



## Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts

Maeda, Toshihisa

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6400号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006400>

※ 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。



Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts

DcR3 は関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるトリプトファン水酸化酵素 TPH1 の発現を制御する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
整形外科学  
(指導教員: 黒坂 昌弘教授)

前田 俊恒

### 背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: 以下 RA) は、滑膜組織の過形成と軟骨内に侵入し軟骨や骨の破壊を引き起こすパンヌスの形成とを特徴とする自己免疫および炎症性関節疾患である。TNF のおとりレセプターである Decoy receptor 3 (以下 DcR3) は TNF receptor スーパーファミリーの一つで、Fas-L、LIGHT、TL1A をリガンドとする可溶型レセプターである。DcR3 は主に大腸癌、肺癌、神経膠腫などの腫瘍細胞で発現しているが、関節リウマチ滑膜線維芽細胞 (rheumatoid synovial fibroblast: 以下 RA-FLS) においても発現し TNF  $\alpha$  刺激により発現が増加する。我々は DcR3 がおとりレセプターとして、TNF  $\alpha$  刺激により過剰発現して Fas 誘導アポトーシスを阻害することを報告した。また近年 DcR3 はリガンドとしての直接作用を持つことが報告されており、我々は DcR3 が RA-FLS において細胞膜上に発現している TL1A を介して炎症性サイトカインによる細胞増殖誘導を抑制することを報告した。さらに、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析により、RA-FLS において DcR3 により発現が抑制される候補遺伝子として TPH1 を見出した。TPH1 は、セロトニン合成に関与する律速段階酵素であるトリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase: 以下 TPH) のアイソフォームの一つで、皮膚、腸、松果体などのセロトニンを発現する末梢組織および中枢神経に発現する。本研究では、RA の病態への TPH1 や DcR3 の関与を明らかにするため、RA および変形性関節症 (OA)-FLS における、DcR3 及び炎症性サイトカイン刺激による TPH1 の発現の変化について検討した。

## 材料と方法

RA および OA 患者の膝人工関節手術時に採取した滑膜組織を、継代培養して得られた RA および OA-FLS を用いた。RA および OA-FLS を DcR3-Fc (1 $\mu$ g/ml) あるいは IgG1 (1 $\mu$ g/ml) で 12 時間、ならびに TNF $\alpha$  (1ng/ml)、IL-1 $\beta$  (1ng/ml) で 24 時間刺激して、TPH1 mRNA の発現を RealTime-PCR 法で定量した。また、手術時に採取した滑膜組織から凍結切片を作製し、RA 滑膜におけるセロトニンの発現を免疫組織染色にて解析した。

## 結果

### RA および OA-FLS における TPH1 発現の有無

Real-time PCR にて、RA および OA-FLS における TPH1 の発現の有無を解析した。RA および OA-FLS において TPH1 mRNA は発現していた (Figure 1)。

### RA-FLS において DcR3 刺激により TPH1 発現は疾患特異的に抑制される

RA および OA-FLS において DcR3 および IgG1 にて刺激を行い、TPH1 発現の変化を Real-time PCR にて解析した。DcR3 刺激により TPH1 mRNA 発現は RA-FLS において有意に ( $P < 0.05$ ) 減少したが (Figure 2A)、OA-FLS においては変化しなかった (Figure 2B)。

### RA および OA-FLS における TPH1 発現に及ぼす炎症性サイトカインの影響

RA および OA-FLS において炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  にて刺激を行い、TPH1 発現の変化を Real-time PCR にて解析し

た。TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  刺激により、RA および OA-FLS の双方で TPH1 mRNA 発現は有意に ( $P < 0.05$ ) 減少した (Figure 3A, 3B)。

### RA および OA 滑膜組織におけるセロトニン発現の免疫組織学的解析

RA および OA 滑膜におけるセロトニンの発現と局在を確認するために免疫組織染色を行った。RA 滑膜においては疾患特異的に重層化した滑膜表層に、OA 滑膜においては滑膜表層に高度に発現していたが、下内層には弱く発現していた (Figure 4A, 4B)。

## 考察

本研究で我々は、DcR3 により FLS における TPH1 の発現が RA で疾患特異的に抑制されることを明らかにした。TPH1 により合成される末梢性セロトニンは、免疫系や血管収縮、炎症性疼痛や骨代謝などにおいて多面的な作用を有するとの報告もある。セロトニンは、骨芽細胞の増殖や骨形成、ならびに破骨細胞の分化や活性を制御する。

本研究で免疫組織染色においてセロトニンは、RA 滑膜においては疾患特異的に重層化した滑膜表層に、OA 滑膜においては滑膜表層に高度に発現していたが、下内層には弱く発現していた。それゆえ、セロトニンは RA 滑膜の過形成において滑膜表層に特に重要な役割を果たすことが示唆された。関節液や軟骨に対するさらなる研究により、セロトニンが関節炎や骨、軟骨破壊に与える影響を明らかにする可能性がある。

DcR3 は RA-FLS における TPH1 発現を制御することによりセロトニンを介して、炎症性疼痛や骨リモデリングなどの、RA の病態へ関与することが示唆された。さらに、RA 患者の血清中の DcR3 濃度が OA 患者の

ものより有意に高いことが報告されており、DcR3 や TPH1 が RA 診療におけるバイオマーカーや治療ターゲットになり得る可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2515「号	氏名	前田 俊恒
論文題目 Title of Dissertation	<p>DcR3 は関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるトリプトファン水酸化酵素 TPH1 の発現を制御する</p> <p>Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 伊藤 寿雄 Chief Examiner</p> <p>副査 小川 涉 Vice-examiner</p> <p>副査 木村 信晴 Vice-examiner</p>		

関節リウマチ(rheumatoid arthritis: 以下 RA)は、自己免疫および炎症性関節疾患である。Decoy receptor 3(以下 DcR3)は TNF receptor スーパーファミリーの一つで、Fas-L、LIGHT、TL1A をリガンドとする可溶型レセプターである。DcR3 は主に腫瘍細胞での発現が知られるが、リウマチ滑膜線維芽細胞(rheumatoid synovial fibroblast: 以下 RA-FLS)においても TNF $\alpha$  刺激により過剰発現し、おとりリセプターとして Fas 誘導アポトーシスを阻害する。また近年 DcR3 のリガンド作用が報告され、研究者らのグループは DcR3 が RA-FLS において細胞膜上の TL1A を介して炎症性サイトカインによる細胞増殖誘導を抑制することを報告した。さらに、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析により、RA-FLS において DcR3 により発現が抑制される候補遺伝子として TPH1 を見出した。TPH1 は、セロトニン合成に関与する律速段階酵素であるトリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase: 以下 TPH) のアイソフォームの一つで、セロトニンを発現する末梢組織および中枢神経に発現する。本研究で研究者らは、RA の病態への TPH1 や DcR3 の関与を解明するため、RA および変形性関節症(OA)-FLS における、DcR3 及び炎症性サイトカイン刺激による TPH1 の発現の変化について検討した。

RA および OA 患者の手術時切除滑膜組織から、RA および OA-FLS を分離培養した。RA および OA-FLS を DcR3-Fc (1 $\mu$ g/ml) あるいは IgG1 (1 $\mu$ g/ml) で 12 時間(RA: n=13, OA: n=13)、ならびに TNF $\alpha$  (1ng/ml) (RA: n=18, OA: n=10)、IL-1 $\beta$  (1ng/ml) (RA: n=12, OA: n=12) で 24 時間刺激して、TPH1 mRNA の発現を RealTime-PCR 法で定量した。また、手術時切除滑膜組織から凍結切片を作製し、RA および OA 滑膜におけるセロトニンの発現と局在を免疫組織染色にて解析した。DcR3 刺激により TPH1 mRNA 発現は RA-FLS において有意に減少したが(77±24%)、OA-FLS においては変化しなかった。

TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  刺激により、RA (49±20%, 28±9%) および OA-FLS (63±10%, 34±10%) の双方で TPH1 mRNA 発現は有意に減少した。免疫組織染色にてセロトニンは、RA 滑膜においては疾患特異的に重層化した滑膜表層に、OA 滑膜においては滑膜表層に高度に発現していたが、下内層には弱く発現していた。

本研究で研究者らは、DcR3 により FLS における TPH1 の発現が RA で疾患特異的に抑制されることを明らかにした。DcR3 は RA-FLS における TPH1 発現を制御することによりセロトニンを介して、炎症性疼痛や骨リモデリングなどの、RA の病態へ関与することが示唆された。本研究は、RA の病態への TPH1 や DcR3 の関与について研究したものであるが、従来解明されていなかった DcR3 により FLS における TPH1 の発現が RA で疾患特異的に抑制されることを初めて報告したものである。DcR3 や TPH1 が RA 診療におけるバイオマーカーや治療ターゲットになり得るという重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。