

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域 感染生体防御学教育研究分野 氏名 吉村 小百合
(論文題目) <b>Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by salmon proteoglycan</b> (サケ・プロテオグリカンによるコラーゲン誘導関節炎の抑制)	
(内容の要旨) <p>【目的】 プロテオグリカンは、コアタンパク質にグリコサミノグリカンが共有結合した糖タンパク質であり、軟骨や皮膚などの結合組織を構成する物質の一つである。当該研究室では、サケ鼻軟骨プロテオグリカンフラクション (PGF) が過剰な炎症を抑制する作用を報告してきた。たとえば、マウスに PGF を連日経口投与すると、潰瘍性大腸炎モデルにおいて、腸炎の発症や増悪が抑制される。そのメカニズムとして TH17 (T-helper 17) 細胞や TH1 細胞への分化抑制と制御性 T 細胞の増加により炎症を抑制することが示唆された。関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) は TH17 型の炎症反応を示し、破骨細胞、滑膜線維芽細胞が活性化し、骨破壊が繰り返され、骨が変形する重要な自己免疫疾患である。そこで、本研究では、RA のモデルマウスを用いて、PGF の関節炎に対する抑制効果とそのメカニズムを解析した。</p> <p>【方法】 DBA/1J マウスを II 型コラーゲン (Type II collagen:CII) と完全フロインドアジュバントで皮下免疫することにより、コラーゲン誘導関節炎 (collagen-induced arthritis : CIA) マウスモデルを作製した。CII 免疫マウスにリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) に溶解したサケ鼻軟骨 PGF 2 mg を連日経口投与した (PGF 投与群)。また、比較対照として CII 免疫マウスに PBS のみを連日経口投与した (PBS 投与群)。PGF 投与群及び PBS 投与群に対して四肢関節の発赤、腫脹などの臨床症状をスコアにより評価した。また、HE (Hematoxylin and Eosin) 染色による関節組織の組織学的評価を行なった。さらに、関節組織の薄切切片を用いて、好中球及びマクロファージに対する抗体を用いた免疫染色、破骨細胞に対して TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 染色を行った。関節における炎症性サイトカイン IFN (interferon) <math>\gamma</math>、IL (interleukin) -6、IL-1<math>\beta</math>、IL-17A 及びケモカイン CCL (C-C chemokine ligand) 2、CXCL (C-X-C chemokine ligand) 1、CXCL2 の発現は、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応法 (quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR) を用いて比較した。免疫応答による炎症性サイトカイン産生量を調べるためにマウス脾細胞を CII で再刺激し、上清中の IFN-<math>\gamma</math>、IL-17A を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法により定量した。血清中の CII 特異 IgG1 及び IgG2a 抗体は、ELISA 法により測定した。</p> <p>【結果】 CII 免疫後 26 日目頃から CIA を発症した。PGF 投与群は PBS 投与群に比べ四肢関節の臨床症状が緩和され、スコアによる評価において 45 日目以降に有意差が得られた。また、発症率は 49 日目以降に有意差が得られた。関節組織の HE 染色から、PGF 投与群では滑膜における炎症は悪化せず、PBS 投与群では炎症細胞浸潤及び滑膜増生がみられ、炎症の悪化が観察された。関節組織内では、好中球及びマクロファージの浸潤が低下し、骨組織での破骨細胞の蓄積が抑制された。関節におけるサイトカイン及びケモカインの mRNA 発現は、IL-6、IL-1<math>\beta</math>、IL-17A、CCL2、CXCL1、CXCL2 に対して、PGF 投与群が PBS 投与群に比べ低値を示した。CII で再刺激した CII 免疫マウスの脾細胞における炎症性サイトカイン産生量は、PGF 投与群が IFN-<math>\gamma</math> 及び IL-17A</p>	

で低値を示した。CII 特異的抗体の産生量は、PBS 投与群と PGF 投与群で差はみられなかった。

【考察】 慢性の関節炎は、RA 及び CIA 共通の特徴である。RA の滑膜炎では、炎症性細胞の浸潤とケモカイン産生が特徴としてみられる。CIA においては、単球の遊走は CCL2 が担い、マクロファージからの CXCL1 及び CXCL2 は好中球の走化性因子であることが報告されている。また、滑膜炎中の TH17 細胞やマクロファージは炎症性サイトカインを介して破骨細胞を活性化する。さらに、IL-17A は関節においてマクロファージを活性化し、マクロファージによって産生される IL-1 $\beta$ や IL-6 が破骨細胞形成を誘導すること知られている。これらの結果から、PGF はケモカイン及び炎症性サイトカインを抑制することにより炎症性細胞浸潤を抑制し、CIA 発症と進行を緩和することが示唆された。一方、PGF の効果は抗体非依存性であった。本研究において、PGF の経口摂取が RA に対して有効性を示す可能性が考えられた。