

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

進藤恵実子より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 550 号

学位申請者 : 進 藤 恵 実 子

学位審査論文 : The growth factor midkine may play a pathophysiological role in rheumatoid arthritis

(成長因子ミッドカインは関節リウマチの病態形成に関与する)

著 者 : Emiko Shindo, Toshihiro Nanki, Natsuko Kusunoki, Kotaro Shikano, Mai Kawazoe, Hiroshi Sato, Kaichi Kaneko, Sei Muraoka, Makoto Kaburaki, Yoshikiyo Akasaka, Hideaki Shimada, Tomoko Hasunuma, Shinichi Kawai

公 表 誌 : Modern Rheumatology (in press, doi : 10.1080/14397595.2016.1179860)

論文内容の要旨 :

ヘパリン結合能をもつ成長因子であるミッドカイン (midkine: MK) は腫瘍細胞に発現し、その増殖や浸潤に寄与する。これまで MK には、細胞増殖作用、アポトーシス抑制作用、血管新生作用、炎症細胞の遊走作用、制御性 T 細胞の分化抑制作用が報告されている。関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の関節滑膜組織では、滑膜細胞の増殖、炎症細胞浸潤、炎症メディエーターの産生、血管新生がみられる。そのため RA 滑膜組織でも MK が病態に関与している可能性があり、実際、RA 患者で血清 MK 値の上昇が報告されている。そこで、血清 MK 値と RA 疾患活動性との関連、及び MK の RA 病態形成への関与の解明を目的として本研究を行った。

RA 患者 146 名、健常群 85 名から横断的に末梢血を採取し、血清 MK 濃度を ELISA で測定したところ、RA の血清 MK 値は健常群よりも高値であった (RA: 787.7 ± 68.8 (平均 ± 標準偏差)、540.8 (391.7 - 781.1) (中央値 (四分位範囲))、健常群: 373.6 ± 15.1、334.4 (284.8 - 426.1) pg/ml,  $p < 0.0001$ )。また、RA 患者の血清 MK 値は、RA の疾患活動性 (disease activity score (DAS) 28-ESR)、身体機能評価 (health assessment questionnaire: HAQ)、リウマトイド因子 (rheumatoid factor: RF) と有意な相関を認めた。顕微鏡的多発血管炎 (n=3)、成人スチル病 (n=2)、全身性エリテマトーデス (n=3)、多発性筋炎 (n=2) においても血清 MK 値を測定したが、健常群と比較して有意な違いを認めなかった。RA 患者 4 人に対し、抗 TNF  $\alpha$  抗体であるインフリキシマブ (infliximab

: IFX 投与後の血清 MK 値の推移を観察した。IFX 投与後 CRP、ESR は低下し、血清 MK 値も低下傾向となった。

次に、人工膝または股関節置換術時に得られた RA 及び変形性関節症 (osteoarthritis: OA) の余剰滑膜組織を用いて、ヤギ抗ヒト MK ポリクローナル抗体により免疫染色を行った。RA 滑膜組織では、滑膜表層細胞に強く MK の発現を認めた。一方、OA の滑膜組織では MK の発現はほとんどみられなかった。また、RA 滑膜組織より滑膜線維芽細胞 (rheumatoid synovial fibroblasts: RSFs) を樹立し、48 時間 MK で刺激し、培養上清中の IL-6、IL-8、chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)、chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1)、prostaglandin E2 (PGE2) の濃度を ELISA で測定した。MK 刺激により、RSFs からの IL-6、IL-8、CCL2 の産生が有意に増加した。PGE2 産生には有意な変化はなく、CX3CL1 は測定感度以下であった。RSFs において、MK 受容体候補分子である anaplastic lymphoma kinase、protein tyrosine phosphatase、receptor type Z1、Notch2、LDL receptor-related protein 1 (LRP1) の発現を RT-PCR、ウェスタンブロッティングで解析したところ、Notch2 および LRP1 の mRNA、また LRP1 の蛋白発現を認めた。

RA 患者の血清 MK 値は、RA 疾患活動性と相関し、また IFX 治療により低下したことより、RA の疾患活動性マーカーとなると考えられる。さらに HAQ とも相関することより、RA の予後不良の指標にもなる可能性がある。血清 MK 値は、RF との相関も認めしたが、RF は RA 予後不良因子として広く知られている。血清 MK 値のこれらの指標としての有用性をさらに検討するためには、今後多数例での前向き研究が必要である。また、RA 滑膜組織で MK が発現しており、MK 刺激により RSFs より IL-6、IL-8、CCL2 産生が誘導された。IL-6 は免疫細胞に広く作用するものであり、その阻害薬が RA 治療に用いられている。IL-8、CCL2 細胞遊走に関与するケモカインであり、RA 滑膜組織への炎症細胞浸潤に寄与すると推測されている。今回、RSFs に MK 受容体候補分子の LRP1 の発現を確認したことから、MK は LRP1 を介して RSFs を刺激し、IL-6、IL-8、CCL2 産生を誘導することにより、RA の病態形成に関与していると考えられた。

血清 MK 値は RA 疾患活動性及び予後不良因子としての指標となり、また MK は炎症メディエーター産生により RA の病態形成に関与することが見出された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 550 号	氏 名	進 藤 恵 実 子
学位審査担当者	主 査	三 上 哲 夫
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	武 城 英 明
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	亀 田 秀 人

学位審査論文の審査結果の要旨 :

学位審査会は平成 28 年 9 月 27 日、13:00-14:00 に医学部第 2 セミナー室にて、5 名の審査者の出席の下（書面による事前審査者含む）に開催された。

研究概要：ヘパリン結合能をもつ成長因子であるミッドカイン (Midkine: MK) の関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の滑膜組織における病態形成への関与の可能性を検討した。RA 患者 146 名、健常群 85 名の血清 MK 濃度を測定したところ、RA 群の血清 MK 値は健常群よりも高値であった。また、RA 患者の血清 MK 値は RA の疾患活動性、身体機能評価、リウマトイド因子 (rheumatoid factor: RF) と有意な相関を示した。RA 患者 4 名に対し、抗 TNF 抗体製剤インフリキシマブ投与後の血清 MK 値の推移を観察したところ、インフリキシマブ投与後に炎症マーカーの低下とともに、血清 MK 値も低下傾向を示した。次に、人工関節置換時に得られた RA および変形性関節症の余剰滑膜組織を用いて滑膜組織における MK の発現を見たところ、RA の滑膜表層細胞に強い発現を認めたが、変形性関節症の滑膜では MK の発現はほとんど見られなかった。さらに、RA 滑膜組織から滑膜線維芽細胞 (rheumatoid synovial fibroblast: RSF) を樹立し、MK で刺激後、培養上清中の IL-6、IL-8、chemokine ligand 2 (CCL2)、chemokine ligand 1、prostaglandin E2 の濃度を ELISA で測定したところ、MK 刺激により RSF から IL-6、IL-8、CCL2 の産生が有意に増加した。RSF において、MK 受容体候補分子の発現を RT-PCR、ウエスタンブロットにより解析したところ、Notch2 および LRP1 の mRNA、LRP1 のタンパク発現を認めた。RA 患者において、血清 MK 値は RA の疾患活動性マーカーや予後の指標になる可能性が考えられた。さらに、MK は LRP1 を介して RSF を刺激し、IL-6、IL-8、CCL2 産生を誘導することにより、RA の病態形成に関与していることが示唆された。

研究要旨の発表の後、質疑応答がなされた。主な質問として、MK はどこで産生されるのか？MK 受容体候補分子という表現の意味するところは何か？変形性関節症の滑膜線維芽細胞での実験は行ったか？インフリキシマブ投与の 4 例の選択基準は何か？などの質問が、主査、副査からなされた。それらすべての質問に対して申請者は適切に返答した。以上より、本論文は、RA の病態形成に対する MK の関与を示した研究であり今後の臨床応用の可能性も期待できるとし、審査委員全員一致で学位授与に相当すると判断し、学位審査会を終了した。