



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The Pathogenesis of Joint Destruction in Patients with Rheumatoid Arthritis and its Potential Therapeutic Agents [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	リー, ウェン シー
Description	配架番号 : 2568
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14102号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78113
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Lee_Wenshi_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 リー ウェン シー

主査	教授	木下	一郎
審査担当者	副査	教授	渡邊 雅彦
	副査	教授	畠山 鎮次
	副査	教授	大場 雄介

学 位 論 文 題 名

The Pathogenesis of Joint Destruction in Patients with Rheumatoid Arthritis and its Potential Therapeutic Agents

（関節リウマチにおける関節破壊の病態解明と治療ターゲットに関する研究）

申請者は、関節リウマチ患者の線維芽細胞様滑膜細胞（RA-FLS）を用いて、関節リウマチ（RA）における関節破壊の病態解明と治療標的に関する基礎的研究を行った。RA-FLS を炎症性サイトカインの TNF- α と IFN- γ で刺激すると Optineurin が上昇し、破骨細胞形成に関わる RANKL の発現が亢進した。Optineurin の発現を抑制すると NF- κ B の活性とその下流の RANKL の発現が更に亢進し、RA-FLS における Optineurin の発現が、RA における関節破壊に防御的に関与していることを示した。次に、microRNA-9 (miR-9) が RA-FLS において、NF- κ B の 3'UTR に結合しその発現を抑制すること、更に NF- κ B の転写標的である RANKL の発現を抑制し、関節破壊を改善する可能性があることを示した。

学位論文内容の口頭発表後、副査の畠山教授よりサイトカインのレセプターの RA-FLS 表面における発現について質問があった。これに対して申請者は、過去の報告で、本実験で利用したサイトカインに対するレセプターは、IL-6 を除いてすべて発現していると回答した。またサイトカイン刺激によって RA-FLS の p62 発現量も上がったが、Optineurin しか検討しなかった理由について質問があった。申請者は、RA-FLS の RANKL 発現量は p62 をノックダウンしても変わらなかったが、Optineurin をノックダウンすると著明に亢進したため、その後は Optineurin のみ検討したと回答した。また Optineurin はオートファジーレセプターの一つであるが、RANKL の発現変化とオートファジーの関係について質問があった。申請者は Optineurin をノックダウンした RA-FLS の LC3（オートファジーマーカー）を検査したが、発現量はあまり変わらなかったと回答した。miR-9 に対する NF- κ B 以外の標的について質問があった。これに対して申請者は、軟骨細胞の報告では、

miR-9 は関節破壊に関する *protegenin* や *MCPIP* も標的としていたと回答した。

副査の大場教授からは、chapter 1 と chapter 2 の関係について質問があった。申請者は、UCSC genome browser を用いた検索では、miR-9 は *Optineurin* を調節できる microRNA の 1 つであったが、miR-9 は *Optineurin* の発現量に影響しなかったと回答した。また、*Optineurin* と *RANKL* の関係は、他の細胞、例えば *Osteoblast* でも同じか質問があった。申請者は、RA-FLS における *RANKL* 発現は *Osteoblast* より病的意義が高いため、RA-FLS で研究を行ったが、RA-FLS のコントロールとして用いた変形性膝関節症患者の線維芽細胞様滑膜細胞 (OA-FLS) でも、同じ結果であったと回答した。また、ChIP アッセイの方法について質問があった。申請者は、NF- κ B 抗体で免疫沈降したサンプル DNA の Ct 値を input DNA の Ct 値で normalized した数値と、Control IgG 抗体で免疫沈降したサンプル DNA の Ct 値を input DNA の Ct 値で normalized した数値とを比較したと回答した。

副査の渡辺教授から、FLS は関節滑膜において重要な細胞であるか質問があった。これに対して申請者は、FLS は、通常の滑膜では 1-2 層であるが、関節リウマチでは 10 層以上となり、重要な役割を果たしているとは回答した。また、FLS は患者さんから十分得られるか質問があった。申請者は、一般的に 2-3 フラスコで初代培養し、1 フラスコからは 3 フラスコに継代するので、3-4 代培養までに実験に十分な細胞が得られると回答した。miR-9 発現の調整メカニズムについて質問があった。申請者は、現在まで miR-9 発現の調整メカニズムまだ不明だが、genetic レベルから調整されている可能性が高いと考えられると回答した。

主査の木下教授から LC3 以外のオートファジーマーカーについて検討したか質問があった。申請者は、LC3 は代表的なオートファジーマーカーで、それ以外は検討していないと回答した。また、*Optineurin* が NF- κ B の活性を抑制する機序について質問があった。申請者は、脱ユビキチン化酵素 *CYLD* が NF- κ B の上流の IKK 複合体に作用して TNF α による NF- κ B の活性化を抑制しているが、*Optineurin* は *CYLD* の機能に必須であることが分かっていると回答した。また、今回の検討を RA 以外の FLS で行ったか質問があった。申請者は、chapter 1 の実験について OA-FLS も用いて実験を行ったが、ほぼ同じ結果が得られたと回答した。また、*Denosumab* が *RANKL* 阻害薬として固形癌の骨転移に対して承認されているが、RA の治療にも利用できるか質問があった。申請者は、miR-9 は *RANKL* に加えて、NF- κ B signaling の inflammatory pathway 全般を標的しているため、*Denosumab* よりも治療効果が高いと考えられると回答した。

申請者は上記の質問に対しその主旨を的確に理解し専門領域の文献的見解を交えて適切に回答した。この論文は、RA における関節破壊の病態解明において高く評価され、今後の RA の病態解明が一層発展するとともに、RA の新規治療法の開発につながることを期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士 (医学) の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。