

現在、HIV 感染者の病期が進行し、EBV が再活性化した場合、直接的に EBV の増殖を抑制する治療法はなく、抗 HIV 療法を導入し、宿主の免疫回復にて EBV を不活化するしかないのが現状である。本研究の結果から、HIV 感染者の EBV 再活性化のモニタリングとして、EBV DNA 測定の外に、B リンパ球の CD18 陽性率の検査が有用であると考えられた。

また、HMG-CoA 還元酵素阻害剤などにより、LFA-1 を選択的に阻害することで、悪性リンパ腫細胞の血管外への進展を回避し、AIDS 関連 PCNSL の発症を予防できる可能性が考えられた。

【評価】

本研究により、HIV 患者では免疫不全に続発する EBV の再活性化によって不活化された B リンパ球において、オートクライン、パラクラインの機構で産生される IL-8 の刺激により CD18 の発現が上昇すること、その結果として、不活化 B リンパ球の血管内皮細胞への接着能が増し、PCNSL の発症に関わることが明らかとなった。これらの結果は、AIDS 関連 PCNSL という特殊な病態の発症機構に関わる分子を同定した点で学術的価値は高い。

さらに、本研究によって HIV 患者の B リンパ球における EBV の再活性化のスクリーニングに CD18 発現のモニタリングが有用であること、LFA-1 の阻害薬による PCNSL の発症予防の可能性が示唆され、予後不良の本疾患に対する臨床的意義も極めて高い。

これらの結果から、本研究は学位に値する研究であると判断する。

氏 名	中 川 晃 一
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 1 0 8 3 号
学位授与の日付	平 成 2 4 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	機械的ストレスによる軟骨変性に対するヒアルロン酸の保護作用と細胞内情報伝達機構
論文審査委員 (主 査)	教 授 濱 西 千 秋
(副主査)	教 授 磯 貝 典 孝
(副主査)	教 授 梶 博 史

【目的】

変形性関節症の治療薬としてヒアルロン酸 (hyaluronan, HA) の関節内注入療法が広く使用されている。本研究では、HA の作用を機械的ストレスに対する軟骨細胞内情報伝達機構の側面より検討することとした。

【方法】

最初に HA の抗酸化作用について検討した。ウシ関節軟骨に圧迫負荷を加え、そこに HA を添加し、APF (3-(*p*-Aminophenyl) fluorescein) を用いて組織中の ROS の発生を蛍光強度の増加として観察した。次に圧迫負荷に伴う type 2 collagen, aggrecan の遺伝子発現の変化を観察した。また、転写因子である SOX9 についても検討した。それぞれ HA, HA 受容体の阻害剤である抗 CD44 抗体, Mitogen activated protein kinases (MAPK) の一つである p38 の阻害剤である SB202190 で前処理を行った。さらに、圧迫負荷に伴う p38 のリン酸化と基質分解酵素である MMP-13 の蛋白量の発現の変化と HA の効果を検討した。また、抗 CD44 抗体, SB202190 による前処理も行った。

【結果】

圧迫負荷により ROS 産生が増加し、type 2 collagen や aggrecan の遺伝子発現が抑制された。HA はこれらの基質合成能を回復させるとともに、ROS 産生を抑制した。基質合成調節因子である SOX9 は、圧迫負荷により発現量が減少し、HA 添加により回復した。この現象は抗 HA 受容体抗体にて打ち消された。また、圧迫負荷に伴う SOX9 の発現量の低下は P38 の阻害剤添加でも回復した。さらに、圧迫負荷によりリン酸化 P38, MMP-13 の発現が亢進し、HA 添加により抑制された。この過程にも HA 受容体および P38MAPK が関与していた。

【考察】

機械的ストレスによる基質合成能の低下には、その調節因子である SOX9 が関与し、HA の SOX9 発現回復効果は HA 受容体を介していることが示唆された。一方、細胞外基質分解能の亢進には MMP-13 発現が重要な役割を果たしており、機械的ストレスによる P38 のリン酸化により MMP-13 の発現が亢進し、HA は HA 受容体を介して P38 のリン酸化を抑制することで MMP-13 の発現を抑制しているということが示唆された。

【結論】

軟骨細胞に対する機械的ストレスは ROS 合成亢進と P38 MAPK リン酸化へと変換され、それぞれ基質合成抑制と MMP13 の産生促進となり、最終的に軟骨変性を惹起する。これに対して、HA はその受容体である CD44 を介して ROS 産生抑制および P38MAPK リン酸化抑制を来すことより、軟骨保護作用を発揮している可能性が示唆された。

博士論文の印刷公表	公表年月日	出版物の種類及び名称
	平成23年 月 日 公表予定	出版物名
	公表内容	近畿大学医学雑誌 第36巻 第3・4号
	全文と要約	平成23年 月 日 発行予定

【目的】

変形性関節症の治療としてヒアルロン酸 (HA) の関節内注入が広く行われている。しかしその作用機序については不明な部分が多い。これまで近畿大学医学部整形外科教室では変形性関節症の病因として機械的ストレスに注目し、活性酸素種 (ROS) がその情報を伝達することを明らかにしてきた。本論文は HA の作用を、機械的ストレスに対する軟骨細胞内情報伝達機構より検討したものである。

【方法】培養細胞ではなく軟骨片をそのまま圧迫刺激できる FX-4000C (Flexcell International, Hillsborough, NC) システムを用い、ウシ関節軟骨片を非生理的と考えられる 28kPa で 6 時間圧迫し、組織中の ROS の発生を蛍光組織法で観察し、さらに分子量 800KD の HA で前処理し、同様に観察した。ついで typeII collagen や アグリカンといった細胞外基質の遺伝子発現を RT-PCR で測定した。また基質合成調節因子である SOX9 の遺伝子発現を HA, HA 受容体 CD44 阻害剤である IM7, Mitogen activated protein kinases の一つである p38 MAPK の阻害薬である SB202190 などの影響下で測定した。また蛋白分解酵素である MMP-13 やリン酸化 P38 などの蛋白発現を上記の圧迫、HA、薬剤影響下で Western blotting により測定した。

【結果】

関節軟骨に対する非生理的な強い圧迫負荷は活性酸素産生を増加させ、これは HA により抑制された。すなわち HA は抗酸化作用を有する事が改めて示された。また強い圧迫負荷は typeII collagen やアグリカンといった軟骨基質蛋白の遺伝子発現を抑制したが、HA はこれらの基質合成能を回復させた。また SOX9 は圧迫負荷により発現量が減少し、HA 添加により回復した。またこの SOX9 の減少は p38 MAPK の阻害剤により回復した。また圧迫負荷によりリン酸化 P38 や蛋白分解酵素 MMP-13 の蛋白発現が亢進し、HA 添加により抑制されたがこの過程にも HA 受容体である CD44 や p38MAPK が関与した。

【考察および結語】

本論文は、軟骨細胞への強い機械的ストレスが、活性酸素の合成亢進や p38 MAPK のリン酸化などを引き起こし、それぞれが軟骨基質の合成を抑制し、基質蛋白分解酵素の産生を促進すること、そしてそれらの機能が軟骨変性を惹起

する可能性を示し、さらにこれらに対してヒアルロン酸がその受容体である CD44 を介して活性酸素の産生、および p38MAPK のリン酸化を抑制することなどにより軟骨保護作用を発揮している可能性を示したものである。すなわちヒアルロン酸の臨床的有効性を、軟骨細胞内における情報伝達機構より明らかにしたものであり高い意義を有すると思われる。以上をふまえ、主査と副主査は規定の各種審査、ならびに博士學位論文公聴会（平成 24 年 1 月 26 日）を実施し、慎重に審査した結果、本論文は博士（医学）學位論文に値すると判断した。

氏 名	竹 村 豊
学位の種類	博 士（医学）
学位記番号	医 第 1 0 8 4 号
学位授与の日付	平 成 2 4 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	A tubulointerstitial nephritis antigen gene defect causes childhood-onset chronic renal failure (尿細管間質性腎炎惹起抗原の欠如は小児期の末期腎不全を引き起こす)
論文審査委員（主査）	教授 竹 村 司
	(副主査) 教授 植 村 天 受
	(副主査) 教授 佐 藤 隆 夫