

## 学 位 論 文 題 名

Ganglioside GM3 has an essential role in the pathogenesis  
and progression of rheumatoid arthritis

(ガングリオシドGM3は関節リウマチの発症、進行において重要な役割を担う)

## 学位論文内容の要旨

## 【背景と目的】

関節リウマチ (以下 RA) は慢性の全身性炎症疾患であり、多くの関節における滑膜組織の慢性炎症により関節破壊を導く疾患である。アメリカ合衆国での有病率は 200 万人を超える。現在までさまざまなサイトカイン (IL-6,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 etc.) と本疾患との関連が報告されているが、近年では IL-17 が発症、進行に関して大きな役割を担っていると考えられている。IL-17 は CD4<sup>+</sup>T 細胞のサブセットである Th17 細胞より産生され、動物関節炎モデルの実験においては関節炎増悪に関与していると考えられている。しかし、明確な機序は未だ明らかにはなっていない。

ガングリオシド GM3 (以下 GM3) はセラミドに付随し、シアル酸を 1 つまたはそれ以上に持つオリゴサッカライドからなるスフィンゴ糖脂質 (以下 GSLs) に分類される糖脂質である。GM3 は組織において最も広く分布するガングリオシドであり、細胞浸潤、細胞増殖、血管新生などその役割は多岐にわたり、全ては明らかにされていない。T 細胞に関する役割としては、T 細胞における増殖やサイトカイン産生といった免疫機能を抑制すると言われている。その反面、*in vitro* の実験において、より高いレベルの GM3 が存在すると T 細胞への刺激に対する反応性は促進されるといった報告もあり一定の見解は得られていない。現段階で、生体内における GM3 の免疫応答における役割は明らかになっていない。しかし、過去の報告から T 細胞における免疫を制御していると考えられるため、T 細胞が大きく関与する RA においても GM3 が RA の病勢に関して関与していると我々は考えた。

本研究の目的はヒト滑膜において、GM3 が RA の発症、病勢の進行に関与していることを明らかにし、マウス関節炎モデル (collagen-induced arthritis model、以下 CIA モデル) を用いて、RA の発症時期、病勢の進行にどのように関与しているか、また、T 細胞の機能の制御にどのように関与しているかを GM3 合成酵素 (以下 GM3S) ノックアウトマウス (以下 GM3S<sup>-/-</sup>) 明らかにすることである。

## 【対象と方法】

はじめに、ヒト滑膜における、GSLs、GM3 量を Mass Spectrometry にて解析し、更に、滑膜組織、末梢血単核球 (以下 PBMCs) における GM3 mRNA 発現レベルを real time RT-PCR にて比較した。RA サンプルに対し対照群には変形性関節症 (以下 OA) サンプルを使用した。

次に、マウスを用いた関節炎モデルによる実験を行った。GM3 の欠落による挙動を調べるため、我々は GM3S<sup>-/-</sup>を作成した。マウス関節炎モデルには CIA モデルを用いた。本モデルは、RA を模倣したモデルであり、特に T 細胞依存的な RA 関節炎モデルである。マウスは 10-15 週齢の C57BL/6 を使用した。chicken collagen type II (以下 CII) 2mg/ml と Complete Freund's Adjuvant 5mg/ml を混ぜ合わせ、emulsion を作成し、100 $\mu$ l (100 $\mu$ g chick CII) を臀部に 2 か所皮内注射にて投与した。21 日後に再度同量を投与し、関節炎モデルを作成

した。まずは野生型マウス（以下 WT）に CIA モデルを作成し、滑膜、脾臓における GM3SmRNA 発現量を real time RT-PCR にて正常の WT と比較した。次に WT と GM3S<sup>-/-</sup>とで、CIA モデルにおける、関節炎発症率、発症時期、関節炎評価（スコアにより定量化）、組織学的評価（スコアにより定量化）、血清中 IL-6 レベル、血清抗 II 型コラーゲン抗体を比較した。

RA 発生におけるメカニズム解明のため、WT、GM3S<sup>-/-</sup>において CII 投与 1 週間後のマウスより、鼠径リンパ節を採取後、細胞を単離し、フローサイトメトリーにより Th17 細胞の組成比を調べた。また、T 細胞における刺激に対する反応性を調べるため、anti-CD3 抗体を腹腔内投与したマウスの 1.5 時間後の血清中のサイトカイン（IL-17、IL-4、IFN $\gamma$ 、IL-6、TNF $\alpha$ ）を比較した。

### 【結果】

ヒト滑膜における、GM3 発現量は RA において有意に低下した。しかし、滑膜、PBMCs における GM3SmRNA 発現量は RA にて高かった。WT における滑膜、脾臓の mRNA の比較においては、CIA モデルで有意に高かった。また、関節炎における発症率、発症時期、関節炎評価（スコアにより定量化）、組織学的評価（スコアにより定量化）、血清中 IL-6 レベル、血清抗 II 型コラーゲン抗体全てにおいて、GM3S<sup>-/-</sup>にて有意に増悪する結果となった。CII 刺激後の Th17 細胞も GM3S<sup>-/-</sup>にて有意に増加し、T 細胞刺激によるサイトカイン産生においても GM3S<sup>-/-</sup>にて有意に上昇する結果となった。

### 【考察】

本研究により我々はヒト滑膜において、RA 発症には GM3 の低下が関係していることを明らかにした。しかし、GM3SmRNA 発現量が上昇しており、これらは反対の方向に動いている。この結果から、GM3 が低下することで RA の発症、病勢の進行が誘発されるが、その代償機構として GM3SmRNA の発現量が上昇しているものと考えられる。そこで GM3S が欠落した場合を想定して、GM3S<sup>-/-</sup>を用いて、CIA モデルの比較を行ったところ、GM3S<sup>-/-</sup>において、病勢は悪化した。これらは GM3 の低下において RA の病状が悪化するというヒトでの結果を裏付ける結果となった。そのメカニズムとしては近年では Th17 は様々なサイトカインを放出し、特に IL-17 は炎症性疾患、自己免疫性疾患に大きく関与しているという報告が多数存在する。また、IL-17 は IL-6、TNF $\alpha$  の産生を促し、それにより、滑膜線維芽細胞、マクロファージを活性化する。また、Th17 の増殖は IL-6 に依存している。WT と GM3S<sup>-/-</sup>との CII 刺激後の Th17 細胞は GM3S<sup>-/-</sup>でより増殖していた。また、anti-CD3 抗体による T 細胞刺激後の血清においては IL-17、IL-4、IFN $\gamma$ 、IL-6、TNF $\alpha$  全ての上昇が認められた。このことから、GM3 の欠落により、T 細胞刺激に対する反応性は上昇し、それにより、Th17 細胞の増殖、IL-17 サイトカインの産生も促進されたと考えられる。その結果、IL-17 の産生上昇を認め、IL-6、TNF $\alpha$  の上昇にも関与することが考えられる。

以上から、GM3 は Th17 細胞への刺激による増殖、サイトカイン産生を制御していると考えられ、この働きにより、RA の発症、病勢進行を抑制していることが示唆された。

【結論】我々は RA において、GM3 が発症、病勢の進行に関与していることを確認し、GM3 が欠落すると、その発症や病勢の進行が促進されることを明らかにした。そのメカニズムとしては、GM3 が CD4<sup>+</sup>T 細胞のサブセットである Th17 細胞の増殖、Th17 細胞から産生されるサイトカインである、IL-17 を制御することが明らかになった。今後 GM3 は今後、GM3 が RA の発症及び治療における一つの重要因子になると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	上出利光
副査	教授	笠原正典
副査	教授	三輪聡一
副査	教授	三浪明男

## 学位論文題名

### Ganglioside GM3 has an essential role in the pathogenesis and progression of rheumatoid arthritis

(ガングリオシドGM3は関節リウマチの発症、進行において重要な役割を担う)

本研究の目的はガングリオシド GM3 (GM3) が関節リウマチ (RA) の発症、進行にどのように関与しているかをヒトサンプル、GM3 合成酵素 (GM3S) ノックアウト (GM3S<sup>-/-</sup>) マウスを用いて検討することである。ヒト滑膜における GM3 含有量は対照群である変形性関節症群と比較すると RA 群において有意に減少した。しかし、GM3S mRNA 発現量は RA 群にて高かった。マウス collagen-induced arthritis (CIA) モデルと naïve マウスにおける滑膜組織、脾臓の mRNA の比較においては、CIA モデルで有意に高かった。また、関節炎における発症率、発症時期、関節炎評価、組織学的評価、血清 IL-6 濃度、血清抗 II 型コラーゲン抗体濃度において、GM3S<sup>-/-</sup>マウスの方が対照群である野生型マウスと比較し、有意に増悪した。collagen type II (CII) 刺激後の Th17 細胞も GM3S<sup>-/-</sup>マウスにて有意に増加し、T 細胞刺激によるサイトカイン産生においても GM3S<sup>-/-</sup>マウスにて有意に上昇した。また、GM3S<sup>-/-</sup>マウスと T 細胞特異的 GM3 欠損マウスにて T 細胞への刺激に対する反応性を比較したところ、両群に差はなかったが、CIA モデルでの関節炎発症においては、GM3S<sup>-/-</sup>においてその発症率、関節炎重症度は高かった。

これらの結果から、RA 発症には GM3 の減少が関与していることが示唆された。また、GM3S<sup>-/-</sup>マウスにて、CIA モデルにおける関節炎の増悪が認められたことから、GM3 は関節炎発症を抑制する因子として働いている可能性が示唆された。更には、GM3S<sup>-/-</sup>マウスにて CII 刺激後の Th17 細胞がより増加していたこと、抗 CD3 抗体による T 細胞刺激後の血清においては IL-17、IL-6、TNF  $\alpha$  の上昇が認められたことから、GM3 の欠落により、Th17 細胞の増加、T 細胞刺激に対する反応性の

亢進が認められ、その結果として、IL-17 分泌が促進したと考えられた。したがって、IL-6、TNF  $\alpha$  の血清濃度も上昇し、これが一因で、CIA モデルにおける関節炎の増悪が認められた可能性があると考えられた。

審査にあたり、副査三輪教授から Mass spectrometry にて、GM3 単体の質量分析に関する質問があった。申請者は GM3 に関しては他の糖脂質と異なり、同一質量のものが存在しないため、GM3 のみを質量分析することが可能であったと回答した。また、ヒト RA 滑膜にて GM3 を検討しているが、その基となる情報、発表に関する質問があった。申請者は過去の報告で、GM3 が、T 細胞機能や自己免疫疾患病態に影響するとの報告がなされていると説明した。実際にヒト RA 滑膜を用いて、GM3 の質量分析を行ったところ、GM3 の減少が認められたため、それをきっかけにこの研究を進めたと回答した。更に、糖脂質分解過程にはどのように行われるかという質問があったが、申請者は酵素によって、分解される経路があることを説明した。次に、副査笠原教授から GM3<sup>-/-</sup>マウスにおける他疾患での研究はどのようなものがあるかと質問があった。申請者は過去の報告を引用し、インスリン分泌能の亢進、難聴、精神遅滞などがあると回答した。次いで副査三浪教授から、GM3 が T 細胞に及ぼすメカニズムに関する質問があった。申請者は GM3 が及ぼすメカニズムについてはクリアになっておらず、今後の研究課題であると回答した。更に主査上出教授から、CIA モデルにおいて、2 回目の免疫後 4 日目で血清 IL-6 レベルが上昇したとあるが、経時的にみて、初回免疫後、他の時期の血清 IL-6 レベルはどうであったかと質問があった。これに対し、申請者は 2 回目の免疫以前には血清 IL-6 の上昇は認められず、2 回目の免疫後 14 日目の血清レベルも野生型マウスと比較し、差は認められなかったと回答した。また、GM3 は細胞膜上でのシグナルトランスデューサーとしての役割があると申請者の発表の中にあったが、実際にどのシグナルを調節しているかを調べる必要があるのではないかと質問があったが、これに対し、申請者は今後の課題であり、検討する必要があると回答した。

この論文は GM3 の RA 発症への影響を、ヒトサンプル、GM3 ノックアウトマウスを用いて、組織学的手法、分子生物学的手法を駆使して明らかにし、GM3 が RA 治療における 1 つの重要因子になりうる可能性を見出した非常に有用な研究であり、今後の RA 治療戦略のターゲットになる可能性が期待される。

審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院過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）の学位を受ける資格を有すると判定した。