

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 河 野 通 仁

学 位 論 文 題 名

線維芽細胞様滑膜細胞における Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 の
増殖促進作用に関する研究

(The synovial proliferative effect of Ras guanine nucleotide-releasing protein 4
in fibroblast-like synoviocytes)

【背景と目的】 関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)は慢性の滑膜炎をきたす自己免疫性疾患で、近年メトトレキサートや生物学的製剤などを発症早期に使用することで関節破壊の抑制が可能となってきている。しかし、約 3 割の患者は治療によっても骨破壊、関節破壊による関節の変形を完全には食い止めることが出来ず activities of daily living が低下する患者もみられること、治療に伴う易感染性や治療薬が高額であることなど、未だ問題点が多い。滑膜組織表層の線維芽細胞様滑膜細胞(fibroblast-like synoviocyte: FLS)は、その腫瘍様増殖や局所でのサイトカイン産生および蛋白分解酵素産生などを通じて RA の特徴である滑膜炎、パンヌス形成や骨・軟骨破壊に関わっている。

Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 (RasGRP4)は Ras を標的とする guanine nucleotide exchange factor であり、マスト細胞、単球、好中球に発現する。我々はこれまでに、RA 患者は健常者と比較し、単球における RasGRP4 の splicing 異常の頻度が高いことを報告した。また、RasGRP4 欠損マウスでは血清移入による関節炎モデルマウスである K/BxN 関節炎が誘導されないが、その病態は明らかになっていない。そこで、RA 患者の滑膜における RasGRP4 の病態への関与を明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法】 2012 年 4 月から 2013 年 12 月までに北海道大学病院整形外科で人工関節置換術を施行された患者のうち、文書による説明と同意を得られた RA 患者 9 例、変形性関節症 5 例の滑膜に対し、ミラー切片を用いて滑膜組織において FLS に特異的に発現していると報告されている Cadherin-11 を認識する抗体および抗 RasGRP4 抗体で免疫組織化学染色を行った。また、滑膜表層の Cadherin-11 陽性かつ RasGRP4 陽性の面積を測定した。また、滑膜組織の RasGRP4 の遺伝子発現を検討するため、in situ hybridization を行った。

次に北海道大学病院整形外科で人工関節置換術または滑膜切除術を施行された患者のうち、文書による説明と同意を得られた RA 患者 10 例、変形性関節症患者 10 例の滑膜から FLS を分離し、RasGRP4 の遺伝子発現量を real-time quantitative PCR で検討した。FLS に tumor necrosis factor α (TNF α)を添加し、FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量と増殖能を検討した。また RasGRP4 に特異的な small interfering RNAs (siRNA)を FLS に添加し、FLS の増殖能と FLS における receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)、interleukin-6 (IL-6)、vascular endothelial growth factor A (VEGF)、matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)、MMP3、

microsomal prostaglandin E synthase-1 (miPGES-1)の遺伝子発現量を検討した。増殖能は tetrazolium/formazan assay を用いて検討した。

最後に、合計 15 匹の 7 週齢の Lewis ラットに II 型コラーゲンを免疫し関節炎を誘導した。各グループ 5 匹ずつ 3 群に分け、siRNA Control または 2 種類の RasGRP4 特異的 siRNA と atelocollagen との混合液を両足関節に関節注射した。関節炎スコア、足関節の直径、micro CT を用いた画像的評価、組織学的評価を行った。

【結果】滑膜の免疫組織化学染色では、FLS に特異的な cadherin-11 を発現している細胞の多くにミラー切片で RasGRP4 が発現しており、RasGRP4 は特に滑膜表層の重層化している部分に高発現していた。滑膜表層の Cadherin-11 陽性かつ RasGRP4 陽性細胞の面積は OA 患者と比較し、RA 患者で増加していた。in situ hybridization においても滑膜表層の FLS に RasGRP4 の遺伝子発現が認められた。

患者から分離した FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は OA 患者と比較し、一部の RA 患者で増加していた。生物学的製剤を使用していた RA 患者 6 例中 5 例、特に TNF α 阻害薬を使用していた RA 患者 4 例中 4 例で、FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は低下していた。FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は FLS の増殖能と正の相関を示した。TNF α の添加により FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は濃度依存性に増加し、同時に FLS の増殖能も増加した。siRNA を用いた RasGRP4 の knock down により、FLS の増殖能は低下した。RasGRP4 の knock down により、FLS における RANKL、IL-6、VEGF、MMP-3 の遺伝子発現量は変化しなかったが、MMP-1、miPGES-1 の遺伝子発現量は低下した。

RasGRP4 特異的 siRNA の関節注射により、足関節の直径、滑膜炎スコアは改善した。micro CT を用いた画像的評価では骨びらんスコアの改善が認められ、組織学的評価においても、滑膜組織への炎症細胞浸潤、骨・軟骨破壊はいずれも軽減した。

【考察】本研究で我々は OA 患者と比較し、RA 患者の滑膜表層の FLS に RasGRP4 が高発現していること、RasGRP4 は特に、RA 患者の滑膜表層の重層化している FLS に高発現していることを初めて報告した。また、FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は FLS の増殖能と相関しており、TNF α の添加により FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は濃度依存性に増加し、同時に FLS の増殖能も増加した。さらに RasGRP4 の knockdown により FLS の増殖能は低下し、MMP-1、miPGES-1 の遺伝子発現量が低下すること、RasGRP4 特異的 siRNA の関節注射により、コラーゲン誘導関節炎ラットの滑膜炎、骨・軟骨破壊が改善することを示した。RasGRP4 の knockdown により FLS の増殖が抑えられ、FLS の産生するサイトカインなどの総量が低下し、結果として骨・軟骨破壊が軽減されると考えられた。RasGRP4 欠損マウスではマスト細胞や好中球の欠損、奇形など、明らかな表現型の異常は報告されておらず、RasGRP4 は関節リウマチの新たな治療ターゲットとなりうると思われる。

【結論】RasGRP4 は RA 患者の滑膜表層の重層化している部分に高発現していた。FLS における RasGRP4 の遺伝子発現量は FLS の増殖と相関し、RasGRP4 の特異的阻害によって、in vitro、in vivo において FLS の増殖が抑制された。RasGRP4 は、関節リウマチの滑膜炎病態を形成する責任分子のひとつである。