

論 文 内 容 要 旨

題目 Thymidine phosphorylase regulates the expression of CXCL10 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes

(関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞において thymidine phosphorylase は CXCL10 を制御する)

著者 Yuko Toyoda, Sho Tabata, Jun Kishi, Takuya Kuramoto, Atsushi Mitsuhashi, Atsuro Saijo, Hiroshi Kawano, Hisatsugu Goto, Yoshinori Aono, Masaki Hanibuchi, Hideaki Horikawa, Toshihiro Nakajima, Tatsuhiko Furukawa, Saburo Sone, Shin-ichi Akiyama, Yasuhiko Nishioka

平成 26 年発行 Arthritis & Rheumatology に掲載予定

(平成 26 年 1 月に名称を Arthritis & Rheumatism から変更)

内容要旨

Thymidine phosphorylase (TP) は分子量 55kDa のサブユニットの二量体として機能するピリミジンヌクレオシドの代謝に関与する酵素で、チミジンからチミンと 2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸への可逆的な変換を触媒する。TP は 5-FU や 5-FU のプロドラッグ (ドキシフルリジン、テガフル) の活性化酵素でもある。この酵素活性は悪性腫瘍症例の血清中で上昇しており、腫瘍の血管新生や増殖・浸潤・転移に関与することが示されている。一方、TP は関節リウマチ (RA) の線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) においても発現し、TNF- $\alpha$  などの RA に関連するサイトカインにより誘導されることや関節破壊に関連することが報告されている。申請者らは TP が RA の病態にどのように関与しているか、また TP 阻害剤が RA の治療に適用できるか否かについて検討した。

実験には RA 患者の滑膜から採取した FLS において TP、CXCL10 および各サイトカインを Real-time PCR 法、免疫ブロット法、ELISA 法により測定した。また TP cDNA を遺伝子導入した FLS を作製し、TP 阻害剤作用下に Microarray 解析を行い、TP に関連するサイトカインを検索した。

その結果、RA 患者の FLS において TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-17、IFN- $\gamma$  および LPS により TP の発現が誘導された。一方、IL-6、MMP-3 などのサイトカインには影響がみられなかった。TP cDNA を導入して TP を強制発現させた FLS の Microarray 解析の結果、TP により発現が亢進するとともに TP 阻害剤により発

様式(8)

現阻害され、かつ RA との関連が報告されている遺伝子として 19 の遺伝子を抽出した。その中で最も TP と関連するサイトカインとして IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10 ; CXCL10) を同定した。CXCL10 は RA で優位となる Th1 細胞に特異的に発現している CXCR3 のリガンドであり、RA 患者の血清、滑膜液、滑膜組織に発現し、FLS の浸潤や関節軟骨の破壊に関与することが報告されている。

そこで、FLS における TP と CXCL10 の関連について Real-time PCR 法、免疫ブロッティング法および ELISA 法により検討した結果、TNF- $\alpha$  により誘導された CXCL10 の発現は TP siRNA や TP 阻害剤により抑制された。また TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  は TP および CXCL10 の発現を相乗的に増大させ、その CXCL10 の誘導は TP siRNA によって顕著に抑制された。さらに TP が誘導する CXCL10 の発現は抗酸化剤 (EUK-8) により抑制され、TP による CXCL10 の発現のメカニズムに活性酸素種が関与していることが考えられた。加えて GEO データベースを用いて RA 患者の滑膜組織における遺伝子発現について検討したところ、TP と CXCL10 の発現に相関が認められ、今回の *in vitro* の結果が RA 患者の生体内における現象を反映している可能性が示唆された。

以上から、RA の FLS において TP は CXCL10 の発現に関与することで RA における Th1 免疫誘導および骨破壊に関与すること、ならびに TP 阻害剤が RA の新規の治療薬となる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1191</b> 号	氏名	豊田 優子
審査委員	主査 松本 俊夫 副査 松本 満 副査 安友 康二		

題目 Thymidine phosphorylase regulates the expression of CXCL10 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes  
(関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞において thymidine phosphorylase は CXCL10 を制御する)

著者 Yuko Toyoda, Sho Tabata, Jun Kishi, Takuya Kuramoto, Atsushi Mitsuhashi, Atsuro Saijo, Hiroshi Kawano, Hisatsugu Goto, Yoshinori Aono, Masaki Hanibuchi, Hideaki Horikawa, Toshihiro Nakajima, Tatsuhiko Furukawa, Saburo Sone, Shin-ichi Akiyama, Yasuhiko Nishioka  
平成 26 年発行 Arthritis & Rheumatology 誌に掲載予定  
(主任教授 西岡 安彦)

要旨 Thymidine phosphorylase (TP) は分子量 55kDa のサブユニットの二量体として機能するピリミジンヌクレオシドの代謝に関与する酵素であるが、腫瘍の血管新生や増殖・浸潤・転移に関与することが示されている。一方、TP は関節リウマチ (RA) の線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) においても発現し、TNF- $\alpha$  などの RA に関連するサイトカインにより誘導されることや関節破壊に関連することが報告されている。申請者らは TP が RA の病態にどのように関与しているか、また TP 阻害剤に RA 治療薬としての効果を期待し得るか否かについて、RA 患者の滑膜から採取した FLS を用いて検討した。得られた結果は以下に要約される。

1) RA 患者の FLS において、TNF- $\alpha$ 、IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、

LPS 刺激により TP 発現が亢進した。

- 2) TP 遺伝子を強制発現させた FLS を TP 阻害薬で処理し、マイクロアレイ解析を行った結果、TP の遺伝子導入により誘導され、TP 阻害薬により抑制される遺伝子として、CXCL10 および CXCL11 を同定した。
- 3) TNF- $\alpha$  刺激により誘導される FLS の CXCL10 発現は、TP siRNA 処理により抑制された。
- 4) TNF- $\alpha$  刺激により誘導される FLS の CXCL10 発現は、抗酸化剤 EUK-8 処理により低下した。
- 5) GEO データベースを用いた RA 患者の滑膜組織における遺伝子発現解析では、RA における TP および CXCL10 遺伝子発現の亢進が確認され、さらに両遺伝子発現には高い相関が認められた。

以上の結果から、TP が FLS における CXCL10 発現を活性酸素種を介して間接的に制御することで RA の Th1 免疫誘導に関与するという新たな知見と TP 阻害薬による制御の可能性が示された。本研究は、RA における細胞分子病態の解明と新規治療法開発に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。