

審査の結果の要旨

氏名 齋藤茂樹

変形性関節症 (OA)や慢性関節リウマチ (RA)などの関節症は、関節軟骨破壊を特徴とする疾患である。特にOAでは痛み止めとしての抗炎症薬の投与など対症療法が中心であり、軟骨破壊を抑制する進行抑制薬が待望されている。関節軟骨マトリクスは主としてII型コラーゲンとプロテオグリカンから構成され、関節の弾性、柔軟性に重要な役割を演じており、OAやRAにおいてはマトリクス分子の分解が認められることから、マトリクス分子の分解活性を有するマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP)が、関節症治療薬の標的候補として注目されている。これまで、MMPを阻害するステップとして、酵素活性の阻害、発現の阻害、誘導因子の阻害などが想定され、これらを標的としたMMP阻害による関節症治療薬が目指されてきた。しかし、このような考えに基づいた創薬には、以下の未解決な問題点がある。第一に、各MMPの阻害がどのマトリクス分子の分解抑制につながるかが軟骨培養系のレベルで明らかでない。第二に、MMP誘導因子阻害を狙う場合、病態での誘導因子が何か必ずしも明らかでない。そこで本研究では、上記の問題点を明らかにし、MMP阻害による関節症治療の可能性を明らかにすることを目的として、以下の検討を行った。

1. 関節軟骨コラーゲン分解へのMMPの関与

創薬研究でスクリーニングを行うに当たって、実際にどのMMPがどのマトリクス分子の分解に関与するかを知ることは極めて重要な問題である。そこで、まず最初に、主要な軟骨マトリクス成分であるコラーゲンの分解にMMPが関与するか否かをウサギ関節軟骨培養系を用いて検討した。その結果、関節軟骨培養系のコラーゲンはプロテオグリカンと異なり、IL-1刺激のみでは分解されず、MMP活性化因子であるplasminogen (plgn)とIL-1の両方の添加により効率的に分解されることを認めた。これは、関節軟骨を用いた系でのコラーゲン分解の初めての報告である。一方、MMPに関して調べたところ、IL-1単独の添加によりMMP-1、-3、-9の誘導が認められたが、いずれも前駆体がメインであり、plgn添加により活性化が起こること分かった。このコラーゲン分解は、MMP阻害蛋白(tissue inhibitor of metalloproteinase-1)によりほぼ完全に抑制され、更にMMP-1、-3、-9各々に対する抗体の添加実験から、特に抗MMP-1抗体が用量依存的に分解を抑制することを示した。以上の結果から、主としてMMP-1が前駆体として産生され、活性化を受けた後にコラーゲン分解に関与することを示唆した。

2. Dexamethasone(Dex)のマトリクス分解抑制効果

DexはMMPの発現を転写レベルで抑制することからマトリクス分解抑制作用が期待される。しかし、これまで軟骨培養系ではプロテオグリカン分解への効果のみが検討され、分解

抑制効果がないと報告されていた。そこで、ウサギ軟骨を用いたコラーゲン分解系を用いてDexの軟骨分解抑制効果の有無を解析した結果、MMP-1、およびMMP-3の産生を抑制すると同時にIL-1とplgn添加によるコラーゲン分解を阻害することを認めた。一方、IL-1刺激によるプロテオグリカン分解に対しては報告通りにDexは阻害効果を示さなかった。このようにコラーゲン分解を指標とすることで、Dexが軟骨マトリクス分解抑制作用を有することを初めて示し、MMP産生の阻害が関節症治療の標的となる可能性を示した。

3. Fibronectin-extra-domain-A(FN-EDA)のMMP誘導活性

病態特有のMMP誘導因子が同定されれば、それを標的にした副作用の少ないマトリクス分解抑制剤の開発が期待されるという考えに基づき、新規MMP誘導因子の探索として、関節症において発現が上昇することが報告されている細胞外マトリクスのFN分子にalternative-splicingにより挿入されるEDAに着目し、病態への関与を検討した。

先ず、大腸菌で作成した組換え型EDAを含む培地でウサギ軟骨および滑膜細胞を培養し、用量依存的なMMP-1、-3、-9の産生誘導を、タンパク質あるいは活性レベルで認めた。また、MMP-1、-3、-9のmRNAの上昇も観察し、EDAが転写レベルでMMPの発現を亢進する事を示した。更に、EDA添加に伴うMMP mRNAの発現上昇に先立ってIL-1 mRNAの発現誘導が起こること、IL-1 receptor antagonistの添加は、EDAによるMMP-1の産生を抑制することを観察した。以上から、EDAは炎症性サイトカインIL-1の発現を誘導し、二次的にMMP発現を誘導することを示唆した。

次に、MMP誘導活性が全長FNの中のEDAにあるのか、断片化して初めて出てくるものなのかを解明するため、種々組換え体を作成し検討した。その結果、隣接するドメインを片側に一つ結合させたEDAの活性は減少し、さらに両側に結合させたEDAでは活性が消失すること、EDAを含む全長FNはMMP-1を誘導しないこと等を見出し、EDAのMMP誘導活性は通常マスクされており、その近傍の断片化によって生じてくる可能性を示した。生理的なEDA断片の存在を調べるため、胎盤から精製を試み、160kDaのFN-EDA断片（N端からEDAまでを含む）を検出すると共に、この断片がMMP-1誘導活性を有することを認めた。以上から、関節症に伴ってEDAとプロテアーゼの発現が上昇した結果、FN-EDAの断片化が生じ、この断片がIL-1やMMPを誘導することで更にマトリクス破壊を助長するという病態増悪化の可能性を示唆した。

以上、本研究ではウサギ軟骨および滑膜培養系を用いることにより、活性化MMP-1がコラーゲンの分解に関与すること、DexがMMPの発現を阻害することによりコラーゲン分解を抑制すること、更にFN-EDAがMMP誘導能を有すること、等を明らかにした。これらの新発見は、関節症治療薬の開発に重要な指針を提供するものであり、博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと判断した。