

学位論文題名

関節リウマチにおける内在性制御因子としての

 $\alpha 9$ インテグリンの役割

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

関節リウマチ (RA) において好中球や T 細胞の役割は解明が進んでいるが、常在滑膜細胞の重要性も指摘されている。滑膜細胞は種々の細胞外マトリックスを産生するが、中でもオステオポンチン (OPN) やテネイシン C (TN-C) の発現上昇や炎症との関与が報告されている。OPN と TN-C の共通の受容体として $\alpha 9$ インテグリンがある。我々はマウスコラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) が $\alpha 9$ インテグリンの中和抗体で抑制されることを証明した。しかしヒト RA における $\alpha 9$ インテグリンの発現は部分的な報告があるのみで、その機能は不明である。本研究の目的は、ヒト RA 滑膜組織および細胞における $\alpha 9$ インテグリンの発現と、その関節破壊における機能を解析することである。

【対象と方法】

滑膜切除術または関節置換術を受ける予定の RA および変形性関節症 (OA) 患者にインフォームドコンセントを行い、同意が得られた 31 名の RA 患者、25 名の OA 患者から手術中に切除された滑膜組織を採取し解析に用いた。本研究は北海道大学大学院医学研究科・医学部の医の倫理委員会に承認されている。

免疫組織化学で滑膜組織中の $\alpha 9$ インテグリン、OPN、TN-C の発現を解析した。 $\alpha 9$ インテグリン染色はポリクローナル抗体を作成した。 $\alpha 9$ インテグリンの細胞内アミノ酸配列を合成したペプチドを C57BL/6 マウスに 4 回免疫して得られた血清を不活化して染色に用いた。滑膜組織中の遺伝子発現は、組織を凍結破碎し RNA を抽出した後、real-time PCR 法にて定量解析した。

滑膜組織からコラゲナーゼで滑膜細胞を単離し、細胞レベルの解析および培養を行った。フローサイトメトリーにて滑膜線維芽細胞、マクロファージの分画を特定し、それぞれの細胞群における $\alpha 9$ インテグリンの発現を解析した。発現強度は解析ソフト (Flowjo) で計算した平均蛍光強度を比較した。また、CD14 抗体・磁気ビーズを用いた分離システム (MACS) で滑膜線維芽細胞とマクロファージを分離し、TN-C および OPN の発現を上清中のタンパクレベル (ELISA)、遺伝子レベル (real-time PCR) で解析した。

$\alpha 9$ 特異的に反応するよう OPN および TN-C 分子内の RGD 配列を RAA 配列に置換した変異タンパク (OPN/RAA および TN-C/RAA) を作成し、これを用いて滑膜線維芽細胞の細胞接着試験、細胞増殖試験を行った。抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体による阻害の影響も検討した。細胞接着試験は接着細胞をクリスタルバイオレットで染色し、光学顕微鏡像および吸光度にて細胞接着を評価した。細胞増殖試験は Cell Counting Kit-8 による、吸光度にて細胞数を評価した。

滑膜線維芽細胞および滑膜マクロファージに対し、TN-C/RAA 刺激によるサイトカイン産生試験を行った。各試験の際には抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体またはコントロール抗体を加え、

$\alpha 9$ インテグリン阻害による影響も検討した。遺伝子レベルの発現は real-time PCR 法、上清中のタンパクレベルの発現を ELISA により解析した。

統計学的解析は統計ソフト GraphPad Prism を使用し、2 群間比較は unpaired 2-tailed Student's *t* test、多群間比較は 1-way ANOVA により有意差検定を行った。P<0.05 を統計学的有意とした。

【結果】

免疫組織染色及び real-time PCR で、滑膜組織に $\alpha 9$ インテグリン、OPN、TNC の発現を認めた。RA 滑膜組織ではこれらの発現が遺伝子レベル、タンパクレベルともに OA 滑膜組織よりも亢進していた。

フローサイトメトリー解析では滑膜線維芽細胞、滑膜マクロファージの両群に $\alpha 9$ インテグリンの発現を認めた。RA では滑膜線維芽細胞および滑膜マクロファージともに $\alpha 9$ インテグリンの発現が OA の滑膜細胞に対して亢進していた。

MACS によって滑膜細胞は、CD14 陽性の滑膜マクロファージと CD14 陰性の滑膜線維芽細胞に分離された。CD14 陽性および陰性細胞の培養にて、TN-C は主に CD14 陰性細胞（滑膜線維芽細胞）から、OPN は主に CD14 陽性細胞（滑膜マクロファージ）から産生されていた。

細胞接着試験、細胞増殖試験では、OPN/RAA または TN-C/RAA の濃度依存性に滑膜線維芽細胞の接着性および増殖性が亢進した。また、これら接着性および増殖性の亢進は、滑膜線維芽細胞を抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体で処理することによって、有意に低下した。

TN-C/RAA を用いた滑膜線維芽細胞の刺激試験では、MMP-1,-3,-13,IL-6 の産生が遺伝子レベル、タンパクレベルとも刺激によりコントロール (BSA) 群に比し有意に亢進した。抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体による阻害で、TN-C/RAA 刺激による MMP-1,3,13,IL-6 の産生亢進が有意に抑制された。また、抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体による阻害で BSA 群においても MMP-1,3,IL-6 の産生が抑制された。刺激試験の条件下で、滑膜線維芽細胞からは TN-C および OPN が産生されており、TN-C の産生は炎症性サイトカイン (TNF- α または IL-18) 添加時に、サイトカインの濃度依存性に亢進した。

TN-C/RAA を用いた滑膜マクロファージの刺激試験では、TNF- α および IL-18 の産生がコントロール群に比し亢進した。抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体による阻害で、TN-C/RAA 刺激による TNF- α および IL-18 の産生亢進は有意に抑制された。

【考察】

ヒト RA 及び OA 滑膜組織の解析から、我々は $\alpha 9$ インテグリンとそのリガンドである OPN、TN-C が RA 患者の関節微小環境の重要な要素であることを発見した。これら分子の RA における発現レベルは OA と比べ有意に増加していた。 $\alpha 9$ インテグリンを介したシグナルは滑膜線維芽細胞に細胞増殖を促し、これは RA の病理学的特徴である滑膜の過形成の一部を説明することが出来る。滑膜線維芽細胞は $\alpha 9$ インテグリンを介した刺激で、MMP-1, 3, 13 のような蛋白分解酵素や、炎症性サイトカイン IL-6 を分泌する。これらは軟骨の主成分であるコラーゲンやプロテオグリカンの分解を促進し、関節破壊に寄与することが明らかになっている。また、滑膜マクロファージは $\alpha 9$ インテグリンを介した刺激で、炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-18 を分泌する。TNF- α および IL-18 の RA の病態における重要性は、これらサイトカインがヒト RA の治療における分子標的となっていることから明らかである。

滑膜線維芽細胞は TN-C を産生しており、これは炎症性サイトカインの存在下で更に亢進した。これらの結果は、滑膜線維芽細胞や滑膜マクロファージが自ら産生した TN-C 及び OPN は、滑膜線維芽細胞やマクロファージ自身が発現する $\alpha 9$ インテグリンに作用するという自己分泌・傍分泌反応の存在を示唆するものである。

【結論】

ヒト RA 滑膜組織、滑膜細胞（滑膜線維芽細胞および滑膜マクロファージ）では $\alpha 9$ イン

テグリンの発現が亢進していた。 $\alpha 9$ インテグリンを介した刺激により、滑膜線維芽細胞の増殖性や MMP-1, 3, 13 や炎症性サイトカインの産生亢進が認められた。これら細胞増殖性や炎症性メディエーターの産生亢進は抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体により抑制された。

$\alpha 9 \beta 1$ インテグリンはヒト RA における治療標的になり得ることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	小池隆夫
副査	教授	上出利光
副査	教授	今村雅寛
副査	教授	瀬谷司
副査	教授	三浪明男

学位論文題名

関節リウマチにおける内在性制御因子としての $\alpha 9$ インテグリンの役割

申請者は、ヒト関節リウマチ (RA) および変形性関節症患者 (OA) から手術時に得られた滑膜組織及びそこから単離された滑膜細胞を用い、炎症性滑膜における $\alpha 9$ インテグリンの発現および滑膜細胞における $\alpha 9$ インテグリンの役割について詳細に解析し、その研究結果を報告した。

RA 患者由来の滑膜組織は OA 患者由来の滑膜組織と比べ、 $\alpha 9$ インテグリンとそのリガンドであるオステオポンチン (OPN) やテネイシン C (TN-C) の発現が亢進していた。滑膜を構成する細胞群における発現解析では、滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージにおいて $\alpha 9$ インテグリンの発現が認められ、RA 由来の滑膜細胞では OA 由来の滑膜細胞に比べその発現は亢進していた。また、 $\alpha 9$ インテグリンのリガンドの産生源を解析したところ、OPN は主に滑膜マクロファージから、TN-C は主に滑膜線維芽細胞から産生されていることが明らかになった。次に、滑膜線維芽細胞およびマクロファージにおける $\alpha 9$ インテグリンの機能解析を行った。細胞接着試験では、滑膜線維芽細胞は $\alpha 9$ インテグリンのリガンドである TN-C および OPN と濃度依存的な接着を示し、この接着性は抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体による処理で、有意に低下した。細胞増殖試験では、滑膜線維芽細胞は TN-C の濃度依存的に増殖性を示し、これは抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体により抑制された。サイトカイン産生試験では、滑膜線維芽細胞では TN-C 刺激により、MMP-1、-3、-13 および IL-6 の産生が亢進した。この産生亢進は抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体により有意に抑制された。この抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体による MMP 群および IL-6 の産生抑制は、TN-C 刺激群のみならず対照群でも認められた。この現象は滑膜線維芽細胞自身が内在性に産生する $\alpha 9$ インテグリンのリガンドが関与すると考え、滑膜線維芽細胞からの TN-C および OPN の産生を解析した。滑膜線維芽細胞は TN-C および OPN を産生しており、TN-C の産生は TNF- α および IL-1 β の存在で促進さ

れた。一方、滑膜マクロファージに対するサイトカイン産生試験では、TN-C 刺激により TNF- α および IL-1 β の産生が亢進し、この産生亢進は抗 α 9 インテグリン抗体による阻害で有意に抑制された。

主査の小池教授からは、1) 抗線維芽細胞抗体の特徴・抗原について、2) CD14/Mac-1 による展開について、3) α 9 インテグリンが局所で発現が亢進しているか、4) OPN と TN-C は相加的又は相乗的に作用するか、5) α 9 インテグリンは IL-6 の pathway に関与するか、副査の三浪教授からは、6) α 9 インテグリンの阻害が局所のみ病態のブロックになるのか、7) IL-6 を直接阻害する場合との治療効果の違い、8) ヒトとマウスの α 9 インテグリンおよびリガンドの役割の違いについて、9) 抗 α 9 インテグリン抗体による治療に際し考えられる利点・欠点について、副査の今村教授からは10) サイトカイン産生に対する α 9 インテグリン阻害が部分的である点在实际の治療効果に影響するか、11) 抗 α 9 インテグリンを全身投与した場合の副作用の可能性、12) TNF- α の産生源（マクロファージと線維芽細胞）について、副査の瀬谷教授からは13) 他のサイトカイン阻害と比較した際の α 9 インテグリン阻害のメリットについて、14) 自己分泌に強く影響を与えている内因性のリガンドの特定について、15) 抗 α 9 インテグリン抗体による接着阻害が完全ではないことの考察について、副査の上出教授からは16) 抗 α 9 インテグリン抗体の実際の治療に応用した場合の考えられる位置づけ、17) 局所での α 9 インテグリンが発現増加しているメカニズムについて質問を受けた。申請者はいずれの質問に対しても、自己の実験データや過去の報告を引用しながら概ね適切な回答をなし得た。

この論文は、これまでヒト特に RA おける関連が殆ど分かっていなかった α 9 インテグリンという分子について、発現および滑膜線維芽細胞とマクロファージにおける機能を明らかにした。ヒト RA 滑膜において発現が亢進している α 9 インテグリンとそのリガンドは、リガンドを産生した滑膜細胞自身に α 9 インテグリンを介して作用し、炎症維持・関節破壊を促進するという自己分泌・傍分泌サイクルが存在することが明らかになり、 α 9 インテグリンがヒト RA 治療における分子標的の一つになり得る事が示唆された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。