

氏名	しみず まこと 清水 真
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	論医博第 1856 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Hyaluronan Inhibits Matrix Metalloproteinase-1 Production by Rheumatoid Synovial Fibroblasts Stimulated by Proinflammatory Cytokines に関する研究 (ヒアルロン酸は炎症性サイトカインにより刺激された関節リウマチ滑膜細胞のマトリックスメタロプロテイナーゼ 1 産生を抑制する)
論文調査委員	(主査) 教授 戸口田 淳也 教授 鈴木 茂彦 教授 中村 孝志

### 論文内容の要旨

#### 1. はじめに

変形性膝関節症に対して関節内投与するヒアルロン酸 (HA) は、近年の臨床試験で関節リウマチ (RA) 膝に投与しても疼痛など臨床症状の改善が得られることが判明した。しかしながら、ヒアルロン酸のリウマチ関節に対する作用機序には未解明の点が多い。CD44 は HA に対する細胞受容体であるが、HA の作用に CD44 が関与しているか否かも不明である。RA 関節では腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) などの炎症性サイトカインによりリウマチ滑膜線維芽細胞 (RSF) からマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が産生され、MMP は関節破壊に深く関与している。本研究では、炎症性サイトカインによる RSF の MMP-1 産生に対するヒアルロン酸の効果と、CD44 が HA の作用に対して関与するか否かについて検討した。

#### 2. 方法

単層培養した RSF を、HA の存在非存在下に TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  で刺激した。細胞内の MMP-1 mRNA を RT-PCR、MMP-1 蛋白を western blotting にて、培養上清中に分泌された MMP-1 蛋白を western blotting にて検索した。抗 CD44 抗体を用いて CD44 の RSF における発現、HA 結合への影響、MMP-1 産生に対する HA の効果への影響を調べた。

#### 3. 結果

単層培養した RSF を TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  で刺激すると、MMP-1 の産生分泌が亢進した。HA を健常関節液中濃度 (3 mg/ml) で添加すると、サイトカインによる MMP-1 の mRNA、細胞内蛋白誘導、MMP-1 分泌が抑制された。培養 RSF と蛍光標識 HA との結合は、抗 CD44 抗体 OS/37 で阻害された。逆に、培養 RSF と蛍光標識 OS/37 との結合は、HA で阻害された。HA と RSF を結合させても、RSF に発現している VCAM-1 と抗 VCAM-1 抗体との結合は阻害されなかった。抗 CD44 抗体 OS/37 で前処置すると、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  による MMP-1 産生亢進を抑制する HA の作用は部分的に阻害された。

#### 4. 考察

本研究の結果から、HA 投与によりサイトカイン刺激による MMP-1 産生が抑制されることが判明した。RA パンヌスが関節を破壊する過程で、MMP-1 はコラゲナーゼとして主要な役割を担うと考えられている。RA 関節液では HA 濃度が減少していると報告されており、HA を RA 関節に投与することで RSF による MMP-1 産生を抑制し RA で生ずる関節破壊を防止することが期待される。

抗 CD44 抗体を用いた実験結果から、HA の作用発現には RSF 表面の CD44 との結合が重要であることが示唆された。また、HA 処理が抗 VCAM-1 抗体と VCAM-1 との結合を阻害しなかったことから、HA の作用機序としてこれまで唱えられていた HA のバリア効果の関与は少ないと考えられた。

HA は、CD44 以外の細胞表面蛋白とも結合可能である。抗 CD44 抗体による HA 作用の抑制効果が部分的であったこと

から、HAの作用機序に他の細胞表面蛋白が関与している可能性も否定できない。

### 論文審査の結果の要旨

ヒアルロン酸 (HA) は、関節リウマチ (RA) 膝への投与で症状改善が得られる。しかしHAのRA関節に対する作用機序には未解明の点が多く、その作用にHAの受容体CD44が関与しているか否かも不明である。炎症性サイトカインによりRA滑膜線維芽細胞 (RSF) からマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) が産生される。RAパンスが関節を破壊する過程で、MMP-1は主要な役割を担う。RSFのMMP-1産生に対するHAの作用と、それに対するCD44の関与について検討した。

HAは炎症性サイトカインで誘導されたRSFのMMP-1産生を抑制した。RSFとHAの結合は、抗CD44抗体OS/37で阻害された。HAはRSFのVCAM-1と抗VCAM-1抗体との結合を阻害しなかった。OS/37によりHAの作用は部分的に阻害された。

HA濃度が減少しているRA関節にHAを投与することでRSFによるMMP-1産生を抑制し関節破壊を防止することが期待される。

OS/37を用いた実験結果及びHAがVCAM-1と抗VCAM-1抗体との結合を阻害しなかったことから、HAの作用はCD44との結合により発揮されるもので、HAによる炎症性サイトカインとRSFとの接触減少による結果ではないと考えられた。

以上の研究は、HAをRA関節へ投与することが有用であることの作用機序解明に貢献し、RAの治療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16年3月4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。