

氏名	きしもと ゆうじ 岸本 勇二
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第501号
学位授与年月日	平成17年 3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Gene expression relevant to osteoclastogenesis in the synovium and bone marrow of mature rats with collagen-induced arthritis (成熟期コラーゲン誘発性関節炎ラットの滑膜と骨髄における破骨細胞形成に関与する遺伝子の発現)
学位論文審査委員	(主査) 重政千秋 (副査) 平井和光 豊島良太

## 学位論文の内容の要旨

破骨細胞は関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)にみられる骨破壊の中心的役割を果たしている。近年、破骨細胞の形成に滑膜あるいは関節近傍の骨髄で産生される種々のサイトカインが関与していることが証明された。特に receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)は単球系細胞の破骨細胞への分化を決定付ける因子とされ、その receptor である RANK、decoy receptor である osteoprotegerin (OPG)とともに、RA における働きが注目されている。

今回、コラーゲン誘発性関節炎(CIA)ラットを用い、破骨細胞形成に関与する因子の滑膜と骨髄におけるメッセンジャーRNA(mRNA)発現を経時的に追跡した。その結果に基づき、炎症関節における破骨細胞形成の機序を考察することが本実験の目的である。

### 方法

成熟期SD系ラット30匹にコラーゲン感作を行った。感作後3、5、7、10、15、21日に関節炎の重症度を評価し、その後各5匹より両膝関節滑膜と両大腿骨遠位部骨髄を採取した。滑膜と骨髄の各々から total RNA を抽出後、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法で RANKL/RANK/OPG、CIA の炎症反応惹起に関わる炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、interleukin (IL)-1 $\beta$  と IL-6、破骨細胞マーカーである tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) と cathepsin-K、および標準遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現の有無を評価した。さらに RT-PCR 法で特異的単一バンドの発現を認めた遺伝子を real-time PCR 法を用いて定量し、その未感作ラ

ットに対する相対量を算出した。

## 結 果

臨床的関節炎は感作後 15 日前後に発症し、以後、徐々に増悪した。

滑膜では、RT-PCR 法ですべての mRNA が特異的単一バンドとして認められた。Real-time PCR 法による相対定量実験では OPG の mRNA 発現量が減少、RANK が不変であった他は、発現量が増加していた。RANKL と 2 つの破骨細胞マーカー (TRAP、cathepsin-K) はいずれも経日的に増加しており、これらの間には有意な相関関係を認めた ( $P < 0.01$ )。

骨髄では、RT-PCR 法で IL-6、RANKL および OPG の単一バンドは検出されなかった。単一バンドを認めた遺伝子に対し real-time PCR 法による定量実験を行ったところ、TNF- $\alpha$  と RANK の mRNA 発現量には変化が見られず、IL-1 $\beta$  はわずかに増加していた。TRAP と cathepsin-K は経日的に増加する傾向にあった。

## 考 察

滑膜では、RANKL と破骨細胞マーカーの間に高い相関を認め、RA 滑膜での破骨細胞形成における RANKL の重要性が示唆された。他方、OPG の mRNA 発現は臨床的関節炎の発症と同時に有意に減少しており、RANKL/OPG mRNA の比が破骨細胞数と正の比例関係にあるとした *in vitro* での過去の報告に一致する結果と考えられた。また TNF- $\alpha$  は他のサイトカインに先立ち発現が増強しており、関節炎発症のトリガーとしての役割をうかがわせた。IL-1 $\beta$  と IL-6 は臨床的関節炎の発症時期に急激に増加しており、炎症惹起におけるこれらの重要性を示していた。また炎症性サイトカインと RANKL、あるいは破骨細胞マーカーの間にはすべて正の相関が認められ、炎症性サイトカインは炎症関節において破骨細胞形成を促す方向に作用しているものと思われる。

骨髄においては IL-6、RANKL および OPG の発現は検出されなかった。また TNF- $\alpha$  と RANK に経時的な変化は認められず、IL-1 $\beta$  は増加していたものの滑膜と比較するとその変化はわずかであった。他方、TRAP と cathepsin-K の発現は増加傾向にあり、骨髄内で破骨細胞が形成されていることを示唆していた。滑膜と骨髄でそれぞれ独立して破骨細胞形成が起こることを組織学的に証明したわれわれの過去の報告とあわせて考察すると、骨髄においては破骨細胞形成に関与するサイトカインの発現・変動に乏しいにも拘わらず、破骨細胞が形成されるという結論が得られる。その機序として、滑膜で産生されるサイトカインが骨髄内での破骨細胞形成にも影響を及ぼしているのではないかと考えた。

## 結 論

RA 滑膜における破骨細胞形成には RANKL の増加が重要であり、さらに OPG の抑制など種々のサイトカインの変動が関与していると思われる。また滑膜で産生されるサイトカインが滑膜内のみならず、骨髄での破骨細胞形成にも影響している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、成熟期コラーゲン誘発性関節炎（CIA）ラットの滑膜と関節近傍骨髄における破骨細胞分化関連因子の経時的変化を、mRNA レベルで検討したものである。その結果、滑膜においては RANKL と炎症性サイトカインの mRNA 発現が増強し、OPG の発現が減弱するなど、破骨細胞分化に関与するサイトカインが多彩な変化を示し、特に RANKL と破骨細胞マーカーの間に高い相関が認められた。他方、骨髄においては破骨細胞マーカーの mRNA 発現が増強したにも拘わらず、サイトカインの発現は変化に乏しかった。これらの結果は、炎症関節の滑膜における RANKL の発現増強や OPG の減弱などが滑膜内の破骨細胞形成を促進させると同時に、滑膜由来のサイトカインが骨髄における破骨細胞形成にも影響を及ぼしている可能性を示唆するものである。

本論文の内容は、関節リウマチにおける骨関節破壊の病態解明に大きく寄与するものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認められる。