

学位論文題名

犬変形性関節症に対する病態修飾薬(Disease modifying osteoarthritis drugs; DMORDs)の効果発現機序に関する基礎的検討

学位論文内容の要旨

変形性関節症(OA)の分子生物学的な病態に関する研究が進むにつれ、OAを本質的に改善する変形性関節症病態修飾薬(disease modifying osteoarthritis drugs, DMOADs)が注目されている。これら薬剤はOAの特徴的病態である軟骨の変性・消失を遅延・改善する効果を持つと考えられているが、それらの臨床効果発現に関する詳細な作用機序は不明である。そこで、本研究では、犬のDMOADsあるいはそれに準ずると考えられているテポキサリン、ポリ硫酸ペントサンナトリウム(PPS)およびヒアルロン酸(HA)について、これら薬剤の臨床効果発現機序を解明することを目的とした。

第1章では、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)のひとつであるシクロオキシゲナーゼ(COX)/リポキシゲナーゼ(LOX)共阻害薬テポキサリンについて、OAの特徴的病態のひとつである増殖性の滑膜炎の制御機構を、COX阻害をその作用機序とするNSAIDsであるメロキシカムおよびカルプロフェン、およびLOX特異的阻害薬AA-861と共に検討した。関節炎罹患症例犬の病的滑膜から犬培養滑膜細胞を培養し、これに対する薬剤の細胞障害性を評価した。その結果、他のNSAIDsと異なり、テポキサリンおよびAA-861は犬培養滑膜細胞に対する有意な細胞障害性を示した。また、この細胞障害性はLOXの一種である5-LOXの介在を受けてアラキドン酸から産生される5-oxoETEにより減弱された。テポキサリンおよびAA-861の細胞障害性の特徴を検討するため、ギムザ染色法、アネキシンV/ヘキスト33342による蛍光染色法およびカスパーゼ3阻害試験を行った。その結果、テポキサリンおよびAA-861の犬培養滑膜細胞に対する細胞障害性はアポトーシス誘導によるものであった。以上の結果から、COX-2選択的阻害をその主な作用機序とするNSAIDsは、OA罹患犬に対する臨床効果は鎮痛効果に限定される可能性が示唆された。テポキサリンは、炎症性増殖を示した滑膜に対する直接的な抑制効果があることが示唆された。したがって、COX/LOX共阻害薬であるテポキサリンは、OAに対する病態修飾作用を有していると考えられ、OA病態改善に有効なDMOADsとしての可能性があると考えられた。

第二章では、犬のDMOADsとして臨床応用されているPPSについてその効果発現機序を検討した。レッグ・カルベ・ペルテス病患症例犬から治療のために切除した大腿骨頭の正常と思われる軟骨から、培養細胞を得た。この犬培養軟骨細胞にインターロイキン(IL)-1 β で刺激し、関節炎における軟骨の炎症性反応を再現した。まず、PPSが軟骨代謝酵素の産生を抑制するか検討するため、OAの病態形成に重要と考えられているマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)-3の遺伝子およびタンパクの発現に対するPPSの効果を検討した。その結果、IL-1 β 刺激によるMMP-3の産生亢進をPPSが濃度依存性に抑制した。次に、MMP-3産生につながる代表的な細胞内シグナル伝達系である分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPKs)、すなわち、p38、細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)およびc-Jun N末端キナーゼ(JNK)のリン酸化に対

するPPSの効果についてウェスタンブロッティング法を用いて検討した。その結果、PPSはIL-1 β 刺激により誘起される軟骨細胞内でのp38およびERKのリン酸化を抑制し、JNKのリン酸化には関与しなかった。さらに、P38およびERKのシグナルが、核内に情報を伝達する物質である核内因子(NF)- κ Bに伝えられていることを確認するため、NF- κ Bの核内移行におけるPPSの抑制効果を検討した。その結果、IL-1 β 刺激により誘起されるNF- κ Bの核内移行はPPS存在下では有意に抑制された。以上の結果から、PPSは炎症刺激によるMAPKs、特にp38およびERKのリン酸化を抑制してNF- κ Bの核内移行を抑制し、軟骨細胞の核内におけるMMP-3産生を含む炎症性反応を抑制することが示された。この炎症反応抑制効果が、結果的にPPSのDMOADsとしての軟骨保護効果と深く関連していると考えられた。

第三章では、犬OA治療で実施されるHAの関節内投与の効果発現機序を検討するため、HAの軟骨の細胞外基質(ECM)の性状改善作用について検討した。軟骨から産生されるHAが高分子なほど、軟骨細胞のECMにおけるコラーゲンの成熟が促進され、より質の良いECM形成が誘導されるため、関節内に投与されたHAについて、その軟骨細胞における高分子HA産生促進作用を第二章と同様の*in vitro*で関節炎を再現した犬培養軟骨細胞を用いて検討した。HAを合成する3種類のHA合成酵素(HAS)がそれぞれ異なる分子量のHAを合成することに注目し、炎症環境下におけるHAS遺伝子発現様式に対するHAの効果を検討した。供試したHAは、分子量が500-1,200 kDaと6,000 kDaの2種類を用いた。犬培養軟骨細胞にHAを作用させた後、24時間IL-1 β 刺激を加えた。その後、全RNAを抽出し、リアルタイムPCR法にてHAS1、2および3、II型コラーゲン、およびアグリカンの遺伝子発現を定量した。その結果、IL-1 β 刺激はHAS1には影響せず、HAS2の遺伝子発現を低下させ、HAS3の遺伝子発現を増加させた。また、II型コラーゲンおよびアグリカンの遺伝子発現を低下させた。すなわち、炎症刺激は軟骨細胞での高分子HA産生を抑制し、低分子HA産生を促進させて軟骨ECMの質を低下させることが示唆された。分子量が500-1,200 kDaの外因性HAは、このような炎症刺激を抑制する効果が認められたが、分子量6,000 kDaのHAでは認められなかった。さらに、分子量が500-1,200 kDaの効果は、HA受容体と考えられているCD44に対する抗体IM7の競合作用を受け、抑制された。以上の結果から、適切な分子量の外因性HAは、CD44を介して細胞内における各HAS遺伝子発現を調節することで、軟骨からの産生されるHAの分子量を高め、関節軟骨のECMの性質を改善する作用を有し、この特徴によって軟骨保護効果を発揮することが示唆された。

以上の結果から、1)COX/LOX共阻害薬テポキサリンでは、一般的なNSAIDsにはない、特徴的な部分的LOX阻害能による炎症性の増殖滑膜に対する直接的な抑制効果、2)PPSでは特定の細胞内シグナルの活性化およびNF- κ Bの核内移行の抑制による軟骨代謝酵素産生抑制効果、3)外因性のHAでは、軟骨細胞からの高分子HA産生を促進させ、OAに伴う炎症刺激による軟骨ECMの変性抑制効果により、それぞれがDMOADsとしての効果を有していると考えられた。これら薬剤の異なる作用機序は、各薬剤を複合して使用することでOAを効果的に治療できる可能性を示しており、相乗あるいは相加効果についての臨床的あるいは*in vivo*での検討が必要であるが、本研究はOA治療を確立する上での重要な基礎的情報を供給すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	奥村	正裕
副査	教授	昆	泰寛
副査	教授	堀内	基広
副査	准教授	高木	哲

学位論文題名

犬変形性関節症に対する病態修飾薬(Disease modifying osteoarthritis drugs; DMORDs)の効果発現機序に関する基礎的検討

変形性関節症(OA)は年齢の経過とともに人と多くの動物が罹患する疾患であり、関節の構造的な疲弊を主徴とする。一般に、OAの治療は対症療法的な鎮痛および機能保持を目的とした理学療法に主眼がおかれ、薬理効果に関するエビデンスに基づいた治療法は確立されていない。近年、OAの治療において病態修飾薬(disease modifying osteoarthritis drugs, DMOADs)という概念がつけられ、多種の物質について関節症の症状改善効果が検討されるようになった。その多くは、関節軟骨の構成成分であるグリコサミノグリカン類似物である。それらの物質は疲弊した軟骨成分を補填することを目的に投与されているが、結果的に関節症の症状を著しく軽減することが経験されている。

本論文の第1章では、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)のひとつであるシクロオキシゲナーゼ(COX)/リポキシゲナーゼ(LOX)共阻害薬テポキサリンの増殖性滑膜炎制御能およびその効果発現機構について、COX-2阻害性NSAIDsであるメロキシカムおよびカルプロフェン、さらにLOX特異的阻害薬AA-861とともに検討した。その結果、テポキサリンおよびAA-861における特徴的な細胞障害性と、これらの細胞障害性が5-LOX阻害を介在して発現することが示された。第2章では、ポリ硫酸ペントサンナトリウム(PPS)の犬培養軟骨細胞における炎症誘導性基質異化反応の抑制について検討した。まず、インターロイキン(IL)-1 β で刺激した軟骨細胞において産生されるマトリックスメタロプロテイナーゼ-3がPPSによって抑制されることを示された。そして、その効果はPPSがp38とERKのリン酸化および核内因子(NF)- κ Bの核内移行阻害によることが明らかとなった。この炎症反応抑制効果が、PPSのDMOADsとしての軟骨保護効果の一部であることが示唆された。第3章では、ヒアルロン酸(HA)の軟骨細胞外基質の性状改善効果をHA合成酵素(HAS)のアイソエンザイムの発現比を調べることで検討した。その結果、IL-1 β 刺激がHAS2の遺伝子発現を低下させ、HAS3の遺伝子発現を増加させること、および低分子HA(分子量500-1,200 kDa)がCD44を介して細胞内におけるIL-1誘発性のHAS遺伝子発現の変化を緩和させることが示された。また、低分子HAは、軟骨基質成分であるII型コラーゲンおよびアグリカンの遺伝子発現についても同様の改善効果を有することが示された。以上の結果から、1)COX/LOX共阻害薬テポキサリンでは、特徴的なLOX阻害能による炎症性滑膜炎に対する直接的な抑制効果、2)PPSでは特定の細胞伝達シグナルの活性化およびNF- κ Bの核内移行の抑制による軟骨異化酵素産生抑制効果、3)外因性のHAでは、HASアイソエンザイム産生調節による軟骨細胞外基質の性状改善効果により、それぞれがDMOADsとしての効果を有していると考えられた。これら薬剤の異なる作用機序の解明は、各薬剤によるOAの治療を効果的に施行する上で重要な基礎的情報となりうると判断された。

以上のように申請者は、犬変形性関節症に対するDMOADsの効果発現機序解明に重要な知見を提示した。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者須永隆文氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。