

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591177

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるアディポサイトカインの臨床的意義

研究課題名(英文) Clinical Significance of Adipocytokines in Rheumatoid Arthritis

研究代表者

川合 眞一 (KAWAI SHINICHI)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：70129401

研究成果の概要(和文)：脂肪組織はアディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質を分泌しており、申請者らは関節リウマチ(RA)における意義を検討した。中でもアディポネクチンは、ヒト滑膜細胞のIL-8産生(*Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378:218-223)やプロスタグランジンE<sub>2</sub>産生(*Arthritis Rheum.* 2010;62:1641-1649)を増加させた。一方、RA患者のアディポネクチン、レジスチン、レプチン血清濃度は健常人よりも増加していた(*Intern Med.* 2011;50:269-275)。即ち、アディポサイトカインはRAの病態形成に何らかの関与をしていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have demonstrated that adipocytokines secreted by adipocytes may have a role in the inflammatory process. We investigated their clinical significance in patients with rheumatoid arthritis (RA). We have reported that adiponectin stimulates the production of IL-8 (*Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378:218-223), and prostaglandin E<sub>2</sub> (*Arthritis Rheum.* 2010;62:1641-1649) by rheumatoid synovial fibroblasts *in vitro*. We also have reported that the serum levels of adiponectin, resistin, and leptin in RA patients were elevated (*Intern Med.* 2011;50:269-275). These findings suggest that adipocytokines may, at least in part, contribute to synovial inflammation in RA.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2010年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
|        |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：内科学、リウマチ膠原病学、薬物治療学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ学、関節リウマチ、アディポサイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、脂肪組織は単なるエネルギー蓄積という機能のみならず、さまざまな生理活性物質を分泌するというホルモン臓器として機能していることが明らかとなった。これらは一般に、アディポサイトカインあるいは

アディポカインと呼ばれている。また、これらにはさまざまな分子が含まれるが、例えばレプチン、アディポネクチン、レジスチンなどの分子が注目されている。さらに、従来はマクロファージやリンパ球といった免疫担当細胞が主たる分泌細胞とされていた腫瘍

壊死因子(TNF)  $\alpha$ 、インターロイキン(IL)-1、IL-6 などの炎症性サイトカインの一部も脂肪組織から分泌されている。また、肥満患者では、血清 CRP 濃度などの全身性炎症反応が亢進していることなどからもアディポサイトカインの関わりが示唆されている。

(2) 関節リウマチ(RA)は、自己免疫異常を背景とした原因不明の慢性炎症性疾患だが、近年、その病態研究が進み、種々の炎症性サイトカインが関与することが明らかとなった。この疾患の主病変は関節の滑膜炎であり、滑膜細胞はサイトカインなどの炎症刺激により、活性化および増殖し、パンススと呼ばれる増殖・肥大した滑膜組織となる。この滑膜組織は自身がさらに炎症性サイトカインを分泌し、直接軟骨・骨組織にも進入して関節破壊を進行させるような炎症の悪循環を形成している。RA の病態形成に関わる炎症性サイトカインとしては、IL-1、TNF  $\alpha$ 、IL-6 などが強く関与しており、実際、それらを標的としたモノクローナル抗体や受容体制剤などの生物学的製剤が RA 患者で著効することが臨床でも証明されている。しかし、これらの最新治療にもかかわらず改善しない RA 患者がなお認められ、RA の全ての病態形成をこれらの炎症性サイトカインのみで説明することはできない。

(3) 申請者は、以前より多くの RA 患者の診療を行い、さらに手術時に得られた滑膜組織を利用した生物学的または薬理学的研究を行ってきた。そうした臨床および基礎研究の過程において、RA 患者からの摘出標本や内視鏡下の関節腔内には、増殖した滑膜組織に加えて多くの脂肪組織が存在することを観察してきた。即ち、脂肪組織が RA の病態形成に直接何らかの関与をしていることが想定されたことから、今回の研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

(1) 前述したように、申請者らは以前より手術時に得られた RA 患者滑膜組織を利用した生物学的または薬理学的研究を医学部倫理委員会の承認を受けて行ってきた。その実験系を用い、*in vitro*でアディポサイトカインの滑膜細胞への作用を検討し、臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

(2) 申請者らは東邦大学医療センター大森病院リウマチ膠原病センターにおいて 1000 名以上のリウマチ膠原病疾患患者の診療にあたっている。そのため、倫理委員会承認の下、患者の協力を得て血液を採取した。それらの血清のアディポサイトカイン濃度を測定し、患者の臨床所見との関連を明らかにすることも目的の 1 つとした。

(3) 以上の検討により、RA におけるアディポサイトカインの臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) *in vitro*の実験方法の詳細は、従来申請者らが行ってきた方法(*J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314:796 など)によった。即ち、本学整形外科における RA 患者の関節置換術などの手術時に得られたヒト滑膜組織を用いた。診療に必要とする組織以外の残余組織を研究利用することに同意した RA 患者から滑膜組織を得た。滑膜組織をコラゲナーゼ処理し、培養液に懸濁した。細胞培養用フラスコにて 37 °C・5% CO<sub>2</sub>の条件下で 24 時間培養し、フラスコに付着した細胞を滑膜細胞とした。この滑膜細胞培養系に、種々のアディポサイトカインを血清濃度近傍の濃度で作用させた。

種々のアディポサイトカインをさまざまな濃度で作用させた滑膜細胞の培養上清を採取し、各種炎症性サイトカインおよびケモカイン、またはプロスタグランジン E<sub>2</sub>濃度などの炎症関連物質の産生を、各々の ELISA キットなどで測定した。また、それらに関連した蛋白の mRNA 産生を、RT-PCR や Real time PCR にて検討した。

これらの検討に加え、RNAi によるアディポネクチン受容体の遺伝子ノックダウンを行い、アディポネクチンの作用を調べた。さらに細胞内シグナル伝達に関わる分子などの変動を調べた。

(2) 外来または入院患者より研究使用に関して同意が得られた RA および他の膠原病疾患患者、また健常人より得られた健常人血液を採取した。全血から分離して得た血清は、-80 °C に保存した。血清レジスチン、レプチン、およびアディポネクチン濃度は、各々の ELISA キットにて測定した。また、採血時点における疾患活動性を、関節所見などの臨床症状・血清 CRP 濃度・赤沈値などにて検討し、さらに体重・Body Mass Index (BMI) などの情報も得て、アディポサイトカイン濃度に関連する臨床所見について多変量解析で検討した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト滑膜細胞に対するアディポネクチンの作用

①アディポネクチンはヒト滑膜細胞の IL-8 産生を刺激する

申請者らは、アディポネクチンを生理的濃度でヒト滑膜細胞に作用させると、IL-8 産生を増加させることを見出した [Kitahara K, Kusunoki N, Kakiuchi T, Suguro T, Kawai S.

Adiponectin stimulates IL-8 production by rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378:218-223. (doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.017)].

図1に示したように、アディポネクチンはヒト滑膜細胞のIL-8蛋白およびmRNA産生を誘導し、その作用は抗アディポネクチン抗体の添加で減弱した。

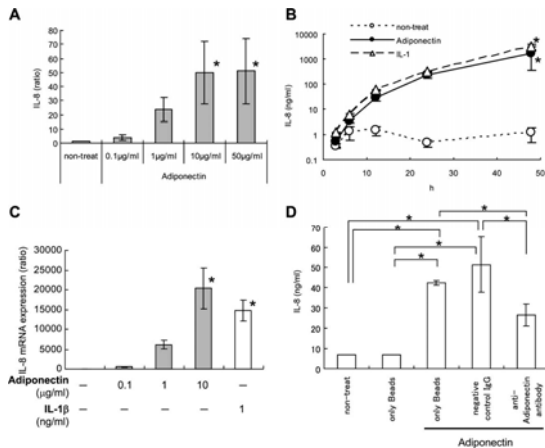


図1. アディポネクチンによるヒト滑膜細胞のIL-8産生誘導作用。(A) 24時間後のIL-8産生、(B) IL-8産生のタイムコース、(C) IL-8 mRNA産生、(D) 抗アディポネクチン抗体添加によるIL-8誘導作用の減弱

図2に示したように、RNAiにより特異的にアディポネクチン受容体をノックダウンしたところ、アディポネクチンによるIL-8誘導作用は減弱した。

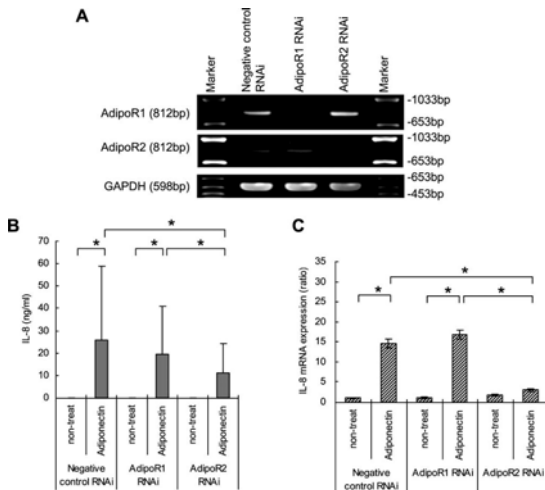


図2. アディポネクチンによるIL-8産生誘導作用に及ぼすアディポネクチン受容体(AdipoR1およびAdipoR2)遺伝子ノックダウンの影響。(A) AdipoR1およびAdipoR2のRNAi導入によるmRNA減弱、(B) 受容体遺伝子ノックダウンによるIL-8産生誘導作用の減弱、(C) 同IL-8 mRNA誘導作用の減弱

②アディポネクチンはヒト滑膜細胞のプロスタグランジンE<sub>2</sub>産生を誘導する

申請者らは、アディポネクチンを生理的濃度でヒト滑膜細胞に作用させると、プロスタグランジンE<sub>2</sub>産生を誘導することを見出した[Kusunoki N, Kitahara K, Kojima F, Tanaka N, Kaneko K, Endo H, Suguro T, Kawai S. Adiponectin stimulates prostaglandin E<sub>2</sub> production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:1641-1649. (doi:10.1002/art.27450)].

図3に示したように、アディポネクチンはヒト滑膜細胞のプロスタグランジンE<sub>2</sub>産生を増加させた。

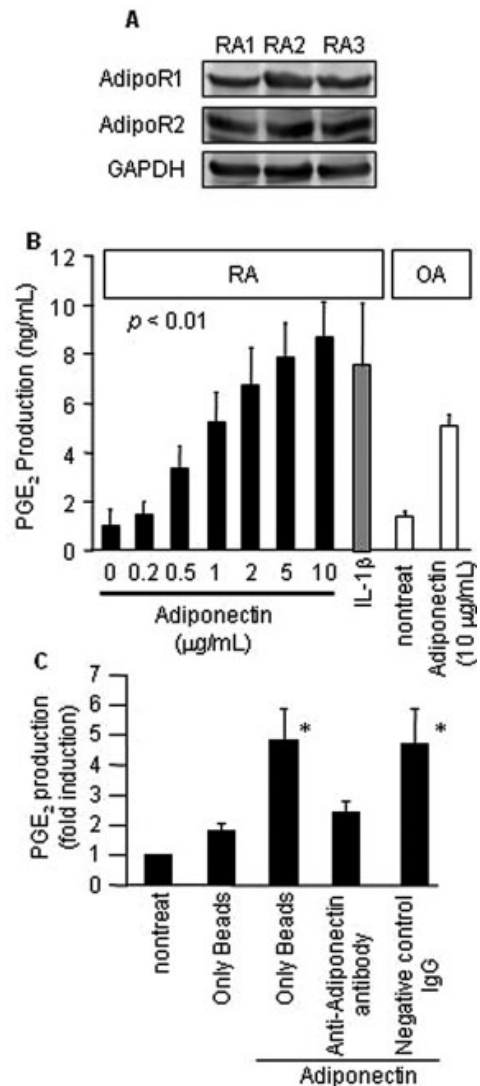


図3. ヒト滑膜細胞におけるアディポネクチンによるプロスタグランジンE<sub>2</sub>誘導作用。(A) アディポネクチン受容体mRNAの検出、(B) プロスタグランジンE<sub>2</sub>産生の増加、(C) 抗アディポネクチン抗体による作用の減弱

図4に示したように、このプロスタグラン

ジン E<sub>2</sub> 誘導作用はシクロオキシゲナーゼ (COX)-2 および膜関連プロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES)-1 の mRNA 発現誘導を介していた。

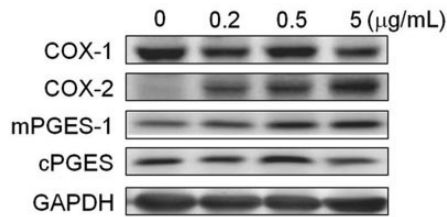


図 4. ヒト滑膜細胞の種々のプロスタグランジン産生に関わる酵素の発現に対するアディポネクチンの作用

アディポネクチン受容体、AdipoR1 と AdipoR2 の mRNA を RNAi でノックダウンすると、アディポネクチンによるプロスタグランジン E<sub>2</sub> 誘導作用が减弱した (図 5)。

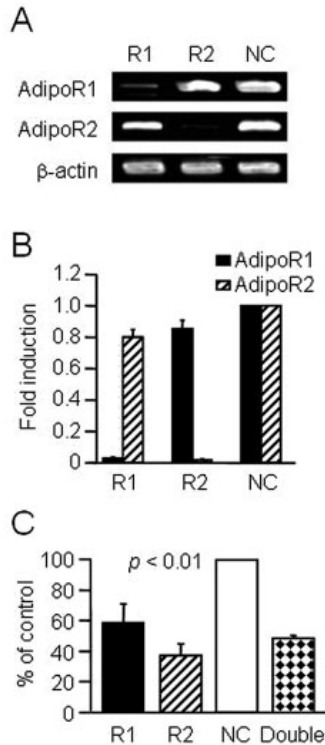


図 5. (A) (B) RNAi による AdipoR1 と AdipoR2 mRNA 発現抑制、(C) RNAi 導入後のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 誘導作用の减弱

さらに作用機序を検討したところ、アディポネクチンによる COX-2 および mPGES-1 誘導を介したプロスタグランジン E<sub>2</sub> 産生増加作用は NF-κB 活性化が関連していた。

(2) RA 患者血清のアディポネクチン濃度と臨床所見の関連

次に申請者らは、RA 患者血清中の各種アディポサイトカイン濃度を検討した。血清レジ

スチン濃度 (図 6) は健常人と有意差はなかったが、多変量解析により血清 CRP 濃度および女性であることと有意な関連を示した。

RA 患者の血清レプチン濃度は、図 7 のように男女共に健常人よりは増加し、多変量解析では血清 CRP および BMI と関連していた。

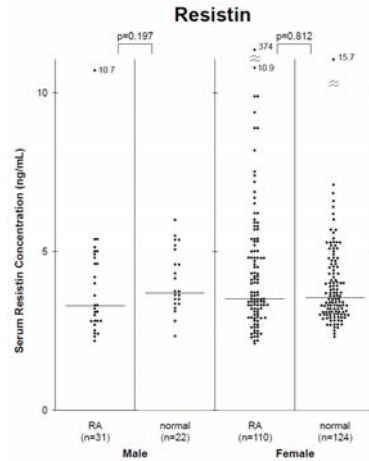


図 6. RA 患者と健常人の血清レジスチン濃度

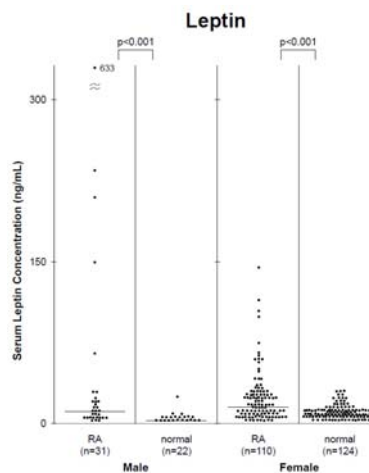


図 7. RA 患者と健常人の血清レプチン濃度

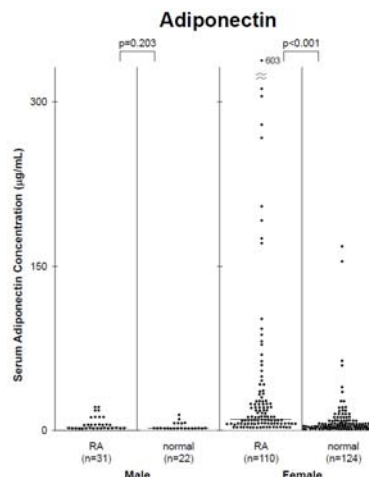


図 8. RA 患者と健常人の血清アディポネクチン濃度

一方、血清アディポネクチン濃度は女性患者で有意な増加を示したが(図8)、多変量解析では血清CRPとは負の関連、プレドニゾロン服用とは正の関連を認めた。

#### 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 24 件)

1. Yoshino T, Kusunoki N, Tanaka N, Kaneko K, Kusunoki Y, Endo H, Hasunuma T, Kawai S. Elevated serum levels of resistin, leptin, and adiponectin are associated with C-reactive protein and also other clinical conditions in rheumatoid arthritis. *Intern Med*. 2011; 50:269-275. (査読有)
2. Kameda H, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, Mori S, Yoshida Y, Takayanagi N, Taki H, Hasegawa Y, Hatta K, Yamanaka H, Dohi M, Hashimoto S, Yamada H, Kawai S, Takeuchi T, Tateda K, Goto H. Clinical and radiological features of acute-onset diffuse interstitial lung diseases in patients with rheumatoid arthritis receiving treatment with biological agents: importance of pneumocystis pneumonia in Japan revealed by a multicenter study. *Intern Med*. 2011;50:305-313. (査読有)
3. Hashimoto J, Garner P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N. Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study. *Mod Rheumatol*. 2011; 21:10-15. (査読有)
4. Kaneko K, Kaburaki M, Muraoka S, Tanaka N, Yamamoto T, Kusunoki Y, Abe H, Endo H, Kawai S. Exacerbation of adult-onset Still's disease, possibly related to elevation of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  after etanercept administration. *Int J Rheum Dis*. 2010;13:e67-e69. (査読有)
5. Kawai S, Uchida E, Kondo M, Ohno S, Obata J, Nawata Y, Sugimoto K, Oribe M, Nagaya I. Efficacy and safety of ketoprofen patch in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Pharmacol*. 2010;50:1171-1179. (査読有)
6. Tanaka N, Kusunoki Y, Kaneko K, Yamamoto T, Kaburaki M, Muraoka S, Abe H, Endo H, Sato D, Homma S, Shibuya K, Kawai S. Systemic lupus erythematosus complicated by recurrent pneumothorax: case report and literature review. *Jpn J Clin Immunol*. 2010;33:162-168. (査読有)
7. Kusunoki N, Kitahara K, Kojima F, Tanaka N, Kaneko K, Endo H, Suguro T, Kawai S. Adiponectin stimulates prostaglandin E<sub>2</sub> production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2010;62:1641-1649. (査読有)
8. Ichikawa Y, Saito T, Yamanaka H, Akizuki M, Kondo H, Kobayashi S, Oshima H, Kawai S, et al. Clinical activities after 12 weeks of treatment with non-biologics in early rheumatoid arthritis may predict the articular destruction 2 years later. *J Rheumatol*. 2010;37:723-729. (査読有)
9. Kusunoki Y, Tanaka N, Kaneko K, Yamamoto T, Endo H, Kawai S. Tacrolimus therapy for systemic lupus erythematosus without renal involvement: a preliminary retrospective study. *Mod Rheumatol*. 2009;19:616-621. (査読有)
10. Miyasaka N, Kawai S, Hashimoto H. Efficacy and safety of tacrolimus for lupus nephritis: a placebo-controlled double-blind multicenter study. *Mod Rheumatol*. 2009;19:606-615. (査読有)
11. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:1580-1584. (査読有)
12. Koike R, Harigai M, Atsumi T, Amano K, Kawai S, Saito K, Saito T, Yamamura M, Matsubara T, Miyasaka N. Japan College of Rheumatology 2009 guidelines for

- the use of tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2009; 19:351-357. (査読有)
13. Inoue S, Hashiguchi M, Kawai S, Mochizuki M. Erythrocyte methotrexate-polyglutamate assay using fluorescence polarization immunoassay technique: application to the monitoring of patients with rheumatoid arthritis. *Yakugaku Zasshi.* 2009;129:1001-1005. (査読有)
  14. Kunisch E, Jansen A, Kojima F, Löffler I, Kapoor M, Kawai S, Rubio I, Crofford LJ, Kinne RW. Prostaglandin E<sub>2</sub> differentially modulates proinflammatory/prodestructive effects of TNF-alpha on synovial fibroblasts via specific E prostanoïd receptors/cAMP. *J Immunol.* 2009; 183:1328-1336. (査読有)
  15. Inoue S, Hashiguchi M, Takagi K, Kawai S, Mochizuki M. Preliminary study to identify the predictive factors for the response to methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Yakugaku Zasshi.* 2009;129:843-849. (査読有)
  16. Kojima F, Kapoor M, Kawai S, Yang L, Aronoff DM, Crofford LJ. Prostaglandin E<sub>2</sub> activates RAPI *via* EP2/EP4 receptors and cAMP-signaling in rheumatoid synovial fibroblasts: Involvement of EPAC1 and PKA. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009;89:26-33. (査読有)
  17. Nishio S, Yamamoto T, Kaneko K, Tanaka-Matsumoto N, Muraoka S, Kaburaki M, Kusunoki Y, Takagi K, Kawai S. Pharmacokinetic study and Fcy receptor gene analysis in 2 patients with rheumatoid arthritis controlled by low-dose infliximab. *Mod Rheumatol.* 2009;19:329-333. (査読有)
  18. Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N. A combination of biochemical markers of cartilage and bone turnover, radiographic damage and body mass index to predict the progression of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis treated with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Mod Rheumatol.* 2009; 19:273-282. (査読有)
  19. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, Kishimoto T. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol.* 2009; 19:12-19. (査読有)
  20. Kitahara K, Kusunoki N, Kakiuchi T, Suguro T, Kawai S. Adiponectin stimulates IL-8 production by rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 378:218-223. (査読有)
  21. Kusunoki N, Yamazaki R, Kawai S. Pro-apoptotic effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on synovial fibroblasts. *Mod Rheumatol.* 2008; 18:542-551. (査読有)
  22. Akimoto K, Kusunoki Y, Nishio S, Takagi K, Kawai S. Safety profile of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2008;27:1393-1397. (査読有)
  23. Kitahara K, Takagi K, Kusunoki Y, Nishio S, Nozaki T, Inomata H, Takei M, Sawada S, Kawai S. Clinical value of second and third generation assays of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:1059-1060. (査読有)
  24. Kawai S, Tanaka K, Ohno I, Utsunomiya K, Seino Y. Safety of long-term tacrolimus therapy for rheumatoid arthritis: an open-label uncontrolled study in non-elderly patients. *Mod Rheumatol.* 2008;18:345-353. (査読有)
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.lab.toho-u.ac.jp/med/omori/kogen/research/achievement.html>
6. 研究組織
    - (1) 研究代表者  
川合 眞一 (KAWAI SHINICHI)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：70129401
    - (2) 研究分担者 なし
    - (3) 連携研究者 なし