

氏名(国籍)	おう 王	ぎょう 暁	ひ 斐	(中 国)
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	博 甲 第 3794 号			
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	Overexpression of Human Matrix Metalloproteinase-12 Enhances the Development of Inflammatory Arthritis in Transgenic Rabbits (hMMP-12 の過剰発現はトランスジェニックウサギの炎症性関節炎を促進する)			
主 査	筑波大学教授	医学博士	住 田 孝 之	
副 査	筑波大学客員教授	薬学博士	四 釜 久 隆 (山之内製薬株式会社製品企画部部長)	
副 査	筑波大学助教授	博士 (獣医学)	杉 山 文 博	
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	水 谷 太 郎	

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的) マトリックスメタロプロテアーゼ-12 (MMP-12) はマクロファージから分泌される金属依存性の細胞外マトリックス分解酵素であり、エラスチンを始めとする細胞外基質を分解することにより、動脈硬化、リウマチ関節炎、肺気腫などの発生に重要な役割を果たしている。最近、我々はヒトリウマチ患者の滑膜及び滑膜液では MMP-12 の発現が著しく亢進していることを見出した (Liu, et.al. Arth Rheum 50 : 3112-17, 2004)。しかし、MMP-12 の高発現はどのように炎症性関節炎に関わっているのか特にそのメカニズムに関してはまだ解明されていない。本研究では、炎症性関節炎の発生における MMP-12 の役割を *in vivo* で解明することを目的として、我々が開発した MMP-12 過剰発現するトランスジェニック (Tg) ウサギを用いて、研究を行った。

(材料と方法) Tg 及び正常ウサギ (メス, 4-5 ヶ月齢, 各群 18 羽) を用いて右の膝関節に 0.3ml carrageenan 液を注入することによって無菌性関節炎モデルを作成した。sham コントロールとして同じウサギの左の膝関節腔に同量の食塩水を注入した。注射後, 7, 14, 35 日目で両膝関節組織並びに滑膜液を採取し、病理学的並びに分子生物学的な解析を行った。関節炎の程度は HE 染色切片を顕微鏡で評価した上で、滑膜増殖の程度 (Rooney 法により) 及び関節炎の病理所見であるパンヌスのサイズ (画像解析により) を定量的に計測した。また、関節軟骨の破壊程度について Safranin O 染色により proteoglycan (PG) 染色性を評価した。各ステージにおける滑膜に浸潤したマクロファージの数及び MMP-12 発現量は免疫染色像を用いた画像解析並びに Western blot で測定した。滑膜液の MMP-12 の活性を確認するために β -casein Zymography を行った。マクロファージの遊走能に及ぼす MMP-12 の影響について両群のウサギから肺胞マクロファージを採取して、Boyden chamber により MCP-1 に対するマクロファージの走化性を評価した。

(結果) Carrageenan に誘導された関節炎はヒトのリウマチ関節炎の病理特徴と類似しており、滑膜の増殖やパンススの形成、軟骨の破壊などが観察できた。滑膜炎の程度を解析したところ、正常ウサギに比べ、Tg ウサギのほうがマクロファージの浸潤が強く、滑膜炎スコアは7日（正常より1.5倍）と14日目（正常より1.46倍）に高度であった。パンススの形成は14日目に peak となり、正常ウサギと比べて、Tg ウサギではパンススのサイズが著明に（正常より1.63倍）大きかった。関節軟骨基質の破壊が Carrageenan の注射後35日目に見られるようになり、軟骨 PG の量の減少と共に関節表面の軟骨の侵食や欠損などの病理所見が Tg ウサギではしばしば認められた。関節炎の程度が MMP-12 発現量あるいはマクロファージの数と相関しているかどうかを調べるために、画像解析及び Western blot で MMP-12 発現量並び滑膜に浸潤したマクロファージの数を比較した。Tg ウサギのほうが正常ウサギより病変の MMP-12 の発現量が強くしかも浸潤したマクロファージの数も増えていることが認められた。また Western blot の解析により、Tg ウサギの滑膜と滑膜液において MMP-12 の増加と共に MMP-3 蛋白の分泌量も正常より多いことが分かった。走化性実験では、MCP-1 に対するマクロファージの走化性は Tg ウサギのマクロファージが正常ウサギより 3.26 倍高く、MMP-12 はマクロファージの遊走を促進することが示唆された。

(考察) 本研究では炎症性関節炎の発生における MMP-12 の役割を *in vivo* で解明することを目的として、ヒト MMP-12 を過剰発現する Tg ウサギを用いて、carrageenan で誘導された関節炎モデルにより検討した。滑膜増殖やパンススの形成、軟骨の破壊に関しては、Tg ウサギのほうが正常ウサギよりそれらの程度が著しく強いことから、MMP-12 の過剰発現は直接的に細胞外基質や軟骨基質の分解を強め、病変の進展を促進することが考えられた。興味深いことに、MMP-12 の過剰発現が関節炎に深く関わっている。MMP-3 を活性化することにより、炎症性関節炎の発生をさらに促進することが示唆された。特に関節炎の過程においては MMP-12 が細胞外基質を分解することによってマクロファージの遊走能を高め、関節炎の進展を増悪させる可能性が考えられる。今後、MMP-12 発現の抑制はリウマチ関節炎の治療を目的とした新薬の開発においても大きな意義を持つことが示唆された。

(結論) マクロファージ特異的に MMP-12 の過剰発現は carrageenan に誘導された関節炎を促進することが明らかにされた。MMP-12 の過剰発現は細胞外基質を分解することによりマクロファージの浸潤を促進させ、滑膜の増殖やパンススの形成、軟骨の破壊などに関与していることが明らかとなった。MMP-12 は炎症性関節炎の発生における細胞外基質の分解において中心的な役割を果たしていることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、炎症性関節炎の発生におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-12 (MMP-12) の役割を *in vivo* で解明することを目的として、MMP-12 過剰発現するトランスジェニック (Tg) ウサギを用いて解析が行われた。その結果、マクロファージ特異的に MMP-12 を過剰発現することにより carrageenan に誘導された関節炎が促進することを明らかにした。今後、関節炎治療のターゲットとして MMP-12 が重要であることを示した。本研究は世界的にも高く評価されている。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。