

## 別記様式第 6 号 (第 16 条第 3 項, 第 25 条第 3 項関係)

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	吉田 雄介
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 IL-1 $\beta$ Enhances Wnt Signal by Inhibiting DKK1 (IL-1 $\beta$ は DKK1 を抑制することにより Wnt シグナルを活性化する)			
論文審査担当者			
主査	教授	安達 伸生	印
審査委員	教授	稲葉 俊哉	
審査委員	准教授	横崎 典哉	
<p>[論文審査の結果の要旨]</p> <p>研究の背景：自己炎症性疾患の一つであるクリオピリン関連周期熱症候群 (Cryopyrin-associated periodic syndrome: CAPS) では、クリオピリン (Cryopyrin) をコードする <i>NLRP3</i> 遺伝子の変異によって、インフラマソーム (inflammasome=<i>NLRP3</i>/<i>ACS</i>/<i>Caspase-1</i> の複合体) を介して活性化された炎症性サイトカイン IL-1<math>\beta</math> の過剰産生が病態に深く関わっている。CAPS には 3 つの型があり、中でも最重症型である慢性乳児神経皮膚関節症候群 (Chronic infantile neurologic cutaneous, and articular syndrome: CINCA 症候群) は、新生児期発症多臓器系炎症性疾患 (Neonatal onset multisystem inflammatory disease: NOMID) とも呼ばれ、皮疹、中枢神経系病変、関節症状を 3 主徴とするが、関節病変は軟骨内骨化による骨過形成を特徴とする関節変形であり、IL-1<math>\beta</math> による病態としては炎症背景がないことから、その詳細な機序は不明とされてきた。</p> <p>NOMID / CINCA における関節病変の病理学的特徴は、別の遺伝性疾患である fibrous dysplasia に類似している。fibrous dysplasia は <i>GNAS</i> 遺伝子の変異によってもたらされるが、この変異は Wnt シグナルの異常な活性化を導くことが知られている。Wnt シグナルはこれと拮抗する分泌蛋白質 Dickkopf-1 (DKK1) と共に、骨芽細胞、軟骨細胞の分化を調整していることが示唆されている。</p> <p>NOMID / CINCA における過剰な IL-1<math>\beta</math> が、fibrous dysplasia の原因である Wnt シグナルの活性化をもたらすことで、これら 2 つの疾患が類似した病理学的表現形をもたらしていると仮定し、これを証明するために、本研究では IL-1<math>\beta</math> の Wnt シグナルに対する効果を検討した。</p> <p>実験方法と結果：最初に、関節滑膜組織の主たる構成細胞である線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocytes: FLS) における <i>Wnt</i> mRNA と <i>DKK1</i> (Wnt antagonist) mRNA の発現を quantitative RT-PCR で確認した。FLS は Articular Engineering より購入した関節リウマチ由来のものと autopsy cases から採取された変形性関節症 (OA)、健常人由来のものを使用した。いずれの FLS も <i>Wnt3A</i> 以外の canonical、non-canonical の <i>Wnt</i> mRNA を発現していた。また、いずれの FLS も Mesenchymal stem cell (MSC) と同程度に <i>DKK1</i> mRNA を発現していた。次に、FLS</p>			

と骨肉腫細胞株 U2OS 細胞の培養上清中の DKK1 濃度を ELISA で測定した。その結果、FLS は DKK1 を産生していた。一方で、U2OS 細胞では DKK1 の産生は極めて低く、ELISA では検出レベル以下であった。これらの結果を踏まえ、U2OS 細胞を後の T cell factor (TCF) レポーターアッセイ用の細胞として用いた。

次に、FLS 上清が Wnt シグナル活性に及ぼす影響を検討するため、ルシフェラーゼアッセイ (TCF レポーターアッセイ) を施行した。U2OS 細胞に FLS 上清を加えると、リコンビナント Wnt3A (recWnt3A)、あるいは塩化リチウム (LiCl) による TCF レポーターの活性化が抑制された。LiCl は GSK-3 $\beta$  のインヒビターであり、Wnt シグナルを強力に活性化するため、測定系の陽性コントロールとして用いた。

recWnt3A による TCF の活性化は FLS の培養上清の添加により濃度依存性に抑制された。さらに、FLS 由来の DKK1 が Wnt シグナルを抑制するかを評価する目的で抗 DKK1 抗体を用いた。前述のように、recWnt3A で誘導された TCF 活性は FLS 培養上清により抑制されるが、抗 DKK1 抗体を用いると、この抑制が解除されることが明らかとなった。したがって、FLS 由来の DKK1 が Wnt 活性を抑制していることが示唆された。

また次に、FLS において IL-1 $\beta$  が Wnt の発現や DKK1 の産生に与える影響を評価した。FLS ごとに個体差があったが、IL-1 $\beta$  は *Wnt2*、*Wnt5A* の発現を有意に亢進させた。IL-6 は DKK1 の産生を抑制することが既に報告されているが、IL-1 $\beta$  も DKK1 産生を抑制し、その効果は IL-6 より顕著であった。

最後に、TCF レポーターアッセイを用いて、IL-1 $\beta$  が FLS を介して U2OS 細胞内の Wnt シグナルに与える影響を確認した。未処理の FLS の上清は TCF 活性を抑制したが、IL-1 $\beta$  または IL-6 で培養した FLS では、この抑制効果が減弱した。抑制効果の減弱は IL-6 より IL-1 $\beta$  の方が顕著であった。

今回得られた結果から、FLS が DKK1 の産生を介して U2OS 細胞の Wnt シグナルを抑制すること、また、IL-1 $\beta$  は FLS による DKK1 の発現を抑制し、その結果 U2OS 細胞での Wnt シグナルが活性化されることが示された。

以上の結果から、NOMID/CINCA では過剰な IL-1 $\beta$  が関節内の DKK1 産生を抑制し、Wnt シグナルを活性化することで軟骨や骨の形態異常が起こる可能性がある。NOMID/CINCA では、現在 IL-1 $\beta$  の中和抗体 (カナキヌマブ) しか治療薬がない。

本研究では新たな治療方法として DKK1 の投与や Wnt シグナルを標的とした薬剤が、この疾患の治療薬となる可能性があることを明らかにした点で、高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本研究が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	吉田 雄介
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 IL-18 Enhances Wnt Signal by Inhibiting DKK1 (IL-18はDKK1を抑制することによりWntシグナルを活性化する)			
最終試験担当者			
主査	教授	安達 伸生	印
審査委員	教授	稲葉 俊哉	
審査委員	准教授	横崎 典哉	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席の上、平成30年11月1日の第76回広島大学研究科発表会(医学)及び平成30年11月6日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 本研究でFLSを用いて実験を行なった意義</li> <li>2 NOMID/CINCAとfibrous dysplasiaでのWntシグナル活性化の違い</li> <li>3 NOMID/CINCAの遺伝形式やmutationの様式</li> <li>4 NOMID/CINCAの関節内病変でWntシグナルの活性化を調整する細胞とその役割</li> <li>5 本研究の今後の展望</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			