

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	河野 紘輝
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当			
論文題目 The Lipopolysaccharide Mutant Re-LPS Is a Useful Tool for Detecting LPS Contamination in Rheumatoid Synovial Cell Cultures (LPS 変異体である Re-LPS はリウマチ滑膜細胞培養における LPS 混入の検出に有用である)				
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	講師	高萩 俊輔		
〔論文審査の結果の要旨〕				
<p>はじめに、Toll-like receptor (TLR) は病原体関連分子パターンを認識する受容体で、自然免疫と獲得免疫の両者を引き起こす。TLR に起因する慢性炎症と、TLR と内因性リガンドの相互作用は、関節リウマチ (RA) をはじめとした多くの疾患で重要な役割を果たしている。</p> <p>また、RA 患者の関節滑膜には TLR4 が過剰発現していることが知られており、そのシグナルが RA の病態に深く関わることを示唆されている。一方で、TLR4 関連実験ではそのリガンドである lipopolysaccharide (LPS) の混入に細心の注意を払わなければならない。</p> <p>RA の滑膜細胞 (RSC) を用いて、自己抗原であるシトルリン化フィブリノーゲン (cit-Fb) の効果を検討したところ、TLR4 を介して、T 細胞遊走ケモカインである C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) の産生が誘導された。しかし、この効果は cit-Fb 試薬に混入した LPS の影響であることが判明した。一方、混入した LPS による CXCL10 産生は、LPS の変異体である Re-LPS により完全に抑制されることを偶発的に見出した。この Re-LPS の抑制作用は、培養実験の LPS 混入を簡便に検出する方法として有用かもしれないと考えた。そこで、本研究で、LPS および LPS の混入した cit-Fb 試薬を用いて、RSC ならびに健常人末梢血単球 (PBMs) のサイトカイン産生に対する Re-LPS の効果を検討した。</p> <p>RA 患者の人工関節置換術時に得られた関節滑膜をコラゲナーゼ処理し、デッシュ附着細胞を RA 滑膜細胞 (RSC) として実験に使用した。まず、RSC における cit-Fb のサイトカイン発現効果を遺伝子発現は定量的 RT-PCR (qPCR)、蛋白発現は ELISA 法により評価した。RSC を cit-Fb 試薬で刺激すると IFNβ を介して CXCL10 の発現が強く誘導され、その効果は濃度依存的であった。また、siRNA-TLR4 で RSC の TLR4 をノックダウンすると CXCL10 と IFNβ 発現は阻害され、cit-Fb による CXCL10 の発現誘導は TLR4 シグナルを介することが判明した。TLR4 のシグナルは微量の LPS の混入によって影響をうけるため、LPS の中和活性を有するポリミキシン B (PMB) の効果を検討した。PMB は低濃度の cit-Fb による CXCL10 遺伝子・蛋白発現を有意に抑制したが、高濃度の cit-Fb では PMB の抑制作用を認めなかった。一方、LPS は熱耐性であることが知られている。cit-Fb は蛋白で、熱処理により変性を来し、活性は低下する。そこで、95°C、15 分間熱処理をして、cit-Fb の効果を検討した。コントロールとして用いた LPS は熱処理しても CXCL10、IL-6 遺伝子発現誘導作用は抑制されなかった。反対に TNFα の CXCL10、IL-6 遺伝子発現誘導作用は、熱処理により完全に抑制された。cit-Fb 試薬では、IL-6 の遺伝子発現は熱処理により影響を受けなかったが、CXCL10 遺伝子発現は熱処理により有意の抑制を認めた。以上より、cit-Fb 試薬への LPS 混入が強く示唆されたものの、cit-Fb 自体の作用は否定できなかった。</p> <p>LPS はリピッド A、コア多糖、O 抗原多糖で構成されるが、O 抗原多糖が欠失した LPS 変異体 (R-LPS) が知られており、R-LPS はコア多糖の付加の程度により Ra、</p>				

Rc、Re-LPS などに分類される。RSC とヒト末梢血単球における大腸菌由来 Wild type (WT)-LPS と R-LPS の CXCL10 発現誘導作用を検討すると、両培養系とも WT-LPS で強く誘導されたが、Rc、Re-LPS ではほぼ認めなかった。一方、Re-LPS は WT-LPS による CXCL10 の誘導を濃度依存性に抑制した。また、この抑制効果は *E. coli* のみならず、*Salmonella* 由来 Re-LPS においても同様に認められた。さらに、Re-LPS は cit-Fb の CXCL10 発現誘導作用を濃度依存性に抑制した。また、末梢血単球においても、cit-Fb による IL-6、IL-8、CXCL10 の発現誘導を Re-LPS は有意に抑制した。最終的に、リムルス反応を用いた Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Assay により、cit-Fb 試薬 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) から 0.3 ng/ml 相当の LPS 活性を認めた。

RA の病態には TLR4 シグナルが重要な役割を担っているが、TLR4 関連実験では検体や試薬への LPS 混入が大きな問題となる。本実験で使用した cit-Fb 試薬は、そのシトルリン化に大腸菌由来の酵素 (PAD) を用いており、その際に LPS が混入した可能性が高い。

培養実験では微量に混入した LPS が結果に大きな影響を与えるが、その検出法には問題が多い。LAL アッセイは LPS 検出のための最も汎用される方法であるが、高価で特殊な機器を必要とし、簡易的に測定することは難しく、偽陰性となる可能性が指摘されている。また PMB は効果持続時間が短く、PMB 自体がサイトカイン誘導を引き起こすことが報告されている。LPS の熱処理に関しても、熱に敏感な菌株も存在する。

本研究では RSC、末梢血単球の培養系で Re-LPS が WT-LPS のサイトカイン誘導に対して阻害的に働くことを明らかにした。さらに、Re-LPS は LPS の混入した cit-Fb 試薬のサイトカイン誘導作用を完全に抑制した。

以上の結果から、本論文は Re-LPS の作用は培養実験における LPS の混入を迅速に検出するツールとして有用であることを示した重要な研究と考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が河野紘輝に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認める。