

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建・再生科学領域 運動機能病態修復学教育研究分野 氏名 中村 讓
(論文題目) <b>Possible involvement of DExD/H box helicase 60 in synovial inflammation of rheumatoid arthritis: role of Toll-like receptor 3 signaling</b> (関節リウマチの滑膜炎における DExD/H box ヘリカーゼ 60 関与の可能性: Toll-like receptor 3 シグナルの役割)	
(内容の要旨) <b>【背景】</b> 関節リウマチ (RA) は慢性の自己免疫疾患であり、多関節に滑膜炎、骨びらんを引き起こし、関節構造が破壊される。従来、RA 治療には非ステロイド性抗炎症薬や疾患修飾性抗リウマチ薬が用いられてきた。近年では生物学的製剤が開発され、高い治療効果が得られている。一方で、高額な費用や日和見感染が問題として挙げられ、RA の病態のさらなる解明と、新たな治療薬開発が求められている。 自然免疫は侵入する病原体から宿主を守る基本的な機構だが、その制御の異常が自己免疫性疾患の要因ともなる。RA による滑膜炎の病態への自然免疫の関与も知られているが、その詳細な分子機構については解明されていない。Toll-like receptor (TLR) はパターン認識受容体の 1 種であり、TLR アゴニストによる滑膜での自然免疫の活性化は RA 発症メカニズムの 1 つである。RA 患者由来滑膜細胞において、TLR2、3、4、5 の発現増加が報告されており、RA 患者由来線維芽細胞様滑膜細胞 (RFLS) においては TLR3 の発現増加とそれによるリンパ球の活性化が報告されている。さらに、培養 RFLS においては TLR3 経路の活性化が interferon (IFN) - $\beta$ を誘導し、さらに IFN 誘導性遺伝子 (ISG) の発現が上昇すると報告されている。リンパ球の遊走を活性化させる ISG の 1 種である C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) は RA を含む自己免疫性疾患に関与していることが知られているが、その他の ISG と RA の関係は依然明らかにされていない。 DExD/H box ヘリカーゼ 60 (DDX60) は DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) モチーフを持つ RNA ヘリカーゼの 1 種であり、RNA 代謝や抗ウイルス自然免疫反応に関与する。DDX60 はヒト培養糸球体内皮細胞において、TLR3 シグナル発現に誘導され、びまん性増殖性糸球体腎炎患者の糸球体では強発現することが報告されている。また、全身性エリトマトーデスのような全身性自己免疫疾患発症に関与するとの報告がある。これらより、DDX60 が TLR3 関連の自己免疫性疾患の病態に関与する可能性が示唆されるが、RA における DDX60 の役割は明らかではない。本研究の目的は、RA 滑膜炎における DDX60 の発現とその役割について検討することである。 <b>【方法】</b> ヒト膝滑膜組織における DDX60 タンパクの発現を検討するため、RA 患者と変形性膝関節症 (OA) 患者 4 名ずつから全人工膝関節置換術施行時に膝滑膜組織を採取し、免疫組織化学で評価した。 次に、RFLS を培養し、TLR3 リガンドであるポリイノシン・ポリシチジン酸 (poly IC) を添加して、DDX60 タンパク質と mRNA の発現を western blotting (WB) と定量的 reverse transcription (qRT) -PCR で検討した。Poly IC は各添加濃度 (0.08-50 $\mu$ g/mL)	

及び、各添加時間（0-24 時間）について比較を行なった。さらに、I 型 IFN の役割を調べるため、RFLS に I 型 IFN 中和抗体処理をし、poly IC 添加培養を行って DDX60 の発現を WB で評価した。

続いて、DDX60 と CXCL10 との関係を検討するため、small interfering RNA を用いて DDX60 をノックダウンした後に poly IC を添加し、CXCL10 の発現を qRT-PCR、ELISA で評価した。

最後に、DDX60 タンパク質の細胞内局在を免疫蛍光で評価した。

#### 【結果】

DDX60 タンパク質は OA、RA の滑膜組織において、滑膜細胞、線維芽細胞、内皮細胞、形質細胞で陽性であった。その免疫反応性は、RA 全症例で OA 全症例よりも明らかに強かった。

RFLS における DDX60 は poly IC の添加前から一定量の発現を認めたが、添加した poly IC の濃度に依存してタンパク量、mRNA 量は共に増加した。また、poly IC 処理後 16、24 時間時点で poly IC 添加前よりも DDX60 の発現量が増加した。I 型 IFN 中和抗体の前処理は poly IC によって誘導される DDX60 の発現増加を阻害しなかった。

RFLS において、poly IC に誘導される CXCL10 の発現は DDX60 のノックダウンによって、タンパク質、mRNA 共に部分的に減少した。

培養 RFLS における DDX60 タンパク質は、poly IC 添加の有無に依らず、細胞質内に存在していた。

#### 【考察】

DDX60 は RNA 代謝に広く関与し、口腔扁平上皮癌、神経膠腫などの悪性腫瘍や自己免疫性疾患であるループス腎炎との関連が示されている。本研究では RA 膝滑膜組織の免疫組織化学によって DDX60 が RA 滑膜炎の病態に関与する可能性を示した。

培養 RFLS においては、TLR3 シグナルが DDX60 タンパクや mRNA の発現を増加させることを明らかにした。TLR3 の活性化は I 型 IFN を介して遺伝子発現に影響を与えるという報告もあるが、本研究では TLR3 シグナルに誘導される DDX60 の発現は I 型 IFN を介さないことが示唆された。

また、本研究では、DDX60 のノックダウンが CXCL10 の発現を減少させたことから、DDX60 は CXCL10 の発現を正に制御していると考えられた。CXCL10 は C-X-C motif chemokine 受容体 3 (CXCR3) に結合し、ナチュラルキラー細胞や T 細胞などの CXCR3 発現細胞の遊走を増加させることや、RA 患者の関節液中では CXCL10 が OA 患者よりも増加していることから、CXCL10 は RA における重要な因子であることが示唆されている。したがって、DDX60 は CXCL10 の発現を増加させることによって RA の病態に関与していると考えられた。

免疫蛍光では、DDX60 タンパク質は細胞質内に局在しており、poly IC 処理によって変化しなかった。DDX60 は RFLS の細胞質において TLR3 を介した細胞内シグナル伝達に関与している可能性がある。

#### 【結語】

膝滑膜組織における DDX60 の発現は RA 患者で OA 患者よりも強く発現していた。ヒト RFLS において DDX60 発現は TLR3 シグナルによって増加し、DDX60 は CXCL10 発現を増強させると考えられた。以上より、DDX60 は RA の滑膜炎の病態に関与している可能性が考えられた。