

学位論文の要旨

| | | | |
|---|----|----|------|
| 学位の種類 | 博士 | 氏名 | 小林厚志 |
| <h3>学位論文題目</h3> <p>Effect of glucocorticoids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and bisphosphonates on receptor activator of NF-κB ligand expression in rheumatoid arthritis.</p> <p>(関節リウマチにおける、グルココルチコイド、非ステロイド系抗炎症薬、ビスホスホネートのreceptor activator of NF-κB ligandに対する作用に関する研究)</p> <p style="text-align: right;">共著者名 平野史倫、牧野 勲</p> <p style="text-align: center;">未公表</p> <h3>研究目的</h3> <p>関節リウマチ (RA) は、原因不明の難治性炎症性疾患で、多発性関節炎を主徴とし、軟骨・骨の破壊、関節の強直・変形に至る疾患である。RAの病態形成の一因として滑膜細胞やマクロファージ、Tリンパ球から産生されるサイトカインが考えられている。なかでもtumor necrosis factor (TNF)-α は、IL-1やIL-6など他の炎症性サイトカインを誘導することからRAの病態形成に中心的役割を担っていると考えられている。また、罹患関節では増殖した滑膜 (パンヌス) が骨と接し、骨との界面には多数の破骨細胞が出現することから破骨細胞が関節破壊に関与していると考えられている (引用文献1)。</p> <p>最近、この破骨細胞の活性化因子としてreceptor activator of NF-κB ligand (RANKL) がクローニングされた (引用文献2)。RANKLは骨芽細胞やTリンパ球などで産生され、$1\alpha,25-(OH)_2$Vitamin D_3 やPTH、PGE_2などの骨吸収因子により細胞膜上に発現する。さらに一部は膜から遊離し可溶型になると考えられている (引用文献3)。RANKLは、その受容体であるRANKを細胞膜上に発現する破骨細胞前駆細胞を活性型多核破骨細胞に分化誘導することより破骨細胞の機能を調節していることが明らかになった。したがって、RANKLはRAにおける骨破壊や骨粗鬆症に密接に関与していることが示唆される。</p> | | | |

現在、RA患者に対する治療として、非ステロイド抗炎症薬（NSAIDs）やグルココルチコイドが、また骨粗鬆症に対する治療として、ビスホスホネート製剤の投与が広く行われている。しかしながら、RAにおけるRANKLの発現およびRA治療によるRANKL発現に与える影響については不明な点が多い。そこで本研究はRAの病態形成に重要なTNF- α とRA治療薬であるNSAIDs、グルココルチコイドおよび骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネートのRANKL発現に与える作用を検討し、RAにおける骨破壊、骨粗鬆症の病態を解明することを目的とした。

材料・方法

(1) 細胞

滑膜細胞は、滑膜切除術を施行した患者から得られた滑膜細胞を使用し、10%ウシ胎仔血清添加RPMI 1640培地で培養し、各々の実験には3-5継代目の滑膜細胞を使用した（参考論文2）。ヒト骨肉腫由来のMG-63細胞は、10%ウシ胎仔血清、1%ピルビン酸、1%非必須アミノ酸を添加したEMEM培地で培養した。ヒト末梢血単核球は、RAおよび変形性関節症（OA）患者血液からFicoll-paque遠心法を用いて分離した。

(2) 試薬

リコンビナントヒトTNF- α 、グルココルチコイドとしてdexamethasone（DEX）、NSAIDsとして、非選択的シクロオキシゲナーゼ阻害薬のsodium salicylateとシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害薬のtiracoxib、ビスホスホネート製剤としてetidronate、alendronateを用いた。

(3) RANKL mRNA発現の検討

AGPC法により細胞からtotal RNAを抽出し、0.5 μ g total RNAを逆転写酵素反応によってcDNAに変換後、RANKL特異的プライマーを用いてPCR反応を行った。

(4) 可溶性RANKL蛋白（sRANKL）の測定

MG-63細胞を培養した上清中および患者血清中のsRANKLを、Enzyme immunoassay法を用いて測定した。

(5) レポータープラスミドを用いた転写活性の測定

MG-63細胞にグルココルチコイド応答性ルシフェラーゼ発現プラスミドをリポフェクション法により一過性に導入し、DEX、etidronate、alendronateの存在・非存在下で培養後、細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(6) 骨塩定量

骨塩定量は、RA患者の腰椎（L2-L4）の骨密度をDual energy X-ray absorptiometry法で測定した。

成績

(1) RA、OA滑膜細胞におけるRANKL mRNAの発現

RA滑膜細胞ではRANKL mRNAは様々な程度で発現していた。OA滑膜細胞では、発現はほとんど認められなかった。

(2) RA、OA患者末梢血単核球のRANKL mRNAの発現

RANKL mRNAの発現は、OAと比較してRA患者末梢血単核球で増加していた。RA各ステージ間ではステージIII、IVで増加する傾向を認めた。

(3) RA患者末梢血単核球のRANKL mRNAの発現と炎症マーカーとの関連

RA患者末梢血単核球のRANKL mRNAの発現と赤血球沈降速度、CRPとの関連は認められなかった。

(4) RA患者ステロイド使用量と末梢血単核球のRANKL mRNAの発現、骨塩量との関連

ステロイド使用量が多いほど、RA患者末梢血単核球のRANKL mRNAの発現が増加し、骨塩量は減少する傾向がみられた。

(5) MG-63細胞を用いたRANKL mRNA、sRANKL蛋白発現の検討

(5) -1 TNF- α による作用

TNF- α はRANKL mRNAとsRANKL蛋白の発現を濃度依存性に増加させた。その発現はDEXでは抑制されず、sodium salicylate、tiracoxibで濃度依存性に抑制された。

(5) -2 DEXによる作用

DEXはRANKL mRNAとsRANKL蛋白の発現を濃度依存性に増加させた。その発現はetidronate、alendronateで抑制されたが、sodium salicylate、tiracoxibでは抑制されなかった。

(6) グルココルチコイド応答性ルシフェラーゼ発現プラスミドを用いた転写活性の測定

DEXは濃度依存性にグルココルチコイド応答性ルシフェラーゼ発現プラスミドの転写を活性化した。etidronate、alendronateはグルココルチコイド応答性遺伝子発現に影響を与えなかった。

考案

RA患者の滑膜細胞、末梢血単核球においてRANKL mRNAの発現がみられ、RAの骨破壊に関与している可能性が示唆された。その発現は炎症マーカーと関連を認めなかったが、RAのステージが進行するにつれて発現が増加する傾向がみられた。また、グルココルチコイド使用量が増加するとRANKL mRNAの発現が増加する傾向を認めた。さらにグルココルチコイド使用量が増加すると患者の骨密度が減少する傾向を認め、RAの骨粗鬆症発症に関与している可能性が示唆された。

MG-63細胞を用いた実験から、TNF- α とDEXはRANKL mRNAおよびsRANKL蛋白の発現を誘導することが明らかとなった。TNF- α によるsRANKL蛋白発現の誘導はNSAIDsにより濃度依存性に抑制され、シクロオキシゲナーゼ-2からPGE₂の経路を介している可能性が示唆された。一方、DEXによるsRANKL蛋白発現の誘導はNSAIDsにより抑制されず、ビスホスホネート製剤で抑制された。グルココルチコイド応答性ルシフェラーゼ発現プラスミドを用いた実験では、ビスホスホネート製剤は、グルココルチコイド応答性遺伝子発現に影響を与えず、別の経路でRANKLの発現を抑制していると考えられた。

RAにおけるグルココルチコイド使用は、TNF- α などの炎症性サイトカインの抑制によりRA活動性を減少させる一方、本成績のごとくRANKL発現の誘導を介して骨破壊、骨粗鬆症を進展させることが推測され、より慎重な適応判定、容量設定が必要と考えられた。また、ビスホスホネート製剤は、破骨細胞に対する直接作用のほかにRANKLを介した経路からもRAにおける骨破壊および骨粗鬆症の治療、予防に有効な可能性が示唆された。

結論

RAの骨破壊、骨粗鬆症にRANKLが関与している可能性が示唆された。また、治療に使用しているNSAIDs、グルココルチコイド、ビスホスホネートはRANKL発現に影響を与えることが明らかとなった。




引用文献

1. Bromley M, Woolley DE. Chondroclasts and osteoclasts at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 1984; 27:968-975.
2. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-176.
3. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001; 142:1419-1426.

参考論文

1. Hirano F, Kobayashi A, Hirano Y, Nomura Y, Fukawa E, Makino I. Bile acids regulate RANTES gene expression through its cognate NF- κ B binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:1095-1101.
2. Hirano F, Kobayashi A, Hirano Y, Nomura Y, Fukawa E, Makino I. Nuclear factor- κ B regulates RANTES chemokine expression in response to tumor necrosis factor- α in fibroblast-like synoviocytes. *Mod Rheumatol* 2002; 12:37-43.
3. Hirano F, Kobayashi A, Hirano Y, Nomura Y, Fukawa E, Makino I. Thrombin-induced expression of RANTES mRNA through protease activated receptor-1 in human synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:834-837.

学位論文の審査結果の要旨

| | | | |
|--|---------|----|-------|
| 報告番号 | 第 号 | | |
| 学位の種類 | 博士 (医学) | 氏名 | 小林 厚志 |
| <p>審査委員長 原 渕 保 明 </p> <p>審査委員 牧 野 勲  ✓</p> <p>審査委員 立 野 正 致 </p> | | | |
| <p>学 位 論 文 題 目</p> | | | |
| <p>Effect of glucocorticoids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and bisphosphonates on receptor activator of nuclear factor-κB ligand expression in rheumatoid arthritis.</p> <p>(関節リウマチにおけるグルココルチコイド、非ステロイド性抗炎症薬、ビスホスホネートの receptor activator of nuclear factor-κB ligand に対する作用)</p> <p>Receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)は骨芽細胞やTリンパ球などで産生され、PTHなどの骨吸収因子により細胞膜上に発現し、一部は膜から遊離して可溶性になる。RANKLは関節リウマチ(RA)における骨破壊や骨粗鬆症と密接に関与しているが、その発現様相およびRA治療によるRANKL発現に与える影響については不明な点が多い。本研究はRAの病態形成に重要なTNF-αとRA治療薬であるNSAIDs、グルココルチコイドおよびビスホスホネートのRANKL発現に与える作用を検討し、RAにおける骨破壊、骨粗鬆症の病態解明を目的とした。</p> <p>RT-PCR法にてRANKL mRNAの発現を検討したところ、RA患者の滑膜細胞、末梢血単核球にはその発現を認めた。一方、変形性関節症患者には認められず、RA病期の進行および骨密度の減少と共に増加し、炎症マーカーとの関連がなかったことから、RANKLがRAの骨破壊に深く関与している可能性が考えられた。また、患者のグルココルチコイド使用量の増加と共に、増加する傾向を認めた。</p> | | | |

次に培養細胞ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 細胞を用いて、細胞培養上清中の可溶性 RANKL 蛋白を EIA 法により測定した。その結果、TNF- α と dexamethazone は RANKL mRNA および可溶性 RANKL 蛋白を誘導することが認められた。さらに、TNF- α による可溶性 RANKL 蛋白の誘導は NSAIDs により抑制され、一方、dexamethazone による誘導はビスホスホネートで抑制されることが判明した。これらの所見は RA におけるグルココルチコイド使用が TNF- α などの炎症性サイトカインの抑制により RA の活動性を減少させる反面、RANKL の発現誘導を介して骨破壊、骨粗鬆症を進展させる可能性を示唆すると共に、ビスホスホネート製剤の投与は破骨細胞に対する直接作用や RANKL を介する経路からも治療および予防に有効であることを明らかにした。

本研究は RA の骨破壊、骨粗鬆症に RANKL が関与している可能性を明らかにし、現在、治療に供されている NSAIDs、グルココルチコイド、ビスホスホネートは RANKL 発現に影響を及ぼす薬剤である事を明らかにした。これらの研究成果は臨床における RA 治療の実際に寄与するところが大きいと考えられる。また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。