

## 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 猿賀 達郎
(論文題目) Role of MDA5 in regulating CXCL10 expression induced by TLR3 signaling in human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes (関節リウマチ患者由来滑膜細胞における Toll-like receptor 3 を介した CXCL10 の産生に対する MDA5 の意義)	
(内容の要旨) 1837/2000 字 <p>【背景】関節リウマチ (RA) は自己免疫性の慢性炎症性疾患であり、全世界における RA の有病率は 0.5-1.0%と報告されている。RA の病態において主要な役割を担う滑膜細胞は、炎症性サイトカインやプロテアーゼを産生して滑膜炎を増強し、軟骨破壊や骨破壊を引き起こし、その結果患者の生活の質は低下する。自然免疫応答におけるパターン認識受容体は病原微生物をはじめとする pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識する一方で、死細胞またはストレス下の細胞から放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs) も認識する。DAMPs は無菌性の炎症反応に関与し、RA の病態に重要な役割を果たすと考えられている。Toll-like receptor (TLR) は自然免疫応答における主要な受容体であり、TLR3 は double-stranded RNA (dsRNA) を認識する。TLR3 の発現量は RA の滑膜細胞で高く、interleukin-8 や C-C motif chemokine ligand 5 の発現に関与すると報告されている。Interferon-<math>\beta</math> (IFN-<math>\beta</math>) は自然免疫応答における主要なサイトカインであり、数百の IFN-stimulated genes (ISGs) を発現することで機能する。ISGs の一つである melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) は dsRNA の受容体であり、炎症反応の制御分子の一つでもある。関節リウマチ患者由来滑膜細胞 (rheumatoid fibroblast-like synoviocytes: RFLS) では MDA5 が発現しているとされているが、RA の病態における MDA5 の関与は未だ十分には解明されていない。RA 患者の関節液内では dsRNA の濃度が上昇していると報告されており、DAMPs としての dsRNA が RA の病態に関与している可能性は高い。RA の病態において、dsRNA に関与する TLR3 と MDA5 の役割を検討することは重要である。C-X-C motif interferon ligand 10 (CXCL10) は Th1 型 T 細胞浸潤に関与するケモカインで、C-X-C receptor 3 (CXCR3) と結合する。CXCL10-CXCR3 axis は RA の病態に関与するとされているが、その制御機構は不明である。</p> <p>本研究の目的は、RFLS における CXCL10 の発現に TLR3 と MDA5 が関与しているかを検討することである。</p> <p>【方法】RFLS を培養し、dsRNA である polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C) で各濃度 (0.08-50 <math>\mu</math>g/mL) 及び各処理時間 (0-24 時間) で処理した。次に、IFN-<math>\beta</math> の中和抗体または MDA5 の small interfering RNA (siRNA) で処理した RFLS を polyI:C で処理した。PolyI:C で処理した RFLS の medium を回収し、細胞からメッセンジャー RNA (mRNA) 及びタンパク質を抽出した。IFN-<math>\beta</math>、MDA5、CXCL10 の発現量を、mRNA は定量的 reverse transcription-PCR、タンパク質は Western blotting および ELISA を用いて解析し、2 群間比較には t 検定を、他群間比較には Two-way ANOVA を用いて統計学的に検討した。</p> <p>【結果】IFN-<math>\beta</math>、MDA5、CXCL10 の発現量は polyI:C の濃度に依存して亢進した。PolyI:C</p>	

の添加により、IFN- $\beta$ の mRNA の発現量は 4 時間で最大となり、その後急速に低下した。MDA5 と CXCL10 の mRNA およびタンパク質の発現量は、polyI:C の添加後 16 時間で最大となった。IFN- $\beta$ 中和抗体の添加は、polyI:C 添加による MDA5 と CXCL10 の mRNA およびタンパク質の発現を有意に抑制した( $p<0.001$ )。MDA5 の siRNA は、polyI:C 添加による CXCL10 の mRNA およびタンパク質の発現を有意に抑制した( $p<0.001$ )。

【考察】RFLS における TLR3 の活性化は、IFN- $\beta$ 、MDA5、CXCL10 の発現を亢進した。IFN- $\beta$ を抑制することで MDA5 と CXCL10 の発現は抑制された。また、MDA5 を抑制することで CXCL10 の発現は部分的に抑制された。以上より、RA の滑膜炎において TLR3/IFN- $\beta$ /CXCL10 という未知の炎症経路が存在し、MDA5 が部分的にこの炎症経路を媒介する可能性が示唆された。CXCL10 の発現は RA 患者の血清および関節液内で上昇しており、CXCL10 の血中濃度は抗 RA 薬である abatacept に対する治療反応と相関する。CXCL10 は破骨細胞を活性化させることで骨破壊を誘導する可能性も示唆されている。CXCL10 の抗体である MDX-1100 は、第 II 相臨床試験より、RA 患者において有用である可能性が示唆されている。これまで、RFLS における CXCL10 の発現には tumor necrosis factor- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  などが関与すると報告されてきた。脳血管内皮細胞、肝細胞癌由来肝細胞、腎糸球体内皮細胞などにおいては、MDA5 が CXCL10 の産生を制御する可能性が示唆されている。本検討より、RFLS における TLR3 を介した CXCL10 の発現には IFN- $\beta$ と MDA5 が関与すると考えられた。

本検討では、IFN- $\beta$ は TLR3 を介して RA の滑膜炎を促進すると考えられた。しかし、IFN- $\beta$ は RA の炎症を抑制するという報告もある。IFN- $\beta$ はそれ自身が多くの ISGs の産生を誘導すると考えられており、ISGs には炎症を促進する分子と抑制する分子が数多く存在する。TLR3 を介した RA の炎症経路においては、IFN- $\beta$ は MDA5 を經由することで炎症を促進する分子として機能することが示唆された。しかし、本検討において MDA5 は部分的にしか CXCL10 の発現を制御しなかった。TLR3 を介した CXCL10 の制御に関しては、MDA5 の関与についてのより詳細な機序や、新たな伝達分子の探索も必要であると考えられた。

【結語】関節リウマチ患者由来ヒト培養滑膜細胞を dsRNA により刺激して TLR3 を活性化することで、IFN- $\beta$ 、MDA5、CXCL10 の発現が亢進した。IFN- $\beta$ は MDA5 の発現に関与し、MDA5 は部分的に CXCL10 の産生に関与した。RA の炎症において、TLR3/IFN- $\beta$ /CXCL10 という新規経路が存在し、本経路は部分的に MDA5 によって制御されている可能性が示唆された。