

学位論文題名

Macrophage Migration Inhibitory Factor Up-regulates Expression of Matrix Metalloproteinases in Synovial Fibroblasts of Rheumatoid Arthritis

(マクロファージ遊走阻止因子は慢性関節リウマチ滑膜線維芽細胞の
マトリックスメタロプロテアーゼ発現を亢進する)

学位論文内容の要旨

慢性関節リウマチ (以下RA) は滑膜を病変の主座とする疾患であり、滑膜細胞は、様々なサイトカインや蛋白分解酵素・活性酸素等を産生して、関節破壊に中心的に関与する。細胞外基質分解酵素の一つであるマトリックスメタロプロテアーゼ (以下MMP) は現在20種類以上が同定されているが、なかでもMMP-1 (コラゲナーゼ) およびMMP-3 (ストロメライシン) がRAにおける関節構成要素 (関節包・靭帯・軟骨) の破壊に重要であり、これらは主に滑膜表層細胞よりIL-1やTNF- α によって誘導され産生されると考えられている。またMMPと結合しその活性を選択的に阻害するtissue inhibitor of metalloproteinases (以下TIMP) も滑膜細胞により産生され、MMPの活性を制御している。マクロファージ遊走阻止因子 (以下MIF) は、Tリンパ球により産生されマクロファージの炎症部位よりの散逸を抑制する因子として知られてきたが、1989年のcDNAクローニングに伴い近年各種炎症性疾患のメディエータ・細胞増殖制御因子として再評価されている。我々はRA滑膜組織においてMIFがCD45+T細胞で強く発現していること、さらにRA患者における関節液中MIF濃度が正常・変形性関節症 (以下OA) 患者に比べ高いことを既に報告したが、そのRA病態における役割は不明な点が多い。そこでMIFのRA患者由来滑膜線維芽細胞に対する作用を主にMMP産生誘導能の観点から検討した。

【方法】滑膜組織の実験的使用に関し同意の得られたRAおよびOA患者より人工膝関節置換術時に滑膜組織を採取し、0.2%コラゲナーゼ消化により得られた細胞を10%FCS・100 μ M非必須アミノ酸添加Eagle's MEMにて継代培養し、主に3代目 (播種より約14日後) に滑膜線維芽細胞として使用した。培地より血清を除去した後ヒトrMIFを添加し、1) MMP-1・3、TIMP-1、転写因子AP-1を構成する*c-jun*・*c-fos*、及びIL-1 β のmRNA発現 2) MMP-1・3 mRNAの誘導に対する各種のシグナル伝達阻害剤の効果 に関しノーザンブロット法で検討した。さらにrMIF添加後のRA・OA細胞の培養上清中MMP-1濃度に関しELISA法で検討した。またMIFの有するisomerase活性にはN端側第1prolineが重要とされているが、これをalanineに置換した変異体 (P1A mutant) をsite-directed mutagenesis technique

により作製し、そのMMP誘導活性の差異も併せて検討した。統計学的解析は分散分析を用い、Fisher's PLSDをポストホックテストとし有意水準を $p < 0.05$ とした。

【結果】 1) MIFは濃度依存的にMMP-1・3のmRNA発現を添加約6時間後より誘導し、24時間後ピークに達した。MMP-1・3の非刺激時レベルおよびMIFによる誘導の程度はOAよりRA由来細胞で強かった。TIMP-1の発現は不変ないし僅かに増強された。またMIF ($1 \mu\text{g/ml}$) 添加30分後に*c-jun* mRNA発現が増加し、以後漸減して6時間後無刺激時レベルに戻った。また添加30分後に*c-fos* mRNAが一過性に増加した。IL-1 β の発現も濃度依存的に増加し、6時間でピークに達した後漸減した。2) MIF ($1 \mu\text{g/ml}$) によるMMP-1・3の誘導はチロシンキナーゼ阻害剤 (genistein $10 \mu\text{M}$ 及びherbimycinA $1 \mu\text{M}$)、プロテインキナーゼC (以下PKC) 阻害剤 (H-7 $10 \mu\text{M}$ 及びstaurosporine 100nM)、AP-1結合阻害剤 (curcumin $10 \mu\text{M}$) の同時添加により阻害された。cyclicAMP依存性プロテインキナーゼA阻害剤 (H-8 $1.5 \sim 15 \mu\text{M}$) の添加はMMPの誘導に影響を与えなかった。IL-1レセプターアンタゴニスト ($10\text{nM} \sim 1 \mu\text{M}$) の添加もMMPの誘導に影響を与えず、MIFのMMP誘導作用は少なくとも内因性IL-1の作用を介していないことを示唆した。3) $1 \mu\text{g/ml}$ のMIF添加により培養上清中のMMP-1濃度は有意に増加し (RA: $p < 0.0001$, OA: $p < 0.005$)、この増加はOAよりRA由来細胞で有意に大きかった ($p < 0.0005$)。P1A mutantはMMP-1・3の誘導活性を示さなかった。

【考察と結論】 MIFのMMP誘導活性に関する報告は本研究が嚆矢である。MMP-1とMMP-3はそのpromotorがTRE (AP-1結合領域) およびPEA-3 (Ets結合領域) を有する類似した構造を持っているため、MIFによる誘導とその阻害のパターンが共通していたのも頷ける。またTIMP-1プロモーターもTREが複数有り、細胞の条件によってはMIFにより誘導されると思われる。RAの滑膜細胞は、転写活性の亢進を特徴としており、この原因としてretrovirusによる感染とそれにより持ち込まれるproto-oncogene (*sis*, *myb*, *myc*, *ras*, *jun/fos*等) の関与が示唆されている。結果に示したRA細胞とOA細胞のMIFに対する反応性の相違はこうした原因によると思われる。

本結果より、MIFのMMP-1・3誘導は、PKC/チロシンキナーゼを介し、*c-jun/c-fos*の誘導を経て、主にAP-1により調節されていることが示された。PKCはIL-1やTNF- α によるAP-1結合の促進やMMP-1・3の転写誘導に関与するとされている。またherbimycin Aは非レセプター型チロシンキナーゼである*src* familyに強く選択的であり、さらに*src*がPKCの基質であり、例えば β -adrenergic receptorからのシグナル伝達はPKCによる*src*のリン酸化を主に利用する等の報告もあることから、MIFによる刺激により起こる細胞内イベントの初期にはPKCの活性化と*src* familyのリン酸化が重要である可能性がある。一方MMP-1の転写にはAP-1とともに転写調節因子Etsも重要とされており、この関与の検討は今後の課題である。またMIFの生物活性はそのisomerase活性と強く関連するとの報告があり、本研究の結果もそれを支持したが、MIFが細胞に作用を及ぼす過程でどのように酵素活性と結びつくのかは全く不明であり、MIF受容体の解析が必須である。

抗原提示を受けたT細胞は滑膜内に浸潤しTh1/Th2に大別されるリンフォカインを産生するが、MIFもその一つであることが近年明らかにされており、サイトカインネットワークの中心に位置して、滑膜マクロファージのIL-1 β ・TNF- α や本研究が示した如く滑膜線維芽細胞のMMP・IL-1 β 産生を促し、関節炎・関節破壊に強く関与することが推測される。

またMikulowskaらはRAモデルであるII型コラーゲン誘発関節炎マウスに抗MIF抗体を投与し、関節炎の著明な改善と抗II型コラーゲン抗体価の減少を報告した。以上の結果は、MIFがRA治療のターゲットになりうることを示しており、MIFの抑制によるRAに対する新たな治療のアプローチが可能になると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Macrophage Migration Inhibitory Factor Up-regulates Expression of Matrix Metalloproteinases in Synovial Fibroblasts of Rheumatoid Arthritis

(マクロファージ遊走阻止因子は慢性関節リウマチ滑膜線維芽細胞の
マトリックスメタロプロテアーゼ発現を亢進する)

慢性関節リウマチ（以下RA）の滑膜組織において、滑膜細胞は、様々なサイトカインや蛋白分解酵素等を産生し、関節破壊に中心的に関与する。我々はRA滑膜組織においてMIFがCD45(+)T細胞で強く発現しており、RA患者の関節液中MIF濃度が正常・変形性関節症（以下OA）患者に比べ高いことを報告したが、そのRA病態への関与は不明な点が多い。そこでMIFのRA患者由来滑膜線維芽細胞に対する作用を主にマトリックスメタロプロテアーゼ（以下MMP）との関連で検討した。RAおよびOA由来の滑膜線維芽細胞にヒトrMIFを添加し、MMP-1・3等のmRNA発現、およびその誘導に対する各種シグナル伝達阻害剤の効果に関しノーザンブロット法で検討した結果、MIFは濃度依存的にMMP-1・3、及びIL-1 β のmRNA発現を6時間後より誘導し、これらの誘導の程度はOAよりRAで強かった。TIMP-1の発現は僅かに増強した。またMIF（1 μ g/ml）添加30分後にc-junおよびc-fosのmRNA発現が一過性に増強した。チロシンキナーゼ阻害剤、PKC阻害剤、AP-1結合阻害剤の添加によりMIFによるMMP-1・3の誘導は阻害されたが、cAMP依存性PKA阻害剤及びIL-1レセプターアンタゴニストの添加はMMPの誘導に影響を与えなかった。培養上清中MMP-1濃度をELISAにて測定した結果、1 μ g/ml以上のMIF添加により培養上清中のMMP-1濃度は有意に増加し、増加の程度はRAがOAより有意に高かった。核抽出タンパクのAP-1結合活性に関しゲルシフト法で検討した結果、MIF添加5分後よりAP-1結合活性は著明に増加し、このバンドは抗c-jun抗体によりスーパーシフトした。またMIFのN端側第1prolineをalanineに置換した変異体はMMP-1・3の誘導活性を示さなかった。MIFのMMP誘導活性に関する報告は本研究が嚆矢であり、以上よりMIFはRAにおいてIL-1 β やMMP-1・3を介し関節の炎症と破壊に関与していること、MIFのMMP-

1・3誘導はその情報伝達にチロシンキナーゼ、PKC、AP-1を介し、IL-1非依存的であること、またMIFのMMP誘導活性はN端側第1prolineが重要であることが示された。近年II型コラーゲン誘発関節炎マウスに対する抗MIF抗体の著明な抗炎症効果が報告されており、以上の結果より、MIFをターゲットとしたRAの新たな治療のアプローチの展開が期待される。吉木教授より、MIFがMMPの発現を制御するという知見は今まで無かったもので非常に興味深いとのコメントがあり、1) OAとRAの滑膜細胞の違い、2) RAの病状と関節液中MIF濃度との間の相関、3) MIFのレセプターの解明の現状、4) MIFのregulation、5) 抗MIF抗体の全身投与の問題点、等の質問があり、1) OAの滑膜細胞は本質的には正常と考えてよく、一方RAの滑膜細胞はウイルス感染などの病態修飾により外来遺伝子が持ち込まれて活性化しており、transformしたもので本質的に違うと考えられる、2) 印象としてはおおむね相関している、3) 未だ報告はなく、最近MIFがendocytosisにより細胞内に取り込まれるとの報告があり、従来のレセプターが介在する情報伝達とは異なる様式かもしれない、4) 成長因子、血清、hypoxia等での誘導の報告がある、5) ラット肝炎モデルや肺炎モデルで投与が行われているが特に問題はないようである、との回答があった。石橋教授より、1) コントロールとしてOAは適切か、2) シグナル伝達経路はinhibitorを使った間接的アプローチだが、今後どのように進めるのか、3) isomerase活性がMMPをregulationする機序は、等の質問があり、1) 本来は正常滑膜細胞が適切だが採取が困難であり、またestablishされた線維芽細胞のcell lineではMIFに反応したものはなかった、2) この系は継代数やoriginの患者さんの病態などにより反応があまり安定しないため、現在別な細胞の系を用いて詳細な解析をしている、3) 不明であるが、isomerase活性そのものより、第1プロリンをmutationさせることによるconformationalな変化の結果との説もある、との回答があった。三浪教授より、1) 現在RAの抗サイトカイン療法としては抗TNF- α 抗体が有望視されているが、MIFを標的にするのはそれに比べどうか、2) チロシンキナーゼやPKCは情報伝達経路の上流で作用すると思われるが、下流では何が働くか、との質問があり、1) 抗TNF- α 抗体が効くのはTNF- α がサイトカインカスケードその中でかなり上流に位置するためだと考えられているが、最近MIFがTNF- α をさらに上流でregulationしているというevidenceの報告が相次いでおり、かなり有望ではないかと思われる、2) 別な細胞の系であるが、MIFはERK1/2によるJunのリン酸化を介してMMPを誘導する知見を得た、との回答があった。

この論文は、慢性関節リウマチの関節破壊病態に新しい知見をもたらした点で高く評価され、今後のリウマチ病態への更なる関与の検討や、新しい治療に向けた臨床応用の研究への展開が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。