

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591959

研究課題名（和文） インターロイキン 32 の炎症性関節炎における役割と治療標的分子としての可能性

研究課題名（英文） The role of interleukin-32 on inflammatory arthritis and the possibility of being a therapeutic target.

研究代表者

二木 康夫 (NIKI YASUO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10276298

研究成果の概要（和文）：インターロイキン 32 は NF $\kappa$ B/ERK シグナルを介して TNF $\alpha$  を誘導し、プロテオグリカンの消失と滑膜増殖を惹起し関節炎の病態に関与すると考えられた。また、経時的に IL-32 による TNF $\alpha$  誘導が減少し、IL-10 の誘導が増加することから、初期には炎症を増悪させるが、その後炎症を抑える作用をもっている可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：IL-32 induces TNF $\alpha$  via NF $\kappa$ B and ERK signaling pathway and contributes to developing inflammatory arthritis through loss of proteoglycan and provocation of synovitis. Since IL-32 induced TNF $\alpha$  had gradually reduced and IL-10 had gradually increased, IL-32 might develop inflammation in early stage and resolve subsequently.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：リウマチ病学、炎症性サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

インターロイキン 32(以下 IL-32)は 2005 年に Kim らによって報告された新規サイトカインである。初期の文献によると、IL-32 は TNF $\alpha$  を初めとする炎症性サイトカインを誘

導し、関節リウマチ、炎症性腸疾患、閉塞性肺疾患、マイコプラズマ感染、ウイルス感染などの病態に関与すると考えられている。一方受容体やマウスにおける相似分子は発見されていない。

## 2. 研究の目的

IL-32 の炎症性関節炎における作用の詳細とその機序について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) トランスジェニックマウスの作製

CAG プロモーター制御下に、アイソタイプ の 1 つである IL-32  $\alpha$  を過剰発現するトランスジェニックマウス (background : C57BL/6) を作製した [8]。各臓器の病理組織学的検索と、IL-32  $\alpha$  発現量 real time PCR で解析し、また TNF  $\alpha$  発現量についても同様に解析した。IL-32  $\alpha$  タンパク量を ELISA で測定した。

### (2) 関節炎モデルの作製

① IL-32  $\alpha$  トランスジェニックマウス (以下 Tg) と C57BL/6 の野生型マウス (Wt) の膝関節に、To11 様受容体 (TLR) 4 のアゴニストである LPS を 1 回注射し、対側には対照として PBS を同量注射した。2 週間後に病理組織学的検索と膝滑膜中の TNF  $\alpha$  mRNA を real time PCR 法で測定した。

② リコンビナント IL-32  $\alpha$  (rIL-32  $\alpha$ ) を作製し、これを野生型マウス 2 系統 (C57BL/6  $\cdot$  Balb/C) の膝関節に注射し、対側に対照として PBS を同量注射した。2 週間後に病理組織学的検索と膝滑膜中の TNF  $\alpha$  mRNA を real time PCR 法で測定した。

### (3) マウス細胞を用いた実験

① マウスマクロファージのセルラインである RAW264.7 細胞と rIL-32  $\alpha$  を共培養し、24 ~ 96 時間後の上清中の TNF  $\alpha$  量ならびに抗炎症性サイトカインとして知られる IL-10 量を ELISA にて測定した。

② シグナル伝達経路の解明のため、マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 細胞を用いて、TLR シグナル下流分子である NF  $\kappa$  B と MAPKs (ERK1/2、p38、JNK) のインヒビターと rIL-32  $\alpha$  を加え、24 時間後の上清中の TNF  $\alpha$

量を測定し、また各分子のリン酸化の有無を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) トランスジェニックマウスの解析

われわれが作製した Tg マウスの各臓器における IL-32  $\alpha$  の発現が mRNA ならびに ELISA で確認された。また TNF  $\alpha$  の発現量は臓器によりばらつきはあるが、Wt の 2~7 倍程度高発現していた。しかし一方で明らかな表現系の異常を認めず、病理組織学的にも野生型との相違を認めなかった。

(2) IL-32  $\alpha$  は TNF  $\alpha$  を誘導し関節炎を増悪させる。

① 病理組織学的所見において、Tg マウスに LPS を投与した群において関節軟骨の菲薄化と滑膜炎を認めた。Wt マウスまた PBS を注射した側ではとくに変化は見られなかった (fig. 1A)。膝滑膜中の TNF  $\alpha$  mRNA 量は Tg において有意に増加していた (fig. 1B)。

fig. 1A

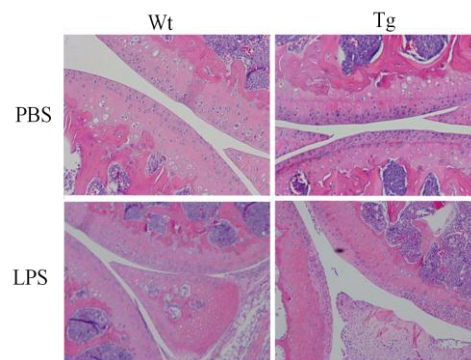
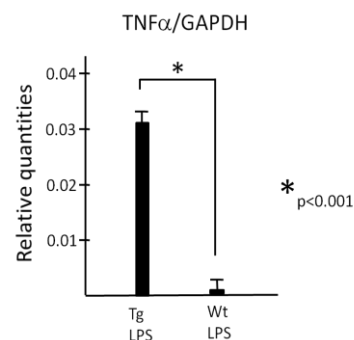


fig. 1B



②病理組織学的所見において、rIL-32 $\alpha$ を注射した群で両系統ともプロテオグリカンの消失と軽度の滑膜炎を認めた(fig.2A:C57BL/6)。また膝滑膜中のTNF $\alpha$ mRNA量はrIL-32 $\alpha$ 注射側において有意に増加していた(fig. 2B)。

fig. 2A

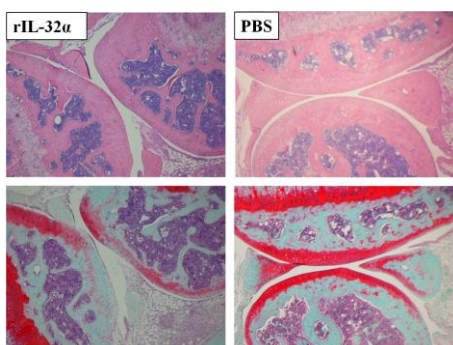
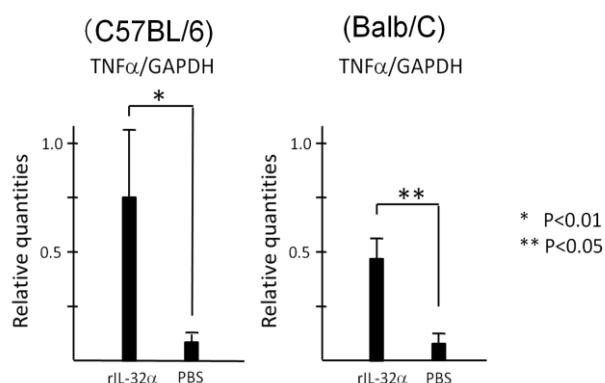


fig. 2B



(3) IL-32 $\alpha$ はサイトカインを誘導し炎症性関節炎の病態に関与する。

①RAWcellにrIL-32 $\alpha$ を投与後12時間をピークにTNF $\alpha$ の誘導が増加し、その後徐々に減少していくのに対して、IL-10はrIL-32投与後、経時的に増加した。

②Raw264.7細胞においてはIL-32 $\alpha$ によるTNF $\alpha$ 誘導がNF $\kappa$ BとERK1/2のインヒビターにより阻害された。またWestern blotにてI $\kappa$ BおよびERK1/2のIL-32添加によるリン酸化を確認した。

[考察]

われわれが行った関節炎モデルの実験では、いずれもIL-32により関節炎の増悪がみられたが、これらの実験系は長期的な観察が難しく、IL-32の初期の作用のみを反映している可能性がある。またとくに野生型にrIL-32 $\alpha$ を注射したモデルではプロテオグリカンの消失の程度に比べ滑膜炎の程度が弱く、すでに回復傾向にある時期を見ている可能性がある。

またマウス細胞を用いた実験から、IL-32の作用として初期にはTNF $\alpha$ を誘導し炎症を増悪させるが、後期以降はIL-10を誘導しむしろ炎症を終息に向ける可能性が示された。

IL-32のシグナル経路についてもその一端を解明することができた。さらなる検索を行っているところである。

## 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1件)

① M. Nakayama, Y. Niki, et al, "Enhanced susceptibility to lipopolysaccharide-induced arthritis and endotoxin shock in interleukin-32 alpha transgenic mice through induction of tumor necrosis factor alpha" *Arthritis Research and Therapy*, 査読あり, 2012 (投稿中)

[学会発表] (計5件)

① 中山政憲、二木康夫他 "IL-32 $\alpha$ はNF $\kappa$ B/ERKシグナルを介してTNF $\alpha$ を誘導し関節炎の病態に関与する"、第25回日本軟骨代謝学会、愛知、2012.3.9-10.

- ② M. Nakayama, Y. Niki, et al, “The effects of interleukin-32 alpha on development of inflammatory arthritis and endotoxin shock in mice” ,Orthopaedic Research Society 2012 annual meeting, San Francisco, USA, 4-7 February (2012)
- ③ 中山政憲、二木康夫他 ” IL-32 $\alpha$  のマウスにおける関節炎ならびに敗血症性ショックの誘導効果について” 、第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会、群馬、2011. 10. 20-21.
- ④ 中山政憲、二木康夫他、” IL-32 $\alpha$  のマウスにおける関節炎誘導効果について “、第 54 回日本リウマチ学会学術総会、神戸、2010. 4. 22-24.
- ⑤ M. Nakayama, Y. Niki, et al, “The effects of interleukin-32 alpha on development of inflammatory synovitis and cartilage destruction in mice” , American College of Rheumatology 2009 scientific meeting ,Philadelphia, USA, 16-21 October (2009)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二木 康夫 (NIKI YASUO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：10276928

### (2) 研究分担者

中山 政憲 (NAKAYAMA MASANORI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：70528249

川崎 俊樹 (KAWASAI TOSHIKI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：30365291