

## 論文の内容の要旨

氏名：鈴木麻由

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ヒト顎関節滑膜細胞の MCP および GRO 産生に対する 30 kDa フィブロネクチンフラグメントの影響

滑膜は関節腔内における非加重部構造を被覆する軟組織で、滑液分泌や細胞外基質の産生など、顎関節の恒常性維持に重要な組織である。顎関節症の中で高頻度に発生する顎関節円板転位障害 (internal derangement: ID) および変形性顎関節症 (osteoarthritis of the temporomandibular joint: OA-TMJ) の両者において滑膜の炎症所見が確認されている。

近年、細胞外基質の分解産物は、非感染性の炎症における内在性因子として注目されている。フィブロネクチン (fibronectin: FN) は、細胞外基質の高分子会合体を構成する糖タンパク質で、コラーゲン/ゼラチン、フィブリン、ヘパリンおよび細胞結合ドメインを有している。FNは滑膜組織および軟骨の表面に局在し、その発現の増加は、組織のリモデリングおよび修復に関連することが報告されている。FNの分解は、関節リウマチなど多くの関節炎において関節破壊を導く中心的事象である。FNは細胞外基質分解酵素によって、30 kDa, 45 kDa, 120 kDa のフィブロネクチンフラグメント (fibronectin fragment: FN-F) に分解されること、これら分解産物が内在性の起炎物質となる可能性が報告されている。変形性関節症 (osteoarthritis: OA) 患者の滑液中からは高濃度の FN-F が検出されており、FN-F が OA や病態形成に関与すると報告されている。これらの FN-F のうち、30 kDa FN-F が最も軟骨細胞やマクロファージの産生を上昇させたとの報告がある。

Monocyte chemotactic protein (MCP) は CC ケモカインであり、MCP の主たるレセプターは CCR2 であると報告されている。CCR2 は主にモノサイト/マクロファージに発現していることから、MCP はモノサイト/マクロファージの遊走および活性化に重要なケモカインであるといわれている。活性化したマクロファージは、炎症性サイトカイン、細胞外基質分解酵素、活性酸素等を産生することから、過剰なマクロファージの遊走は、正常組織の破壊、炎症亢進を引き起こすことが報告されている。Growth related oncogene (GRO) は CXC ケモカインであり、Glu-Leu-Arg 配列 (ELR モチーフ) の有無によってさらに分類される。ELR モチーフを有する CXC ケモカインは好中球遊走作用や、血管新生の他に、神経系細胞の受容体である CXCR2 に作用することにより、末梢および中枢で疼痛調節に関与することが報告されている。

本研究では、細胞外基質分解産物が滑膜炎に関与する可能性があるのかを検討することを目的として、30 kDa FN-F をヒト顎関節滑膜細胞 (以下 滑膜細胞) に作用させ、MCP-1, -2, -3 および GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  の経時的遺伝子発現および MCP-1 および GRO- $\alpha$  産生について研究を行った。次に、滑膜細胞における 30 kDa FN-F のシグナル伝達経路の解明を目的に、p38MAPK および NF $\kappa$ B の阻害剤を用いた検討を行った。

本研究では顎関節の炎症病態関連因子の検索を目的に、滑膜細胞に 30 kDa FN-F を作用させ、以下の結果を得た。

- 1) 滑膜細胞の、MCP-1 および MCP-3 遺伝子発現は、30 kDa FN-F 刺激 6 時間において、発現上昇を認めた。また、MCP-2 遺伝子発現は、30 kDa FN-F 刺激 24 時間において、発現上昇を認めた。
- 2) 滑膜細胞の、GRO- $\alpha$  遺伝子発現は、30 kDa FN-F 刺激 6, 12 および 24 時間において、発現上昇を認めた。GRO- $\beta$  遺伝子発現は、30 kDa FN-F 刺激 12 および 24 時間において、発現上昇を認めた。また、GRO- $\gamma$  遺伝子発現は、30 kDa FN-F 刺激 24 時間において、発現上昇を認めた。
- 3) 滑膜細胞培養上清中の MCP-1 および GRO- $\alpha$  タンパク質量は、30 kDa FN-F 刺激 24 および 48 時間において、上昇を認めた。
- 4) 30 kDa FN-F 刺激によって上昇した MCP-1 タンパク質産生は、SP600125 (JNK1/2 inhibitor) および APDC (NF $\kappa$ B inhibitor) によって減少を認めた。APDC によって MCP-1 は 98% の阻害を認めた。NF $\kappa$ B 経路についてさらに検討を行ったところ、MCP-1 タンパク質産生は、LY294002 (PI3K inhibitor), (5z)-7-oxozeaenol (TAK1 inhibitor) および PS-1145 (IKK inhibitor) によって減少を認めた。IRAK-1/4 inhibitor では、減少傾向が認められたが、有意差は認められなかった。

- 5) 30 kDa FN-F 刺激によって上昇した GRO- $\alpha$ タンパク質産生は, SP600125, SB203580 (p38 inhibitor) および APDC による減少を認めた. APDC によって GRO- $\alpha$  は 99.8%の阻害を認めた. NF $\kappa$ B 経路についてさらに検討を行ったところ, GRO- $\alpha$  産生は IRAK-1/4 inhibitor, LY294002, (5z)-7-oxozeaenol および PS-1145 によって減少を認めた.

以上の結果から, 30 kDa FN-F は, 滑膜細胞の MCP-1 および GRO- $\alpha$  産生を上昇させることが明らかになった. また, 30 kDa FN-F は Toll Like Receptor を介して NF $\kappa$ B を活性化している可能性が示唆された. MCP-1, -2, および-3 はモノサイト/マクロファージの滑膜組織への遊走を誘導する可能性, 過剰なマクロファージは, IL-1 や基質分解酵素および活性酸素を産生することから炎症亢進や組織破壊を誘導する可能性が考えられた. GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , および- $\gamma$ は, 好中球の遊走, 血管新生, および疼痛が炎症によって引き起こされる可能性が考えられる. よって, 細胞外基質の分解産物である 30 kDa FN-F は, 顎関節滑膜細胞の炎症性因子の産生を上昇させることで, 顎関節炎症病態形成に関与する可能性が示唆された.