

氏 名	ひら みる てる こ 平 光 照 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3007 号
学位授与の日付	平 成 18 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Intercellular adhesion molecule-1 mediates the inhibitory effects of hyaluronan on interleukin-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase production in rheumatoid synovial fibroblasts via down-regulation of NF- $\kappa$ B and p38 (Intercellular adhesion molecule-1 は滑膜線維芽細胞におけるインターロイキン-1 $\beta$ で誘導されたマトリックスメタロプロテアーゼ産生に対するヒアルロン酸の抑制効果を NF- $\kappa$ B と p38の抑制により調節する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 三 森 経 世 教 授 戸 口 田 淳 也 教 授 坂 口 志 文

### 論 文 内 容 の 要 旨

関節リウマチ (RA) では、滑膜線維芽細胞 (RSF) がインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) のようなサイトカインで刺激され、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を産生し、関節破壊をもたらすことが知られている。これまでに、ヒアルロン酸 (HA) は主要な HA 受容体である CD44 を介して、RSF における IL-1 $\beta$  作用を抑制することがわかっている。しかしながら、CD44 は HA の効果を部分的にしか伝達しておらず、また HA が受容体に結合した後の細胞内の事象もまだ明らかにされていない。本研究では、HA の他の細胞表面受容体の一つである intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の役割と HA の作用における細胞内シグナル経路を調べる。

RA 患者の人工膝関節置換術施行時に採取した滑膜から酵素処理により RSF を単離し、単層培養した。コンフルエントに達した RSF を、IL-1 $\beta$  のみ、IL-1 $\beta$  と HA、または、抗 ICAM-1 抗体での前処置後に IL-1 $\beta$  と HA を添加して48時間培養した。MMP-1 と MMP-3 の分泌を免疫プロット法で調べ、MMP-1 と MMP-3 の産生を免疫蛍光法で調べた。また、HA と ICAM-1 の結合を免疫蛍光法で調べた。nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) と mitogen-activated protein kinases (MAPK) のリン酸化を免疫プロット法で調べた。

IL-1 $\beta$  2ng/ml で RSF を刺激すると著しく MMP-1 と MMP-3 の産生は亢進するが、HA は濃度依存性に IL-1 $\beta$  刺激で亢進した MMP の産生を抑制し、2mg/ml 以上で有意に抑制した。さらに、免疫プロット法と免疫蛍光法により、抗 ICAM-1 抗体での前処置は 50 $\mu$ g/ml で RSF における IL-1 $\beta$  作用に対する HA の効果を有意に抑制することが示された。また、免疫蛍光法で、HA は ICAM-1 を介して RSF に結合することが示された。NF- $\kappa$ B, p38, c-jun NH2-terminal kinase (JNK) それぞれに対する阻害剤で前処置後に RSF を IL-1 $\beta$  で刺激すると、MMP-1 と MMP-3 の産生は抑制された。また、IL-1 $\beta$  は NF- $\kappa$ B, p38, JNK を活性化するが、HA はそれらのリン酸化を抑制した。抗 ICAM-1 抗体での前処置は、JNK を除いて、NF- $\kappa$ B と p38 の活性化に対する HA の抑制効果を取り消した。

本研究は、HA は RSF において IL-1 $\beta$  で増強された MMP-1 と MMP-3 の合成を抑制し、この HA の抑制効果は NF- $\kappa$ B と p38 のリン酸化を抑制することで ICAM-1 を介して作用することを示した。関節内注射による外因性の高分子量の HA は、RA に罹患した関節において、このような機構で作用している可能性がある。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

関節リウマチ (RA) では、サイトカイン刺激でリウマチ滑膜線維芽細胞 (RSF) がマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を産生し、関節破壊をもたらす。ヒアルロン酸 (HA) は HA 受容体の CD44 を介して RSF におけるインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) の作用を抑制する。本研究では、HA の他の受容体である intercellular adhesion molecule-1 (ICAM

-1) の役割と HA の作用における細胞内シグナル経路を調べた。

HA は RSF の IL-1 $\beta$  による MMP-1, MMP-3 の産生亢進を有意に抑制し, 抗 ICAM-1 抗体の前処置はこの HA の抑制効果を有意に阻害した。HA は ICAM-1 を介して RSF に結合した。NF- $\kappa$ B, p38, c-jun NH2-terminal kinase (JNK) に対する各阻害剤は, IL-1 $\beta$  による RSF の MMP-1 と MMP-3 の産生を抑制した。IL-1 $\beta$  は NF- $\kappa$ B, p38, JNK を活性化するが, HA はそれらのリン酸化を抑制し, 抗 ICAM-1 抗体の前処置は NF- $\kappa$ B と p38 の活性化への HA の抑制効果を阻害した。

HA は RSF において ICAM-1 を介して NF- $\kappa$ B と p38 のリン酸化を抑制することで, IL-1 $\beta$  で亢進した MMP-1 と MMP-3 の合成を抑制すると考えられた。

以上の研究は, 外因性の HA の RSF における作用機序の解明に貢献し, HA の RA の治療への有用性に寄与するところが多い。

したがって, 本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 本学位授与申請者は, 平成18年3月13日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認められたものである。