

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32661  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2014～2016  
 課題番号：26462321  
 研究課題名(和文) マクロファージ、T細胞由来サイトカインによる関節破壊制御機構の解明と治療への応用  
  
 研究課題名(英文) T cell and macrophage derived proinflammatory cytokines-induced joint destruction  
  
 研究代表者  
 中島 新 (NAKAJIMA, Arata)  
  
 東邦大学・医学部・准教授  
  
 研究者番号：60583995  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の滑膜におけるIFN- $\gamma$ 、IL-17、TNF- $\alpha$ の発現パターンと相関を遺伝子レベルで解析し、TNF阻害薬(TNFi)がこれらのサイトカインの発現に及ぼす影響を検討した。RA患者24例から手術時に採取した滑膜を用い、IL-17、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ に対する定量的PCRを行った。サイトカインの発現パターンからIFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ 優位型、IL-17優位型、その他、の3群に分けられた。TNF- $\alpha$ はIFN- $\gamma$ と強い相関を示し、TNF- $\alpha$ とIL-17およびIFN- $\gamma$ とIL-17の間には弱い相関を認めた。なお、TNFiはどのサイトカインの発現量にも影響を及ぼさなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, mRNA expression levels of IFN- $\gamma$ , IL-17 and TNF- $\alpha$  were investigated in individual patients with RA and the correlations between pairs of these three pro-inflammatory cytokines were analyzed. Synovial tissues were obtained during arthroplasties from 24 RA patients and qRT-PCR for IFN- $\gamma$ , IL-17 and TNF- $\alpha$  was performed. Based on relative expression levels of the three pro-inflammatory cytokines, patients were classified into 3 major types; an IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$ -dominant type, an IL-17-dominant type, and the other type. TNF- $\alpha$  expression levels were correlated with IFN- $\gamma$ . In addition, there was a negative correlation between TNF- $\alpha$  and IL-17, and IFN- $\gamma$  and IL-17. Median relative expression levels of TNF- $\alpha$  have no significant difference between the TNFi and the csDMARDs groups. In the rheumatoid synovial tissues, expression levels of TNF- $\alpha$  were modulated in parallel with IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  and IL-17, or IFN- $\gamma$  and IL-17 did not co-express at high levels.

研究分野：整形外科学

キーワード：関節リウマチ 滑膜 炎症性サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は原因不明の炎症性疾患であり、罹病率は世界総人口の約0.5-1%といわれている。RAの特徴は進行性の四肢関節破壊であり、ひとたび関節の破壊がおこると重度の機能障害を残すことから病態の解明が急務な疾患である。

活動性の関節リウマチ(RA)の滑膜組織ではTh1, Th17などのT細胞、マクロファージが浸潤し、これらの細胞から炎症性サイトカインであるIFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$ が組織内に多量に放出され、関節破壊の中心的な役割を果たしている。TNF阻害薬(TNFi)に代表される抗サイトカイン療法はRA患者の一部に寛解達成、骨破壊抑制を可能にした。しかし、抗サイトカイン療法の問題点は不応・2次無効例の対処法であり、滑膜におけるサイトカインの発現パターン解析、他のサイトカインとの相対的な発現量の比較はこれらの問題点の解決に重要な手掛かりとなる。

### 2. 研究の目的

定量的RT-PCRによってRA滑膜におけるIL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ の発現量の相関を解析し、さらにTNFiがこれらのサイトカインの発現に及ぼす影響を検討した。

### 3. 研究の方法

実験にはRA患者24例(10例:TNF阻害薬使用、14例:生物学的製剤非使用)24関節から手術時に採取した滑膜を用いた。遺伝子発現の検討のために滑膜からtotal RNAを抽出後cDNAを作成し、IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ に対するTaqMan probeを用いてリアルタイムPCRを行った。各遺伝子の発現量は $\beta$ -actinの発現量で除した値を用いた。

各サイトカインの発現量の相関にはPearson's correlation test, 2群間の比較にはMann-Whitney U testまたはchi-square testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

### 4. 研究成果

(1)RA滑膜におけるTNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17の発現

リアルタイムPCRによる各遺伝子の発現  
TNF阻害薬の使用・非使用に関わらずTNF- $\alpha$ の発現は24例中18例(75%)に認められた。IL-17とTNF- $\alpha$ の発現は興味深い発現パターンを示した。症例3, 5, 10, 14, 16のようにIL-17の発現が寛解例(症例1)の4倍以上高い場合には、TNF- $\alpha$ の発現は検出されなかった。さらに、症例3, 14のようにIL-17の発現が寛解例の20倍以上高い場合にはTNF- $\alpha$ だけでなくIFN- $\gamma$ の発現も検出されなかった。一方、症例6, 9, 11, 18-20, 24のようにIFN- $\gamma$ の発現が寛解例の20倍以上高い場合、TNF- $\alpha$ の発現は増加したがIL-17はほとんど検出されなかった。また、TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17の発現パターンから、患者はIFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ 優位型、IL-17優位型、その

他、の3群に分けられた。(図1)

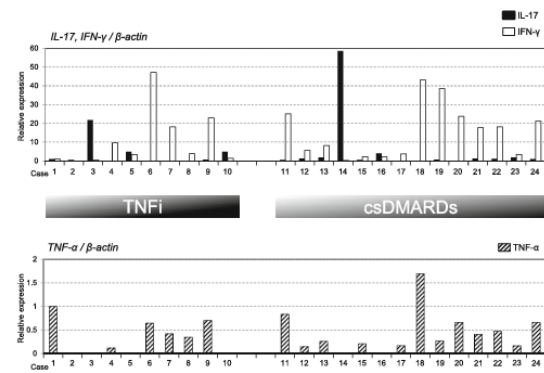


図1. RA滑膜におけるIL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ の発現. 左 Case 1-10: TNF阻害薬群, 右 Case 11-24: 生物学的製剤非使用群. 左 Case 1は寛解(REM)症例.

TNF阻害薬使用・生物学的製剤非使用患者間におけるTNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17の発現量の比較

TNF阻害薬使用群、生物学的製剤非使用群におけるTNF- $\alpha$ の相対的発現量の中央値はそれぞれ0.232, 0.263であり、両群間に有意差は認めなかった。同様にIFN- $\gamma$ , IL-17についても同様の比較を行ったが、両群間に有意差は認めなかった。

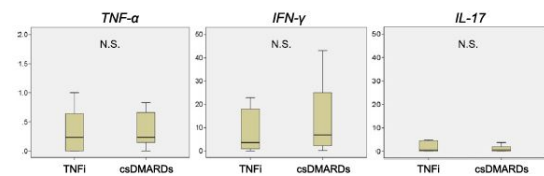


図2. RA滑膜においてTNF阻害薬(TNFi)がIL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ の発現に及ぼす影響. TNFi: TNF阻害薬使用群, csDMARDs: 生物学的製剤非使用群.

RA滑膜におけるTNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17の発現量の相関

TNF- $\alpha$ の発現量はIFN- $\gamma$ の発現量と強い相関を示した( $r = 0.641$ ,  $p = 0.001$ )。また、TNF- $\alpha$ とIL-17( $r = -0.460$ ,  $p = 0.03$ )、IFN- $\gamma$ とIL-17( $r = -0.434$ ,  $p = 0.04$ )の発現量に弱い相関を認めた。

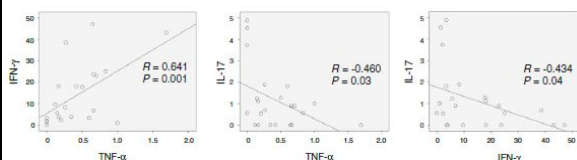


図3. RA滑膜におけるIL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ の発現量の相関.

本研究の結果、RA滑膜におけるTNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ の発現量は強い相関を示すことが分かった。これは、Th1由来のIFN- $\gamma$ が滑膜中

のマクロファージを刺激し TNF- $\alpha$  を誘導するという病態を反映していると考えられる。また、TNF- $\alpha$  と IL-17、IFN- $\gamma$  と IL-17 の発現量は負の相関があることが示された。これらのサイトカインの特徴的な発現パターンは現在の生物学的製剤を用いた RA の薬物治療において有用な情報になると考えられる。興味深いことに、TNF 阻害薬は遺伝子レベルでは IL-17、IFN- $\gamma$  の発現に影響を及ぼさないことが示された。このことから、TNF 阻害薬無効・効果減弱例での IL-17 阻害剤の有効性が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Nakajima A, Aoki Y, Terayama K, Sonobe M, Takahashi H, Saito M, Nakagawa K. Health assessment questionnaire-disability index (HAQ-DI) score at the start of biological disease-modifying antirheumatic drug (bDMARD) therapy is associated with radiographic progression of large joint damage in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2017 Mar 8:1-6. DOI: 10.1080/14397595.2017.1294302. [Epub ahead of print] 査読有

Nakajima A, Aoki Y, Sonobe M, Takahashi H, Saito M, Nakagawa K. Serum level of reactive oxygen metabolites (ROM) at 12 weeks of treatment with biologic agents for rheumatoid arthritis is a novel predictor for 52-week remission. *Clin Rheumatol.* 2017 Feb;36(2):309-315. DOI: 10.1007/s10067-016-3479-3 査読有

Nakajima A, Aoki Y, Sonobe M, Watanabe F, Takahashi H, Saito M, Nakagawa K. Relative expression and correlation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , and interleukin-17 in the rheumatoid synovium. *Clin Rheumatol.* 2016 Jul;35(7):1691-7. DOI: 10.1007/s10067-016-3249-2 査読有

Nakajima A, Aoki Y, Sonobe M, Takahashi H, Saito M, Terayama K, Nakagawa K. Radiographic progression of large joint damage in patients with rheumatoid arthritis treated with biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Mod Rheumatol.* 2016 Jul;26(4):517-21. <http://dx.doi.org/10.3109/14397595.2015.1109785> 査読有

Nakajima A, Aoki Y, Shibata Y, Sonobe M, Terajima F, Takahashi H, Saito M, Taniguchi S, Yamada M, Nakagawa K. Identification of clinical parameters associated with serum oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2014 Nov;24(6):926-30. <http://dx.doi.org/10.3109/14397595.2014.891495> 査読有

[学会発表](計 20 件)

Nakajima A, Sonobe M, Yamamoto K, Nakagawa K. Serum level of reactive oxygen metabolites (ROM) at 12 weeks of treatment with biologic agents for rheumatoid arthritis is a novel predictor for 52-week remission. The ACR/ARHP 2016 Annual Meeting 2016.11.15 Washington Convention Center, Washington, DC, USA

中島 新、園部正人、高橋 宏、齋藤雅彦、宮本卓弥、小山慶太、山本景一郎、中川晃一. 生物学的製剤投与中の関節リウマチ患者における大関節破壊進行の実態とその危険因子. 第 89 回日本整形外科学会学術総会 2016.5.15 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

中島 新、園部正人、谷口慎治、中川晃一. 生物学的製剤投与後 12 週の血中酸化ストレス (ROM) は 52 週の寛解と関連する. 第 60 回日本リウマチ学会 2016.4.21 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

中島 新、園部正人、谷口慎治、中川晃一. 生物学的製剤投与開始時の HAQ は大関節破壊進行の危険因子である 経過観察期間 1-3 年の結果から. 第 60 回日本リウマチ学会 2016.4.21 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Nakajima A, Sonobe M, Takahashi H, Saito M, Koyama K, Yamamoto K, Nakagawa K. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  is associated with interferon- $\gamma$  but not with interleukin-17 in the rheumatoid synovium. The ORS 2016 Annual Meeting 2016.3.6 Coronado Springs, Orlando, FL, USA

Nakajima A, Sonobe M, Koyama K, Nakagawa K. Progressive destruction of large joints in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. The ACR/ARHP 2015 Annual Meeting 2015.11.9 Moscone Convention Center, San Francisco, CA, USA

中島 新、園部正人、高橋 宏、齊藤雅彦、井上雅寛、谷口慎治、山田 学、小山慶太、山本景一郎、寺島史郎、中川晃一。(シンポジウム；関節リウマチ病態解明の現状と展望) T細胞、マクロファージ由来の炎症性サイトカインによる関節破壊制御の解析 .第30回日本整形外科学会基礎学術集会 2015.10.23 富山国際会議場(富山県富山市)

中島 新、園部正人、寺島史明、高橋 宏、齊藤雅彦、井上雅寛、谷口慎治、山田 学、小山慶太、山本景一郎、中川晃一。生物学的製剤による経時的な血中酸化ストレスの抑制効果 - トシリズマブと TNF 阻害薬との比較 - .第30回日本整形外科学会基礎学術集会 2015.10.23 富山国際会議場(富山県富山市)

中島 新、園部正人、寺島史郎、高橋 宏、齊藤雅彦、井上雅寛、谷口慎治、山田 学、小山慶太、山本景一郎、中川晃一。関節リウマチ患者におけるトシリズマブによる血中酸化ストレスの抑制効果 .第88回日本整形外科学会学術総会 2015.5.21 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

中島 新、園部正人、谷口慎治、中川晃一。生物学的製剤による経時的な血中酸化ストレスの抑制効果 - トシリズマブと TNF 阻害薬との比較 - .第59回日本リウマチ学会 2015.4.23 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

中島 新、園部正人、谷口慎治、中川晃一。生物学的製剤治療下の大関節破壊抑制効果と破壊進行危険因子の検討 .第59回日本リウマチ学会 2015.4.25 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

中島 新。(パネルディスカッション；リウマチ治療の地域連携) 整形外科医による関節リウマチの地域連携 .第55回関東整形災害外科学会 2015.3.28 ラフレさいたま(埼玉県さいたま市)

中島 新、園部正人、寺島史明、高橋 宏、齊藤雅彦、中川量介、谷口慎治、山田 学、中川晃一。関節リウマチ滑膜組織において TNF- は IL-17 ではなく IFN- と関連する .第29回日本整形外科学会基礎学術集会 2014.10.9 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

中島 新、園部正人、寺島史明、高橋 宏、齊藤雅彦、中川量介、谷口慎治、山田 学、青木保親、中川晃一。関節リウマチ患者に対する IL-6 受容体抗体の血中酸化ストレスお

よび滑膜線維芽細胞における活性酸素種(ROS)の抑制効果 .第29回日本整形外科学会基礎学術集会 2014.10.9 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

中島 新、青木保親、園部正人、寺島史明、高橋 宏、齊藤雅彦、谷口慎治、山田 学、中川晃一。関節リウマチ患者の大関節破壊に対する生物学的製剤の治療効果と破壊進行危険因子の検討 .第87回日本整形外科学会 2014.5.22 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

中島 新、青木保親、柴田孝史、園部正人、寺島昭史、高橋 宏、齊藤雅彦、谷口慎治、山田 学、中川晃一。関節リウマチ患者における血中酸化ストレスと関連する因子の同定 .第87回日本整形外科学会 2014.5.22 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

中島 新、望月 猛、山中 一、玉井 浩、小林達也、河本泰成、三束武司、付岡 正、常泉吉一、後藤憲一郎、田原正道、中村順一、李 泰鉉。関節リウマチに対するアダリムマブの有効性と安全性評価：整形外科リウマチ医の多施設共同研究による経過観察 1年の治療成績 .第58回日本リウマチ学会 2014.4.24 高輪プリンスホテル(東京都品川区)

中島 新、青木保親、園部正人、谷口慎治、中川晃一。トシリズマブは他の生物学的製剤より血中酸化ストレスを有意に低下させる .第58回日本リウマチ学会 2014.4.24 高輪プリンスホテル(東京都品川区)

中島 新、青木保親、園部正人、谷口慎治、中川晃一。RA患者の大関節破壊に対する生物学的製剤の治療効果と破壊進行危険因子の検討 .第58回日本リウマチ学会 2014.4.24 高輪プリンスホテル(東京都品川区)

Nakajima A, Aoki Y, Sonobe M, Taniguchi S, Nakagawa K. Effects of biologic agents on inhibition of large joint-destruction in patients with rheumatoid arthritis and the risk factors of progress in joint-destruction. 第58回日本リウマチ学会 2014.4.26 高輪プリンスホテル(東京都品川区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 新 (NAKAJIMA, Arata)  
東邦大学・医学部・准教授  
研究者番号：60583995

(2) 研究分担者

中川 晃一 (NAKAGAWA, Koichi)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：30400823

齊藤 雅彦 (SAITO, Masahiko)  
東邦大学・医学部・助教  
研究者番号：30718747

青木 保親 (AOKI, Yasuchika)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任教授  
研究者番号：70584001

(3) 連携研究者

該当なし