

主論文の要旨

**Metabolic changes in synovial cells in early
inflammation: Involvement of CREB phosphorylation
in the anti-inflammatory effect of 2-deoxyglucose**

炎症初期の滑膜細胞の代謝変化：
2-deoxyglucose の抗炎症効果における CREB のリン酸化の関与

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

岸本 賢治

【緒言】

関節リウマチ(RA)は関節内の滑膜の炎症と増殖を特徴とし、炎症が持続すると関節軟骨や骨の破壊を引き起こす疾患である。近年、抗リウマチ薬の進歩により、寛解状態に到達できる患者が多くみられるようになった。その一方で、RAはその病因が明らかになっておらず、完治する治療が確立されていない。また抗リウマチ薬の使用による合併症のリスク増加や薬剤による経済的負担などの問題がある。以上よりRAの発症予防、治癒を可能とする新しい治療法が求められている。

近年、RAの病態において、免疫における代謝の関与が指摘されている。RAの特徴として関節内の滑膜増生があるが、炎症下の滑膜細胞では腫瘍細胞でみられる代謝(Warburg効果)と同じような代謝の変化が起き、細胞増殖が起きている。我々はRAの滑膜細胞におけるこの代謝について注目した。

生体内の細胞はグルコースなどの高分子を分解して、エネルギー分子であるアデノシン三リン酸(ATP)を産生する。グルコースを分解してエネルギーを産生する際、通常では酸素を消費してミトコンドリアの酸化的リン酸化によってATPを産生する好気性解糖系が使用されるが、炎症下では酸素を消費せずATPを産生する嫌気性解糖(glycolysis)が亢進する。これまでにRA患者から採取した滑膜細胞ではglycolysisが亢進していること、またglycolysis阻害剤が抗炎症効果を持つことが報告されている。過去の研究では関節手術の際に採取された末期RAの滑膜細胞を用いた研究が行われてきており、正常の状態や炎症初期の滑膜細胞の代謝についての報告はない。本研究では健常なウシから採取した滑膜を用いることで、関節炎を有していない状態や炎症の初期段階での滑膜細胞の代謝変動について検討した。またglycolysis阻害剤の抗炎症効果の機序については全容解明に至っておらず、本研究ではその機序についても検証した。

【対象および方法】

健常なウシのMTP関節より、関節滑膜を採取し、コラゲナーゼを用いて、滑膜細胞を単離培養した。滑膜細胞にリポポリサッカライド(LPS)を添加して炎症を惹起し、細胞外フラックスアナライザー(XFp)を用いて、代謝変化を評価した。また炎症下の細胞内の代謝産物を質量分析機器で評価した。

次にglycolysis阻害剤である2-deoxyglucose(2DG)をLPSと同時に添加し、その抗炎症効果と代謝解析を行った。mRNAおよびタンパクの発現は、それぞれreal-time PCRおよびwestern blotting法で評価した。glycolysisの代謝産物である乳酸の産生量をlactate assayで評価した。

また2DGの抗炎症効果のシグナル経路の探索のため、nuclear factor-kappa B(NFκB)、adenosine monophosphate-activated protein kinase(AMPK)、cAMP response element binding protein(CREB)のリン酸化をwestern blotting法で評価した。

【結果】

滑膜細胞に LPS を添加すると、経時的に glycolysis による ATP 産生が亢進し、ミトコンドリアの好気性代謝による ATP 産生は減少した(図 1A,B)。LPS で刺激して 4 時間後に XFp を用いて ATP の産生の割合を評価したところ、刺激をしていない滑膜細胞では好気性代謝による ATP 産生が優位であったが、刺激をした滑膜細胞では glycolysis による ATP 産生が優位であった(図 1C)。また LPS 刺激後 4 時間での質量分析機器による細胞内代謝物の解析(メタボローム解析)では、コントロール群と比較して glycolysis の代謝産物であるフルクトース 1,6 ビスリン酸や乳酸が増加した(図 1D,E)。

LPS 刺激と同時に 2DG を投与すると glycolysis による ATP 産生は低下した(図 2A)。lactate assay では LPS 刺激により、培養液中の乳酸は増加し、2DG はその増加を抑制した(図 2B)。炎症性サイトカインである IL-1 β やタンパク分解酵素である MMP1 の mRNA やタンパクの発現は LPS 刺激で亢進し、2DG はその亢進を抑制した(図 2C-F)。

次に 2DG の抗炎症効果のシグナル経路の探索のため、NF κ B、AMPK のリン酸化の評価を行ったが、2DG との関与はみられなかった。一方、CREB は LPS によって、リン酸化が亢進し、2DG によってリン酸化が抑制されていた(図 3A)。また CREB の阻害剤である 666-15 を LPS 刺激と同時に投与したところ、LPS で亢進した IL-1 β と MMP1 の mRNA の発現は抑制された(図 3B,C)。

【考察】

これまでの滑膜細胞の代謝研究は、RA 末期の滑膜が研究に用いられたものが多かった。本研究では滑膜細胞の非炎症状態と炎症初期の代謝について示した。また本研究では glycolysis 阻害剤である 2DG の抗炎症効果と CREB のリン酸化の関与について示した。

非炎症下の滑膜細胞では glycolysis による ATP 産生は 15%程度であったが、LPS によって炎症を惹起させると 64%まで上昇した。一方で、LPS 刺激によりミトコンドリアの好気性代謝による ATP 産生は大きく低下した。またメタボローム解析でも炎症下では glycolysis の代謝産物の増加を認めたことから、滑膜細胞に炎症が起きると劇的に細胞内の代謝が変化していることが分かった。

過去の報告と同様に、本研究の炎症初期の状態でも glycolysis 阻害剤は抗炎症効果を示した。本研究では炎症や代謝に関連する因子である NF κ B、AMPK、CREB のリン酸化を評価した。NF κ B、AMPK と 2DG の関与はみられなかった一方、転写因子である CREB は LPS によって亢進したリン酸化が 2DG によって抑制されていた。CREB は cyclic AMP など様々な細胞外シグナルによってリン酸化し、活性化する。活性化した CREB は CREB binding protein と結合すると、細胞の histone acetyltransferase(HAT)活性が亢進し、転写が促進する。CREB は細胞周囲が acidosis になることによっても活性化すると報告されている。図 2A,B に示すように、2DG の投与により、glycolysis の最終代謝産物である乳酸の産生が抑制され、細胞外の acidosis が是正されていた。2DG の抗炎症効果の機序の一つとして、glycolysis 阻害により、細胞外の acidosis が是正さ

れ、CREB 活性が抑制され、HAT 活性が低下し、炎症性サイトカインやタンパク分解酵素の転写が抑制され、炎症が抑制されたと考えられた。

【結語】

本研究では健常な滑膜細胞を用いて、炎症初期から滑膜細胞に代謝の変化が起きていることを示した。非炎症下での滑膜細胞ではミトコンドリアによる ATP 産生が優位である一方、炎症下では glycolysis 優位の ATP 産生に変化していた。また glycolysis 阻害剤の抗炎症効果の機序に CREB のリン酸化の関与を示した。