

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

佐藤洋志より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 597 号

学位申請者 : さ とう ひろ し
佐 藤 洋 志

学位審査論文 : Resistin upregulates chemokine production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis

(レジスチンは関節リウマチ患者の線維芽細胞様滑膜細胞のケモカイン産生を亢進させることにより関節リウマチ病態形成に關与する)

著 者 : Hiroshi Sato, Sei Muraoka, Natsuko Kusunoki, Shotaro Masuoka, Soichi Yamada, Hideaki Ogasawara, Toshio Imai, Yoshikiyo Akasaka, Naobumi Tochigi, Hiroshi Takahashi, Kazuaki Tsuchiya, Shinichi Kawai, Toshihiro Nanki

公 表 誌 : Arthritis Research & Therapy 19 (1) : 263, 2017

論文内容の要旨 :

アディポカインは脂肪組織から産生される生理活性物質である。アディポカインの一つであるレジスチンはインスリン抵抗性や炎症の制御に重要な役割を担っている。関節リウマチ(RA)を始めとした種々の膠原病患者において、血清レジスチン濃度が上昇していることが報告されており、レジスチンが膠原病における炎症病態に關連していることが推測されている。しかし、RAの病態形成におけるレジスチンの役割は明らかにはされていない。そこで我々は、RAにおけるレジスチンの病態形成への關与を明らかにすることを目的とした。

RA患者滑膜組織におけるレジスチンとその受容体であるadenylate cyclase-associated protein 1 (CAP1)の発現を免疫染色で解析した。RA患者の滑膜組織においてレジスチンとCAP1の発現を認め、その発現は変形性関節症(OA)患者の滑膜組織より増強していた。また二重染色では、CD68陽性マクロファージがレジスチンを発現しており、CAP1はCD68陽性マクロファージ、cadherin-11陽性線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)、von Willebrand因子陽性血管内皮細胞で発現を認めた。さらに*in vitro*で培養されたFLSでも、CAP1の発現をRT-PCR, Western blottingで確認した。次に、レジスチン1000 ng/mlで刺激したFLS、および未刺激のFLSからtotal RNAを抽出し、RNAシーケンスにより遺伝子発現を網羅的に解析した。未刺激のFLSと比較して2

倍以上に遺伝子発現が増加した遺伝子は18個抽出された。その中に7個のケモカイン (CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL8、CCL2) が含まれていた。また、蛋白レベルでのケモカイン産生亢進を解析するため、*in vitro*で種々の濃度のレジスチンとともに培養したFLSの培養上清におけるケモカイン濃度をELISAで測定した。培養上清中のCXCL8濃度はレジスチン刺激により有意に上昇を認めた。さらに培養上清中のCCL2濃度もレジスチン濃度依存的に有意に上昇した。RNAシーケンスで遺伝子発現の上昇が確認されたIL-1 β 、IL-32についても同様にELISAで解析を行ったが、共に測定感度以下の結果であった。RAとの関連が報告されているIL-6はレジスチン刺激により濃度上昇が確認された。このようなFLSに対するレジスチンの作用におけるCAP1の関与を解析するため、CAP1 siRNAによりFLSにおけるCAP1発現を抑制し、レジスチンで刺激したところ、培養上清中のCXCL8濃度は、control siRNAを導入したFLSと比較して有意に低下した。

RNAシーケンスの結果、FLSに対するレジスチン刺激により上記7個のケモカインの発現増加を認めた。その中でC-X-CケモカインであるCXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL8は、N末端にGlu-Leu-ArgのELRモチーフを有している。そしてこれらのELR+ C-X-Cケモカインは血管新生を誘導することが報告されている。そのため、レジスチンはELR+ C-X-Cケモカイン産生亢進させることにより、RA滑膜組織における血管新生を引き起こすと考えられる。また、CXCL8は好中球や樹状細胞の遊走作用を有するが、さらに抗CCP抗体陽性RA患者のCD14陽性単球から破骨細胞への分化を誘導することが報告されている。そのためCXCL8はRA滑膜組織において、血管新生、炎症細胞浸潤、破骨細胞分化などの働きを担っていると考えられている。またレジスチンによりFLSから産生亢進するCCL2はRA滑膜組織や関節液中で強い発現を認め、単球/マクロファージの遊走やFLSからのIL-6、CXCL8産生を亢進させる。

本研究結果より、レジスチンはRA滑膜組織において、FLSからのケモカイン産生を亢進させることにより、炎症細胞浸潤、血管新生、破骨細胞分化を誘導し、RA病態形成に関与すると考えられる。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 597 号	氏 名	佐 藤 洋 志
学位審査担当者	主 査	亀 田 秀 人
	副 査	三 上 哲 夫
	副 査	弘 世 貴 久
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	池 上 博 泰

学位審査論文の審査結果の要旨 :

アディポカインは脂肪組織から産生される生理活性物質であり、その一つであるレジスチンの血中濃度が関節リウマチ (RA) を含めた膠原病患者において上昇していることが報告されている。本研究は RA の病態形成におけるレジスチンの関与を明らかにすることを目的とした。

RA 患者の滑膜組織において変形性関節症 (OA) 患者の滑膜組織より強いレジスチンとその受容体 adenylylate cyclase-associated protein 1 (CAP1) の発現を認めた。マクロファージがレジスチンを発現しており、CAP1 はさらに線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS)、血管内皮細胞にも発現を認めた。CAP1 の発現は培養 FLS でも mRNA と蛋白レベルで確認した。次に、レジスチン 1000 ng/ml で刺激した FLS と未刺激の FLS から total RNA を抽出し、RNA シークエンスにより遺伝子発現を網羅的に解析し、未刺激の FLS と比較して 2 倍以上に遺伝子発現が増加した遺伝子は 18 個抽出され、そこには 7 種類のケモカイン (CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL8、CCL2) が含まれていた。ELISA で測定したところ、培養上清中の CXCL8、CCL2、およびインターロイキン (IL) -6 の濃度がレジスチン刺激で有意に増加した。CAP1 siRNA によりレジスチン刺激による CXCL8 濃度上昇は低下した。これらの結果より、レジスチンは RA 滑膜組織において、FLS からのケモカイン産生を亢進させることにより RA の病態形成に関与すると考えられた。

平成 30 年 1 月 26 日に行われた学位審査会では、ホルモンという用語の定義やそれに関連して RA 患者の血中および関節局所の濃度、アディポネクチンとの作用比較、組織や細胞におけるレジスチン発現の OA との比較や疾患特異性、CAP1 の受容体としての特性とレジスチン作用の用量反応性などについて質問がなされ、申請者は丁寧かつ真摯に回答した。本研究は RA の病態形成におけるレジスチンの関与を検討した有意義なもので、学位授与に十分相当すると審査委員全員の合意が得られた。