

# 玉井慎美 論文内容の要旨

## 主 論 文

Significant inhibition of TRAIL-mediated fibroblast-like synovial cell apoptosis by IFN- $\gamma$  through JAK/STAT pathway by translational regulation

IFN- $\gamma$  は JAK/STAT 経路活性化を介し滑膜線維芽細胞の TRAIL 依存性アポトーシスを顕著に抑制する

玉井慎美、川上 純、田中史子、宮下賜一郎、中村英樹、岩永 希、和泉泰衛、有馬和彦、荒武弘一朗、黄 明国、蒲池 誠、井田弘明、折口智樹、江口勝美

The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 144 巻 4 号 182—190 2006

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：江口勝美教授)

## 緒 言

IFN- $\gamma$  は JAK/STAT 活性化を誘導する代表的なサイトカインであり、滑膜線維芽細胞 (FLS) では HLA クラス II 分子や副刺激分子発現を誘導することが今までに報告されている。関節リウマチ (RA) 滑膜組織には IFN- $\gamma$ /JAK/STAT 活性化に関連する遺伝子群が強く発現するため、RA 滑膜炎の増強に関与することが示唆される。

一方、RA 滑膜組織では FLS のアポトーシス像はあまり検出されない。RA 滑膜組織にはサイトカインの発現増強が認められるが、これら液性因子による FLS アポトーシス感受性の抑制が RA 滑膜組織の増殖につながることが予想される。アポトーシスを誘導する機序は種々あるが、近年の報告では TRAIL 依存性アポトーシスの抑制はコラーゲン誘発関節炎を増強するとされ、TRAIL を介するアポトーシス感受性の修飾と RA 滑膜増殖との関わりが注目されてきた。今回、私たちは、IFN- $\gamma$  による FLS の TRAIL 依存性アポトーシス抑制機序を検討した。

## 対象と方法

1. FLS は文書でインフォームド・コンセントが得られた関節外科症例の滑膜組織より得、以下の実験に使用した。
2. FLS の TRAIL 依存性アポトーシスは rTRAIL 添加により誘導し、rTRAIL 添加 2

時間後のミトコンドリア膜電位の低下 ( $\Delta\Psi_m$ )、カスパーゼ活性化および DNA 断片化で評価した。これらアポトーシスのマーカーはフローサイトメトリー法で解析した。

3. FLS の TRAIL 依存性アポトーシスへの IFN- $\gamma$  の作用は、IFN- $\gamma$  で FLS を前処理し、TRAIL 依存性アポトーシスへの抑制効果で評価した。
4. IFN- $\gamma$  による FLS の TRAIL 依存性アポトーシス抑制機序を検討するために、IFN- $\gamma$  刺激後の STAT、ERK および Akt のリン酸化を各々に対するリン酸化抗体を用いたウェスタンブロットで、また、NF- $\kappa$ B 核内移行は免疫蛍光染色で評価した。
5. 翻訳抑制剤の CHX を用いて IFN- $\gamma$  による FLS の TRAIL 依存性アポトーシスへの翻訳制御系の関与を、また JAK 活性化の関与は JAK 阻害剤 ATA の添加で検討した。種々のアポトーシス関連蛋白の発現はウェスタンブロットで評価した。

## 結 果

### 1. IFN- $\gamma$ による FLS の TRAIL 依存性アポトーシスの抑制

IFN- $\gamma$  は 2 時間までの短時間刺激では FLS の TRAIL 依存性アポトーシスを抑制しなかった。しかし、24 時間刺激後には TRAIL 依存性アポトーシスを濃度依存性に、かつ顕著に抑制し、その効果は  $\Delta\Psi_m$ 、カスパーゼ活性化および DNA 断片化のすべてのマーカーで認められた (Fig. 1, Table I, Table II)。これら FLS の TRAIL 依存性アポトーシスはカスパーゼ 8 活性化の抑制でほぼ抑制された (Fig. 2)。

### 2. IFN- $\gamma$ の FLS への TRAIL 依存性アポトーシス抑制機序の検討

TRAIL 受容体発現は IFN- $\gamma$  で変化しなかったが (Fig. 3, Table III)、IFN- $\gamma$  は FLS の STAT1、STAT3、STAT6 および ERK のリン酸化を強く誘導した。しかしながら、Akt リン酸化や NF- $\kappa$ B 核内移行の促進は認めなかった (Fig. 4A)。ATA は IFN- $\gamma$  による ERK リン酸化は抑制せず、STAT1/3/6 のリン酸化を顕著に抑制するとともに (Fig. 4B)、IFN- $\gamma$  の TRAIL 依存性アポトーシス抑制効果を解除した。CHX の効果も ATA とほぼ同様であった (Fig. 5, Fig. 6)。以上より、JAK/STAT 活性化を介する翻訳制御機序で FLS の TRAIL 依存性アポトーシスは IFN- $\gamma$  により抑制されると考えられたが、TRAIL 受容体に加え、FADD、TRADD、pro-caspase-8、FLIP、SODD、pro-caspase-3、pro-caspase-9、Bcl-2、Bcl-x、Bax 発現は IFN- $\gamma$  刺激で変化しなかった (Fig. 7)。

## 考 察

今回の実験結果より、IFN- $\gamma$  は FLS の TRAIL 依存性アポトーシスを抑制し、RA の滑膜組織増殖を誘導すると考えられた。

IFN- $\gamma$  によるシグナル伝達は主に JAK1/2 活性化により誘導される。本実験でも FLS の STAT は IFN- $\gamma$  により強くリン酸化され、かつ、JAK 阻害剤 ATA は FLS の STAT リン酸化を抑制するとともに IFN- $\gamma$  の TRAIL 依存性アポトーシス抑制効果を解除したので、FLS への IFN- $\gamma$  の作用は、JAK/STAT 活性化を介して惹起されることが示唆される。

FLS の TRAIL 依存性アポトーシスは caspase-8 活性化に伴うミトコンドリア機能障害が中心をなすので、II 型アポトーシスに分類される。ATA や CHX による阻害実験の結果より、ある分子が IFN- $\gamma$ /JAK/STAT 経路を介して発現が誘導され、この分子が caspase-8 活性化の上流に作用して FLS の TRAIL 依存性アポトーシスを抑制する機序が想定されるが、今回の検討では、その分子を同定することはできなかった。cDNA マイクロアレイによるこれら分子の同定、および、如何なる STAT 分子が特に重要なのか等が、今後の検討課題と考えられる。