

氏名（本籍）	長田 侑			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第 9936 号			
学位授与年月	令和 3 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	Citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 in arthritic joints and its potential effect in the neutrophil migration（炎症関節におけるシトルリン化 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 と好中球遊走におけるその潜在的意義の検討）			
主査	筑波大学教授	博士（医学）	松阪	諭
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	三島	初
副査	筑波大学講師	博士（医学）	際本	拓未
副査	筑波大学助教	博士（医学）	川崎	綾

論文の内容の要旨

長田 侑氏の博士学位論文は、pGIA マウスおよび RA 患者における ITIH4 の発現、そのシトルリン化のメカニズムと、好中球の機能に関連する ITIH4 および cit-ITIH4 の役割を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）筆者はまずインターアルファトリプシンインヒビター重鎖 4（Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4: ITIH4）について、ペプチドグルコース 6-リン酸イソメラーゼ誘発関節炎（peptide glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis: pGIA）マウスと RA 患者の血中でシトルリン化 ITIH4（Citrullinated inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4: cit-ITIH4）が特異的に増加することを先行研究に基づいてまとめている。そして、これらの背景を踏まえ、本論文の目的は、pGIA マウスおよび RA 患者における ITIH4 の発現、そのシトルリン化のメカニズムと、好中球の機能に関連する ITIH4 および cit-ITIH4 の役割を明らかにすることであると述べている。

（対象と方法）

筆者は、DBA / 1 マウスを pGPI で免疫し多発性関節炎を誘発する pGIA 関節炎モデルマウス、および日本人の RA 患者および変形性関節症（OA）患者の血漿と滑液、また健康なボランティア（Healthy volunteer: HV）の血漿を用いて研究を行った。筆者は、pGIA マウスを用いて、ITIH4、cit-ITIH4 発現解析と、好中球除去による pGIA マウスのシトルリン化蛋白レベルの変化を解析した。筆者は、ヒト関節におけるシトルリン化蛋白の関連を評価するために、RA および OA 患者由来の滑液液中の ITIH4 および cit-ITIH4 の発現を測定した。また、ITIH4 および citITIH4 蛋白の好中球遊走への関与を実験レベル

で解析を行った。

(結果)

筆者は、ITIH4 シトルリン化のメカニズムを明らかにするために、マウス pGIA 関節炎モデルを用いて、ITIH4 が、免疫 14 日後（関節炎極期）に増加し、28 日後（関節炎後期）に消失することを明らかにした。免疫 14 日後の pGIA マウスからの組織ライセートおよび血漿の比較では、cit-ITIH4 レベルは関節で有意に増加することを明らかにした。次に、筆者は、免疫 14 日後に、Pad4 mRNA が、対照マウスと比較して pGIA 関節で有意に増加することを明らかにした。特に浸潤する好中球において蛋白レベルでの PAD4 発現が確認され、さらに、PAD4 は好中球周囲の細胞外にも存在し、連続切片の対応する領域に ITIH4 蛋白が存在していることを明らかにした。

さらに筆者は、好中球と蛋白のシトルリン化の関連をさらに調査するために、抗 Gr-1 抗体の腹腔内投与により pGIA マウスの好中球を除去させることを試みた。抗 Gr-1 抗体は、アイソタイプコントロールと比較して末梢好中球数を減少させ、関節炎の重症度を軽減し、好中球の除去で PAD の関節局所発現が著しく低下することが明らかにした。さらに、血漿および関節におけるシトルリン化蛋白の発現は、抗 Gr-1 抗体の投与により有意に低下した。また、抗 Gr-1 抗体と比較して、より好中球を特異的に結合するとされる抗 Ly6G 抗体を用いて好中球の除去を施行し、同様にシトルリン化 ITIH4 の発現低下を明らかにした。

筆者は、ヒト関節におけるシトルリン化蛋白の関連を評価するために、RA および OA 患者由来の滑液を AMC 抗体を用いたウェスタンブロットで測定した。その結果、ITIH4 の分子量に対応する 120kD バンドを含むいくつかのシトルリン化蛋白を RA 患者滑液でのみ観察されることを明らかにした。さらに筆者は、ITIH4 のシトルリン化は RA 患者でのみ観察され、RA 患者の間では、バンド強度が血漿よりも滑液で有意に高いことを明らかにした。

筆者は、補体系の活性化は好中球の遊走を惹起し、他の ITIH ファミリー蛋白において補体カスケードの阻害作用が報告されていることから、ITIH4 蛋白と好中球遊走に関して焦点を当て検討を行った。血清を含まない場合には遊走は惹起されず、ITIH4 蛋白単独で走化性作用はないことを明らかにした。さらに筆者は、ITIH4 および citITIH4 蛋白の好中球遊走能を測定し、ITIH4 の添加は、フィブリノーゲンと比較して好中球の遊走を有意に抑制したが、cit-ITIH4 には抑制的な作用は認めず遊走を亢進させることを明らかにした。筆者は、蛋白とインキュベートした血清において、補体カスケードの主要産物であり好中球走化性因子として作用する C5a のレベルを測定した。その結果 ITIH4 添加血清では C5a の濃度が有意に低下しており、ITIH4 の補体カスケード阻害能が示唆されたが、一方 cit-ITIH4 ではその作用は認めず、添加により C5a レベルは上昇することを明らかにした。

(考察)

筆者は、pGIA マウス関節および RA 患者関節の両方で cit-ITIH4 が増加していることを明らかにし、ITIH4 のシトルリン化のメカニズムとして、関節内に浸潤する好中球とその PAD4 の寄与を推測し、pGIA マウスと RA 患者いずれでも血漿よりも関節において cit-ITIH4 は豊富に分布しており、循環する cit-ITIH4 が主に炎症を起こした関節に由来すると考察している。

筆者は、本研究により ITIH4 蛋白の補体カスケードの抑制作用が観測されたことについて、他のヒト ITIH ファミリー蛋白において補体系の抑制作用が報告されていることから、ITIH4 蛋白について同様の機序が推測されると考察した。また、血清への ITIH4 の添加は補体カスケードを抑制し、結果として C5a 産生が抑制され、好中球の遊走が減少したものと推測している。ITIH4 のシトルリン化が好中球の遊走亢進を介して、関節炎の増悪に寄与する可能性を考慮している。筆者は、今後の課題として、RA 患者の血清および滑液においても ITIH4 および cit-ITIH4 の補体系への影響を検討する必要があるとし、生体内での ITIH4 の正確な機能についての検討のために、ITIH4 欠損マウスを使用した検討が必要になると考察している。

審査の結果の要旨

(批評)

筆者は、pGIA マウスおよび RA 患者の炎症関節において cit-ITIH4 の発現増加を明らかにし、PAD4 を高発現する好中球がそのシトルリン化に寄与することと、シトルリン化 ITIH4 が補体系への作用を介して好中球の遊走を惹起する可能性を示した。本研究は、関節炎モデルマウスで好中球の除去が、関節炎の改善のみならず血液と関節におけるシトルリン化蛋白の発現を減弱させることを示した初めての報告であり、シトルリン化における好中球の重要性を実証するものとする。

令和3年1月5日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとする。