

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 浅野 毅

### 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

##### 【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、その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、組織を凍結破砕し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- $\alpha$  または IL-1 $\beta$ ) 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- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  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- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  を分泌する。TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  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。

$\alpha 9$  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。