

学位論文題名

慢性関節リウマチにおける
ヒト内在性レトロウイルスの発現

学位論文内容の要旨

【はじめに】

慢性関節リウマチ(RA)は関節の滑膜組織の炎症と組織破壊を特徴とする全身性炎症性疾患である。その本態は自己の滑膜組織に対する免疫応答によると考えられているが、その引金となっている抗原については長年にわたり種々の細菌、ウイルスが候補に上げられ世界中で研究されてきたが今までに未だ確実なものは見つかっていない。

1980年代に入りhuman immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)やhuman T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)の感染者でRAと酷似する関節炎が発症することが報告され、RA患者の滑膜組織を免疫組織学的に検索すると、HTLV-I、HIV-1関連抗原が半数以上で陽性になると報告されている。しかし、一般にRA患者は、HIV-1、HTLV-Iの感染を受けていないことから、HIV-1、HTLV-Iと相溶性のある遺伝子を持ったレトロウイルスがRAの発症と深く関係しているのではないかと推察される。一方、イーストからヒトまで殆ど全ての生物のゲノム中に数千コピーもの内在化したレトロウイルスが含まれ生殖細胞を通じてプロウイルスの形で親から子へ安定した形で遺伝している。最近、動物では内在性レトロウイルスは免疫異常を引き起こしたり、自己免疫疾患の病因的関与を示唆する報告がみられるが、ヒトにおいては未だその生理的機能あるいは病原性は殆ど知られていない。本研究では長いopen reading frame(ORF)を持ち、蛋白まで翻訳される可能性を持つヒト内在性レトロウイルスERV3、 λ 4-1を用いてRAへの病因的関与を検討した。

【材料と方法】

RA患者の新鮮滑膜組織、培養滑膜細胞、RA患者と健常人の末梢血単核球(PBMC)、胎盤組織、ヒト尿管上皮の培養細胞(hKEC)を材料として用いた。常法に従ってDNAを抽出しヒト内在性レトロウイルスERV3env、 λ 4-1envをプローブとして用いてサザンブロット法を行い、制限酵素断片長多型(RFLP)解析した。材料からAGPC法により全RNAを抽出し一部はpoly(A)-RNAを選別し、常法に従ってノーザンブロット法、Reverse transcription(RT)-PCR法を行い、ERV3、 λ 4-1の発現を検索した。また培養滑膜細胞ではサイトカインのinterleukin- 1β (IL- 1β)、interleukin-2(IL-2)、interleukin-6(IL-6)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interferon- γ (IFN- γ)を細胞培養液に添加し、内在性レトロウイルスの増強や抑制を試み、hKECのそれと比較し内在性IL-6の発現も併せて検索した。

【結 果】

1) RFLP解析

PBMCからDNAを抽出し、制限酵素Msp Iで消化しRFLP解析を行うと、ERV3をプローブとすると2.8kb、3.4kbの2種類のRFLPを有するバンドが見られた。その頻度は60名のRA患者と55名の健常人とで比較すると有意差は認められなかった($\chi^2=4.379$ 、 $p>0.10$ 、 $df=2$)。同様に $\lambda 4-1$ を調べると、数十種の断片の一部にRFLPが見られたが、その頻度は76名のRA患者と42名の健常人とで比較すると有意差は認められなかった($\chi^2=3.440$ 、 $p>0.20$ 、 $df=2$)。

2) 胎盤における内在性レトロウイルスの発現

10個の胎盤でERV3、 $\lambda 4-1$ の発現を調べた。ERV3では3.5kb、7.3kb、9.0kb 3種のmRNA、 $\lambda 4-1$ では3.0kb、3.6kb 2種のmRNAの発現が確認された。発現量には個人差が認められ、発現の見られない検体も存在した。パイオイメージングアナライザーを用いて定量的に解析すると、ERV3と $\lambda 4-1$ の発現は比例していることが明らかになった($r=0.926$)。

3) 滑膜組織、PBMCにおける内在性レトロウイルスの発現

ノーザンブロット法、RT-PCR法を用いてERV3、 $\lambda 4-1env$ の発現を調べた。新鮮滑膜組織、培養滑膜細胞、PBMCいずれでもERV3では3.5kb、9.0kb 2種のmRNA、 $\lambda 4-1$ では胎盤と異なるサイズの4.2kb 1種のmRNAがみられたが、RT-PCR法で検索しても全く転写の見られないものも認められた。滑膜組織やPBMCにおいてERV3、 $\lambda 4-1$ の発現量には個人差が存在したが、RAの活動性や治療薬に相関は見られず、逆に健常人のPBMCでもERV3、 $\lambda 4-1$ の発現が見られた。また、ERV3と $\lambda 4-1$ の発現の強さは胎盤と同様に滑膜組織においても比例する傾向がみられた。

一方、IL-6の発現はRA患者のPBMCで有意に増加していた($\chi^2=7.304$ 、 $p<0.01$)が、ERV3の発現とは相関していなかった。

4) サイトカインによるERV3の発現への影響

サイトカインによる培養滑膜細胞でのERV3の発現誘導を試みた。500U/mlの濃度でIL-2、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 添加培養液に4時間 滑膜細胞を培養後RNAを抽出し、ERV3とIL-6の発現について検討した。IL-6の発現はIL-1 β 、TNF- α で増加し、IL-2、IL-6、IFN- γ で抑制されたが、ERV3の発現量にはサイトカイン添加による変化が認められなかった。一方、hKECにおいて同様な実験を行うと、IL-2、IL-6、IFN- γ 添加では変化は認められなかったが、IL-1 β 添加によりIL-6の発現と平行してERV3の発現が増強していた。

【考 察】

ERV3のRFLP解析において白人種を対象とした成績では、RA患者では健常人と比較して3.4kb断片の有意な増加2.8kbをホモにもつ患者の減少が報告されているが、日本人を対象とした我々の検索において同様な傾向を示したもののその頻度には両者間に有意な差は存在しなかった。単なる偶然による可能性あるいは検索した人種、病変の程度の違いによる可能性があるが明かではない。

新鮮滑膜組織、培養滑膜細胞、PBMCにおいてヒト内在性レトロウイルスの発現について検索すると、ERV3では3.5kb、9.0kb 2種のmRNAが見られたが、胎盤に特異的なmRNAと報告されて

いる7.3kb mRNAは見られず胎盤での何等かの生理的役割を担っている可能性が考えられた。λ4-1では滑膜細胞やPBMCにおいて4.2kb 1種のmRNAが見られ、胎盤とは異なるサイズであった。読み取り枠の差異、またはマルチコピー型なので別のコピーの発現の可能性が考えられ、胎盤とは異なる蛋白の生成、生物学的機能が示唆された。

SLE患者で報告されているように、RA患者のPBMCにおいても健常人と比較し有意にIL-6の発現が増強していた。IL-6は血清中のIgG産生亢進やpolyclonal B cell activationなどを起すことから、RAの病態は関節局所だけでなく全身性の系統的免疫異常の疾患であることを裏付けるものと推察された。

ERV3とλ4-1の発現は比例していたことから、複数の内在性レトロウイルスの発現を調節する共通の因子が存在する可能性が示唆され、それがRA関節液中で亢進しているサイトカインではないかと考え検索した。しかし、滑膜細胞ではERV3の発現は検索したサイトカインでは影響を受けなかった。一方、hKECではIL-1βによりIL-6の発現と平行してERV3の発現が増強したことから、ある種の細胞ではヒト内在性レトロウイルスの発現がサイトカインによって調節、活性化されることが示された。このことは正常では発現の見られない内在性レトロウイルスがサイトカインによって誘導活性化されることがあり、それらが作る蛋白が抗原となったり、または他の細胞性遺伝子を活性化して何等かの疾患の病態に関与することも十分考えられた。

今回、ヒト内在性レトロウイルスERV3、λ4-1がRAの発症に直接関与する証拠は得られなかったが、ヒトゲノムの中に多数存在する内在性レトロウイルスがRAの発症に何等かの役割を果たしている可能性は依然として残されていると考えられた。今後、HTLV-I、HIV-1などと相同性の高い内在性レトロウイルスを発見し検索することが発症機序の解明に有効であると同時にRAの治療に寄与するものと考えられた。

【結 語】

- 1、RA患者と健常人の間ではヒト内在性レトロウイルスERV3、λ4-1のRFLPに有意な差は存在しなかった。
- 2、胎盤においてERV3、λ4-1の発現が確認された。その発現の強さには個人差がみられERV3とλ4-1の発現の程度は相関していた($r=0.923$)。
- 3、RA患者の滑膜組織や末梢血単核球(PBMC)でERV3、λ4-1の発現が確認された。その発現には個人差が認められ病勢の活動性や治療に無関係であった。
- 4、RA患者のPBMCでは健常人と比較して有意にIL-6の発現が認められた。
- 5、λ4-1では胎盤と異なる4.2kbのmRNA分子が滑膜細胞やPBMCで認められ、異なる蛋白が生成されている可能性が示唆された。
- 6、培養滑膜細胞ではサイトカインによって、ERV3の発現の増強や抑制は見られなかった。
- 7、一方、ヒト尿細管上皮の培養細胞(hKEC)においては、IL-1βによりERV3の発現の増強が認められ、それはIL-6の発現量と相関していたことから、細胞によってはサイトカインにより内在性レトロウイルスが誘導され何等かの病因に関与する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 西 信 三

学 位 論 文 題 名

慢性関節リウマチにおける

ヒト内在性レトロウイルスの発現

慢性関節リウマチ(RA)は関節の滑膜組織の炎症と組織破壊を特徴とする全身性炎症性疾患であり、成人における最も頻度の高い自己免疫疾患である。その本態は自己の滑膜組織に対する免疫応答によると考えられているが、その引金となっている抗原については長年にわたり種々の細菌、ウイルスが候補に上げられ世界中で研究されてきたが今までに未だ確実なものは見つかっていない。

一方、殆ど全ての生物のゲノム中に数千コピーもの内在化したレトロウイルスが含まれ生殖細胞を通じてプロウイルスの形で親から子へ安定した形で遺伝している。最近、動物では内在性レトロウイルスは免疫異常を引き起こしたり、自己免疫疾患の病因的関与を示唆する報告がみられるが、ヒトにおいては長年の研究にもかかわらず未だその生理的機能あるいは病原性はほとんど知られていない。本稿では長い open reading frame(ORF)を持ち、蛋白まで翻訳される可能性があるヒト内在性レトロウイルスERV3、 λ 4-1を用いてrheumatoid arthritis(RA)への病因的関与を検討した。新鮮滑膜組織、培養滑膜細胞、末梢血単核球(PBMC)でのERV3、 λ 4-1の発現を検索した。培養滑膜細胞、ヒト尿細管上皮の培養細胞(hKEC)を用いて、サイトカインによるERV3の発現増強についてIL-6の発現と併せて検索した。

ERV3については60名のRA患者と55名の健常人の間で、 λ 4-1については76名のRA患者と42名の健常人の間でRFLP解析を行うと、一部にRFLPが存在したが、そのRFLPに有意な差は存在しなかった。ノーザンブロット法を用いて、胎盤においてはERV3、 λ 4-1の発現が確認された。その発現の強さは個人差がみられERV3と λ 4-1の発現の程度は相関していた($r=0.926$)。また、RA患者の滑膜組織や末梢血単核球(PBMC)でERV3、 λ 4-1の転写を確認した。その発現には個人差が認められ病勢の活動性や治療薬に無関係であり、健常人のPBMCでもその発現が確認された。 λ 4-1では胎盤と異なる4.2kbサイズの

mRNAが滑膜細胞やPBMCで認められ、胎盤とは異なる蛋白が生成されている可能性が示唆された。次に内在性レトロウイルスの発現調節機構におけるサイトカインの影響を調べるために、滑膜細胞の培養液に5種のサイトカインIL-2、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ を500U/mlの濃度で添加した結果、ERV3の発現は変化しなかった。しかし同様な実験をヒト尿細管上皮の培養細胞(hKEC)を用いて調べると、IL-1 β によってERV3の発現は増強され、それはIL-6の発現と比例していた。このことは、細胞によっては サイトカイン添加により内在性レトロウイルスが誘導される場合があり、何等かの病因に関与する可能性が示唆された。

今回、ヒト内在性レトロウイルスERV3、 λ 4-1がRAの発症に直接関与する証拠は得られなかったが、ヒトゲノムの中に多数存在する内在性レトロウイルスがRAの発症に何等かの役割を果たしている可能性は依然として残されていると考えられた。

口頭発表において副査の葛巻教授より1) RA患者からのPBMCは継代培養したものかどうか2) サイトカインの内在性レトロウイルス発現への影響について、培養滑膜細胞、hKEC以外でも調べているかどうか3) 胎盤と滑膜細胞での λ 4-1mRNAのサイズが異なる機構についてはどう考えるか、副査の西教授より1) 蛋白まで翻訳されている可能性はどうか、生田教授より1) HIV-1との関連について、小林教授より1) HTLV-Iとの関連、などについて質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をなした。葛巻、西両教授には個別に審査を頂き、合格と判定された。内在性レトロウイルスの発現という新たな観点から、RAの発症機序を研究したことは意義が大きく、学位授与に値するものと考えられる。