

学位論文

「Medermycin Inhibits TNF α -Promoted Inflammatory Reaction
in Human Synovial Fibroblasts」

(ヒト滑膜線維芽細胞におけるメデルマイシンのTNF α を介した炎症反応の抑制効果)

DM20003 井上 翔

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 整形外科学
指導教授 高相 晶士

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

(以下論文要旨)

目的：変形性関節症(OA)は滑膜炎や軟骨変性に基づく変性疾患である。高齢化の進む我が国において OA 患者は増加する一方であり、平均寿命と健康寿命の乖離に大きく影響している。末期 OA は基本的に不可逆的変化であり、その治療は人工関節置換術などの手術療法や、NSAIDs を代表とした薬物による対症療法が中心となる。OA 発症における炎症性サイトカインの産生には TNF α や NF κ B の関与が報告されており、新たな治療標的として注目されている。

近年では特定の抗生物質とその誘導体が抗炎症作用を有することも報告されている。メデルマイシン(MED: C₂₄H₂₇NO₈)はグラム陽性球菌に感受性を持つ抗生物質である。今回我々は、OA や関節リウマチ(RA)の創薬シーズの探索を目的とし、MED の滑膜細胞に対する抗炎症作用を調査した。

方法：滑膜細胞株 sw982 を培地のみ (vehicle 群)、TNF α 添加培地 (TNF α 群)、MED 含有 TNF α 添加培地 (MED 群) で培養した。RNA-seq を行い、vehicle 群、TNF α 刺激群・MED 群で各遺伝子の発現を検証した。また MED の濃度依存性の影響を検討するため、sw982 と初代培養ヒト滑膜線維芽細胞(HSF)を用い、それぞれに TNF α および各濃度の MED(62.5、125、250 ng/mL)を添加した。これらを用いて rtRT-PCR、ELISA、ウェスタンブロットを行い、vehicle 群・TNF α 刺激群・各濃度 MED 群で比較を行った。

結果：RNA-Seq により、TNF α で刺激された sw982 において vehicle 群と比較して 1478 の遺伝子に有意な上昇を認めた。このうち、MED 添加により IL1 β 、IL6、IL8 等の炎症性サイトカインを含む 1167 遺伝子の発現抑制が認められた。パスウェイ解析により、発現変動遺伝子は TNF および NF κ B シグナル伝達経路に多く含まれていることがわかった。

sw982 では TNF α 刺激により、mRNA レベル・タンパク質レベルの両方において IL1 β 、IL6、IL8 それぞれの上昇を認めた。MED の効果については、mRNA レベルでは IL1 β は 62.5、125、250 ng/mL の群、IL6 は 125、250 ng/mL の群、IL8 は 250 ng/mL の群で発現抑制を認めた。タンパク質レベルでは、62.5、125、250 ng/mL の群において IL1 β 、IL6、IL8 全ての発現抑制を認めた。HSF でも同様に、TNF α 刺激により IL1 β 、IL6、IL8 全ての mRNA 上昇を認めた。タンパク質レベルでは IL1 β は検出されなかったが、IL6、IL8 の発現上昇を認めた。MED 添加により、mRNA レベルでは、IL1 β は 125、250 ng/mL の群、IL6 および IL8 は 250 ng/mL の群でそれぞれ有意な抑制を認めた。タンパク質レベルでは IL6・IL8 において 62.5、125、250 ng/mL の群で有意な抑制を認めた。

ウェスタンブロットでは、sw982 で p65 の発現は vehicle 群と TNF α 群とで有意差を認めなかったが、125、250 ng/mL の MED 存在下で TNF α 群と比較して p65 発現の低下が見られた。TNF α 刺激により p65 のリン酸化誘導が見られたが、250 ng/mL の MED 群ではこの誘導の抑制が確認された。Akt やリン酸化 Akt の発現は vehicle 群と TNF α 群で有意差を認めず、Akt リン酸化は 62.5、125、250 ng/mL の群で有意な低下が見られた。HSF でも同様に p65 発現は vehicle 群と TNF α 群で有意差を認めず、リン酸化 p65 は TNF α 刺激により有意に増加した。このリン酸化誘導は MED 250 ng/mL 群で有意な抑制がみられた。Akt の発現も vehicle 群と TNF α 群で有意差を認めず、

MED 250 ng/mL 群で抑制を認めた。しかし sw982 の結果に反し、MED 62.5、125、250 ng/mL の群でリン酸化 Akt の有意な増加を認めた。

考察: パスウェイ解析の結果から、MED は炎症反応の調節機構に影響を及ぼすことが示唆された。MED は sw982 と HSF において、mRNA レベル・タンパク質レベルの両方で IL6 と IL8 の発現を抑制し、p65 のリン酸化を阻害することで NFκB 活性化を抑制することがわかった。Akt については sw982 において MED によりリン酸化の阻害がみられたが、HSF においては Akt リン酸化を増加させた。過去の研究では Akt と NFκB 両経路の相互作用の報告があるが、本研究の結果は MED が p65 のリン酸化を標的として炎症性サイトカイン産生を抑制することを示している。

結論: MED の TNFα 刺激に対する炎症性サイトカイン抑制効果を検証した。MED は TNFα 刺激による IL6、IL8、IL1β 上昇を有意に抑制することがわかった。この作用は p65 活性化抑制による、NFκB 経路の阻害に起因する可能性が高い。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. メデルマイシン (MED) の精製	2
2-2. 使用抗体	2
2-3. 細胞培養	2
2-4. RNA-Seq	2
2-5. rtRT-PCR	3
2-6. ELISA	3
2-7. ウェスタンブロット	3
2-8. 統計分析	4
3. 結果	
3-1. RNA-Seq	4
3-2. SW-982 を用いた rtRT-PCR および ELISA	4
3-3. HSF を用いた rtRT-PCR および ELISA	6
3-4. MED による NF κ B 経路や Akt 経路への影響	7
4. 考察	9
5. 総括及び今後の課題	10
6. 謝辞	10
7. 引用文献	10

1. 序論

変形性関節症 (OA) は世界的に有病率の高い変性疾患であり、日常生活動作の低下の主な原因となっている[1]。その主な症状は、滑膜や関節軟骨、軟骨下骨の変性による疼痛や関節の変形、可動域制限である。治療法は非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を代表とした鎮痛薬の投与、コンドロイチン硫酸やグルコサミンを含む遅効性薬 (SYSADOA)、外科手術、および理学療法が挙げられる[2,3]。進行例の OA は非可逆的変化であり、薬物治療や理学療法を含む保存的加療により、OA の変性を逆転させることを示した報告はまだ無い。可逆的変化と考えられる比較的初期での病態進行を抑制、または逆転させる治療法について現在も多くの研究が行われている。

滑膜炎は OA の関節変形と痛みの発症に大きく関わり[4,5]、滑膜炎における IL1 β 、IL6、TNF α などの炎症性サイトカイン上昇により、関節軟骨における細胞外マトリクスの分解が促進されることが知られている[5, 6]。また、OA 患者では滑膜中 NF κ B 発現が増加しており[7]、OA 患者の滑膜で産生される IL6 や IL8 などの炎症性サイトカインは、NF κ B 活性化を介した異化反応のトリガーとなることが示されている[8, 9]。さらにこれらのサイトカインは、OA 患者の疼痛に関係している[10, 11]。また NF κ B は、滑膜炎において免疫細胞の遊走を促進するケモカインリガンドを調節することも知られている[12,13]。これらのメカニズムをもとに、新規 OA 治療薬として NF κ B 阻害剤の開発が注目されている。

また、近年では化合物ライブラリーを用いた創薬研究が盛んに行われている。当学北里生命科学研究所は、約 500 の天然化合物と天然物を基盤とした約 3000 の合成化合物から構成された大村天然化合物ライブラリーを保有している。今回このライブラリー中の 726 化合物を用いて抗炎症作用をスクリーニングしたところ、30 化合物が抗炎症作用を示すことがわかった。さらにこの 30 化合物の細胞毒性を調査した結果、3 化合物の細胞毒性が比較的低いことがわかった。

この 3 化合物のうち、メデルマイシン (MED) が高い抗炎症作用と比較的低い細胞毒性を示すことがわかった。MED は、*Streptomyces* 属から単離されたグラム陽性菌に活性を持つ抗生物質として知られている[14]。一部の抗生物質とその誘導体が抗菌作用だけでなく抗炎症作用をも有していることがすでに報告されている[15-18]。当研究室では線虫に有効な抗生物質として知られるジエタシンやその誘導体が、滑膜細胞において NF κ B 抑制を介して抗炎症作用を発揮することを報告している[15]。

本研究では、ヒト滑膜線維芽細胞に対する MED の抗炎症作用について調査し、その効果の作用機序を明らかにすることとした。

2. 方法

2-1. メデルマイシン (MED) の精製

Streptomyces tanashiensis 144 由来の MED [図 1] は、過去の報告と同様の方法で精製した[18]。この化合物は当初ルテオマイシン[16]として報告されたが、 $^1\text{H}^{13}\text{C}$ NMR によってメデルマイシンとして同定された[19]。

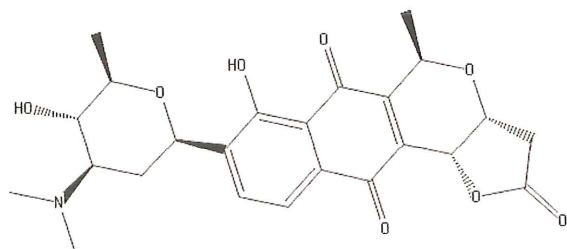


図 1: メデルマイシン (MED) の分子構造

2-2. 使用抗体

抗 p65 抗体 (No. 6956)、抗リン酸化 p65 抗体 (No. 76778)、抗 Akt 抗体 (カタログ No. 4691)、抗リン酸化 Akt 抗体 (No. 4060) は、Cell Signaling Technology 社 (アメリカ合衆国マサチューセッツ州ビバリー) より入手した。抗 GAPDH 抗体 (No. 014-25524)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (No. 115-035-146)、および HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (No. 115-035-003) は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪府大阪市) より購入した。

2-3. 細胞培養

滑膜細胞株 SW-982 は American Type Culture Collection 社 (アメリカ合衆国メリーランド州ロックヴィル) から、OA 患者由来の初代ヒト滑膜線維芽細胞 (HSF) は Sigma-Aldrich 社 (アメリカ合衆国ミズーリ州セントルイス) より入手した。これらは、10%FBS を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いて 37°C で培養した。

2-4. RNA-Seq

SW-982 における TNF α 刺激に対する MED の影響を網羅的に調査すべく、RNA-Seq を実施した。SW-982 を 1 ウェルあたり 2×10^5 細胞の濃度で播種し、72 時間培養を行った。その後、250 ng/mL MED、10 ng/mL ヒト組換え TNF α (hrTNF α) を含有させたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で 6 時間処理し、MED 群を作成した。同様に DMEM のみで 6 時間処理した Vehicle 群、DMEM と 10 ng/mL hrTNF α で 6 時間処理した TNF α 群を比較対象として作成した。これら hrTNF α 濃度やタイムポイントは、先行研究[14]に基づいて決定した。LDH アッセイを用いた先行研究において、MED 濃度が 500 ng/mL を超えると細胞毒性を呈することが示されたため、今回 MED の最大濃度を 250 ng/mL に設定した。RNA 抽出は Trizol (Invitrogen 社 アメリカ合衆国カリフォルニア

ア州カールスバッド) を溶解バッファーとして用い、Direct-zol MicroPrep キット (Zymo Research 社 アメリカ合衆国カリフォルニア州オレンジ) を使用して精製した。RNA 量は分光光度計 (Denovix 社 アメリカ合衆国デラウェア州ウィルミントン) を使用して測定し、RNA 品質チェックは Agilent2100 バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent 社 アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタクララ) を用いた。RNA-Seq は MGI DNB-SEQ-G400 シーケンサー (BGI 社 中国深圳) により実施した。

2-5. rtRT-PCR

RNA-Seq の結果をもとに、rtRT-PCR により IL1 β 、IL6 および IL8 の RNA 発現を測定し、MED の濃度別での影響を調査した。細胞は SW-982 と HSF を用い、各濃度の MED (0, 31.3, 62.5, 125, 250 ng/mL) 同時存在下で 10 ng/mL の hrTNF α で 6 時間処理した。cDNA 作成には、SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen アメリカ合衆国カリフォルニア州カールスバッド) を使用し、SYBR Green を用いた定量 PCR を行った。Vehicle 群の遺伝子発現 (各遺伝子/GAPDH) の平均値を 1 として $\Delta\Delta C_T$ 法を用い、それぞれの群の各遺伝子相対発現レベルを計算した。

2-6. ELISA

SW-982 と HSF を 96 ウェルプレート上に 1 ウェルあたり 1×10^4 細胞の密度で播種した。その後、各濃度 (0, 31.25, 62.5, 125, 250 ng/mL) の MED と同時存在下で 10 ng/mL hrTNF α で 24 時間処理した ($n = 6$)。培養上清を回収し、上清中の IL1 β 、IL6、および IL8 の濃度を ELISA キット (BioLegend アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて測定した。

2-7. ウェスタンブロット

SW-982 および HSF を 10ng/mL の hrTNF α と各濃度の MED (0, 31.25, 62.5, 125, 250 ng/mL) で 6 時間処理した ($n = 4$)。その後ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファーを使用してタンパク質抽出を行った。その後 SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに転写した。10%スキムミルクでブロッキングし、一次抗体反応には抗 p65 抗体、抗リン酸化 p65 抗体、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体、抗 GAPDH 抗体を使用し、その後 HRP 標識二次抗体と反応させた。発光検出には、Chemi-Lumi One L (ナカライテスク株式会社 京都市中京区) を用いた。CCD カメラを用いてキャプチャーし、解析には Image J ソフトウェアを利用した。標的タンパク質の相対発現レベルは、一般的なハウスキーピングタンパク質として知られる GAPDH の発現をコントロールとした。

2-8. 統計分析

DMEM のみの Vehicle 群、hrTNF α 刺激を加えた TNF α 群、および各濃度の MED 存在下で hrTNF α 刺激を加えた MED 群に分類し、各群を比較した。データ分布の正規性は Shapiro-Wilk テストを使用して評価した。各群を Kruskal-Wallis 検定（ノンパラメトリック検定）または Bonferroni 補正を伴う多重比較検定を用いて比較した。これらの統計分析には、の SPSS ソフトウェアバージョン 25.0 (IBM 社 アメリカ合衆国ニューヨーク州ニューヨーク)を使用した。すべて両側検定であり、 $p < 0.05$ の場合に統計的有意性ありと評価した。

3. 結果

3-1. RNA-Seq

SW-982 を用いたシーケンス解析では、発現変動遺伝子 (DEG) 分析により、TNF α 群では Vehicle 群と比較して 1478 の遺伝子が有意に上昇していることが示された。この内、炎症性サイトカイン (IL1 β , IL6, IL8) および AKT3 を含む 1167 の遺伝子が MED によって低下していた (図 2A)。パスウェイ解析では、DEG は NF κ B 経路 (KEGG ID 04060) および TNF シグナル伝達経路 (KEGG ID 04668) に多く含まれていた (図 2B)。

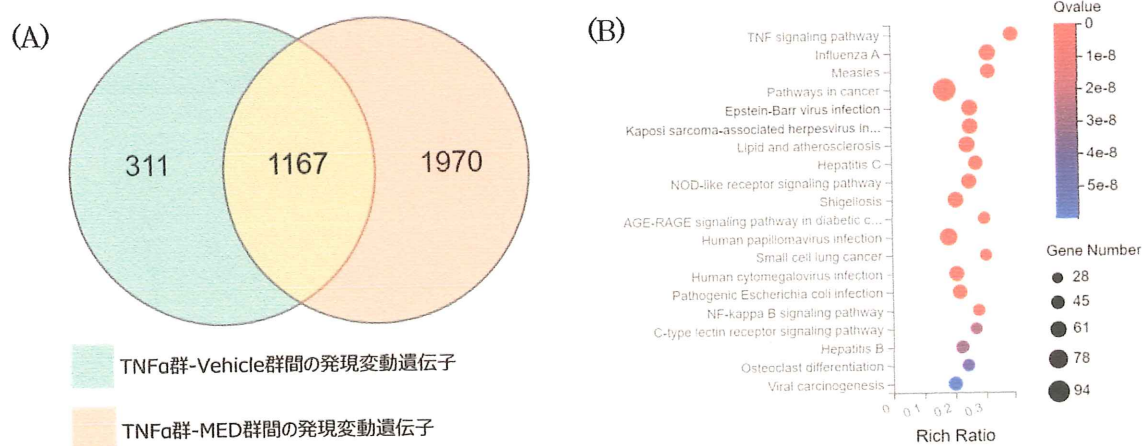


図 2. Vehicle 群、TNF α 群、MED 群の RNA-seq 結果

(A) : DEG (発現変動遺伝子) のベンダイアグラム解析を示す。TNF α 群/Vehicle 群データセットと MED 群/TNF α 群データセット間の重複領域に 1167 の遺伝子が含まれている。これは、両方の条件で差別的に発現される共通の遺伝子を示す。

(B) : DEG に関連する 20 の KEGG 経路の分析を表すバブルチャートを示す。各バブルは特定の経路を表し、バブルのサイズはその経路に関わる遺伝子数に対応している。

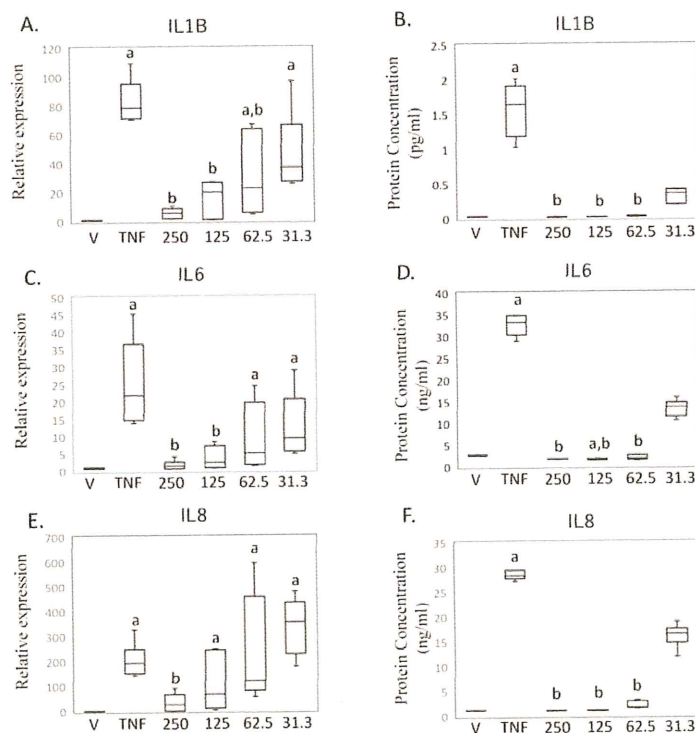
3-2. SW-982 を用いた rtRT-PCR および ELISA

Vehicle 群、TNF α 群、各濃度の MED 群を用い、rtRT-PCR および ELISA を実施した (図 3A~D) 。TNF α 群では、IL1 β が mRNA 発現とタンパク質産生の両方において有意な増加が見られた (mRNA : $p < 0.001$, タンパク質 : $p = 0.013$ 図 3A, B) 。一方、62.5、

125、および 250 ng/mL の濃度の MED 群において、この反応は阻害された (mRNA: $p = 0.043$, $p = 0.005$, $p = 0.002$, タンパク質: $p = 0.006$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ 図 3A, B)。

IL6 も同様に、TNF α 群において mRNA 発現およびタンパク質産生が有意に増加した (mRNA: $p < 0.001$, タンパク質: $p = 0.030$ 図 3C, D)。この mRNA 発現増加は 125 および 250 ng/mL の MED 群で阻害され、タンパク質産生は 62.5、125、および 250 ng/mL の MED 群で阻害された (mRNA: $p = 0.005$, $p < 0.001$, タンパク質: $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ 図 3C, D)。

IL8 も同じく TNF α 群において、mRNA、タンパク質両方のレベルで増加を認めた ($p = 0.002$, $p = 0.003$ 図 3E, F)。mRNA 発現は 250 ng/mL、タンパク質産生は 2.5、125、および 250 ng/mL の MED 群でそれぞれ有意な低下が見られた (mRNA: $p = 0.013$, タンパク質: $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.048$ 図 3E, F)。



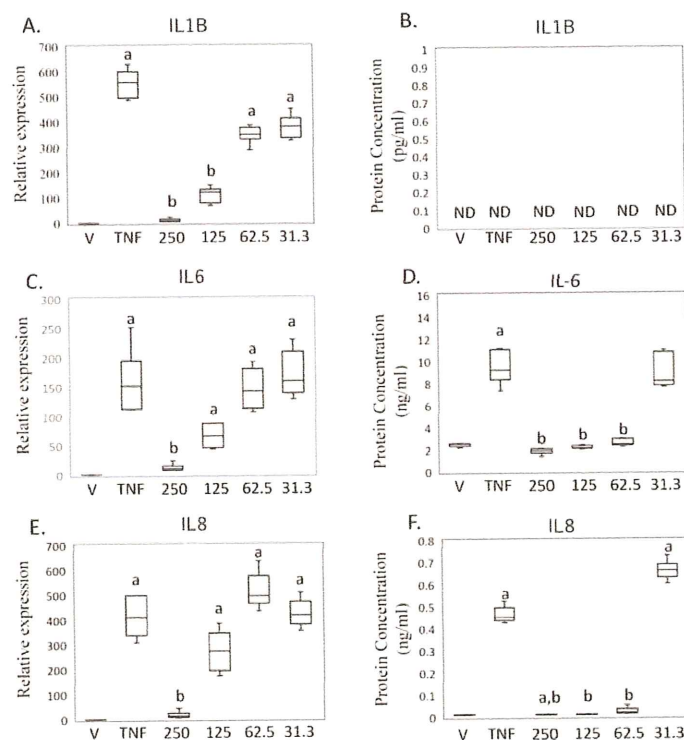
a : Vehicle 群と比較して $p < 0.05$ b : TNF α 群と比較して $p < 0.05$

- (A) rtRT-PCR による IL1 β mRNA 発現 (B) ELISA による IL1 β タンパク質濃度
 (C) rtRT-PCR による IL6 mRNA 発現 (D) ELISA による IL6 タンパク質濃度
 (E) rtRT-PCR による IL8 mRNA 発現 (F) ELISA による IL8 タンパク質濃度

図 3. SW-982 における IL1 β 、IL6、IL8 の mRNA 発現および産生に対する MED の影響を示す。SW-982 を DMEM のみで処理した Vehicle 群、hrTNF α で刺激した TNF α 群、各濃度の MED (31.3、62.5、125、250 ng/mL) 存在下で hrTNF α 刺激した MED 群で比較した。

3-3. HSF を用いた rtRT-PCR および ELISA

続いて、HSF における結果を示す (図 4A-F)。hrTNF α 刺激により IL1 β の mRNA 発現が有意に上昇した ($p < 0.001$) が、この効果は 125 および 250 ng/mL の MED によって有意に減少した (125 ng/mL : $p = 0.002$, 250 ng/mL : $p < 0.001$ 図 4A, C, E)。一方 IL1 β タンパク濃度は、ELISA の検出限界 (< 2 pg/mL) を下回っており (図 4B)、以前の研究 [14] と同様の結果であった。IL6 および IL8 については、mRNA 発現とタンパク質産生の両方が TNF α 群において有意な増加が見られた (IL6 : $p < 0.001$, $p = 0.025$, IL8 : $p < 0.001$, $p = 0.016$)。さらに、250 ng/mL の MED 群で IL6 と IL8 とともに mRNA 発現が抑制された (IL6 : $p = 0.004$, IL8 : $p = 0.014$)。また 62.5、125、および 250 ng/mL の MED 群でタンパク質産生とともに抑制されていた (IL6 : $p = 0.004$, IL8 : $p = 0.014$) (図 4C-F)。



a : Vehicle 群と比較して $p < 0.05$

b : TNF α 群と比較して $p < 0.05$

(A) rtRT-PCR による IL1 β mRNA 発現

(B) ELISA による IL1 β タンパク質濃度

(C) rtRT-PCR による IL6 mRNA 発現

(D) ELISA による IL6 タンパク質濃度

(E) rtRT-PCR による IL8 mRNA 発現

(F) ELISA による IL8 タンパク質濃度

図 4. HSF における IL1 β 、IL6、IL8 の発現および産生に対する MED の影響を示す。HSF を DMEM のみで処理した Vehicle 群、hrTNF α で刺激した TNF α 群、各濃度の MED (31.3、62.5、125、250 ng/mL) 存在下で hrTNF α 刺激した MED 群で比較した。

3.4. MED による NF κ B 経路や Akt 経路への影響

パスウェイ解析の結果、MED が滑膜細胞における NF κ B シグナル伝達経路を調節することが示唆された。また、過去の研究では、MED が腫瘍細胞株において Akt シグナル伝達を阻害することが報告されている [20, 21]。Akt シグナル伝達は NF κ B シグナル伝達と交差する可能性があるため [22-24]、我々は NF κ B および Akt 経路に対する MED の影響を調査した。

まず SW982 の p65 の発現は、TNF α 群と Vehicle 群の間では有意差を認めなかった(図 5A, B)。しかし TNF α 群と比較して MED 群では、125 ng/mL ($p = 0.026$) および 250 ng/mL ($p = 0.049$) の濃度で p65 発現が有意に抑制された。p65 リン酸化は TNF α 群で誘導されたが ($p < 0.001$)、これは 250 ng/mL の MED 群で抑制がみられた ($p = 0.040$) (図 5A, B, C)。Akt およびリン酸化 Akt の発現については、TNF α 群と Vehicle 群の間で有意差を認めなかった (図 5A, D, E)。ただし、Akt 発現は SW-982 の TNF α 群と比較して、125 ($p = 0.006$) ng/mL MED 125 ng/mL の存在下で減少した(図 5A, D)。リン酸化 Akt は TNF α 群と比較して、MED 62.5 ng/mL ($p = 0.037$)、125 ng/mL ($p = 0.045$)、および 250 ng/mL ($p = 0.035$) の群で低下が見られた (図 5A, E)。

HSF においても SW982 と同様に、p65 発現は TNF α 群と Vehicle 群で有意差は認めず (図 6A, B)、TNF α 群で p65 リン酸化が増加した($p=0.004$, 図 6A, C)。リン酸化 p65 は、MED 250 ng/mL の群で有意な抑制がみられた ($p < 0.001$, 図 6A, B)。Akt 発現は、MED 250 ng/mL の群において、Vehicle 群ならびに TNF α 群と比較してそれぞれ有意に減少した($p=0.037$, $p=0.003$)。一方リン酸化 Akt については SW982 の結果に反し、MED 62.5 ng/mL ($p = 0.040$)、125 ng/mL ($p = 0.002$)、および 250 ng/mL ($p = 0.036$)の群で有意な増加が見られた。

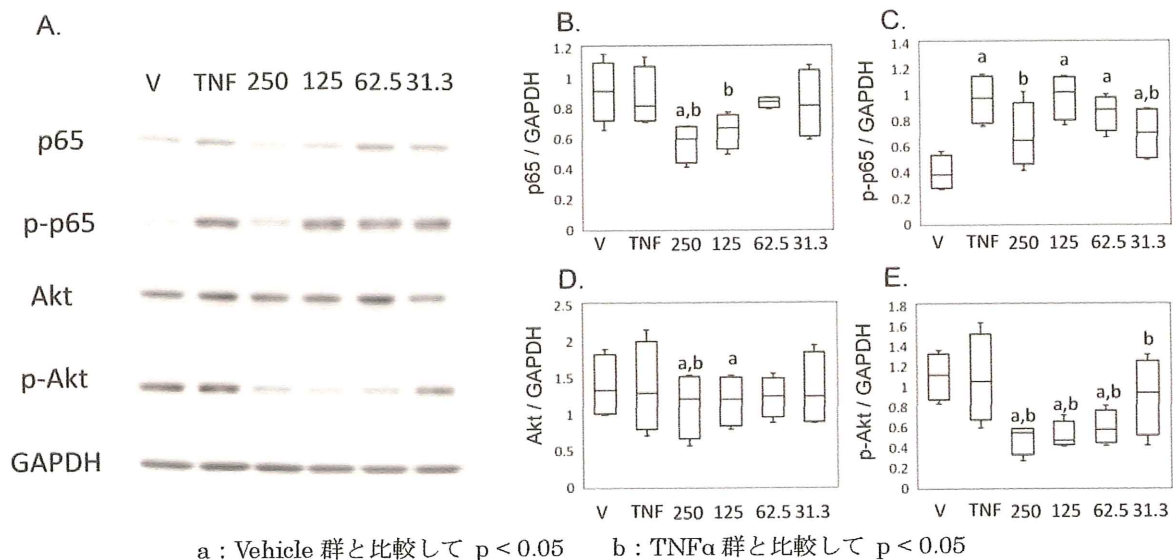


図 5. SW-982 における NFκB および Akt 経路に対する MED の効果を示す。ウェスタンブロットにより p65、リン酸化 p65 (p-p65)、Akt、リン酸化 Akt (p-Akt)、および GAPDH (A) のタンパク質発現レベルを分析した (n = 4)。バンドの吸光度を、p65 (B)、p-p65 (C)、Akt (D)、および p-Akt (E) について実施し、GAPDH 発現をコントロールとして計測した。Vehicle 群、TNFα 群、各濃度の MED 群 (31.3, 62.5, 125, 250 ng/mL) に分類し比較した。

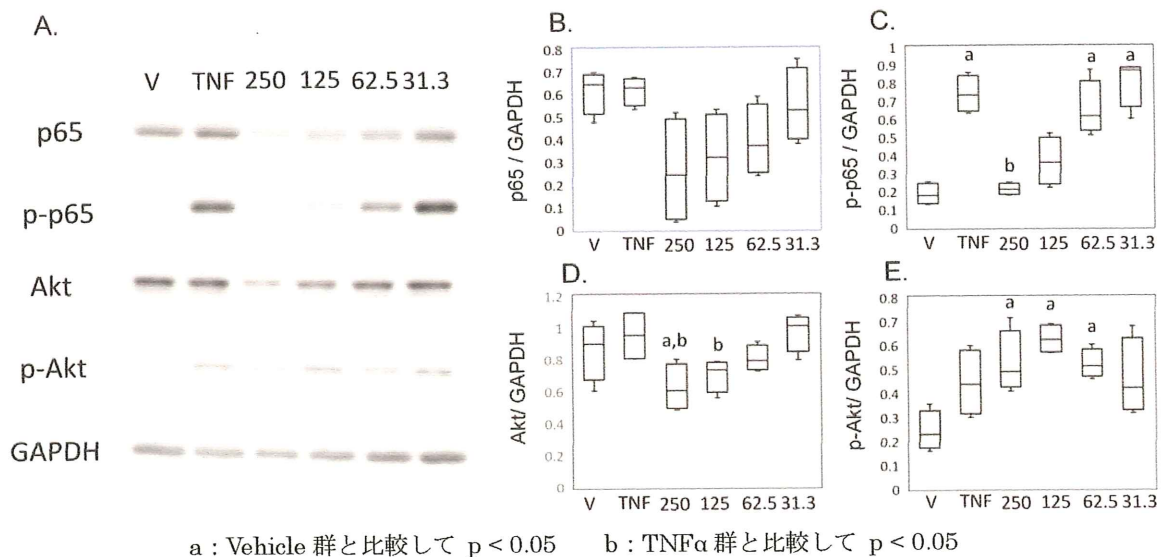


図 6. HSF における NFκB および Akt 経路に対する MED の効果を示す。ウェスタンブロットにより、p65、p-p65、Akt、p-Akt および GAPDH (A) のタンパク質発現レベルを分析した (n = 4)。p65 (B)、p-p65 (C)、Akt (D)、および p-Akt (E) のタンパク質バンドを、GAPDH 発現をコントロールとして計測した。Vehicle 群、TNFα 群、各濃度の MED 群 (31.3, 62.5, 125, 250 ng/mL) に分類して比較した。

4. 考察

本研究の結果、SW-982においてTNF α 刺激により1478個の遺伝子発現が増加し、このうち1167個の遺伝子発現がMEDにより抑制された。またDEGはTNFおよびNF κ Bシグナル伝達経路に多く含まれていることが示された。この結果は、MEDが炎症反応の調節機構に関わることを示唆している。さらに、MEDはSW982とHSFの両方においてIL6とIL8の発現をmRNA、タンパク質の両レベルで阻害し、両方の細胞においてp65リン酸化を抑制した。MEDはp65リン酸化を標的としてNF κ B活性化を抑制し、結果TNF α により誘発される炎症性サイトカイン産生を抑制すると考えられる。OAの新たな治療薬として、MEDによるNF κ B抑制効果が有用である可能性がある。

すでに多くの研究において、炎症性サイトカインの上昇とOAの重症度および症状との関連が示されている[25-30]。関節液中IL1 β 濃度とOA重症度との相関[29]や、末期OAにおいて関節液中IL6濃度の上昇[25]と、その濃度とOA患者の痛みとの相関[27]、血清IL6濃度と軟骨損傷との関連[30]が報告されている。過去の研究では、関節液中IL8濃度とOA重症度との関連性が確立されているが、血清中IL8濃度との相関は明らかでない[26]。一方Ruanらは、血清IL8濃度とOA重症度との相関を報告している[26, 28]。今回の研究では、TNF α 刺激を受けたHSFにおいて、MEDが炎症性サイトカインIL6およびIL8の産生を有意に抑制することを確認した。新規治療薬としてのMEDの有用性を明らかにするため、今後OAの動物モデルを利用したさらなる研究が必要である。

通常、NF κ Bは阻害タンパク質I κ Bとの相互作用により、不活性化された状態で細胞質に隔離されている[31, 32]。p65リン酸化は、核内におけるNF κ Bの転写活性に重要な役割を果たす[7]。本研究では、MEDがSW-982とHSFの両方においてp65リン酸化を阻害することが見出された。過去の研究ではNF κ B経路の抑制により炎症性サイトカイン産生が抑制されることが示唆されている。一方、Akt経路とNF κ B経路の相互作用についても報告されており、Aktリン酸化を阻害するとNF κ B経路が阻害され、結果炎症性サイトカイン産生が減少することが示されている[23, 24]。

PI3K/Akt経路の阻害剤であるLY294002は、HSFにおいてTNF α 刺激に対する反応を部分的に抑制することが報告されている[24]。RNA-Seqにより、SW982においてMED処理によりAKT3遺伝子の発現が低下することがわかった。この結果と一致して、SW982ではMED処理によりAktタンパク質産生が低下し、HSFにおいても同様の結果が得られた。また、MEDによりSW982におけるAktリン酸化が抑制されたが、これに反してHSFにおいてはAktリン酸化を増加させた。このことから、MEDはAktリン酸化だけでなくAkt転写活性をも調節することを示唆している。しかしAktリン酸化に対しては、SW982とHSFでそれぞれ異なる反応がみられた。MEDによる抗炎症効果の経路の詳細については、追加の実験が必要である。

5. 総括及び今後の課題

- ・ 抗菌薬として知られているメデルマイシン (MED) の滑膜細胞における抗炎症作用とそのメカニズムを調査すべく、SW-982 細胞株と初代ヒト滑膜線維芽細胞 (HSF) を用いて TNF α 刺激に対する MED の影響を検討した。
- ・ MED は、SW-983 と HSF の両方において TNF α による炎症性サイトカイン上昇効果を抑制することが示された。
- ・ MED は SW-983 と HSF の両方において NF κ B の主なサブユニットである p65 のリン酸化を抑制することがわかった。Akt のリン酸化については SW-982 と HSF とで異なる影響を示しており、MED は p65 を標的として NF κ B 活性化を抑制し、結果抗炎症作用を呈するものと考えられた。
- ・ 変形性関節症 (OA) の新規治療として、抗 NF κ B 療法などの抗炎症療法に期待が寄せられ、多くの探求がなされている。新規治療薬としての MED の有用性を検証するため、今後関節軟骨細胞を用いた実験や、OA の動物モデルを使用したさらなる研究が必要である。

6. 謝辞

本論文は、筆者が北里大学大学院医療研究科在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました北里大学整形外科教授 高相 晶士先生に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、実験の基礎技術のご指導ならびに研究に関するご助言を頂きました整形外科 内田 健太郎先生に深い感謝の意を表します。

また、これまで研究課程において数々のご指導を賜りました、北里大学整形外科診療教授の井上 玄先生をはじめ、整形外科分野の諸先生方、研究にご助力頂きました、北里大学医学部生化学准教授 板倉 誠先生、北里大学大村智記念研究所の皆様、北里大学整形外科教室の皆様に心よりの感謝を申し上げます。

7. 引用文献

1. Nelson A.E.: Osteoarthritis year in review 2017: Clinical. Osteoarthritis and Cartilage 2018; 26:319-325.
2. Stellavato A, Restaino O.F., Vassallo V, Cassese E, Finamore R, Ruosi C, et al: Chondroitin Sulfate in USA Dietary Supplements in Comparison to Pharma Grade Products: Analytical Fingerprint and Potential Anti-Inflammatory Effect on Human Osteoarthritic Chondrocytes and Synoviocytes. Pharmaceutics 2021; 13:737.

3. Mintarjo J.A., Poerwanto E, Tedyanto E.H.: Current Non-surgical Management of Knee Osteoarthritis. *Cureus* 2023;15: e40966.
4. Benito M.J., Veale D.J., FitzGerald O, van den Berg W.B., Bresnihan B: Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Disease* 2005; 64:1263-1267.
5. Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, Lane N.E., Guma M: Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nature Reviews Rheumatology* 2022; 18:258–275.
6. Pulik L, Legosz P, Motyl G: Matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: A state of the art review. *Reumatologia* 2023; 61:191-201.
7. Huang W.C., Hung M.C.: Beyond NF- κ B activation: nuclear functions of I κ B kinase α . *Journal of Biomedical Science* 2013; 20:3.
8. Mabey T, Taleongpong P, Udomsinprasert W, Jirathanathornnukul N, Honsawek S: Plasma and synovial fluid autotaxin correlate with severity in knee osteoarthritis. *Clinica Chimica Acta* 2015; 444:72–77.
9. Wojdasiewicz P, Poniatowski L.A., Szukiewicz D: The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of Inflammation* 2014; 2014:561459.
10. Leung Y.Y., Huebner J.L., Haaland B, Wong S.B.S., Kraus V.B.: Synovial fluid pro-inflammatory profile differs according to the characteristics of knee pain. *Osteoarthritis and Cartilage* 2017; 25:1420-1427.
11. Radojcic M.R., Thudium C.S., Henriksen K, Tan K, Karlsten R, Dudley A, et al.: Biomarker of extracellular matrix remodelling C1M and proinflammatory cytokine interleukin 6 are related to synovitis and pain in end-stage knee osteoarthritis patients. *Pain* 2017; 158:1254-1263.
12. Albarnaz J.D., Ren H, Torres A.A., Shmeleva E.V., Melo C.A., Bannister A.J., et al.: Molecular mimicry of NF- κ B by vaccinia virus protein enables selective inhibition of antiviral responses. *Nature Microbiology* 2022; 7:154-168.
13. Pein M, Insua-Rodriguez J, Hongu T, Riedel A, Meier J, Wiedmann L, et al.: Metastasis-initiating cells induce and exploit a fibroblast niche to fuel malignant colonization of the lungs. *Nature Communications* 2020; 11:1494.
14. Takano S, Hasuda K, Ito A, Koide Y, Ishii F, Isoko H: A new antibiotic, medermycin. *The Journal of Antibiotics* 1976; 29:765-768.
15. Muneshige K, Inahashi Y, Itakura M, Iwatsuki M, Hirose T, Inoue G, et al.: Jietacin Derivative Inhibits TNF- α -Mediated Inflammatory Cytokines Production via Suppression of the NF- κ B Pathway in Synovial Cells. *Pharmaceuticals* 2022; 16:5.

16. Nishimuta K, Ito Y: Effects of metronidazole and tinidazole ointments on models for inflammatory dermatitis in mice. *Archives of Dermatological Research* 2003; 294:544-551.
17. Pradhan S, Madke B, Kabra P, Singh A.L.: Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of Antibiotics and Their Use in Dermatology. *Indian J Dermatol* 2016; 61:469-481.
18. Scaglione F, Rossoni G: Comparative anti-inflammatory effects of roxithromycin, azithromycin and clarithromycin. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41:47-50.
19. Jiang Y.J., Zhang D.S., Zhang H.J., Li J.Q., Ding W.J., Xu C.D., et al.: Medermycin-Type Naphthoquinones from the Marine-Derived *Streptomyces* sp. XMA39. *Journal of Natural Products* 2018; 81:2120-2124.
20. Salaski E.J., Krishnamurthy G, Ding W.D., Yu K, Insaf S.S., Eid C, et al.: Pyranonaphthoquinone lactones: A new class of AKT selective kinase inhibitors alkylate a regulatory loop cysteine. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 52:2181-2184.
21. Toral-Barza L, Zhang W.G., Huang X, McDonald L.A., Salaski E.J., Barbieri L.R., et al.: Discovery of lactoquinomycin and related pyranonaphthoquinones as potent and allosteric inhibitors of AKT/PKB: Mechanistic involvement of AKT catalytic activation loop cysteines. *Molecular Cancer Therapeutics* 2007; 6:3028-3038.
22. Hadzic E, Beier F: Emerging therapeutic targets for osteoarthritis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2023; 27:111-120.
23. Li H, Xie S, Qi Y, Li H, Zhang R, Lian Y: TNF- α increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Experimental Therapeutic Medicine* 2018; 16:4737-4744.
24. Liu S, Cao C, Zhang Y, Liu G, Ren W, Ye Y, et al.: PI3K/Akt inhibitor partly decreases TNF- α -induced activation of fibroblast-like synoviocytes in osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2019; 14:425.
25. Beekhuizen M, Gierman L.M., van Spil W.E., Van Osch G.J., Huizinga T.W., Saris D.B., et al.: An explorative study comparing levels of soluble mediators in control and osteoarthritic synovial fluid. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013; 21:918-922.

26. Garcia-Manrique M, Calvet J, Orellana C, Berenguer-Llergo A, Garcia-Cirera S, Llop M, et al.: Synovial fluid but not plasma interleukin-8 is associated with clinical severity and inflammatory markers in knee osteoarthritis women with joint effusion. *Scientific Reports* 2021; 11:5258.
27. Li L, Li Z, Li Y, Hu X, Zhang Y, Fan P: Profiling of inflammatory mediators in the synovial fluid related to pain in knee osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2020; 21:99.
28. Ruan G, Xu J, Wang K, Zheng S, Wu J, Bian F, et al.: Associations between serum IL-8 and knee symptoms, joint structures, and cartilage or bone biomarkers in patients with knee osteoarthritis. *Clinical Rheumatology* 2019; 38:3609-3617.
29. Smith M.D., Triantafillou S, Parker A, Youssef P.P., Coleman M: Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology* 1997; 24:365-371.
30. Stannus O, Jones G, Cicuttini F, Parameswaran V, Quinn S, Burgess J, et al.: Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010; 18:1441-1447.
31. Baldwin A.S. Jr.: The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology* 1996; 14:649-683.
32. Naumann M, Scheidereit C: Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *The EMBO Journal* 1994; 13:4597-4607.