

氏 名 (本籍) 高 橋 美 奈 子

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 3 2 4 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 13 年 3 月 7 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 62 年 3 月 1 6 日
東 京 女 子 医 科 大 学 卒 業

学 位 論 文 題 目 化 学 修 飾 リ ボ ザ イ ム に よ る ヒ ト 滑 膜 細 胞 に お け る
TNF α 産 生 抑 制 に 関 す る 研 究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 飯 沼 一 宇 教 授 佐 々 木 毅

教 授 賀 来 満 夫 教 授 岡 本 宏

論文内容要旨

研究目的

慢性関節リウマチ (RA) は関節における滑膜の増殖を特徴とし、骨や軟部組織が進行性に破壊され、結果として関節の機能障害をきたす全身性の慢性炎症性疾患である。本症の原因は未だに不明であるが、滑膜では多種のサイトカインが過剰に産生され、これが複雑なネットワークを形成しつつ病態形成に強く関与しているとみなされている。とりわけ tumor necrosis factor α (TNF α) は各種の炎症性サイトカイン発現において初めに活性化される最も重要な因子の1つとされている。従って、これらの炎症性サイトカインを制御することがRAの新しい治療戦略として注目されている。本研究では、RA滑膜細胞におけるTNF α 産生をターゲットとして、化学修飾リボザイム (Rz) が遺伝子および蛋白レベルにおいて抑制効果を有するかを検討して、新しい治療法開発の方向性を求めた。ここでは、その効果を評価する方法として、定量的RT-PCRによるTNF α mRNAの測定方法を確立することを計った。

研究方法

ABI PRISM 7700を用いたリアルタイム定量RT-PCRシステムにより、TNF α mRNAの定量的測定を行った。定量用標準DNAとしてTNF α プラスミドの希釈系列を用いた。

TNF α mRNAに対するハンマーヘッド型の化学修飾Rzを合成した。In vitro cleavage assayによりRzの切断活性を評価した。滑膜細胞は、活動期RA 6例より合意を得て採取した滑膜組織を細断し、コラゲナーゼ処理後第3-8継代培養したものを使用した。共焦点顕微鏡を用いて、FITC標識Rzの細胞内への取込みを形態学的に評価した。RA由来滑膜細胞にRzとIL-1を添加し、経時的に採取した培養上清および細胞抽出RNAを用いてRzの抑制効果を検討した。ここではELISA法にて培養上清中のTNF α を、また化学発光酵素免疫法にてIL-6濃度を測定した。細胞より抽出したtotal RNAを用いて定量的RT-PCR法にてmRNAを測定した。

研究結果

(1) TNF α mRNAの定量用標準DNAとして用いたTNF α プラスミドの希釈系列とThreshold cycle (C_T) 値の間には良好な直線性が得られ、 1.29×10^3 から 1.29×10^7 コピーの広範囲で同時再現性に優れ、感度も良好であった。(2) In vitro cleavage assayにより、Rzによる基質RNAの特異的切断を確認した。(3) 共焦点顕微鏡解析によりFITC標識Rzが、添加後1時間後には細胞質内に取り込まれ、少なくとも48時間後まで存在することが確認された。(4) アラマー

ブルーによる検討では明らかな細胞毒性は認められなかった。(5) TNF α mRNA は、IL-1 で刺激すると速やかに増加し約 1 時間後に最高となり以後速やかに減少した。(6) IL-1 刺激後の TNF α mRNA 増加は Rz 添加により抑制された。(7) 培養上清中の蛋白量は TNF α 、IL-6 共に Rz の濃度依存性に抑制された。

結 論

(1) ABI PRISM 7700 を用いた TNF α mRNA の定量的 RT-PCR 法は従来の半定量法と比較して簡便、迅速、正確で、かつ感度が高く、微量のサンプルでも測定可能であり、TNF α の変動を評価する上で有用な方法であると考えられた。(2) RA 滑膜細胞の TNF α mRNA を標的とした化学修飾 Rz は、遺伝子レベルおよび蛋白レベルにおいて特異的に TNF α を抑制した。

研究の意義、独創的な点

ウイルス等のベクターを使用せずに Rz で特異的に標的遺伝子の発現を抑制しうることを示した。本法は、難治性 RA の新しい治療法として発展することが期待しえ、社会的にも意義が大きいと考える。また、TNF α mRNA の簡便かつ感度の高い定量測定法の確立は、炎症病態を有する各種疾患の研究に有用な手段となろう。

審査結果の要旨

慢性関節リウマチ (RA) は関節における滑膜の増殖を特徴とし、骨や軟部組織が進行性に破壊され、結果として関節の機能障害をきたす全身性の慢性炎症性疾患である。本症の原因は未だに不明であるが、滑膜では多種のサイトカインが過剰に産生され、これが複雑なネットワークを形成しつつ病態形成に強く関与しているとみなされている。とりわけ tumor necrosis factor α (TNF α) は各種の炎症性サイトカイン発現において初めに活性化される最も重要な因子の1つとされている。従って、これらの炎症性サイトカインを制御することがRAの新しい治療戦略として注目されている。本研究の目的は、RA滑膜細胞におけるTNF α 産生をターゲットとして、化学修飾リボザイム (Rz) が遺伝子および蛋白レベルにおいて抑制効果を有するかを検討し、新しい治療法開発の方向性を求めることである。まず、その効果を評価する方法として、定量的RT-PCRによるTNF α mRNAの測定方法を確立することを計った。

この結果、TNF α mRNAの定量用標準DNAとして用いたTNF α プラスミドの希釈系列とThreshold cycle値の間には良好な直線性が得られ、感度も良好であった。In vitro cleavage assayにより、Rzによる基質RNAの特異的切断を確認した。FITC標識Rzが、添加後1時間後には細胞質内に取り込まれ、少なくとも48時間後まで存在することが確認された。明らかな細胞毒性は認められなかった。TNF α mRNAは、IL-1で刺激すると速やかに増加し約1時間後に最高となり以後速やかに減少した。IL-1刺激後のTNF α mRNA増加はRz添加により抑制された。培養上清中の蛋白量はTNF α 、IL-6共にRzの濃度依存性に抑制された。

本研究では、ウィルス等のベクターを使用せずにRzで特異的に標的遺伝子の発現を抑制示すことを示した。本法は、難治性RAの新しい治療法として発展することが期待され、社会的にも意義が大きいと考える。また、TNF α mRNAの簡便かつ感度の高い定量測定法の確立は、炎症病態を有する各種疾患の研究に有用な手段となることを示した。これらの成果は医学博士の学位に値するものである。