

# (里村健志) 論文内容の要旨

## 主 論 文

Serum amyloid A (SAA) induces pentraxin3 (PTX3) production in rheumatoid synoviocytes

関節リウマチ滑膜における血清アミロイドAのペントラキシン3誘導について

里村健志, 鳥越雄史, 古賀智裕, 前田由美, 和泉泰衛, 地内友香, 宮下賜一郎, 山崎聡士, 川上純, 相葉佳洋, 中村稔, 小森敦正, 佐藤純司, 石橋大海, 本川哲, 右田清志

(Modern Rheumatology 2013, 23:28-35)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻  
(主任指導教員: 右田清志教授)

## 緒 言

Pentraxin3 (PTX3)は、381個のアミノ酸からなる急性期蛋白で、全身性炎症疾患（敗血症、血管炎、Rheumatoid Arthritis (RA)）で上昇する。C-reactive protein (CRP) や Serum amyloid P component (SAP) は、Short Pentraxin に分類される急性期蛋白で、肝臓で合成されるが、PTX3 は Long Pentraxin に分類され、Short Pentraxin と異なり、プロモーター領域には Interleukin (IL)-6 の結合配列を認めないため、IL-6 では誘導されない。IL-1 $\beta$  や Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の刺激により、肝細胞ではなく、血管内皮細胞や好中球、マクロファージから産生される。Serum amyloid A (SAA) は、サイトカインの刺激により、肝細胞で産生される急性期蛋白であるが、産生された SAA は炎症細胞に作用し、IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  の産生を誘導する。RA は軟骨破壊を主徴とする慢性炎症性疾患で、様々な炎症性サイトカイン、急性期蛋白が誘導される。今回、RA 滑膜細胞を用いて PTX3 と SAA の相互作用を検討した。

## 対象 と 方法

手術の際、得られた RA 滑膜、Osteoarthritis (OA) 滑膜より得られた第 3~4 継代目の培養滑膜細胞を使用した。

- ① RNA 抽出試薬 (Trizol 試薬; Invitrogen 社) を用い滑膜細胞から Ribonucleic acid (RNA) を抽出した。この RNA から complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を作成した。特異的なプライマーを用いて PTX3 と  $\beta$ -アクチンを増幅し、PTX3 messenger RNA (mRNA) の発現を測定した。
- ② SAA (Peprotech 社)、各種サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  (R&D 社)) にて滑膜細胞を刺激し、PTX3 産生を検討した。RA 滑膜細胞を RPMI、10% ウシ胎児血清で培養し、SAA (0-5  $\mu$ g/ml) にて 24 時間刺激し、培養上清中の PTX3 を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D 社) で測定した。

- ③ SAA によって誘導される PTX3 産生に対する Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (p38/Jun-N-Terminal Kinase; JNK)、Nuclea Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) の特異的阻害剤 SB203580 (p38)、SP600125 (JNK)、Bay11-7082 (NF- $\kappa$ B) (Calbiochem 社) の影響を検討した。
- ④ SAA のレセプターである N-formyl peptide receptor ligand-1 (FPRL-1) の阻害は small interfering RNA (siRNA) (Santa Cruz Biotechnology 社) を用いて行い、PTX3 産生が変化するか測定した。
- ⑤ RA 滑膜細胞、OA 滑膜細胞それぞれに SAA 刺激で誘導される PTX3 を比較した。統計処理は、Wilcoxon 符号付順位和検定を用い、有意水準 5%未満を有意とした。

## 結 果

免疫組織染色で SAA が OA では認めず、RA 滑膜組織に特異的に発現していることを確認した。

- ① RA 滑膜細胞を SAA で刺激すると、2 時間後より PTX3 の mRNA の発現が誘導され、4 時間でプラトーになった。SAA による PTX3 mRNA の発現は、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の SAA で誘導され、生理的濃度に近い 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  でプラトーに達した。SAA による RA 滑膜細胞からの PTX3 産生は、Polymyxin B (Sigma 社) で阻害されないことより、Lypopolysaccharide (LPS) の SAA への混入は否定的であった。
- ② RA 滑膜細胞に高濃度の IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  で刺激すると PTX3 が誘導され、その受容体拮抗薬を加えると PTX3 の誘導は阻害された。SAA 刺激によって誘導された PTX3 にサイトカイン阻害剤を加えても PTX3 誘導は阻害されなかったことより、SAA がサイトカインを介さず、直接 PTX3 を誘導すると考えられた。
- ③ RA 滑膜細胞を SAA で刺激すると、NF- $\kappa$ B と MAPK (p38、JNK) の活性化を誘導するが、p38、JNK、NF- $\kappa$ B の特異的阻害剤により、SAA による PTX3 の産生は阻害された。
- ④ siRNA を用い RA 滑膜細胞に SAA のレセプターである FPRL-1 の発現を抑制すると、SAA による PTX3 誘導は阻害された。
- ⑤ OA 滑膜細胞においても SAA 刺激によって、PTX3 誘導を認めたが、RA 滑膜細胞に比較すると、その誘導能は低下していた。

## 考 察

炎症性疾患である RA において PTX3 のバイオマーカーとしての有用性を示唆する報告が散見されるが、RA 関節滑膜における PTX3 の作用を示した報告は少ない。本研究では、RA 関節滑膜細胞において SAA が PTX3 を誘導することによって、PTX3 が関節局所において免疫・炎症反応の役割を果たすことが示唆された。

①～④の結果は、SAA が直接かつ強力に PTX3 の発現に関与していることが裏付けされる結果と考えられる。さらに、OA 滑膜細胞と比較して RA 滑膜細胞において、SAA 刺激による PTX3 誘導能が高いことより、RA での局所炎症に PTX3 が強く関わっている可能性が考えられた。PTX3 は RA 患者の関節滑膜炎と軟骨破壊に寄与している可能性が考えられ、より詳細な PTX3 の RA の病態への関与が解明されれば、RA 関節局所炎症、治療応答性との関係性が明らかになれば、バイオマーカーとしての有用性も期待できる。

SAA は CRP と同様、急性期蛋白と考えられている。SAA は、IL-6 の刺激で肝細胞より産生され、PTX3 を誘導することにより、両者間に cross-talk が存在し、RA 滑膜の炎症が増幅されることが示唆された。