OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Specifically Modified Osteopontin in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes Supports Interaction With B Cells and Enhances Production of Interleukin-6
Author(s)	武, 靖浩
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54224
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【107】

氏名	武（たけ） 靖浩（やすひろ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 23676 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Specifically Modified Osteopontin in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes Supports Interaction With B Cells and Enhances Production of Interleukin-6. （関節リウマチ由来滑膜細胞が発現する特異的に修飾されたオステオポンチンはB細胞との相互作用を支持し、インターロイキン6の産生を促進する）
論文審査委員	（主査） 教授 吉川 秀樹 （副査） 教授 竹田 潔　教授 菅本 一臣

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

関節炎の発症．憎悪には多くの因子が関わる．オステオポンチン（OPN）は多様な翻訳後修飾をうける多機能分子であるが，OPNの機能抑制により関節炎が抑えられることが知られている。OPNは、関節リウマチ(RA)においても病態，病勢に関わる分子であり、RA患者の関節液，血中にOPNが高濃度にみられる。RAでは，関節滑膜細胞とB細胞との相互作用が病態に重要な役割を持つ事が知られてきたが、RAにおけるOPNの分子メカニズムは不明である．本研究ではRAにおけるOPNの機能をRA由来滑膜細胞とB細胞との細胞間相互作用に着目して解析した。

〔 方法ならびに成績 〕

RA患者11人と非RA患者10人より関節滑膜を採取し実験に使用した。滑膜を酵素消化し分離された接着系の滑膜細胞（FLS）と、B細胞株のMC/Carを用いた。OPNに対するウェスタンブロット法では、全てのFLSで54kDにdouble bandが検出されたほか、全てのRA患者由来のFLSと、3例の非RA患者由来のFLSで、75kDのbandが検出された。FLSを75kD OPN陽性/陰性群に分け（それぞれ75kdOPN+ FLS，75kdOPN- FLS）以後の実験を行った。FLS単独培養またはTranswellを用いて接触を阻んだB細胞との共培養では、培養上清中のIL-6濃度は低値であったが、B細胞とFLSの接触を伴う共培養では、75kdOPN+ FLSにおいて培養上清中のIL-6濃度は有意に上昇した（$p<0.001$）。一方75kdOPN- FLSでは有意な差は認めなかった。75kdOPN+ FLSでは、細胞表面に200kD超のトロンビン切断されたOPNを発現しており、免疫蛍光法ではOPNは細胞の形状に沿って検出された。200kD超のOPNは、ファイブロネクチン（FN）抗体による免疫沈降タンパクでも検出され、またOPN抗体による免疫沈降タンパクに対するFNへのウェスタンブロットでも200kD超のバンドが検出されることから、200kD超のOPNはFNと共有結合した分子であると示唆された。このような共有結合を施す分子としてトランスグルタミナーゼが過去に報告されており、その阻害薬であるcystamine sulfateをFLSに投与すると、200kD超のOPNの発現は抑制された。

次にOPN、特に75kD OPNが共培養におけるIL-6の産生への関わりについてOPNの過剰発現とノックダウンにより検討した。レンチウイルスを用いたOPN過剰発現により、75kdOPN+ FLSでは200kD超、75kD、54kD全てのバンドが増強したが、75kdOPN- FLSでは54kDのバンドのみ増強した。空ベクターまたはOPN発現ベクターの導入後にB細胞と共培養したところ、75kdOPN+ FLSではOPN過剰発現により有意に培養上清中IL-6濃度が上昇した（$p<0.001$）が、75kdOPN- FLSでは有意な差を認めなかった。さらに75kdOPN+ FLSにOPN siRNAまたはコントロールsiRNAを導入し同様に培養上清中IL-6を測定したところ、OPNノックダウンにより有意な低下を認めた（$p<0.001$）。OPNは接着分子として知られているため、OPN中和抗体を用いてFLS表面上のOPNをマスクしたのちB細胞と共培養し、FLS上に接着しなかったB細胞を洗浄にて取り除き、その細胞数を計測した。中和抗体により接着したB細胞数は有意に減少した（$p<0.001$）。

最後にRA滑膜でのB細胞・OPN陽性細胞・IL-6陽性細胞の局在を免疫組織化学法にて検討した。OPNは過去の報告と同様に滑膜絨毛の表層およびその下層の細胞に強く検出された。B細胞は滑膜の内層に集積して認められ、OPN陽性細胞とB細胞が共在している部位で、IL-6も検出された。

〔 総 括 〕

本研究より、RA滑膜細胞は特異的に修飾された75kDのOPNを発現しており、それはトランスグルタミナーゼによりFNと結合し滑膜細胞表面上に局在すると考えられた。滑膜細胞表面上のOPNを介しB細胞が接着し、滑膜細胞とB細胞の細胞接着を伴う細胞間相互作用によりIL-6の産生が刺激されていることが明らかとなった。このRA滑膜におけるRA特異的OPNによる滑膜細胞－B細胞相互作用が、IL-6を介してRAにおける慢性炎症など病態に関わっている可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

関節炎の発症、憎悪には多くの因子が関わる。オステオポンチン(OPN)は多様な翻訳後修飾をうける多機能分子であるが，の機能抑制により関節炎が抑えられることが知られている。OPNは、関節リウマチ(RA)においても病態，病勢に関わる分子であり、RA患者の関節液，血中にOPNが高濃度にみられる。RAでは，関節滑膜細胞とB細胞との相互作用が病態に重要な役割を持つ事が知られてきたが，RAにおけるOPNの分子メカニズムは不明である。本研究ではRAにおけるOPNの機能をRA由来滑膜細胞とB細胞との細胞間相互作用に着目して解析しており、ウェスタンブロット法では、全てのRA滑膜細胞および一部の非RA滑膜細胞において、特異的に修飾された75kDのOPNが発現しており、それらはトロンビン切断された200kD OPNを細胞膜上に発現していた。200kD OPNはファイブロネクチンとトランスグルタミナーゼによりクロスリンクした分子であると考えられた。細胞間の直接接触を伴う滑膜細胞とB細胞の共培養では、75kD OPN陽性群においてインターロイキン６(IL-6)産生の著明な上昇を認めた。細胞接触を絶った共培養や滑膜・B細胞単独培養ではIL-6は低値を示した。OPNの過剰発現において、75kD OPN陽性細胞では200kD，75kD，54kD OPN全ての発現が上昇したが、75kD OPN陰性細胞では54kD OPNのみ上昇し、75kD OPNや200kD OPNの発現は認めなかった。過剰発現・ノックダウンを75kD OPN陽性滑膜細胞に施し、同様に共培養するとIL-6産生はそれぞれ上昇・低下した。75kD OPN陰性滑膜細胞にOPNを過剰発現させ同様に共培養してもIL-6産生は不変であった。OPN中和抗体によりB細胞の滑膜細胞への接着は阻害された。RA滑膜組織での免疫染色では、OPN陽性の線維芽細胞とB細胞が共在するような部位で、IL-6が強く検出された。

本論文は、関節リウマチにおいて、関節滑膜中の線維芽細胞が発現するOPNが特異的に修飾されており、それがB細胞との細胞間相互作用を支持し、IL-6の産生を促進することで、関節炎の慢性化・増悪に関与することを明らかにした。OPNがRA滑膜で発現が上昇していることは既知であったが、OPNのRA特異

的な修飾は過去に報告されておらず、またその修飾により慢性炎症化につながる炎症性サイトカインの産生を促進するという、病態に重要な機能を明らかにしており、学位の授与に値すると考えられる。