

主論文の要旨

Hyaluronan Oligosaccharides Induce MMP-1 and -3 via Transcriptional Activation of NF- κ B and p38 MAPK in Rheumatoid Synovial Fibroblasts

ヒアルロン酸オリゴ糖は関節リウマチ滑膜線維芽細胞において
NF- κ B と p38 MAPK を介して MMP-1 と MMP-3 の発現を誘導する

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：西田 佳弘 准教授)

花林 雅裕

【緒言】

関節リウマチ(RA)は滑膜増生と慢性炎症によって関節の骨軟骨破壊を特徴とする疾患である。リウマチ滑膜線維芽細胞(RSFs)からは、骨軟骨破壊の主要な酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、特に MMP-1 と MMP-3 の産生が亢進している。

細胞周囲にはヒアルロン酸(HA)とそれに結合するプロテオグリカンに満たされた細胞外基質が存在し、細胞表面の CD44 を主要なレセプターとして HA は細胞と結合し恒常性維持に関わっている。HA は N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の繰り返し構造からなる高分子多糖(高分子 HA; HMW-HA)であり、HMW-HA に対し多数の CD44 が集簇して結合する。一方 HA₆~10 糖鎖の HA オリゴ糖(HAoligos)は HMW-HA と競合して CD44 と各々結合する結果、CD44 は離散して細胞内シグナル伝達が誘導される。CD44 は膜貫通型受容体であるがキナーゼ活性を持たず、細胞内ドメインに結合する細胞骨格分子などのタンパク質の活性化によりシグナル伝達が誘導されると考えられている。

細胞外 HA の減少が軟骨細胞の MMP 産生を誘導し、また RA 患者では滑膜組織の HA 濃度の減少が報告されていることから、RSFs においても細胞外 HA の減少が MMP 産生を誘導するのであれば、RA の骨軟骨破壊に関与する可能性がある。

そこで本研究は、CD44 と HMW-HA の相互作用を阻害し細胞外 HMW-HA の減少を模倣する手段として HAoligos を用い、RSFs における MMP 産生とそれに関わる CD44 を介したシグナル伝達を検討した。

【対象及び方法】

1987 年 ACR リウマチ分類基準を満たす RA 患者 6 例の、人工膝関節置換術の際に採取した滑膜より RSFs を分離培養した。名古屋大学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。

ヒト臍帯由来の HMW-HA を牛精巣由来の hyaluronidase で分解し、透析により 6 糖鎖を主とした HAoligos を作成、主に 250 μ g/ml で使用した。

HAoligos の RSFs 周囲 HA に対する作用を確認するため、HAoligos を 3 時間作用後パラホルムアルデヒドで固定し、HA₁₀ 糖鎖単位で結合親和性のあるビオチン標識 HA binding protein を反応させ、ビオチンと親和性のあるペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと発色基質のジアミノベンジジンで免疫染色を行った。

HAoligos による RSFs の MMP-1 と MMP-3 発現は、0~500 μ g/ml で HAoligos を作用、12、24 時間後の mRNA 発現を RT-PCR 法で、24 時間後の培養溶液中への産生を Western blot 法で、産生された MMP の酵素活性を Casein zymography 法で確認した。MMP 産生に関わる HAoligos の受容体の確認には、抗 CD44 抗体又は抗 TLR-4 抗体各々 5 μ g/ml を 1 時間前処置した。細胞内シグナル伝達経路は、HAoligos を 0~120 分作用し、NF- κ B、MAPK のリン酸化を Western blot 法で確認した。シグナル伝達阻害では、NF- κ B の選択的阻害剤(helenalin)と p38 MAPK の選択的阻害剤(SB203580)を 1 時間

前処置した。HAoligos により誘導された作用に対する HMW-HA の添加効果を、HAoligos 処置 1 時間後に 1mg/ml の HMW-HA を 12 時間作用させ確認した。

【結果】

RSFs に HAoligos を添加し HA の免疫染色をすると、control (Fig 1A)と比較し、HAoligos (Fig 1B)及び hyaluronidase (Fig 1C)作用で染色性は低下した。これらより作成した HAoligos が細胞周囲の HMW-HA を排除しうることを示された。

次に HAoligos による RSFs の MMP-1 と MMP-3 発現を確認した。結果は MMP-1、MMP-3 とともに 250 μ g/ml まで容量依存性に mRNA の発現が誘導され(Fig 2A)、同様に培養溶液中への MMP 産生も認められ(Fig 2B)、産生された MMP の酵素活性も確認された(Fig 2C)。これらより HAoligos が MMP-1 と MMP-3 の mRNA 発現とタンパク質レベルでの産生亢進に影響を及ぼすことが示された。

さらに、Toll like receptor (TLR) -4 も HAoligos を認識することから、HAoligos による MMP 産生への各受容体の関与を確認した。結果は TLR-4、CD44 どちらの受容体に対する抗体処置においても MMP-1 と MMP-3 の mRNA 発現は有意に抑制され(Fig 3)、TLR-4 も関与するものの、CD44 は確かに HAoligos による MMP 発現亢進に関わることが示された。

次に MMP 発現に関わる細胞内シグナル伝達経路を確認した。抗 TLR-4 抗体前処置にて TLR-4 を介した影響を除外し HAoligos を作用すると、NF- κ B と p38 MAPK のリン酸化は control より有意に亢進する一方、ERK と JNK では有意差がなく(Fig 4A and 4B)、TLR-4 以外を介した HAoligos の作用は NF- κ B と p38 MAPK 経路を活性化することが示唆された。

そこでこれら経路が HAoligos による MMP の産生亢進に関わるのか確認すると、どちらの経路の阻害剤処置においても濃度依存的に培養溶液中の MMP-1 と MMP-3 は減少し(Fig 5)、HAoligos による MMP-1 と MMP-3 の産生亢進は NF- κ B と p38 MAPK 経路の関与が示唆された。

最後に HAoligos により誘導された MMP の mRNA 発現亢進に対する HMW-HA 作用の効果を確認すると、MMP-1、MMP-3 とともに mRNA のレベルは有意に減少した(Fig 6)。

【考察】

本研究は CD44 と HMW-HA の相互作用を阻害する目的で HAoligos を用い、RSFs 周囲の HMW-HA 減少が MMP-1 と MMP-3 の産生を誘導することを示した。軟骨細胞における同様な報告はあるが、RA の病態からは RSFs での作用がより重要である。

HA の受容体として CD44 の他に多くの細胞表面分子が報告されている。本研究では TLR-4 も関与していたが、さらにその他受容体を介している可能性もある。

MMP 産生に関わる細胞内シグナル伝達経路には、NF- κ B と MAPK ファミリーが関わっている。HAoligos によるものは軟骨細胞で NF- κ B と p38 MAPK が、歯周靭帯細

胞で p38 MAPK の関与が報告されており、細胞種によりシグナル伝達経路が異なる可能性が考えられる。

HAoligos は MMP 産生誘導のみならず、軟骨細胞では細胞外基質の修復を促す作用も報告されており、RSFs における他の作用の検討が今後の研究課題である。

近年 RA 治療に対し炎症性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す一方、関節破壊の完全な抑制は現在も達成されず、他の要素の関与が推測される。本研究の結果は、関節内 HA の減少が RA の病態形成に関わる可能性を示唆している。

HMW-HA は元々生体内に存在し、合成分子化合物よりも生物学的影響や副作用の点で有利な薬剤となり得る。RA 患者への HA 関節内注射の関節破壊抑制効果に関する報告は少ないが、減少した HA 濃度の正常化は過剰産生された MMP を減少させる可能性がある。

【結語】

HAoligos を用いた RSFs における CD44 と HMW-HA の相互作用阻害は、NF- κ B と p38 MAPK を介して MMP-1 と MMP-3 の産生を亢進させることを示した。本研究は RSFs 周囲の HA 濃度減少が関節破壊を導くことを示し、RA 患者への関節内 HA 注射の効果を新たに証明する可能性がある。