

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591456

研究課題名(和文) 関節リウマチ骨破壊に果たすTh17細胞関連サイトカインの役割

研究課題名(英文) Role of Th17 cells and related cytokines on the bone destruction by rheumatoid synovium

研究代表者

鈴木 康夫 (SUZUKI, Yasuo)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90129495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：RA炎症性骨破壊に果たすTh17細胞およびIL-17 familyの役割を明らかにする目的で、in vitroで滑膜細胞から破骨細胞に分化し骨吸収する過程におけるTh17細胞が産生するサイトカインやTh17細胞の分化・生存・増殖、活性化に必須なサイトカインの変動を多項目同時解析手法で解析し、変形性関節症(OA)滑膜細胞培養におけるサイトカインの変動と比較した。

その結果、RA滑膜炎組織では、IL-17 familyの直接作用ではなく、Th17細胞を誘導し、RANKL/RANK系を介して過剰な破骨細胞の形成が引き起こされている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of Th17 cells and IL-17 family in the bone destruction by the rheumatoid synovium, we analyzed the cytokines that are produced by Th17 cells and that regulating the differentiation, survive, and activation of Th17 cells by multiple analyte profiling in the culture of the synovial tissues derived from patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). These results indicate that an excessive formation of osteoclast in the culture of rheumatoid synovium might be caused through the activation of RANKL/RANK system in connection with the induction of Th17 cells.

研究分野：リウマチ膠原病・骨代謝

キーワード：関節リウマチ 関節破壊 破骨細胞 Th17細胞 包括的変動蛋白解析

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)では慢性増殖性滑膜炎により骨・軟骨破壊が起こり、高度の関節変形をきたす。近年、RA滑膜炎による骨破壊に破骨細胞の関与が明らかになっている。RA滑膜炎による骨破壊部には、破骨細胞の集積が図右のようにみられるが、破骨細胞の分化/活性化機序は明らかでない。

申請者はRA滑膜組織を無刺激に培養することにより破骨細胞を誘導し、骨吸収がみられる *in vitro* 骨破壊モデルを確立し(Rheumatology,2000;40:673)、本培養モデルを用いて滑膜マクロファージが破骨細胞へ分化し骨破壊を起こす過程を明らかにしてきた。

正常骨組織では前駆細胞であるマクロファージ系細胞が増殖し、前破骨細胞にコミットし、破骨細胞へ分化・活性化するには receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) と MCSF が必須である。一方、炎症性骨破壊では、TNF、IL-1、IL-6 などの RANKL 非依存的シグナルも重要と考えられている。臨床的には TNF 阻害薬、IL-6 阻害薬の骨破壊抑制作用が明らかになっている。また、RA滑膜組織培養由来破骨細胞では、カルシトニンレセプターの発現が低く、カルシトニンによる形態学的変化が起きない象牙片上で細胞同士が接着し巣状の細胞集団を形成し非常に深い吸収窩をつくるなど、骨組織の破骨細胞による骨吸収過程とは質的に異なることを見いだした。そして、包括的変動蛋白解析を行うことによって、*in vitro* 骨破壊モデルでは炎症性サイトカイン(IL-1, TNF, IL-6) 遺伝子の発現は培養初期に高く、漸減し、RANKL 遺伝子は培養全期を通して発現することを明らかにしてきた(科学研究費補助金[H20~22年度]:課題番号 20591176)。従って、炎症性骨破壊のメカニズムには正常骨組織と異なる RANKL/RANK 系とは異なる系の関与が示唆される。

IL-17は分子量20-30kDのペプチドからなるホモダイマーの糖蛋白質であり、現在、IL-17Aと呼ばれるが、相同性を持つ6個のファミリー分子(IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-25 (IL-17E)、IL-17F)からなることが明らかになった。IL-17はTh17細胞で産生され、繊維芽細胞や上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど種々の細胞に作用して、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞接着因子など、種々の因子を誘導して炎症を誘導することが知られている。最近、RA病態におけるIL-17の重要性を示唆する報告が集積されている; IL-17投与による関節炎の惹起(Lubberts E, Cytokine 2008), RA滑膜組織におけるIL-17, IL-17Rの発現(Chaboaud M. Arthritis Res 2001, Honaratic MC, Rheumatology:2001)。一方、Th17細胞が活性化されるとIL-17とともにIL-10 familyであるIL-22やIL-6, TNF $\alpha$ も産生され、IL-17とこれらのサイトカインとの協調作用も報告され

ている。このようなTh17細胞の分化、生存や増殖、サイトカインの産生に必須な因子の一つとしてIL-21,23やTGFが注目されている。実際、実験的関節炎モデルではIL-23の関節炎部位での発現が報告されている(Paradowska-Gorycka A, Scand J Rheumatol: 2009)

そこで、炎症性骨破壊におけるTh17細胞経路活性化の役割を明らかにする目的で、RA滑膜細胞を用いた *in vitro* 骨破壊モデルを用いて、Th17細胞由来のIL-17 family, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-22やTh17細胞の分化誘導に関わるIL-23, IL-21, TGF $\beta$ の変動を包括的変動蛋白解析と遺伝子発現解析、RT-PCRにより解析する。さらに、これらのサイトカインの骨髄細胞からの破骨細胞誘導への影響や活性抑制による破骨細胞形成制御を行い、検証してゆく

## 2. 研究の目的

RA滑膜細胞を用いた *in vitro* 骨破壊モデルを用いて、RA炎症性骨破壊におけるTh17細胞経路活性化に果たす役割と炎症性サイトカインやRANKL/RANK系との相互作用を明らかにすることを目的とする。具体的にはTh17細胞が産生するサイトカイン(IL-17A, IL-17F, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-22)やTh17細胞の分化、生存、増殖や活性化に関わるIL-23, IL-21, TGF $\beta$ の変動を包括的変動蛋白解析により解析する。さらに、破骨細胞の分化活性化にessentialなRANKL/RANK系、M-CSFやRANKL非依存的に破骨細胞の分化誘導に関わる炎症性サイトカインとの相互作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト滑膜細胞培養と破骨細胞様細胞の形成:

RA患者の滑膜組織を手術時に採取し、顕微鏡下で表層細胞を含む小組織片に細切する。滑膜の研究利用に関しては、術前に文書で同意が得られた場合に限る。既に発表した方法により小組織片をcoatingしたチャンバースライドと象牙片あるいはhydroxyapatite-coated well上で培養培養する(Rheumatology,2000;40:673)。同様に細切した組織片を6-well培養ウェル内で培養し、組織片より出てきた細胞を回収し、チャンバースライド内で培養する

(2) 破骨細胞, Th17細胞の同定

破骨細胞細胞数はTRAP(酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ)活性陽性の3核以上の多核細胞を顕微鏡下で算定する。Th17細胞の同定は、IL-17A, IL-17Fの免疫組織染色で行った。

(3) *In vitro* 骨破壊モデルにおけるTh17活性化経路の解析

多項目同時解析(Multiple Analyte Profiling: MAP)を用いてTh17細胞関連サイトカインを測定した。

滑膜細胞培養開始時から継時的にの培養上清を回収する。回収時には同時に TRAP 染色を行い、各培養時期の破骨細胞の形成状態を確認する。培養上清 50  $\mu$ l を用いて、生理活性物質を multiple bead array assay にて測定した。測定は Capture antibody を結合させた beads とサンプルを array 内で反応させ、サンドイッチ法イムノアッセイで以下のサイトカインを同時に定量する。

Th17 細胞由来サイトカイン：

IL-17A, IL-17F, IL-22

Th17 細胞の分化、生存、活性化に関わるサイトカイン：IL-21, IL-23, TGF

炎症性サイトカイン：IL-1, IL-6, TNF、TNF

破骨細胞の分化・活性化：RANKL, OPG, M-CSF, VEGF

Th1, Th2 関連サイトカイン：IL-4, IFN

#### 4. 研究成果

(1) 滑膜組織培養における破骨細胞の形成：

RA 患者由来滑膜組織培養では培養 7~10 日目で、TRAP 陽性多核細胞 106~1549(平均  $592 \pm 169$ )/well が形成されたが、OA 患者由来滑膜組織培養では、0~1011(平均  $137 \pm 124$ )/well と少なかった(図 1)。

(2) Th17 細胞の形成

RA 滑膜炎組織由来の細胞培養では、破骨細胞の形成が始まる培養 6 日の免疫組織染色では IL-17A, IL-17F 陽性細胞がみられた。変形性関節症滑膜由来の細胞培養ではリンパ球は非常に少なく、IL-17A, IL-17F 陽性細胞は少数であった

(3) In vitro 骨破壊モデルにおける Th17 活性化経路の解析：

RA 患者 8 例, OA 患者 8 例由来の滑膜組織培養上清の Th17 細胞由来サイトカイン、Th17 細胞の分化・生存・活性化関連サイトカイン、炎症性サイトカイン、Th1/Th2 サイトカイン、の変動を同時測定した。

炎症性サイトカイン

炎症性サイトカインは、やや RA 滑膜で産生が多い傾向であったが、RA 滑膜及び OA 滑膜ともに培養全期にわたって多量の IL-6 を産生しており有意差はなかった。

炎症性サイトカインでは、IL-1、TNF の産生は RA 群、OA 群で差はなかったが、TNF は RA 滑膜細胞培養で産生

が多かった( $195.7 \pm 115$  vs  $57.9 \pm 36.7$  pg/ml)(図 1)。

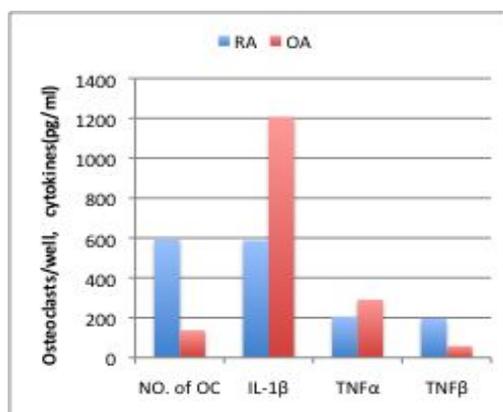


図 1 RA および OA 滑膜細胞培養における破骨細胞の形成と炎症性サイトカイン産生

破骨細胞の分化・活性化に関わる因子 sRANKL, M-CSF は RA 滑膜細胞培養では OA 滑膜細胞培養に比して産生が多かった( $26.1 \pm 5.9$  vs  $11.0 \pm 2.6$ ,  $805.0 \pm 123.3$  vs  $515.3 \pm 147.2$  pg/ml)。VEGF 産生は両群で有意差はなかった。(図 2)

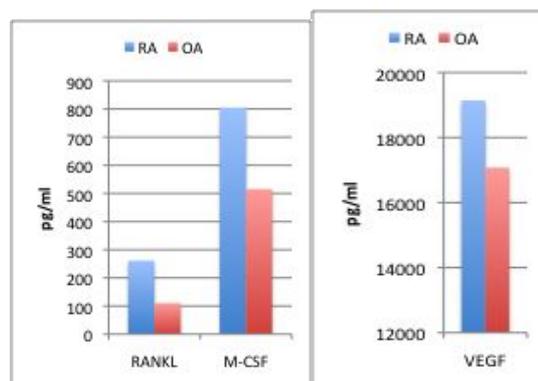


図 2 RA および OA 滑膜細胞培養における RANKL, M-CSF, VEGF の産生

Th17 細胞由来サイトカイン：

IL-17A, 17F, IL-22 は RA 滑膜細胞培養に比べて OA 滑膜細胞培養の方が産生が多く、IL-22 は有意差を認めた( $12.4 \pm 2.7$  vs  $260.4 \pm 86.9$  pg/ml)(図 3)

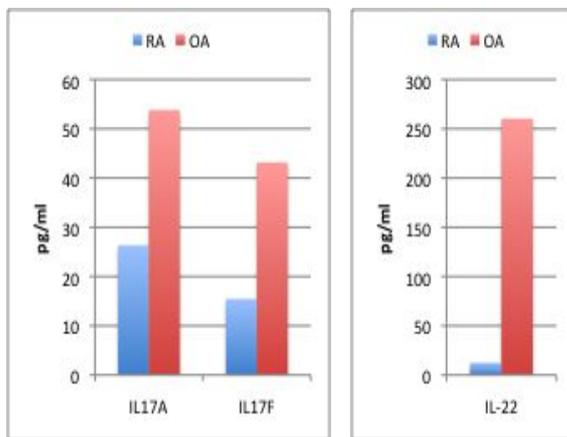


図3 RAおよびOA滑膜細胞培養におけるIL-17A, IL-17F, IL-22の産生

Th17細胞の分化、生存、活性化に関わるサイトカイン:

Th17細胞の分化、生存にかかわるIL-21, 23は、RA滑膜細胞培養ではOA滑膜細胞培養に比べて産生が多く(38.2±16.7 vs 22.3±8.5 pg/ml)またTGFβはRA滑膜細胞培養では75.7±17.5pg/mlとOA(19.8±4.6)に比して有意に高かった(図4)。

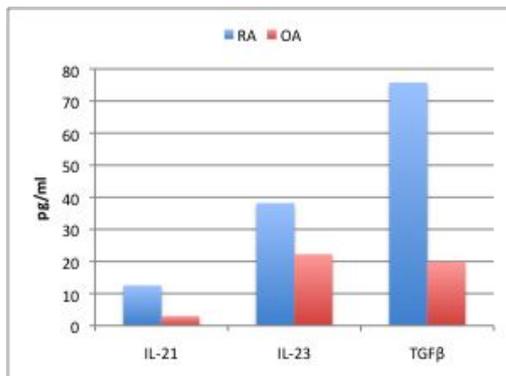


図4 RAおよびOA滑膜細胞培養におけるIL-21, IL-23, TGFβの産生

Th1, Th2関連サイトカイン

RA滑膜細胞培養ではOA滑膜細胞培養に比べてややIFNγとIL-4の産生は多かったが、有意差を認めなかった。

今回の検討では、RA滑膜細胞培養において無刺激の状態でも多数の破骨細胞形成がみられた。Th17細胞の分化、生存にかかわるIL-21, 23, TGFβはRA群で高かったが、Th17細胞が産生するIL-17A, 17F, IL-22はむしろOA群で高値を示した。

一方、RA滑膜細胞培養では破骨細胞の分化にかかわるsRANKL, M-CSFの産生が高く、RANKLの細胞内刺激伝達系に作用し破骨細胞形成を促進するTGFβも高か

った。

以上よりRA滑膜炎組織では、IL-17 familyの直接作用ではなく、Th17細胞を誘導し、RANKL/RANK系を介して過剰な破骨細胞の形成を引き起こしている可能性が示唆された。

#### 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15件)

1. 鈴木康夫 関節リウマチの診断と治療~Up-to-date~ 日本内科学会雑誌 104巻 2015 P519-524 (査読無)
2. 鈴木康夫 メトトレキサートの有害事象 医学のあゆみ 25巻 2014 P99-1004 (査読無)
3. Yasuo Suzuki et al. Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis of the Japanese Society for Bone and Mineral Research:2014 update J.Bone Miner. Metab Vol.32 2014 P337-350(査読あり)
4. 鈴木康夫 メトトレキサート リウマチ科 51巻 2013 P16-23 (査読無)
5. 鈴木康夫、野木真一、若林孝幸 生物学的製剤にMTXは併用すべきか? リウマチ科 50巻 2013 P8-17 (査読無)
6. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, et al. Exome sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the BTNL2. J Hum Genet. Vol.58 2013 P210-215(査読あり)
7. 鈴木康夫 メトトレキサート リウマチ科 Vol.48 No.3 2012 P253-259 (査読無)
8. 鈴木康夫、抗リウマチ薬 リウマチ科日本臨牀増刊号 医薬品副作用学(第2版)70巻 増刊号6 40 2012年 P185-189(査読無)
9. S. Mitsunaga, Y. Suzuki, et al. Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. Tissue Antigens Vol.80 2012 P16-25(査読あり)

〔学会発表〕(計25件)

1. 鈴木康夫 関節リウマチの診断と治療-Up-to-date- 平成26年度日本内科学会生涯教育講演会 2014年5

- 月25日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
2. 鈴木康夫 高用量時代におけるMTXの有効性と安全性 増量承認後の製造販売後調査結果をふまえて 第58回日本リウマチ学会総会アニュアルレクチャー 2014年4月27日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
  3. 鈴木康夫 関節リウマチ治療における低分子抗リウマチ薬の役割 イグランチモドの可能性 第58回日本リウマチ学会総会 2014年4月24日～26日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
  4. 鈴木康夫 抗リウマチ薬の副作用とその対策 第58回日本リウマチ学会総会 2014年4月24日～26日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
  5. 鈴木康夫 RAに対するMTXの適正投与 有効かつ安全に使用するために 第21回新潟リウマチ医学会 2014年1月11日 新潟大学医学部有壬記念館(新潟県・新潟市)
  6. 鈴木康夫 DMARDでのコントロールから見たRA 大阪リウマチカンファレンス第30回記念講演会 2013年12月14日 北浜フォーラム(大阪府・大阪市)
  7. 鈴木康夫 関節リウマチ薬物治療：高用量時代におけるMTXの適正使用 日本リウマチ財団 東海・北陸地区教育研修会 2013年12月8日 富山国際会議場(富山県・富山市)
  8. 鈴木康夫 生物学製剤時代におけるDMARDs治療のあり方 第25回中部リウマチ学会 2013年9月7日 ホテル金沢(石川県・金沢市)
  9. 鈴木康夫 関節リウマチ(RA)に対するメトトレキサート(MTX)治療 高用量時代を迎えて 第57回日本リウマチ学会総会 2013年4月18日～20日 国立京都国際会館(京都府・京都市)
  10. 鈴木康夫 最新の関節リウマチ治療戦略とアンカードラッグであるMTXの適正使用 第45回日本薬剤師会学術集会 2012年10月7日～8日 アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県・浜松市)
  11. 鈴木康夫 関節リウマチの診断-新しい診断基準と鑑別診断 小田原整形外科医会学術集会 2012年6月20日 小田原市民病院(神奈川県・小田原市)
  12. 鈴木康夫 関節リウマチ治療におけるメトトレキサートの安全性-メトトレキサート治療ガイドラインから- 第85回日本整形外科学会学

- 術集会 2012年5月17日～20日 グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)
13. 鈴木康夫 メトトレキサート(MTX)をより安全に使用するために 第56回日本リウマチ学会総会 2012年4月18日～20日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
  14. 鈴木康夫 関節リウマチ(RA)に対するMTXの使用法 第56回日本リウマチ学会総会 2012年4月18日～20日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
  15. 鈴木康夫 関節リウマチ治療におけるタクロリムスの可能性 第56回日本リウマチ学会総会 2012年4月18日～20日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
  16. 鈴木康夫 早期RAに対するブシラミン+サラゾスルファピリジン併用と各単剤の12ヶ月多施設無作為化試験 第56回日本リウマチ学会総会 2012年4月18日～20日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
  17. 鈴木康夫 MTXの有効性と安全性 本邦におけるMTX治療の現状と今後の課題 第56回日本リウマチ学会総会 2012年4月18日～20日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)

〔図書〕計(2)件

1. 鈴木康夫 日本医学出版 治療薬NAVIシリーズVol.1 田中良哉編 関節リウマチ治療における生物学的製剤の選択と適正使用 2014年 P 77-84
2. 鈴木康夫 医薬ジャーナル社 骨粗鬆症治療ハンドブック改訂5版 中村利孝、松本俊夫編 ステロイド性骨粗鬆症の管理と治療のガイドライン 2012年 P368-379

〔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

鈴木康夫(SUZUKI Yasuo)

東海大学医学部内科学系リウマチ内科学教授

研究者番号：90129495