

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	金井 朋毅
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 963 号
学位授与の日付	令和2年9月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	The JNK pathway represents a novel target in the treatment of rheumatoid arthritis through the suppression of MMP-3 (JNK pathway は MMP-3 抑制を通して関節リウマチ治療における新たな標的になる。)
論文審査委員	主査 教授 成田 一衛 副査 教授 松田 健 副査 教授 藤井 雅寛

博士論文の要旨

【背景と目的】

関節リウマチ (RA) は、好中球、マクロファージからの TNF α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインの過剰産生によって生じる炎症促進と、これらと関連がある活性酸素種 (ROS) の産生と滑膜細胞からのマトリクスメタロプロテナーゼ (MMPs) 産生の増加による関節破壊が病因として考えられてきた。これまでは、炎症性サイトカインを抑制する生物学的製剤による治療に焦点絞られていたが、炎症を惹起させる ROS などの酸化ストレスや MMP-3 などのタンパク分解酵素の抑制をターゲットとした研究は、十分には進んでいなかった。申請者らは、RA における抗酸化物質として N-acetylcysteine (NAC) の効果を検討する中でストレスキナーゼである c-Jun N terminal kinase (JNK) pathway の阻害によって、MMP-3 を抑制できるのではないかと仮説を立てた。

【方法】

関節リウマチ線維芽様滑膜細胞 (MH7A 細胞) に対する、NAC の障害性を XTT assay で評価し、MH7A 細胞に対する NAC 投与による抗酸化効果を Nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2) や phospho-p62, JNK などを Western blotting (WB) 法や細胞蛍光免疫染色で評価した。また関節破壊に繋がる MMP-3 発現は WB 法で測定した。炎症性サイトカインである IL-6 については chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) によって細胞上清から測定し、さらに ROS の測定には、MUSE cell analyzer を用いた。NAC の実験結果から、JNK pathway と MMP-3 の関連を疑い、MH7A 細胞における JNK 阻害薬 (SP600125) 投与後の MMP-3 発現、ROS の変化も同様に測定した。最後に RA 患者の滑膜組織から得た初代細胞分散培養細胞 (RA-FLS) についても同様に WB 法で MMP-3 を測定した。

【結果】

MH7A 細胞への低用量 NAC (1000 μ M) 投与によって抗酸化遺伝子を活性化する Nrf2 と p62 の誘導が確認され、H₂O₂ (100 μ M) 投与で誘導された ROS を NAC が抑制する抗酸化効果が確認された。MH7A 細胞は、もともと MMP-3 発現が高い細胞であるため低用量 NAC (1,000 μ M) は投与3時間後で JNK のリン酸化を抑制し、

24 時間後で MMP-3 を抑制した。一方、炎症性サイトカインである IL-6 発現は、NAC による有意な抑制効果は確認できなかった。

JNK のリン酸化の抑制が、MMP-3 発現を抑制するかについて検証する目的で、MH7A 細胞に JNK inhibitor (SP600125 ; 15 μ M と 30 μ M) を投与したところ投与後 3 時間で JNK のリン酸化を抑制した。さらに NAC と同じく JNK 阻害薬 (SP600125) は投与後 3、24 時間で H2O2 (100 μ M) 投与で誘導された ROS を抑制した。また JNK 阻害薬 (SP600125) の投与後 24 時間で H2O2 (100 μ M) 投与で誘導された細胞上清液中の IL-6 濃度を抑制した。最後に JNK 阻害剤 (SP600125 : 30 μ M) は投与後 24 時間で MMP-3 発現を抑制し、さらに RA 患者の滑膜組織から得た RA-FLS においても投与後 3、24 時間で MMP-3 発現を抑制した。

【考察】

申請者らは、低用量 NAC (1000 μ M) と JNK 阻害薬 (SP600125) が、MH7A 細胞における MMP-3 産生を抑制する効果を明らかにした。

抗酸化物質である NAC は *in vitro* で炎症性サイトカインを刺激する NF- κ B を抑制するために NAC 濃度は 5mM 以上必要とされていた。しかし本研究で、MH7A 細胞における NAC (5mM) 投与後 24 時間で 50% の細胞障害性を示したことから、細胞障害性が 10% 以下である 1,000 μ M 以下を選択した。また NF- κ B の発現は IL-6 産生と関連があるとされている過去の報告では低用量 NAC (1,000 μ M) では NF- κ B の転写活性を抑制できないとされており、本研究でも NAC (1,000 μ M) 投与で IL-6 を抑制できなかった。一方 NAC (1,000 μ M) 投与は JNK のリン酸化を抑制でき、さらに MMP-3 発現を有意に抑制した。このため JNK シグナル伝達系の下流に MMP-3 が存在することから JNK 阻害薬 (SP600125) の効果を MH7A 細胞で確認したところ、MMP-3 発現の抑制のみならず、抗酸化効果 (ROS 産生抑制) と抗炎症効果 (IL-6 抑制) が確認できた。この結果は、パラコートを使用したヒト肺胞基底上皮癌細胞 (A549 cells) での JNK 阻害によって IL-6 と MMP-3 が抑制されたという Shen H. ら (inflammation. 2017) の報告に一致した。さらに RA 患者の滑膜組織から得た RA-FLS においても、JNK 阻害薬 (SP600125) が、MMP-3 発現を抑制したことから RA の治療ターゲットとしても成立することを示した。

【結論】

申請者らは MH7A 細胞において、抗酸化物質である低用量 NAC 投与と JNK 阻害剤 (SP600125) が、MMP-3 発現を抑制するメカニズムの存在を明らかにした。このメカニズムは、患者由来 RA-FLS においても存在しており、JNK pathway の制御は、今後 RA 治療の新たな標的となりうる。

審査結果の要旨

関節リウマチ (RA) は、好中球、マクロファージの TNF α 、IL-1 β 、IL-6 等の炎症性サイトカインの過剰産生によって生じる炎症、活性酸素種 (ROS) の産生、および滑膜細胞からのマトリクスメタロプロテナーゼ (MMPs) 産生増加による関節破壊が病因と考えられている。炎症性サイトカインを抑制する生物学的製剤が治療薬として使用されているが、炎症を惹起させる ROS などの酸化ストレスや MMP-3 などのタンパク分解酵素の抑制を標的とした研究は、進んでいなかった。申請者らは、抗酸化物質 N-acetylcysteine (NAC) とともに、ストレスキナーゼである c-Jun N terminal kinase (JNK) pathway の阻害によって MMP-3 を抑制できるかどうかを関節リウマチ線維芽様滑膜細胞 (MH7A 細胞) および RA 患者の滑膜組織から得た RA-FLS を用いて *in vitro* で検討した。低用量 NAC と JNK 阻害薬 (SP600125) は、MH7A 細胞における MMP-3 産生を抑制した。さらに、JNK SP600125 は抗酸化効果 (ROS 産生抑制) と抗炎症効果 (IL-6 抑制) を示した。RA-FLS においても JNK 阻害薬は MMP-3 発現を抑制した。

以上、MH7A 細胞と RA-FLS において、低用量 NAC と JNK 阻害剤が、MMP-3 発現を抑制するメカニズムの存

在を明らかにし、新たな治療戦略の可能性を示した点に本論文の博士論文としての価値を認める。