

主論文の要旨

Hyaluronan Inhibits Tlr-4-Dependent RANKL Expression
in Human Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts

高分子ヒアルロン酸は Toll Like Receptor 4 による
RANKL 発現亢進を、CD44 を介して抑制する

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 整形外科分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

渡部 達生

【緒言】

関節リウマチ(RA)は滑膜増生と関節内の骨軟骨破壊を呈する慢性炎症性疾患である。メソトレキサートや生物学的製剤などのさまざまな抗リウマチ薬の登場によって、炎症の消失である臨床的寛解は現実的な目標となった。しかしながら、生物学的製剤などによっても完全なる臨床的寛解や関節破壊の抑制は不可能である。RAの機序は不明である。近年では関節炎において、Toll like receptor(TLR)が炎症誘導に重要であるとされている。

TLRはパターン認識受容体であり、自然免疫を担っている。そしてRAの滑膜線維芽細胞において、TLR3とTLR4の亢進がみられる。

破骨細胞は造血幹細胞由来の多核巨細胞であり、RAにおける関節内骨破壊の主要な役割を担っている。RA関節におけるびらんには、多くの破骨細胞がみられる。Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)はTNFファミリーに属し、破骨細胞の分化・活性化するサイトカインである。RAにおいて、炎症や関節破壊の主体は滑膜であり、滑膜線維芽細胞にてRANKLの発現亢進がみられる。

ヒアルロン酸はN-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の二糖単位が連結した構造であり、細胞外マトリクスの機能維持に重要な役割を担っている。近年では高分子ヒアルロン酸(HMW-HA)の炎症抑制効果が示されている。

本研究では、RA滑膜線維芽細胞における、Lipopolysaccharide(LPS)刺激によるTLR4経路を介するRANKL発現亢進と、HMW-HAにおけるRANKL発現の抑制効果について検討した。

【対象及び方法】

1987年アメリカリウマチ学会のリウマチ分類基準を満たし、全人工膝関節置換術を施行した5例から滑膜線維芽細胞を採取した。名古屋大学医学系研究科・医学部附属病院の生命倫理委員会より承認を受け、患者からは文書での説明と同意を取得した。全人工膝関節置換術の際に滑膜組織を採取した。組織は4-5mmの切片とし、4mg/mlのtype I collagenase (Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA)を含むDulbecco's modified Eagles's medium (DMEM)で12時間培養後に遠心分離し、滑膜線維芽細胞の分離・培養を行った。

Lipopolysaccharide (LPS)はSIGMA-ALDRICH (Missouri, USA)、高分子ヒアルロン酸は科研製薬(東京、日本)より購入し、以下の抗体を使用した。anti-TLR4 (Abcam, UK), anti-CD44 (Ansell, Minnesota, USA), anti-ICAM-1 (Beckman Coulter, Marseille, France), anti-beta-actin (Cell Signaling, USA), anti-RANKL (Abcam, UK)。

mRNAの計測はRT-PCR法で行った。RNeasy Mini Kit(Qiagen, Germany)を用いてRNAを採取し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA)を用いてcDNA作成した。RT-PCRはLight cycler System with FastStart Master SYBR Green PLUS (Roche, USA)を用い、RANKL, GAPDHのp

ライマーを使用した。

タンパクレベルの計測は Western blotting 法で行った。Cell Lysis Buffer (Cell Signaling, USA)を使用してタンパクを採取した。10%SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体に anti-beta-actin と anti-RANKL を使用した。

【結果】

LPS による RANKL 発現亢進を検討した。Fig1A に示すように、LPS による 12 時間の刺激で RANKL の mRNA 発現は亢進し、これは用量依存的であった。タンパクレベルでも、同様の結果であった (Fig1B)。その効果が TLR4 経路であることを示すために、aTLR4 抗体であらかじめ 1 時間ブロッキングすると、この mRNA 発現亢進は抑制された (Fig 1C)。

HMW-HA による前処置にて LPS により誘導される RANKL mRNA 発現亢進は抑制され、用量依存的であった (Fig 2)。また、HMW-HA 単独では何も効果はなかった。主要な HA 受容体である CD44 及び ICAM-I をそれぞれの抗体で 1 時間ブロッキングして刺激した。抗 CD44 抗体前処置にて、この HMW-HA の抑制効果は打ち消された。一方で抗 ICAM-I 抗体前処置では HMW-HA の抑制効果に変化を認めなかった (Fig3)。Western blotting でも同様に、抗 CD44 前処置で HMW-HA の抑制効果は打ち消されたが、抗 ICAM-I 抗体前処置では抑制効果に変化を認めなかった (Fig3)。

【考察】

RANKL は破骨細胞の分化・活性に重要な役割を担っており、RA における関節破壊と密接に関わっている。RA の滑膜線維芽細胞にて RANKL の発現亢進がみられ、抗 RANKL 抗体であるデノスマブは、RA での関節破壊抑制効果が報告されている。

RANKL 発現亢進は TLR-2 と TLR-4 を経由して亢進する。特に TLR-4 経路では、RA の早期・晩期ともに病因に関与している。今回、滑膜線維芽細胞において RANKL 発現亢進は TLR-4 由来により mRNA において 40 倍の発現亢進を認めた。しかしながら、Western blotting では 30%の発現亢進しかみられなかった。これは転写後の経路に何らかの抑制経路があることを推測させる。今回の研究ではこの経路を検討しておらず、今後の検討課題である。

HA の主要な受容体は CD44 と ICAM-I である。HA の作用が CD44 か ICAM-I によるものかは細胞腫や標的遺伝子によって異なる。抗 CD44 抗体前処置にて、RANKL 発現に対する HMW-HA の抑制効果は打ち消された。さらにこの抑制効果は ICAM-I 受容体を経ないことを本研究で示した。これらから、滑膜線維芽細胞における TLR-4 経路の RANKL に対する HA 抑制効果は CD44 が関わっていることが示される。マウス骨髄間葉系細胞を用いた実験で、CD44 を介する HA による RANKL 抑制は Rho キナーゼが関与しているとの報告があり、HA による抑制効果において、CD44 は重要な役割を担っていると推測される。

HA の関節内注射はリウマチ罹患関節において疼痛の軽減させることは知られているが、その機序は不明である。RA 患者の滑液中の HA 濃度は健常人よりも低いとの報告がある。われわれの研究において、HA 濃度 1mg/ml という比較的健常人と同等の濃度において RANKL 発現を抑制した。関節内の HA 濃度を正常に保つことにより、RANKL 発現が抑制され、関節破壊を予防する可能性がある。

【結語】

本研究において、RANKL は TLR4 経路で亢進し、HMW-HA はこの効果を阻害することを確認した。近年 RA 治療に対して TNF- α や IL-6 などの特定のサイトカインを標的とする生物学的製剤が著明な効果を示しているが、炎症や関節破壊の抑制は完全ではない。他の経路の関わりが推測される。今回の我々の研究が新たな RA 治療の選択肢を提供する可能性がある。