

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

浅野 孝太

専攻分野：疾患プロテオーム・分子病態治療学

コース：

指導教授：加藤 智啓

主論文の題目：Secretion of Inflammatory Factors from Chondrocytes by Layilin Signaling (layilinを介したシグナルによる軟骨細胞からの炎症因子の分泌)

共著者：

Mitsumi Arito, Manae S. Kurokawa, Kazuki Omoteyama, Kazuki Okamoto, Naoya Suematsu, Kazuo Yudoh, Hiroshi Nakamura, Moroe Beppu, Tomohiro Kato

緒言

layilin(LAYN)はC型レクチン様ドメインを有する1回膜貫通型蛋白質であり、ヒアルロン酸 (hyaluronic acid, HA) 受容体の1つである。

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) では、tumor necrosis factor (TNF- α) などの炎症性サイトカインが、その病態形成に関与していることが知られている。実際に、RA患者の血清や滑液で、TNF- α は高値を示し、TNF- α やその受容体を標的とした薬剤は、有効な治療効果を示す。

近年になってRA患者の血清や滑液で低分子HAが高値を示すことが報告され、低分子HAが炎症応答を誘導する可能性が提唱されている。従

って、低分子 HA 及び HA 受容体が、RA など関節炎に関与している可能性が考えられる。関節軟骨については、HA 受容体である CD44 や LAYN が発現しているとの報告がある。しかしながら、関節軟骨における LAYN の調節機構や役割についてはほとんど不明である。

本研究では、軟骨細胞で LAYN の発現調節機構を明らかにするために、TNF- α の LAYN 発現に対する影響を調べた。また、軟骨細胞での LAYN の機能を明らかにするために LAYN シグナルの炎症性もしくは抗炎症性サイトカインに対する影響を調べた。その結果、LAYN が関節炎の病態に関与している可能性を明らかにした。

方法・対象

変形性関節症患者 (n=8) の膝及び股関節人工関節置換術時に採取された関節軟骨から軟骨細胞を単離した。軟骨細胞を培養し、TNF- α (100ng/ml) 刺激群と無刺激群を作製した。24 時間刺激後、各細胞から蛋白質を抽出し、抗 LAYN 抗体を用いた Western blot (WB) により LAYN を検出し、量的比較をした。また、軟骨肉腫細胞 OUMS-27 を培養し、TNF- α (100-800pg/ml) 刺激群及び無刺激群を作製した。同じく 24 時間刺激後、細胞から蛋白質または RNA を抽出し、WB により LAYN の蛋白質量を、定量的 PCR により LAYN の mRNA 量を測定した。

また、OUMS-27 に LAYN シグナル因子として抗 LAYN 抗体 (10 μ g/ml) で刺激した群と対照として非特異的 IgG を添加した群を作製した。48 時間刺激後、その培養液をサイトカインアレイに供した。両群で \pm 1.3 倍以上差のあったサイトカインに関して、ELISA で個別に測定した。

なお、本研究は、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会の承認を得ている (承認番号 1315 号)。

結果

まず、軟骨細胞で LAYN の発現調節機構を明らかにするために、TNF- α の LAYN 発現に対する影響を調べた。軟骨細胞 (n=8) で、TNF- α (100ng/ml) 刺激により、LAYN の蛋白質量は有意な増加を示した (p=0.025)。また、OUMS-27 (n=3) で、RA 患者滑液中と同程度の濃度の TNF- α (100-800pg/ml) を用いて同様に検討した結果、濃度依存的に LAYN の発現量が増加した。また、定量的 PCR の結果から、TNF- α による LAYN の増加は、mRNA の増加によることが示された (p=2.16 \times 10⁻⁶)。

次に、軟骨細胞での LAYN の機能を明らかにするために、OUMS-27 を用いて、LAYN シグナルの炎症性もしくは抗炎症性サイトカインに対する影響をサイトカインアレイで調べた。抗 LAYN 抗体刺激群では、対象群と比較して、培養液中の補体成分 c5/c5a やケモカイン IL-8 などが増加していた。軟骨細胞での c5 合成の報告は、我々の知る限り無いため、RT-PCR を用いて軟骨細胞 (n=3) 及び OUMS-27 で c5 mRNA の発現を確認した。さらに ELISA で c5/c5a と IL-8 を個別に測定した結果、抗 LAYN 抗体刺激により培養液中の c5/c5a と IL-8 が有意に増加することが確認された (それぞれ p=0.049, p=0.002)。

考察

本研究で、LAYN を介したシグナルが、c5/c5a と IL-8 の分泌を促進することが示された。c5 は、炎症時に c3b により切断されアナフィラトキシンである c5a を生ずる。c5a は、単球や好中球の走化性を亢進するとされる。また、IL-8

は、好中球の遊走を促進するとされる。LAYN シグナルは、c5/c5a や IL-8 の合成または分泌の促進により、軟骨での炎症や、それに伴う関節破壊に関与している可能性がある。

結論

軟骨細胞で、LAYN を介したシグナルは、補体成分 c5/c5a 及び IL-8 の分泌を促進し、関節の炎症や破壊に関与する可能性が示された。