

論 文 内 容 の 要 旨

Suitable reference gene selection for gene expression studies in knee osteoarthritis synovium  
using quantitative PCR analysis

変形性膝関節症滑膜での定量的PCR法による遺伝子発現解析に最適な参照遺伝子の選定

日本医科大学大学院医学研究科 整形外科学分野

大学院生 渡部 寛

Connective tissue research (2017) 掲載予定

## 【背景・目的】

関節組織の一つである滑膜は関節液を産生しており関節内の恒常性維持を担う組織である。関節リウマチでは滑膜炎が主要な病態であるため、以前より様々な滑膜研究がなされてきているが、近年は変形性関節症（OA）の病態でも軟骨と同等かそれ以上に滑膜が重要であることが知られている。そのため、滑膜で発現する遺伝子発現プロファイルの同定は OA および滑膜の理解に必要不可欠である。定量的 PCR 法は、現在最も普及した遺伝子発現定量解析法である。定量的 PCR 法では参照遺伝子を用いて規格化を行うが、その際に参照遺伝子の発現安定性を評価し、最適な参照遺伝子を選定する必要がある。しかし、滑膜での定量解析に最適な参照遺伝子の報告はまだない。

学位申請者は、変形性膝関節症（KOA）で人工関節置換術を施行するに至った患者の膝滑膜を用いて参照遺伝子の発現安定性の検定を行った。また、その結果を踏まえて膝滑膜に発現しているエストロゲン(*ESR1*, *ESR2*)、アンドロゲン(*AR*)、糖質コルチコイド(*GR*)、鉱質コルチコイド(*MR*)、プロゲステロン(*PR*)の 6 種ステロイドホルモン受容体と炎症性サイトカイン (*IL1B*, *IL6*) 遺伝子について発現定量解析を行った。

## 【方法】

KOA の診断で人工膝関節置換術を施行した際の破棄検体の一部から滑膜を採取した（倫理委員会承認番号 No. 26-01-418）。男性 18 サンプル、女性 20 サンプルの膝滑膜から全 RNA を抽出し、1  $\mu\text{g}$  の全 RNA から逆転写反応により cDNA を合成した。1 サンプルあたり 40 ng 全 RNA 換算量の cDNA および特異的 PCR プライマーを用いてリアルタイム PCR 法にて遺伝子定量解析を行った。PCR 産物の特異性は DNA sequencing 法および増幅産物の融解曲線を作成し、確認を行った。

## 【結果】

KOA 滑膜での参照遺伝子の安定性を検定した結果、*HPRT1* が最も安定であり、*B2M* が最も不安定であった。そのため、*HPRT1* を参照遺伝子として定量解析の規格化に使用した。ステロイド受容体の発現は *AR*, *GR*, *MR*, *PR*, *ESR1* の順に高発現しており、*ESR2* は検出限界以下だった。また、これらの受容体は互いに強い正の相関を示した。女性膝滑膜では *AR* と *PR* でのみ Body mass index との正の相関を示し、*IL1B* と *IL6* についてはともに女性優位な高発現を示した。男性では *IL1B* と *IL6* の間に正の相関を認めた一方で、女性では有意な相関が認められなかった。また、*IL1B* と *ESR1* および *PR* 間で、*IL6* と *ESR1* および *GR* 間で女性特異的な逆相関を示した。

最も不安定な参照遺伝子である *B2M* を用いて上記の結果との比較を行うと遺伝子間の強い相関や炎症性サイトカイン発現の性差が攪乱されることが判明した。

## 【考察】

KOA において滑膜の遺伝子発現プロファイル解析はその病態を探る上で欠かせない。本研究から KOA 滑膜では *HPRT1* が定量的発現解析に最適な参照遺伝子であることが判明した。従来から女性優位な KOA の罹患が知られているが、その性差の原因は不明であった。本解析から女性優位な炎症性サイトカイン発現が見いだされ、さらに、炎症性サイトカインとステロイドホルモン受容体の性特異的な逆相関関係が存在したことから、性特異的な OA 病態の進行と炎症機序にステロイドホルモンが関与していることが示唆された。血球系を中心にステロイドホルモンによる炎症性サイトカインの発現制御は既に報告されているが、OA 滑膜ではこの制御機構の存在が知られておらず、今回初めてこれら制御機構が滑膜においても存在することが示唆された。さらに、これらの遺伝子発現解析結果は、女性優位な KOA の罹患という臨床的事実とよく相関している。これら遺伝子発現プロファイルは、最も不安定な参照遺伝子である *B2M* を用いると攪乱されることから、定量的遺伝子発現解析に最適な参照遺伝子選択の重要性が確認された。

(1648 字)