



# Production of adrenomedullin from synovial cells in rheumatoid arthritis patients

松下, 雄彦

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2947

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002947>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 98 】

氏 名・(本 籍) 松下 雄彦 (奈良県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1558号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

Production of Adrenomedullin from Synovial Cells  
from Rheumatoid Arthritis Patients  
(関節リウマチ患者における滑膜細胞のアドレノメデュリン産生)

審 査 委 員

主 査 教 授 熊谷 俊一

教 授 横山 光宏

教 授 寺島 俊雄

## 目的

関節リウマチ (RA) 患者の滑膜における炎症過程は種々のサイトカインや因子が関連していることが報告されているが、その詳細は複雑で未だ解明されていない。多くのサイトカインのなかで、tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$  や interleukin (IL)-1 は RA の病態に関与が深いとされている。これらのサイトカインや調節因子の濃度をしらべることが、RA における病理の解明だけでなく、診断や予後を図ることに有用となる可能性がある。

アドレノメデュリン (AM) はヒト褐色細胞腫組織より抽出された降圧活性を有する、52 残基のアミノ酸よりなるペプチドである。AM は高血圧や心筋梗塞等の様々な心血管疾患で血中濃度が上昇することが報告されている。AM は血管内皮細胞や血管平滑筋において多量に産生されており、TNF, IL-1 や lipopolysaccharide (LPS) などの刺激によって著明に産生が増加することが分かっている。さらに、線維芽細胞において AM 刺激により IL-6 の産生増加が報告されており、AM が炎症の調節に関与していることが強く示唆されている。

近年、RA 患者における血中の AM 濃度は変形性関節症 (OA) や健康者と比較して増加していることが報告されている。しかしながら、RA の滑膜細胞が AM 産生に寄与しているかは分かっていない。本研究の目的は、RA 患者の滑膜細胞において AM が発現および産生されているか、また、関節液中の AM の濃度が OA 患者と比較して、上昇しているか調べることである。我々の結果は滑膜細胞が AM 産生に重要な役割を果たしていることを強く示唆する。

## 方法

### 対象

RA 患者 5 人と OA 患者 5 人より人工関節置換術の際に滑膜組織を採取した。RA の診断には American College of Rheumatology 1987 年改訂版診断基準に拠って行い OA は X 線学的手法にて診断した。術前 RA 患者の平均 CRP は 3.1mg/dl で OA 患者の平均は 0.5mg/dl であった。4 人の RA 患者はステロイドの内服をしており、また非ステロイド性抗消炎鎮痛剤は全ての患者が内服していた。

### 細胞培養

滑膜組織を 5% コラゲナーゼで 1 時間、0.02% トリプシンで 30

分、37°C で処理して滑膜由来の細胞を単離した。それらの細胞を培養皿に播種し、10% 仔牛胎児血清を含む培養液中で一晩培養し、浮遊細胞を取り除き、付着細胞のみを獲得した。さらに、その細胞を 3 から 5 回継代して形態学的には、線維芽細胞様の細胞を採取した。

### アドレノメデュリン mRNA の発現

total RNA を培養した滑膜細胞より single step 法にて採取した。cDNA を 2 $\mu$ g の total RNA より逆転写 (RT) にて合成した 1 $\mu$ l の cDNA より polymerase chain reaction (PCR) 法にて denaturation 94°C 1 分, annealing 55°C 2 分, elongation 72°C 2 分で行った。

AM の primer として下記の primer を用いた。

Forward: 5'-AAGAAGTGGAATAAGTGGGCT-3' (250-270)

Reverse: 5'-TGTGAACTGGTAGATCTGGT-3' (521-540)

(GenBank accession number D14874)

8.5 $\mu$ l の PCR 産物を 2.5% アガロースゲルに電気泳動し UV 照射にてバンドを確認した。また、RT を行っていないものを陰性コントロールとしてゲノム DNA の汚染の無い事を確認した。また、塩基配列を direct sequencing (dye terminator sequencing with an Applied Biosystems model 373A machine) にて確認した。

### 免疫染色

ヒト滑膜組織を 10% 中性 formalin にて固定し、ヒト AM に対するポリクローナル抗体 (Peninsula lab. inc) を用いて vectastain ABC kit (Vector Laboratories 社製) にて行った。

### 関節液中の AM 濃度測定

関節液を 8 人の RA 患者と同年代で臨床的にかつ膝関節の X 線上 OA と診断された 7 人の OA 患者の膝関節より採取した。RA の診断には American College of Rheumatology 1987 年改訂版診断基準に拠って行い、穿刺 3 ヶ月前にステロイドの関節内注射を行っていない膝関節炎の存在する患者を選んだ。AM の測定には Nishikimi 等によって報告されている RIA KIT (Peninsula lab. inc) を用いておこなった。Student's t-test を用いて RA 患者と OA 患者の AM レベルの比較を行った。P<0.05 以下を有意差ありとした。

## 結果

培養滑膜細胞における AM mRNA の発現を確認するために、行った RT-PCR では、エチジンプロマイド染色にて 291 base-pair DNA のバンドを認めた (Fig. 1, lane AM)。RT をおこなっていないコントロールにはバンドを認めず、ゲノム汚染のないことが確認された。 (Fig. 1, lane NTC)

免疫染色にて RA 患者より採取した滑膜組織中の滑膜細胞に AM の存在を認めた。OA 患者より採取した滑膜内の滑膜組織には認めず、血管内皮細胞にのみ認めた (血管内皮細胞は多量の AM を産生することが知られている)。AM は RA 患者より採取した全ての滑膜中の滑膜マクロファージ様細胞と滑膜線維芽細胞様細胞両方に発現を認めた。細胞質中に AM の存在を認めた。さらに、関節液中の産生を調べた。RA 患者の関節液中の AM 濃度 (890-76 pg/ml, mean 237) は OA 患者 (140-34 pg/ml, mean 79.5) と比較して有意に高かった ( $p=0.015$ ) (Fig. 3)。

#### 考察

本研究において AM の発現および産生を RA 患者の滑膜細胞中と関節液中にみいだした。過去の報告と一致し RA 患者の関節液中の AM 濃度は OA 患者と比較して有意に高かった。これらより滑膜細胞が AM の主な産生部位という仮説を支持するものと考えられた。近年、Yudoh 等は RA 患者における血中の AM 濃度は OA 患者や健常者と比較して増加しており、また、血中の TNF $\alpha$  濃度や RA の活動レベルを量る臨床的なマーカーや生物学的なマーカーと正の相関を示すことを報告している。しかしながら、AM の主な産生部位は同定されておらず、どのように RA における炎症に関与しているのか明らかではない。

一方、一酸化窒素 (NO) は炎症において生理学的に重要な役割を果たしていることが認められている。RA 患者において血中の NO 濃度は、OA 患者や健常者と比較して増加しておりさらに RA の活動レベルと相関していることを Ueki 等は報告している。興味深いことに、AM それ自身は NO の産生効果をもたないが、心筋や血管平滑細胞において IL-1 $\beta$  による NO 産生を濃度依存性に増強することが分かっている。さらに、AM は NO の合成を血管内皮細胞において増加させることがわかっている。我々は滑膜細胞における AM の産生を示したが、上記の報告とあわせ、AM が NO 合成に影響し、AM が RA の特徴である、関節の炎症に関与している可能性が高いと考えられた。このため、関節液中の AM 濃度は RA 病勢の表す重要な因子となるかもしれない。さら

に、AM は血管内皮細胞のアポトーシスを抑制することが報告されており AM は RA の病理学的に重要な血管新生に関与しているかもしれない。

一方、Kamoi 等は肺マクロファージの IL-8 産生を抑制し、また、AM はマクロファージ系の細胞株 RAW 細胞の TNF $\alpha$  の基礎量は増加させるが、LPS 刺激による TNF $\alpha$  や IL-6 産生を抑制することを報告している。さらに、Nanke 等は RA 患者由来の滑膜細胞において IL-6 の産生を抑制することを報告している。これらの報告から、AM は関連している細胞の炎症を抑制することに寄与していることも考えられる。しかしながら、AM 機能の詳細は依然未知である。

本研究において、我々は RA 患者由来の滑膜細胞における AM の発現を初めて見出した。また、RA 患者の関節液中の AM 濃度は OA 患者と比較して有意に高いことをしめた。しかしながら、AM と RA の原因となる炎症性のサイトカインの正確な関連性についてはさらなる研究を要する。

| 論文審査の結果の要旨 |                                                                                                                        |     |      |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------|
| 受付番号       | 甲第 1566 号                                                                                                              | 氏 名 | 松下雄彦 |
| 論文題目       | Production of Adrenomedullin from Synovial Cells<br>from Rheumatoid Arthritis Patients<br>関節リウマチ患者における滑膜細胞のアドレノメデュリン産生 |     |      |
| 審査委員       | 主 査 熊谷俊一<br>副 査 坂山久彦<br>副 査 寺島俊昭                                                                                       |     |      |
| 審査終了日      | 平成 16 年 1 月 30 日                                                                                                       |     |      |

（要旨は1,000字～2,000字程度）

はじめに

関節リウマチ（RA）患者の滑膜における炎症過程は種々のサイトカインや因子が関連していることが報告されているが、その詳細は複雑で未だ解明されていない。

Adrenomedullin（AM）はヒト褐色細胞腫組織より抽出された降圧活性を有するペプチドであり、高血圧や心筋梗塞等の様々な心血管疾患で血中濃度が上昇することが知られている。AMは炎症の調節に関与していることも報告されているが、AMのRAにおける滑膜の炎症に対して関与しているかは分かっていない。本研究の目的は、RA患者の滑膜細胞においてAMが発現および産生されているか、また、関節液中のAMの濃度がOA患者と比較して、上昇しているか調べ、RAにおけるAMの関与を探ることである。

対象と方法

RA患者5人とOA患者5人より人工関節置換術の際に滑膜組織を採取した。採取した滑膜を用いて抗ヒトAM抗体による免疫染色を行った。また滑膜由来の細胞を分離培養し線維芽細胞様の細胞を獲得した。この細胞よりRNAを抽出し、RT-PCR法を用いて、AMmRNAの発現を調べた。さらに関節液を8人のRA患者と同年代で臨床的にかつ膝関節のX線上OAと診断された7人のOA患者の膝関節より採取し、RIA法にてAMの測定をおこなった。

結果

1. RT-PCRにて、培養滑膜細胞におけるAMmRNAの発現を確認した。
2. 免疫染色において、OA患者より採取した滑膜内の滑膜組織には認めず、血管内皮細胞にのみ認める一方（血管内皮細胞は多量のAMを産生することが知られている）RA患者より採取した滑膜組織においては、滑膜マクロファージ様細胞と滑膜線維芽細胞様細胞両方にAM産生を認めた。
3. RA患者の関節液中のAM濃度（890-76 pg/ml, mean 237）はOA患者（140-34 pg/ml, mean 79.5）と比較して有意に高かった（ $p=0.015$ ）

考察

近年、RA患者における血中のAM濃度はOA患者や健常者と比較して増加しており、また、血中のTNF $\alpha$ 濃度やRAの活動レベルを量るマーカーと正の相関を示すことを報告している。しかしながら、AMの主な産生部位は同定されておらず、どのようにRAにおける炎症に関与しているのか明らかではない。本研究においてAMの発現および産生をRA患者の滑膜細胞中と関節液中にみいだした。さらに、RA患者の関節液中のAM濃度はOA患者と比較して有意に高かった。こ

れらより滑膜細胞が AM の主な産生部位という仮説を支持するものと考えられ、今後、関節液中の AM 濃度は RA 病勢の表す重要な因子となるかもしれない。さらに、AM は血管内皮細胞のアポトーシスを抑制することが報告されており AM は RA の病理学的に重要な血管新生に関与しているかもしれない。

本研究は、RA 患者の滑膜細胞において Adrenomedullin が発現し産生されるかを研究したものであるが、従来明らかになっていなかった RA 滑膜細胞中での Adrenomedullin の発現および産生について重要な知見を得た。また RA 患者の関節液中の Adrenomedullin は OA 患者と比較して有意に高いことなどから、Adrenomedullin が RA 滑膜炎の一因子である可能性を示した価値ある集積であると思われる。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。