

主論文の要旨

**Suppression of Hyaluronan Synthesis Alleviates
Inflammatory Responses in Murine Arthritis and
in Human Rheumatoid Synovial Fibroblasts**

〔ヒアルロン酸合成抑制はマウス関節炎とヒト関節リウマチ患者由来
滑膜線維芽細胞の炎症反応を抑制する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻

運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

吉岡 裕

【緒言】

関節リウマチ（RA）は慢性的な関節滑膜の炎症を特徴とする自己免疫疾患である。近年、RA 患者に対する生物学的製剤の有効性が報告されているが、効果無効例も少なからず存在する。

ヒアルロン酸（HA）と RA との関係は以前より報告があり、ヒアルロン酸の血中濃度は関節リウマチの患者において健常者よりも高く、また疾患活動性に比例して高くなることが知られている。また、ヒアルロン酸の細胞膜上受容体である CD44 に対する抗体投与は関節炎モデルでの炎症を抑制したとの報告がある。以上から、ヒアルロン酸を標的として、その合成を効果的に抑制することは炎症性関節炎の新規治療法となる可能性がある。

本研究では、炎症性関節炎においてヒアルロン酸の果たす役割と治療標的としての可能性を明らかにすることを目的に、コラーゲン誘発関節炎（CIA）マウスモデルと関節リウマチ患者から採取した滑膜様線維芽細胞（FLS）に対して HA 合成阻害薬である 4-methylumbelliferone（4-MU）を使用し、その効果を解析した。

【方法】

DBA/1J マウス（オス 8 週齢）に type II collagen（100 μ g）を接種し、その 21 日後に再度、type II collagen（50 μ g）を接種することにより、CIA マウスモデルを作製した。2 回目の type II collagen 接種後 2 日目より 4-MU の経口連日投与を開始した。4-MU は 5% アラビアガムで混濁液とし、濃度を 3mg/g (n=15)、1.5mg/g (n=5)、0.5mg/g (n=5) に分け、投与した。コントロール群（n=15）は 5% アラビアガムのみ投与した。4-MU の効果を理学所見による関節炎スコア（0=正常、1=1 趾の腫脹、2=2 趾以上の腫脹、3=足全体の腫脹）と足の腫脹の厚みの計測で、また膝関節切片による組織学的スコア（0=正常、1=炎症細胞の浸潤、2=滑膜肥厚、パンヌス形成、3=骨びらん、骨破壊）によって評価した。軟骨細胞や滑膜細胞における MMP-3、MMP-13 発現は膝関節切片の免疫組織化学染色により評価した。また、関節炎における HA の局在を評価するために HA を染色する HABP 染色を行った。マウスの血清中の HA 濃度は HA binding assay にて測定した。

5 人の関節リウマチ患者から FLS を単離した。FLS を tumor necrosis factor- α (TNF α) (10ng/ml) で刺激し、同時に 4-MU (0-1.5mM) または hyaluronidase (10 units/ml) または 4-MU (1.0mM) + HA (25 μ g/ml) で 12 時間処置後、mRNA を採取、タンパクは 24 時間処置後に採取した。MMP-1、MMP-3 の mRNA 発現を real-time PCR で、タンパク発現を Western blotting にて測定した。また、4-MU の効果がヒアルロン酸合成阻害を介したものであるかどうかを評価するため、ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) を siRNA で knockdown (HAS1、HAS2、HAS3 の単独の knockdown もしくは 3 つ同時の triple knockdown) し、TNF α (10ng/ml) により刺激後 12 時間で mRNA を採取、MMP-1、MMP-3 の mRNA 発現を real-time PCR で測定した。また、細胞周囲、細胞内、培地における HA 濃度を HA binding assay で測定した。滑膜細胞で

の HA の分布を評価するため、HABP 染色を行った。4-MU の FLS に対するアポトーシス効果を TUNEL 染色、細胞活性に対する効果を WST-1 assay で評価した。

【結果】

in vivo において 4-MU の経口投与は濃度依存性に CIA マウスの関節炎スコアを低下させ、3mg/g 群で有意な効果を示した (Figure 1A)。また、手指の腫脹も 3mg/g 群で有意に小さかった (Figure 1B)。膝関節切片の HE 染色による組織学的評価において、コントロール群で見られる炎症細胞の浸潤、滑膜の増生、骨破壊が、4-MU 投与により抑制され、その組織学的スコアも濃度依存性に低下した (Figure 2A,B)。

また、膝関節軟骨における MMP-3、MMP-13 の発現も 4-MU により低下し、その発現の割合も有意に減少していた (Figure 3A,B)。滑膜の骨への浸潤部位における MMP-3、MMP-13 の発現も 4-MU により抑制された (Figure 3C,D)。膝関節の HABP 染色において、コントロール群で見られる滑膜細胞の骨への浸潤部位における HA の集積は 4-MU 投与群で低下し、正常マウスと同程度の染色性であった (Figure 4A)。マウス血清の HA 濃度はコントロール群で正常マウスより有意に上昇していたが、4-MU により正常マウスの濃度まで低下した (Figure 4B)。

in vitro において TNF α の刺激で上昇した FLS の MMP-1、MMP-3 の mRNA 発現は 4-MU により濃度依存性に低下し、hyaluronidase 処置でもその発現は低下したが、その 4-MU の効果は HA の添加では打ち消されなかった (Figure 5A)。MMP-1、MMP-3 のタンパク発現に関しても、4-MU により濃度依存性に低下した (Figure 5B)。HAS mRNA の knock down によるヒアルロン酵素抑制試験において、HAS の単独の knock down では MMP-1、MMP-3 の mRNA 発現は抑制されなかったが、HAS1、HAS2、HAS3 の triple knock down では上昇した MMP-1、MMP-3 の mRNA 発現は有意に低下した (Figure 5C)。HABP 染色において、TNF α で刺激した FLS で増強された HA の染色性は 4-MU により低下した (Figure 6A)。培地、細胞周囲の HA 濃度は、TNF α の刺激で上昇したが、4-MU により濃度依存性に抑制され、hyaluronidase 処置でも抑制された (Figure 6B)。一方で、細胞内の HA 濃度は 4-MU により影響を受けなかった。FLS に対する 4-MU の有意なアポトーシス効果は、認められなかった (Figure 6C)。また、4-MU は FLS の細胞活性にも影響を与えなかった (Figure 6D)。

【考察】

本研究における 4-MU の関節炎抑制効果が HA の合成阻害作用を介したものが 4-MU の直接的作用によるものかが本研究の一番の論点となる。そこで我々はヒトの FLS においてヒアルロン酸合成酵素である HAS を siRNA で Knockdown することで検証した。ヒトの HAS は HAS1、HAS2、HAS3 の 3 種類が存在しており、それぞれ違う分子量の HA を合成している。本研究において、HAS の単独の Knockdown では MMP の発現の抑制は認められなかったが、HAS の 3 つすべての Knockdown では 4-MU を投与したときと同様に MMP の発現の抑制がみられた。このことは

HAS1,HAS2,HAS3 が合成する HA はそれぞれ関節炎の発症や進展に重要な役割を担っている可能性を示唆し、また、4-MU の関節炎抑制効果が HA 合成阻害を介したものであることを示唆する。また、本研究において hyaluronidase 処置で FLS の MMP 発現が抑制されたこともこの仮説を支持する。

4-MU の関節炎抑制効果がアポトーシスを介したものである可能性がある。しかし、過去の報告において TNF α で刺激された RA 患者の滑膜細胞は抗アポトーシス作用を有することが示されており、一方、本研究では FLS のアポトーシス活性は 4-MU で増強されず、細胞活性は減弱しなかったことより 4-MU の関節炎抑制効果が滑膜細胞のアポトーシスを介したものである可能性は低いと思われる。

HA が関節炎の発症や進展にどのように関与しているかはまだ詳細にはわかっていないが、ヒアルロン酸の受容体である CD44 と HA との相互作用が RA の炎症過程に関与している可能性を示唆する報告はいくつか存在する。CD44 は T 細胞の活性化、単球からのサイトカインの放出、線維芽細胞の移動、白血球の血管内皮への接着に関与し、RA 患者の滑膜組織は関節症や外傷患者の滑膜組織より CD44 の発現が高く、CD44 の発現は炎症の程度と相関すると報告されている。さらに CIA モデルにおいて抗 CD44 抗体の投与が滑膜炎と関節破壊を抑制したと報告されている。また、一方で CD44-knockout マウスは正常マウスにくらべ関節炎が増悪したという報告もあるが、CD44-knockout マウスはより多くの HA が滑膜組織に蓄積されたと報告しており、HA の蓄積が関節炎に重要な役割を担っていることを示唆する。本研究の CIA マウスにおける滑膜への HA の集積は、このことを支持する結果である。また、本研究において 4-MU の FLS における MMP 抑制効果が HA の添加で打ち消されなかったのは、外因性の HA ではなく、細胞結合型の内因性 HA が関節炎の病態に関与していることを示唆する。

【結論】

CIA マウスにおける 4-MU による関節炎の抑制は HA が関節炎の病態形成において重要な役割を果たすことを示している。4-MU は HA 合成抑制を介して効果を発現していたと考えられ、関節炎の新たな治療薬となる可能性がある。