

氏 名	よし 吉 藤 はじめ 元
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2918 号
学位授与の日付	平 成 17 年 11 月 24 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 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Amelioration of Experimental Arthritis by a Calpain - inhibitory Compound: Regulation of Cytokine Production by E-64-d <i>in Vivo</i> and <i>in Vitro</i> (カルパイン阻害薬によるマウス実験的関節炎の制御 —— <i>In vivo</i> および <i>in vitro</i> での E-64-d によるサイトカイン産生抑制効果 ——)
論文調査委員	(主 査) 教 授 長 澤 丘 司 教 授 坂 口 志 文 教 授 中 村 孝 志

論 文 内 容 の 要 旨

関節リウマチ (RA) の新規自己抗体として抗カルパスタチン抗体が見出され、その対応抗原であるカルパスタチンと、カルパスタチンが阻害する標的分子であるカルパインが RA の病態において注目されている。カルパインは真核細胞の細胞質内に普遍的に分布する Ca^{2+} 依存性システインプロテイナーゼであり、その基質は多岐にわたるが、基質蛋白を限定された部位でのみ切断するため、digestive enzyme ではなく biomodulator として機能すると考えられている。例えばカルパインは pre-IL-1 α やプロテインキナーゼ C を切断することにより活性化するため、炎症を惹起し、関節炎の病態に促進的に作用する可能性がある。そこで、本研究ではカルパインの阻害による関節炎抑制効果ならびに炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を、関節炎モデル動物および RA 患者滑膜細胞を用いて検討した。

まず、カルパイン阻害物質 E-64-d とカルパスタチンリコンビナント蛋白 (rCS) の関節炎抑制効果を検討するため、抗 II 型コラーゲンモノクローナル抗体と LPS を用いて BALB/c マウスに関節炎を誘導し、高用量 E-64-d (9mg/kg/day)、低用量 E-64-d (3mg/kg/day)、rCS (9mg/kg/day)、対照溶液をそれぞれ腹腔内投与したところ、高用量 E-64-d 群では、低用量 E-64-d 群、rCS 群、対照群に比べ、関節炎点数、足部腫脹度、関節病理所見が有意に改善した。また、カルパイン阻害物質が腫脹関節におけるサイトカイン産生に及ぼす作用を解析するため、定量的 RT-PCR 法により組織中の各サイトカイン mRNA 量を測定したところ、高用量 E-64-d 群で、IL-6 および IL-1 β mRNA 量が有意に低下していた。さらに *in vitro* で、RA 患者滑膜細胞から樹立された細胞株 E11 および crude な RA 患者滑膜細胞を用いて、各化合物がサイトカイン産生に及ぼす効果を検討したところ、E11 細胞と crude 滑膜細胞のいずれにおいても、E-64-d の添加によって IL-6 および IL-1 α 産生が有意かつ濃度依存的に抑制された。しかしこのサイトカイン産生抑制作用は、E-64 (E-64-d の膜非透過型誘導体) や rCS の添加ではみられなかった。

カルパインは NF- κ B 阻害物質である I κ B を分解することにより、間接的に NF- κ B を活性化することが示されている。NF- κ B は IL-6 や IL-1 の発現を誘導するので、カルパインはこれら炎症性サイトカインの発現にも関与する。それが、本研究で E-64-d が IL-6 および IL-1 産生を抑制した機序の一つと推論された。また rCS の効果を認めなかったのは、膜非透過性のためと考えられた。本研究は、カルパイン阻害物質 E-64-d の関節炎モデル動物に対する発症抑制効果を証明し、その機序の一つとして、E-64-d による炎症性サイトカイン産生抑制作用という新知見を提示した。これらの知見は、カルパインの阻害による RA などの関節炎治療応用への可能性を示唆する。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

関節リウマチの自己抗体として抗カルパスタチン抗体が見出され、その対応抗原であるカルパスタチンと、カルパスタチンが阻害する標的分子であるカルパインが注目されている。カルパインはカルシウム依存性システインプロテイナーゼの一

種であり、例えば IL-1 α 前駆体やプロテインキナーゼ C を切断して活性化するため、炎症を惹起し、関節炎の病態に促進的に作用する可能性がある。

本研究で、カルパインの阻害による関節炎抑制効果を検討するために、カルパイン阻害物質 E-64-d を抗Ⅱ型コラーゲン抗体誘発関節炎モデルマウスに腹腔内投与したところ、関節炎の肉眼所見と病理所見の有意な改善を認めた。また、E-64-d の投与が腫脹関節における炎症性サイトカイン産生に及ぼす作用を定量的 RT-PCR 法により解析したところ、IL-6 および IL-1 β mRNA の発現量が有意に低下していた。さらに *in vitro* で培養滑膜細胞を用いて検討したところ、E-64-d の添加により IL-6 および IL-1 α 産生が有意かつ濃度依存的に抑制されることを確認した。

以上の研究は、カルパインの阻害による関節炎モデル動物に対する発症抑制効果を証明し、その機序の一つとして、E-64-d による炎症性サイトカイン産生抑制作用という新知見を提示した。これらの知見は、関節炎病態の解明に貢献し、また、カルパインの阻害による関節リウマチなど関節疾患の新たな治療応用への可能性を示唆する。

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17年10月31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。