

学位番号甲第 488 号

学位申請者 : 村 岡 成

主 論 文 : Leptin stimulates interleukin-6 production *via* janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 in rheumatoid synovial fibroblasts

(Leptin は JAK2/STAT3 を介して関節リウマチ患者滑膜細胞の IL-6 産生を増加させる)

著 者 : Sei Muraoka, Natsuko Kusunoki, Hiroshi Takahashi, Kazuaki Tsuchiya, Shinichi Kawai

公 表 誌 : Clinical and Experimental Rheumatology **\*\*(\*)\*\*\*-\*\*\*, 20\*\***

論文内容の要旨 :

**背景:** 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、インターロイキン (interleukin, IL)-1 $\beta$ や IL-6 などの炎症性サイトカインは関節リウマチの病態形成に主要な役割を担っており、近年になりこれらの阻害薬は強力な抗リウマチ薬として目覚ましい進歩を遂げている。しかしながら、これらを持ってしても治癒には至らず、無効な症例が少なからず認められる。レプチンは *ob* 遺伝子の産物で、ほとんどが脂肪細胞により産生されるペプチドホルモンである。レプチンの機能としては食欲やエネルギー消費を調節する一方で、炎症や自己免疫に寄与することも示唆されている。血清レプチン濃度が、健常者より関節リウマチ患者において有意に高いことを当教室で報告してきた。そこで、本研究では関節リウマチ患者から得られた滑膜線維芽細胞の培養系に対するレプチンの直接作用を検討した。

**目的:** 本研究では、関節リウマチ滑膜線維芽細胞における炎症性サイトカイン産生に及ぼすレプチンの影響を明らかにすることを目的とした。

**方法:** 本研究は東邦大学医学部倫理委員会の承認を受け、人工膝関節置換術を施行する関節リウマチ患者より同意を得た上で、手術時に得られた滑膜の余剰組織を研究に用いた。滑膜組織から定法により得た滑膜線維芽細胞

を培養した。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription- polymerase chain reaction, PCR) にて、関節リウマチ滑膜線維芽細胞のレプチン受容体メッセンジャーRNA (mRNA) 発現を検討した。レプチン 0-300nM を添加した関節リウマチ滑膜線維芽細胞における TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ と IL-6 の mRNA 発現を、リアルタイム PCR を用いて測定した。関節リウマチ滑膜線維芽細胞の培養上清中の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ と IL-6 のタンパク濃度は酵素結合免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) キットを用いて測定した。レプチン受容体に対する低分子干渉 (small interfering) RNA (siRNA) や、ヤヌスキナーゼ (janus kinase, JAK) 2 阻害剤、ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 阻害剤、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 阻害剤を用いて滑膜線維芽細胞における IL-6 産生に及ぼす影響を検討した。レプチン受容体下流の転写因子であるシグナル伝達性転写因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 3 のリン酸化に対するレプチンの影響をウエスタンブロット法にて検討した。

**結果:** 関節リウマチ滑膜線維芽細胞にはレプチン受容体 mRNA が存在した。関節リウマチ滑膜線維芽細胞にレプチンを添加すると、濃度依存的に IL-1 $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現は増加した。関節リウマチ滑膜線維芽細胞の培養上清において、添加したレプチン濃度に依存して IL-6 のタンパク産生が増加した。一方で、IL-1 $\beta$ のタンパク産生は認められなかった。レプチンにより促進された IL-6 産生は、レプチン受容体に対する siRNA により減少した。また、関節リウマチ滑膜線維芽細胞における STAT3 のリン酸化は、レプチン濃度依存的に亢進したが、この作用は IL-6 を介していなかった。レプチンにより促進された IL-6 産生は JAK2 阻害剤により減少したが、PI3K 阻害剤と MAPK 阻害剤では有意な変化は認めなかった。

**結語:** レプチンは関節リウマチ滑膜線維芽細胞において JAK2/STAT3 の活性化を介して、IL-6 産生を増加させた。これよりレプチンは炎症に寄与しているものと考えられた。関節リウマチ治療において、レプチンと JAK/STAT 経路は新しい治療標的になる可能性が示唆された。

# 1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号甲第 488 号	氏 名	村 岡 成
論文審査担当者	主 査	龍 野 一 郎
	副 査	高 松 研
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	弘 世 貴 久
	副 査	近 藤 元 就
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>レプチンは ob 遺伝子の産物でほとんどが脂肪細胞により産生されるペプチドホルモンである。食欲やエネルギー消費を調節し、肥満に関係する因子として注目されてきたが、近年、炎症や自己免疫に寄与することが示唆されている。申請者の教室では関節リウマチ患者において、血清レプチン濃度が健常者より有意に高いことを見出しており、このことは関節リウマチ患者でレプチンが病態へ関与している可能性を示唆している。</p> <p>そこで申請者は関節リウマチ患者から得られた滑膜線維芽細胞の培養系を用いて、IL-6 産生へのレプチンの関与を検討した。炎症性サイトカインの一つ IL-6 は関節リウマチの病態形成に重要な役割を担っており、その産生制御機構は関節リウマチの病態を考える上で極めて重要である。研究は東邦大学医学部倫理委員会の承認を受け、人工膝関節置換術を施行する関節リウマチ患者より同意を得た上で、手術時に得られた滑膜の余剰組織から定法により得た滑膜線維芽細胞を用いている。</p> <p>その結果、関節リウマチ滑膜線維芽細胞にはレプチン受容体 mRNA に発現を認め、レプチンの添加により濃度依存性の IL-1、IL-6 の mRNA 発現の増加を認めた。また、培養上清においてレプチン濃度依存性 IL-6 のタンパク産生が増加していた。レプチンによる IL-6 産生はレプチン受容体に対する siRNA により減少した。また、STAT3 のリン酸化がレプチン濃度依存的に亢進し、レプチンによる IL-6 産生は JAK2 阻害剤により特異的に阻害された。</p> <p>以上より申請者はリウマチ患者の血液中で増加しているアデポカインであるレプチンが関節リウマチ患者の滑膜に直接的に働き、STAT3 のリン酸化を介して IL-6 などの産生制御および関節リウマチの病態形成に深くかかわる可能性を初めて明らかにした。</p> <p>3月25日に行われた公開審査会において、申請者は</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① 関節リウマチ患者の血清でレプチンが高い病態およびその産生源は何か？</li> <li>② 正常者の滑膜細胞での反応性はどうか？</li> <li>③ 実験に使用したレプチンの濃度と実際に人で測定されているレプチンの濃度は一致するのか？</li> <li>④ レプチンによる STAT3 のリン酸化はどうだったのか？</li> <li>⑤ 肥満患者では高レプチン血症が良く観察されるが、変形性関節症への関与はあるのか？</li> </ol> <p>などの質問に的確に返答した。</p> <p>審査員一同は村岡氏に十分な学識があることを確認し、学位に値する研究内容であると評価した。</p>		