-1β、TNFα、IL-6、IL-17A、TGF-β1 を加えて刺激し、activin A の発現を検討した。上清中の濃度は ELISA 法により測定し、遺伝子発現は qRT-PCR 法により評価した。炎症性サイトカインを加えると、単独では Activin A の産生は軽微であったが、サイトカインを組み合わせて刺激すると、その発現は増強した。とくに TGF-β 刺激で顕著に増加した。以上より、activin A は複数の炎症性サイトカインによる相加、相乗作用により発現が誘導されること、とりわけ TGF-β が重要な発現増強因子であることが明らかになった。</p> <p>次に RA 滑膜細胞に対する activin A の機能的役割を明らかにするために、炎症性サイトカイン (IL-1β、TNFα、IL-6、IL-10、IL-12A、IL-23A) およびケモカイン (CXCL5、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CCL2、CCL3、CCL5、CCL20) の発現に対する Activin A の効果を検討した。activin A はこれらのサイトカイン、ケモカイン遺伝子の発現を誘導しなかったが、TNFα により誘導された CXCL10 遺伝子の発現を強く抑制し、この抑制効果は異なった 5 名の患者由来の滑膜細胞においても同様に認められた。その他の TNFα により誘導されたサイトカイン、ケモカインの activin A の抑制効果は一定の傾向が認められなかった。また、この activin A による抑制効果は蛋白レベルでも濃度依存性に認められた。</p> <p>RA の関節破壊には関節局所で増加する破骨細胞が深く関与している。そこで、ヒト破骨細胞分化誘導に対する activin A の効果を検討した。健常者末梢血単核細胞を分離後、MACS beads (pan monocyte isolation kit)により単球に分離して実験に用いた。末梢血単球を細胞調整後、破骨細胞分化因子である RANKL と M-CSF、各種濃度の activin A 存在下で 5-10 日間培養した。誘導された破骨細胞の同定は TRAP 染色と Osteo plate を用いた骨吸収活性により行った。activin A は</p>			

RANKL による破骨細胞の分化を濃度依存性に抑制した。また、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 と破骨細胞特異酵素である Cathepsin K の発現を Western blot 法により検討したところ、activin A は両蛋白の発現をともに抑制した。

考察：activin A は RA 関節滑膜に高発現しているが、その発現調節機構と機能的役割に関してほとんど知られていない。本研究では RA 滑膜細胞における activin A の発現は炎症性サイトカインの相加、相乗作用により誘導されること、とりわけ TGF- β 1 はその発現増強効果が顕著であり、activin A の重要な調節因子であることを明らかにした。機能面では、activin A は RA 滑膜細胞に作用して TNF α による CXCL10 発現を強く抑制すること、ヒト破骨細胞の分化誘導を抑制することを明らかにした。CXCL10 は T 細胞、単球、マクロファージを炎症局所に動員させる強力な遊走因子である。また、関節炎モデルマウスにおいて、抗 CXCL10 抗体投与により関節破壊抑制の効果が認められていることから、CXCL10 は RA の病態に深く関与していることが推定されている。さらに、activin A は関節破壊を引き起こす破骨細胞の分化を抑制することから、RA の病態を負に制御している推定される。activin A の抗炎症作用の分子メカニズムに関しては不明な点が多いが、その詳細を明らかにすれば、新規の抗リウマチ薬の開発につながる可能性がある。

本研究は、activin A が関節リウマチ滑膜において炎症性サイトカインと TGF- β 1 の相乗的刺激により発現し、発現した activin A が TNF α 誘導性 CXCL10 を抑制すること、さらにヒト末梢血単球において破骨細胞分化を抑制することを明らかにした。その機序に関しては不明な点が多いが、その解明により新たな RA 治療薬の開発の展開が期待されることから、本研究は臨床的に高く評価される。よって審査委員会委員全員は本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。