

学 位 論 文 要 旨

氏 名 井上 翔



論 文 題 目

「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)

指 導 教 授 承 認 印

高相 翔士



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)

氏名 井上 翔

(以下要旨本文)

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 NF κ B 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 NF κ B 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 TNF- α 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 TNF- α 刺激による IL6、IL8、IL1 β 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、NF κ B 経路の阻害に起因する可能性が高い。