

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592234

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるIL-17の役割と部位特異的な関節破壊機序の解明

研究課題名(英文) Role of IL-17 in rheumatoid arthritis and the mechanism of site-specific joint destruction

研究代表者

園部 正人 (SONOBE, Masato)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：60459774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)滑膜におけるIL-17陽性細胞の割合は患者の疾患活動性に依らず、IL-17をTh17細胞のマーカーであるCCR6，CD3で共染色したところIL-17+CCR6+細胞，IL-17+CD3+細胞の割合は数%程度にすぎなかった。RA滑膜におけるTNF- α ，IFN- γ ，IL-17の関連を検討するためにリアルタイムPCRにより遺伝子発現を解析した。TNF- α の発現量はIFN- γ と強い相関を示したが、TNF- α とIL-17の発現量には有意な相関を認めなかった。同様にIFN- γ とIL-17の発現量に関しても解析を行ったが有意な相関を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：To determine the percentage of IL-17-positive cells and IL-17-expressing cell types in the rheumatoid synovium, immunohistochemical staining for IL-17 and its cell markers such as CCR6 or CD3 was performed. The ratio of IL-17-positive cells was independent of disease activity, and the percentage of IL-17+CCR6+ and IL-17+CD3+ cells was less than 10%. Then, we explored correlation between relative expression levels of TNF- α , IFN- γ , and IL-17 mRNA. TNF- α expression levels were strongly correlated with IFN- γ ; however, no significant correlation was detected between TNF- α and IL-17. Correlation between IFN- γ and IL-17 expression levels was also explored, but no significant correlation was detected.

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 免疫学

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。RAの関節破壊については、これまで免疫学的なアプローチから多くの研究がなされてきたが、申請者らが臨床面で常に疑問に感じているのは「何故、同じ患者の中でも薬物治療に反応する関節と抵抗する関節が存在するのか?」ということであった。実際にRA患者では血液検査上の炎症反応はほとんどなくても、ある関節では関節腫脹が持続し骨破壊が進行することをしばしば経験する。

RAの病態は免疫学的にはTh1型自己免疫疾患と長らく考えられてきた。しかし、その一方で関節局所ではTNF- α などの単球/マクロファージ由来サイトカインに比べて、IFN- γ などのT細胞由来のサイトカインレベルは著しく低いなどの矛盾点は未解決のままであった。このような状況の中、RA関節でT細胞由来のサイトカインであるIL-17が報告された。その後、関節炎を含めた各種自己免疫動物モデルでもTh1ではなく、IL-17とそれを産生する新たなヘルパーT細胞サブセットであるTh17細胞が疾患発症に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、近年、RAはTh17型自己免疫疾患という考え方が広く受け入れられるようになってきた。

一方、2003年に本邦で初めて抗TNF製剤であるインフリキシマブ(IFX)がRAに使用できるようになったことは、RA治療にパラダイムシフトをもたらした。その後も同様に抗TNF製剤であるエタネルセプト(ETN)やアダリムマブ(ADA)、本邦で開発されたIL-6受容体抗体であるトシリズマブ(TCZ)が次々とRA治療に認可され、これらの生物学的製剤を使用することによって、RA病勢のタイトコントロールが可能になってきた。しかしながら、生物学的製剤を使用しても関節破壊が進行し、数年以内に手術に至る症例が少なからず存在するのが現状である。

以上より、RAでは全身には共通でない部位特異的な関節破壊機序が存在し、生物学的製剤治療に抵抗する関節では特にIL-17が重要な役割を果たしているのではないかと考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RA患者の関節手術時に得られる滑膜組織、関節液由来の単核球を用いて、部位特異的な関節破壊のメカニズムと、Th17およびIL-17を軸とした炎症カスケードのRA関節破壊への関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

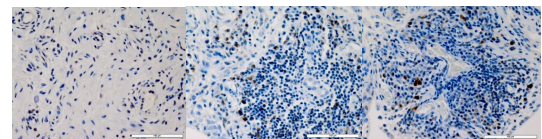
実験にはRA患者20例(10例: TNF阻害薬

使用、10例: 生物学的製剤非使用)20関節から手術時に採取した滑膜を用いた。組織学的評価のために滑膜をホルマリン固定した後、パラフィン包埋し、IL-17, CD3, CCR6, mast cell tryptase (MCT), CD68に対する抗体を用いて免疫染色を行った。一方、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- γ , TNF- α 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 β -actinの発現量で除した値を用いた。

4. 研究成果

(1)RA滑膜におけるTh17細胞分画とIL-17の発現

抗IL-17抗体を用いた免疫染色によって、一視野内の全細胞に対するIL-17陽性細胞の割合を算出した。疾患活動性の高低に関わらず、IL-17陽性細胞の割合は変わらなかった。しかしながら、疾患活動性が高くなるにつれて浸潤する炎症性細胞数は多くなるため、IL-17陽性細胞数は増加する傾向を認めた(図1)。



低疾患活動性 中等度活動性 高疾患活動性

図1. RA滑膜におけるIL-17の発現(免疫染色)

次に、滑膜組織中のIL-17産生細胞を同定するために、細胞マーカーとなるタンパク質との二重染色を行った(CCR6: Th17細胞, CD3: T細胞, MCT: 肥満細胞, CD68: マクロファージ)。IL-17⁺CCR6⁺細胞, IL-17⁺CD3⁺細胞の割合は数%程度にすぎなかった。興味深いことに、肥満細胞(MCT⁺細胞)にもIL-17の局在が認められた。予想に反して、マクロファージ(CD68⁺細胞)はIL-17の主要なソースではなかった(図2)。

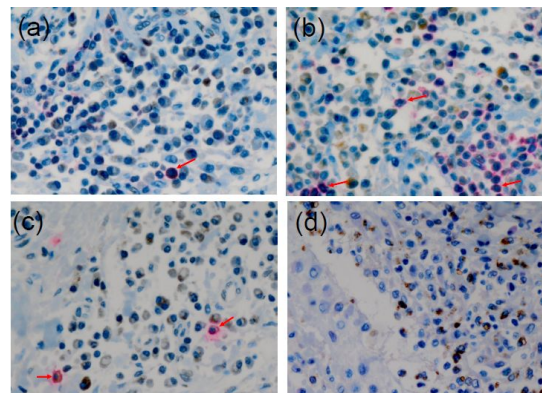


図2. IL-17と細胞マーカーの2重染色(免疫染色)。矢印は共染色陽性細胞を示す。a: IL-17 + CCR6, b: IL-17 + CD3, c: IL-17 + MCT, d: IL-17 + CD68

(2)RA 滑膜における TNF- α 、IFN- γ 、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- α の発現は 20 例中 14 例(70%)に認められた。IL-17 と TNF- α の発現は興味深い発現パターンを示した。症例 3, 5, 10, 14 のように IL-17 の発現が寛解例(症例 1)の 5 倍以上高い場合には、TNF- α 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- α だけでなく IFN- γ の発現も検出されなかった。一方、症例 7, 7, 9, 11, 18-20 のように IFN- γ の発現が寛解例の 10 倍以上高い場合、TNF- α の発現は増加したが IL-17 はほとんど検出されなかった(図 3)。

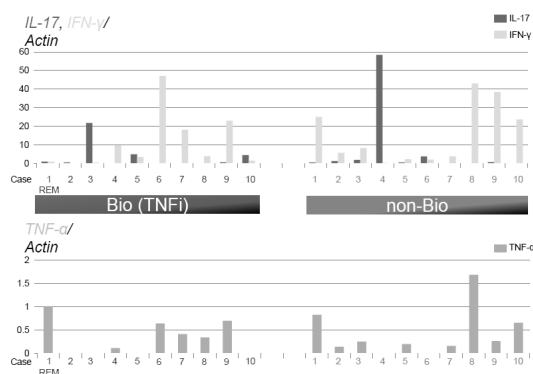


図 3. RA 滑膜における IL-17、IFN- γ 、TNF- α の発現。左 Case 1-10: TNF 阻害薬群, 右 Case 1-10: 生物学的製剤非使用群。左 Case 1 は寛解(REM)症例。

TNF 阻害薬使用・生物学的製剤非使用患者間における TNF- α 、IFN- γ 、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- α の相対的発現量の中央値はそれぞれ 0.231, 0.232 であり、両群間に有意差は認めなかった。同様に IFN- γ 、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。

RA 滑膜における TNF- α 、IFN- γ 、IL-17 の発現量の相関

TNF- α の発現量は IFN- γ の発現量と強い相関を示したが ($r = 0.659$, $p = 0.002$) TNF- α と IL-17 の発現量には有意な相関を認めなかった ($r = -0.304$, $p = 0.192$)。同様に IFN- γ と IL-17 の発現量についても解析を行ったが有意な相関を認めなかった ($r = -0.297$, $p = 0.204$)。

本研究の結果、RA 滑膜における TNF- α と IFN- γ 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- γ が滑膜中のマクロファージを刺激し TNF- α を誘導するという病態を反映していると考えられる。しかしながら IL-17 は TNF- α 、IFN- γ とは

相関せず、IL-17 の発現が有意な関節では Th17-IL-17 を軸とした異なる炎症カスケードが存在することを示唆する。また、興味深いことに TNF 阻害薬は遺伝子レベルでは IL-17、IFN- γ 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、将来的に 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, 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 Mar 26. [Epub ahead of print] 査読有

Nakajima A, Aoki Y, Murakami M, Nakagawa K. Changes in joint gap balances between intra- and postoperation in total knee arthroplasty. *Advances in Orthop*. 2014. doi: 10.1155/2014/790806. 査読有

園部正人, 中島 新, 窪田綾子, 中川晃一, 勝呂 徹. 関節リウマチ患者の荷重関節に対するエタネルセプトの関節破壊抑制効果。関節の外科 40 : 82-86, 2013. 査読有

Aoki Y, Yamagata M, Ikeda Y, Nakajima F, Nakajima A, Nakagawa K, Ohtori S, Inaoka T, Takahashi K. Failure of conservative treatment for thoracic spine fracture in ankylosing spondylitis: delayed neurological deficit due to spinal epidural hematoma. *Mod Rheumatol*. 23(5):1008-1012, 2013. doi: 10.1007/s10165-012-0726-6. 査読有

Nakajima A, Tsuge S, Aoki Y, Sonobe M, Shibata Y, Sasaki Y, Nakagawa K. Intra-articular giant heterotopic ossification following total knee arthroplasty for Charcot arthropathy. *Case Rep Orthop*. 2013. doi: 10.1155/2013/472378. 査読有

[学会発表](計 7 件)

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, 後藤 憲一郎, 田原正道, 山中 一, 玉井 浩, 小林達也, 中川晃一. 関節リウマチ滑膜組織における IL-17、IFN- γ 、TNF- α の発現と関節破壊制御のメカニズム。第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013.10.17, 幕張メ

ッセ（千葉県）

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, 後藤 憲一郎, 田原正道, 山中 一, 玉井 浩, 小林達也, 中川晃二. 関節リウマチ患者における血中酸化ストレスの臨床的意義と滑膜線維芽細胞における活性酸素種(ROS)産生. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013.10.17 幕張メッセ(千葉県)

中島 新, 園部正人, 谷口慎治, 中川晃二. 生物学的製剤使用・非使用下における術後創傷遅延、感染症発生の検討. 第 42 回リウマチの外科研究会 2013.8.31, 名古屋国際会議場(愛知県)

中島 新, 柴田孝史, 園部正人, 高橋 宏, 谷口慎治, 青木保親, 中川晃二. 関節リウマチの新たな疾患活動性指標としての血中酸化ストレスの意義. 第 86 回日本整形外科学会総会 2013.5.23 広島グリーンアリーナ(広島県)

谷口慎治, 中島 新, 青木保親, 園部正人, 柴田孝史, 中川晃二. 膝単関節炎で発症した関節リウマチ症例の検討. 第 57 回日本リウマチ学会総会学術集会 2013.4.18, 京都国際会議場(京都府)

中島 新, 青木保親, 園部正人, 柴田孝史, 谷口慎治, 後藤憲一郎, 田原正道, 山中 一, 中川晃二. 関節リウマチ滑膜組織における IL-17、IFN- γ 、TNF- α の発現と関節破壊制御. 第 57 回日本リウマチ学会総会学術集会 2013.4.18, 京都国際会議場(京都府)

中島 新, 園部正人, 柴田孝史, 谷口慎治, 青木保親, 中川晃二. 生物学的製剤による関節リウマチの大関節破壊抑制効果. 第 57 回日本リウマチ学会総会学術集会 2013.4.18, 京都国際会議場(京都府)

〔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

園部 正人(SONOBÉ, Masato)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：60459774

(2) 研究分担者

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

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

青木 保親(AOKI, Yasuchika)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：70584001

(3) 連携研究者

該当なし