

## 【別紙2】

### 審査の結果の要旨

氏名 浦辻 秀弥

本研究は、痛風等における急性炎症の誘発に重要な役割を果たしている尿酸結晶について、その炎症誘発メカニズムを明らかにするために、ヒト表皮角化細胞、ヒト単球細胞株（THP-1細胞）及び炎症モデル動物を用いて、そのメカニズム解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 表皮角化細胞において、尿酸結晶刺激により、IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-8/CXCL8及びIL-6の産生が刺激濃度依存的に誘導された。この尿酸結晶刺激により誘導される表皮角化細胞からのIL-8/CXCL8及びIL-6産生は、IL-1受容体アンタゴニストによって有意に抑制された。次に、尿酸結晶刺激により表皮角化細胞からIL-1 $\alpha$ が産生されることが確認された。さらに、抗IL-1 $\beta$ 抗体ではIL-8/CXCL8及びIL-6産生が抑制されない一方で、抗IL-1 $\alpha$ 抗体はこれらの産生を有意に抑制した。これらのことから、表皮角化細胞においては、尿酸結晶刺激によって誘導されるIL-8/CXCL8やIL-6産生には、IL-1 $\alpha$ のIL-1受容体への結合を介したシグナルが重要であることが示された。
2. 電子顕微鏡観察では表皮角化細胞による尿酸結晶の貪食像は確認されず、貪食阻害剤であるcytochalasin D処置によってもIL-1 $\alpha$ 、IL-8/CXCL8及びIL-6産生は抑制されなかった。このことから、表皮角化細胞は貪食とは異なるメカニズムにより尿酸結晶を認識していると考えられた。
3. 表皮角化細胞において、尿酸結晶による反応に関与する細胞膜受容体の特定を試みたところ、P2受容体アンタゴニストであるsuramin及びP2Y受容体アンタゴニストであるRB2は尿酸結晶刺激によるIL-1 $\alpha$ 、IL-8/CXCL8及びIL-6産生をほぼ完全に抑制した。次に、表皮角化細胞におけるP2Y受容体サブタイプの発現変化を検討したところ、尿酸結晶刺激により、P2Y<sub>6</sub>受容体発現が増加したため、尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からのサイトカイン産生に対するP2Y<sub>6</sub>受容体の役割を検討した。P2Y<sub>6</sub>受容体特異的アンタゴニストであるMRS2578及びP2Y<sub>6</sub>受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドは尿酸結晶により誘導されるIL-1 $\alpha$ 、IL-8/CXCL8及びIL-6産生を有意に抑制した。さらに、P2Y<sub>6</sub>受容体small interfering RNAによりIL-1 $\alpha$ 及びIL-8/CXCL8産生が有意に抑制された。また、P2Y<sub>6</sub>受容体活性化に続いて細胞内で活性化することが知られているphospholipase Cの阻害剤であるU-73122も尿酸結晶により誘導される表皮角化細胞からのIL-1 $\alpha$ 、IL-8/CXCL8及びIL-6産生を有意に阻害した。これらの結果より、表皮角化細胞における尿酸結晶誘発の炎症性サイトカイン及びケモカイン産生において、P2Y<sub>6</sub>受容体 - PLC経路が重要な役割

を果たすことが示された。

4. 痛風の急性炎症では、尿酸結晶を認識した単球から産生されるIL-1 $\beta$ が重要な役割を果たすことが知られているが、この単球からのIL-1 $\beta$ 産生においてもP2Y<sub>6</sub>受容体が重要であるかを検討したところ、ヒト単球様細胞（THP-1細胞）におけるP2Y<sub>6</sub>受容体発現は尿酸結晶刺激により増加し、P2Y<sub>6</sub>受容体特異的アンタゴニストであるMRS2578はTHP-1細胞における尿酸結晶誘発のIL-1 $\beta$ 産生をほぼ完全に抑制した。さらに、P2Y<sub>6</sub>受容体アンチセンスオリゴヌクレオチド処置により、THP-1細胞からの尿酸結晶誘発IL-1 $\beta$ 産生は有意に抑制され、U-73122によってもIL-1 $\beta$ 産生は有意に抑制された。従って、単球においても、尿酸結晶誘発の炎症反応がP2Y<sub>6</sub>受容体 - PLC経路により制御されていることが示された。
5. マウスエアポートモデルにおいて、尿酸結晶により誘導されるエアポーチ内の好中球数の増加に対し、MRS2578を処置することにより、その好中球浸潤は有意に抑制された。また、尿酸結晶誘発のマウス腹膜炎モデルにおいても、MRS2578によって腹腔内への好中球浸潤は有意に抑制された。従って、尿酸結晶誘発の炎症モデル動物においてもP2Y<sub>6</sub>受容体が重要な役割を果たすことが示された。

以上、本論文により、表皮角化細胞、単球及び炎症モデル動物のいずれにおいても、P2Y<sub>6</sub>受容体が尿酸結晶による炎症反応を制御することが示された。本研究はこれまで知られていなかった、尿酸結晶により誘発される炎症反応におけるP2Y<sub>6</sub>受容体の役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。