

学位番号甲第 487 号

学位申請者 : かぶら 鏑 き 木 まこと 誠

主 論 文 : Expression and function of chemerin in the synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis

(関節リウマチ患者の滑膜組織におけるケメリンの発現および作用)

著 者 : Makoto Kaburaki, Natsuko Kusunoki, Hiroshi Takahashi, Kazuaki Tsuchiya, Shinichi Kawai, Hirahito Endo

公 表 誌 : Journal of the Medical Society of Toho University 60 (1) : 3-14, 2013

論文内容の要旨 :

背景 : Chemerin は脂肪細胞が分泌する生理活性物質であるアディポカインの 1 つであり、G 蛋白結合型受容体の chemerin 受容体 ChemR23 に結合し作用する。Chemerin は、脂肪細胞の前駆細胞から脂肪細胞への分化に関与するなどの代謝系への影響とともに、ケモカインとして免疫疾患の病態に関与する可能性も報告されているが、chemerin/ChemR23 システムの関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) の滑膜炎の病態形成における意義についての詳細な解析の報告はない。

目的 : 本研究では、RA 滑膜組織と対照としての変形性関節症 (osteoarthritis : OA) 滑膜組織における chemerin 及びその受容体 ChemR23 の発現と作用について検討した。

対象・方法 : 対象は東邦大学医療センター大森病院で治療を受けた RA 患者 20 名と OA 患者 10 名で、RA 患者は ACR 診断基準を満たしたものとした。本研究は東邦大学医学部倫理委員会の承認を受け、文書同意を得て東邦大学医療センター大森病院にて施行された人工関節手術時に得られた滑膜組織を用いた。RA 及び OA 滑膜組織より total RNA を分離したのち、cDNA を作成し chemerin と ChemR23 の mRNA 発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 及び real time PCR を用いて測定した。また免疫組織化学法を用い滑膜組織の chemerin の発現分布を同定した。また RA、OA 滑膜組織から滑膜細胞を分離培養し、培養

滑膜細胞を用いて chemerin と ChemR23 発現と chemerin による滑膜細胞からの matrix metalloproteinase (MMP) の産生誘導を検討した。

結果 : RA 患者滑膜組織の chemerin mRNA は、OA よりも 3.01 ± 3.84 倍強く発現していた。免疫組織化学では chemerin は表層単球細胞や滑膜内線維芽細胞に発現し、また血管内皮細胞にも僅少なながら発現を認めた。RA 患者滑膜組織の ChemR23 mRNA は、OA と比較して 2.43 ± 2.95 倍強く発現していた。免疫組織化学の検討では、OA 滑膜組織でも表層細胞に発現を軽度認めた。RA 培養滑膜細胞において、インターロイキン-1 β あるいは腫瘍壊死因子 α により濃度依存的に chemerin と ChemR23 mRNA の発現を誘導した。Chemerin は RA 滑膜細胞の MMP-1、MMP-3、MMP-13 mRNA 発現を誘導し、培養上清中に MMP-1 活性の増加が確認できた。一方、MMP-2、tissue-inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1、TIMP-2 mRNA の発現誘導は認められなかった。また、chemerin による MMP-1、-3 および-13 の発現誘導は extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) 阻害薬と Akt 阻害薬によって抑制された。

結語 : Chemerin と ChemR23 は RA 滑膜組織において炎症病態によって発現誘導される。また、chemerin は ChemR23 \cdot ERK-1/2 を介して RA 滑膜細胞の MMP-1、MMP-3、MMP-13 産生を誘導した。これらの成績は、chemerin および ChemR23 は RA 治療の新規の標的となる可能性を示唆するものである。

1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号甲第 487 号	氏 名	鎬 木 誠
論文審査担当者	主 査	澁 谷 和 俊
	副 査	島 田 英 昭
	副 査	本 間 栄
	副 査	龍 野 一 郎
	副 査	弘 世 貴 久
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>1) 研究概要</p> <p>目的: 詳細不明である関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) 滑膜炎への chemerin/ChemR23 システムの関与とその機序を解明する。</p> <p>材料・方法: RA 患者 20 名および Osteoarthritis (OA) 患者 10 名の手術時に得られた滑膜組織より cDNA を作成し、chemerin と ChemR23 の mRNA 発現を測定した。また免疫組織化学法を用い滑膜組織の chemerin の発現分布を検討した。この一方、被験者から採取した培養滑膜細胞を用いて chemerin と ChemR23 発現と chemerin による滑膜細胞からの matrix metalloproteinase (MMP) の産生誘導を検討した (倫理委員会承認#19021)。</p> <p>結果: RA 由来の滑膜細胞は、OA 由来細胞と比較して 3.0 倍の chemerin mRNA 発現強度ならびに 2.4 倍の ChemR23 mRNA 発現強度を示した。一方、RA 由来の培養滑膜細胞は、インターロイキン-1β あるいは腫瘍壊死因子α により濃度依存性に chemerin と mRNA の発現を誘導した。また、Chemerin は RA 滑膜細胞の MMP-1、MMP-3、MMP-13 mRNA 発現を誘導したが、MMP-2、tissue-inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1、および TIMP-2 mRNA の発現誘導は認められなかった。一方、chemerin による MMP-1/3 と MMP-13 の発現誘導は extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) 阻害薬と Akt 阻害薬によって抑制された。</p> <p>結語: Chemerin と ChemR23 は、RA における滑膜組織で炎症病態の正方向加重因子として機能する。また、chemerin は ChemR23・ERK-1/2 を介して RA 滑膜細胞の MMP-1、MMP-3、MMP-13 産生を誘導した。これらより、chemerin および ChemR23 が RA 治療の新規標的分子となる可能性を指摘した。</p> <p>2) 質疑応答</p> <p>質疑: 図 4B は図 4A の可視的な所見を定量的に表記したものか?</p> <p>応答: 指摘通りである。</p> <p>質疑: 図 4B における 3 つのグラフの Y 軸は相対的な mRNA を表現しているのであれば、目盛を統一すべきでは?</p> <p>応答: 貴重な助言に感謝する。今後、結果の表現には一層の工夫を行いたい。</p>		

質疑：リウマチ患者間での chemerin 活性 (mRNA expression) に差を認めるが、被験者の臨床所見に差はなかったか？

応答：医学部倫理委員会で審査・承認を得た研究計画では、分離した滑膜細胞と臨床情報は連結不可能匿名化処理が必要であったため、質問事項の相関は検討できなかった (倫理的制限項目)。

質疑：chemerin を介した情報伝達は炎症を活性化させるのか？

応答：このシステムを炎症の抑制系として仮説を立てて研究を始めたが、反対に炎症を加速させる因子であることが判明した。

質疑：chemerin の血中濃度測定は可能か？

応答：可能であるが、現時点では一般の施設では行えない。

質疑：chemerin の血中濃度上昇は、全身的な炎症の指標となるか、あるいは濃度上昇は関節局所の現象か？

応答：関節液中の上昇が著明である。局所における濃度上昇により高い意義があると考えている。

質疑：ELISA での測定が可能であれば、既に特異的な抗体が実用可能であろう。これを動物に投与し chemerin 抑制による消炎効果を試行した報告はあるか？

応答：先行研究について調査したが、渉猟の限りでは確認できなかった。

質疑：図 2 で表現を意図した免疫組織学的所見はモノクロームでは極めて難しい。大学院医学研究科委員会での説明までにカラープリントを用意してほしい。

応答：指摘の通りである。説明に使用するプリントを早急に提出する。

3) 審査

本研究は、Chemerin と ChemR23 が RA における関節炎の加速因子の 1 つであること、ならびに RA 由来の滑膜細胞の MMP-1, MMP-3, MMP-13 産生を誘導することを明らかにした価値あるものであり、chemerin および ChemR23 が RA 治療の標的となる可能性を示唆した新規性に富む研究であると判断され、本研究科における学位授与に値するものと認定された。