

氏名(本籍)	赤池 敦 (岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 530 号
学位授与日付	平成 14 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Synergistic induction of apoptosis of rheumatoid arthritis synovial cells by H ₂ O ₂ and N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal
審査委員	(主査) 教授 清水 克時 (副査) 教授 中島 茂 教授 石塚 達夫

論文内容の要旨

慢性関節リウマチ(以下RA)において、滑膜の異常増殖が病状の悪化の指標となることは広く知られている。また、RAの関節滑膜においては主にそのアポトーシスの割合の減少により増殖とアポトーシスのバランスがくずれているとの数々の報告がなされている。今回、我々は、岐阜大学倫理委員会の承認のもと承諾書を得られた4人のRA患者より手術の際得られた滑膜組織をHamermanらの方法に従い滑膜培養細胞を得たのち3~8代継代したものを滑膜線維芽細胞として実験に使用した。

RA滑膜線維芽細胞をH₂O₂の各種濃度にて処置し、細胞死の指標として培養上清のlactate dehydrogenase (LDH)活性を測定した。600 μMまでがコントロールと比較してほとんど差がなかったが1mMでは12時間で90%を越えるLDH活性の上昇を認めた。更にH₂O₂刺激1時間前に様々なカルパイン阻害剤で前処置したところ、N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal 100 μM(ALLN)で前処置のみで、H₂O₂ 400 μM刺激48時間後で60%のLDH活性上昇を認めた。他のカルパイン阻害剤(カルペプチン、N-acetyl-leucyl-leucyl-methionina :ALLM)ではH₂O₂ 400 μMと併用してもLDH活性上昇は認められなかった。RA滑膜線維芽細胞をH₂O₂刺激後48時間後にヘキスト染色を行うと、H₂O₂とALLNの併用で核の濃縮を認めアポトーシスによる細胞死が認められた。H₂O₂刺激後48時間後アポトーシスを支配する重要なカスパーゼであるカスパーゼ3とpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)のウエスタンブロットを行うとH₂O₂とALLNの併用でのみカスパーゼ3の活性化とPARPの分解が認められた。ALLNがカルパインの阻害によるかを調べるためにウエスタンブロットで検討したがカルパインの活性の変化は認められなかった。高濃度のALLNはプロテアソーム阻害活性を持つことが知られている。そこでプロテアソームの阻害によるp53蛋白の蓄積、活性上昇の影響を調べるためp53の標的のひとつであるp21^{WAF}のウエスタンブロットを行った。予想通り、ALLNのみによりp53およびp21^{WAF}の発現が増加した。興味深いことに、H₂O₂はALLNの存在下でp53およびp21^{WAF}の発現を更に増強させた。また、RA滑膜線維芽細胞にて400 μMのH₂O₂はc-Jun N-terminal kinase (JNK)を活性化することがウエスタンブロットにて認められた。H₂O₂は一般的にサバイバルシグナルとして知られているマップキナーゼの一種であるextracellular signal-regulated kinase(ERK)やセリンスレオニンキナーゼの一種であるAktも活性化した。しかしながらALLNはH₂O₂によるこれらの活性化に影響を及ぼさなかった。プロテアソーム阻害とH₂O₂投与による相加的作用によりp53の蓄積、p21の活性化は増加しRA滑膜線維芽細胞に著しくアポトーシスが誘導されたと考えられた。RA関節には、比較的多く活性酸素種が産生されていることは知られている。

以上の結果より、ALLNのような細胞内にてはアポトーシスを促進し、一方細胞外では炎症を阻害する物質は

RAの新たな治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

論文審査の結果と要旨

申請者 赤池 敦は、プロテアソームインヒビターと H_2O_2 の相加的作用より誘導される慢性関節リウマチ患者培養滑膜細胞の死のシグナルメカニズムを検討し、プロテアソームインヒビターが慢性関節リウマチの新たな治療を生み出す可能性を示した。

本研究の成果は、慢性関節リウマチのアポトーシスメカニズムに新しい知見をもたらし、細胞情報学のみならず整形外科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Synergistic induction of apoptosis of rheumatoid arthritis synovial cells by H_2O_2 and N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal

J Orthop Sci 2003 in press