

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592261

研究課題名(和文) DcR3とTL1Aによる滑膜細胞制御を介した関節リウマチ治療の検討

研究課題名(英文) A study of the innovative treatment for rheumatoid arthritis by regulating synoviocytes

研究代表者

三浦 靖史 (Miura, Yasushi)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：60346244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、我々は、TNF受容体に属するデコイレセプターDcR3とその特異的リガンドであるTL1Aを介したシグナル経路の、関節リウマチ(RA)の滑膜炎における働きを明らかにして、この経路を標的とした新しいリウマチ治療法について検討を行った。

RA滑膜線維芽細胞株を用いた遺伝子発現の解析により、DcR3により発現誘導あるいは抑制される遺伝子を明らかにし、それらの中から、特にRAの病態形成に関わると考えられるTPH1とIL-12B(p40)の発現がDcR3によって制御されることを明らかにして、RAの新治療ターゲットとしてのDcR3-TL1Aシグナル系の重要性を解明した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the function of the signaling pathway with decoy receptor 3 (DR3) and its specific ligand TL1A on the synovitis of rheumatoid arthritis (RA) in order to establish a new therapy for RA. We newly found that the set of genes of which expression regulated by DcR3 on RA synovial fibroblasts by using microarray gene analysis. Further, we found that the expression of TPH1 and IL-12B(p40) was regulated by DcR3 and contributed to the pathogenesis of RA. We revealed that DcR3-TL1A signaling on RA synovial fibroblasts is a possible new treatment target of RA.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：関節リウマチ 滑膜線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis;以下RA)は、膠原病のうち最も患者数の多い疾患であり、国内だけで約70万人もの患者が存在する。RAの病変の主体は慢性滑膜炎に基づく多発関節炎であり、発症2年以内の早期から関節破壊が進行し、重篤な肢体障害を来す。そのため、患者のADLやQOLは著しく低下し、社会的、経済的影響は甚大である。近年、炎症性サイトカインであるTNFやIL-6を抑制する生物学的製剤が登場し、RAの薬物療法は飛躍的に強力になった。しかし、サイトカインの抑制は、関節炎を抑制すると同時に、本来、生体防御に必要な免疫も抑制してしまうため、重篤な感染症や、悪性腫瘍の誘導が報告されている。そこで、免疫を抑制せず、関節炎のみを抑制する新しいRA治療法の開発が期待されているが、関節炎を特異的に抑制するためには、RA滑膜細胞の異常増殖メカニズムの更なる解明が不可欠である。

RA滑膜細胞には、アポトーシスを誘導するドメインを持つデスレセプターの1つであるFasが過剰発現されている(Arthritis Rheum. 1995;38:485-491)。にもかかわらず、RA滑膜細胞はアポトーシスに抵抗性を示し、それにより滑膜の異常増殖がもたらされると考えられている(Curr. Opin. Rheumatol. 2003;15:274-9)。抗Fas抗体を用いてFasを介したアポトーシスを誘導することにより、SCIDマウスに移植したリウマチ滑膜組織がアポトーシスに陥ったと報告されているが(J Rheumatol. 2002;29:1609-14)、関節炎に対する有効性は明らかでない。また、我々は、RA滑膜細胞において、デスレセプターの1つであるDR3遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランドが、疾患特異的にメチル化をうけて、DR3の発現が低下していることを報告している(Arthritis Rheum. 2006;54:779-787)。これらのことから、デスレセプターを介するアポトーシスの不良が、滑膜細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが示唆される。Fasリガンド、DR3の特異的リガンドであるTL1A、及びLIGHTの3つのTNFファミリーに対する共通のデコイレセプターとして同定されたDecoy receptor3(DcR3)は(J. Biol. Chem. 1999;274:13733-6)、さまざまな腫瘍細胞で過剰発現することにより、Fas誘導性アポトーシスを抑制して異常増殖を誘導すると考えられている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000;97:1230-5)。一方、近年、DcR3は、おとりレセプターとして機能するだけでなく、直接的な作用として、単球系細胞の破骨細胞への分化促進や(Cell Death Differ. 2004;Suppl 1:S97-107)、Heparan sulfate proteoglycanへの結合を介した樹状細胞への

のアポトーシス誘導など(Blood.2008;111:1480-8)の多面的な機能が明らかになりつつある。

我々は、RAにおけるDcR3の機能に着目し、TNF刺激によりRA滑膜線維芽細胞がDcR3を過剰発現して、Fas誘導アポトーシスに抵抗性を示すことを明らかにした(Arthritis Rheum. 2007;56:1067-1075)。また、DcR3は、マクロファージ系細胞THP-1における接着分子インテグリンの発現を誘導することにより、細胞相互の接着を高め、シクロヘキシミド誘導アポトーシスを抑制することも明らかにした(Biochem Biophys Res Commun.2009;389:593-598)。さらに、DcR3はRA滑膜細胞に対して細胞表面のTL1Aに結合することにより、サイトカイン誘導細胞増殖の部分抑制などの直接作用を呈することを明らかにしたが(Int. J. Mol. Med.2011;28:423-427)、これらは全て新しい知見である。

臨床面で、我々は、RA患者血清中DcR3が高値であることを報告しているが(Mod. Rheumatol. 2009;20:63-68)、同様の結果は、ギリシャのグループからも報告され(Clin. Immunol.2008 129:249-55)、DcR3とRAとの関連が、国外でも、注目を集めていることが明らかになった。また、最近、動物実験において、DcR3の発現誘導によりコラーゲン誘導関節炎が抑制されることが報告された(J Rheumatol. 2011 Sep 1.Epub)。

2. 研究の目的

RA滑膜は、DcR3を過剰発現して増殖する腫瘍のような強い細胞増殖能を示すこと、Fas誘導アポトーシスがRA滑膜細胞では十分に生じていないこと、また、DcR3はヒトで同定されているが、マウスなどの他の哺乳動物に存在せず、ヒトに種族特異的に発症するRAとの関連が示唆されることから、我々はDcR3とRAとの関連に着目した。

DcR3-TL1Aシグナル経路の制御を介することにより、強い免疫抑制を伴わずに、滑膜細胞にアポトーシスを誘導して関節炎を抑制できれば、副作用の少ない新たなRA治療法の開発に役立つことが期待される。RA滑膜線維芽細胞について検討した我々の報告も含めて、DcR3とRAとの関連についてはまだ報告は少なく、線維芽細胞様滑膜細胞とマクロファージ様滑膜細胞、浸潤リンパ球などの複数の細胞から構成される滑膜炎におけるDcR3の機能の多くは未だ不明であることから、本研究は、DcR3-TL1Aシグナル経路のRA滑膜炎への関与の詳細を明らかにして、新治療法へ繋がる基礎データの確立を目的とした。

さらに、RA滑膜線維芽細胞におけるDcR3-TL1Aシグナル経路制御に関わる分子

を探索して、RA の病態に関わる分子を同定するとともに、DcR3-TL1A シグナル経路においてアポトーシス誘導に最も適した標的分子を決定することを目標とする。

3. 研究の方法

複数の培養 RA 滑膜線維芽細胞株を DcR3-Fc リコンビナント蛋白あるいは対照群として IgG で刺激し、マイクロアレイ法で発現変動が認められる遺伝子群を同定する。Real-Time PCR 及び蛋白レベルでの変動を確認した後、対照群として、変形性関節症 (osteoarthritis; OA) 滑膜線維芽細胞を用いて、DcR3-TL1A シグナル経路制御に関わる候補分子の RA への疾患特異性について検討する。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

リウマチ滑膜線維芽細胞 (RA-FLS) における DcR3 により発現が制御される遺伝子プロファイルの解明

RA-FLS における DcR3 に関してマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を、階層型クラスタリング解析により行った。その結果から、発現が促進あるいは抑制される 100 遺伝子を、ヒートマップを用いてリストアップし、その遺伝子プロファイルを検討した。

この 100 遺伝子のうち、比較的発現比が高く、上位のクラスタリングカテゴリーに分類された遺伝子の中から、発現が特に促進あるいは抑制された遺伝子である、IL-12B と TPH1 を、DcR3 と関連する RA-FLS 主要遺伝子候補として同定した。

また、本研究の結果から、DcR3 は RA-FLS に対してリガンド効果を有すること、そして多数の遺伝子の発現が DcR3 により制御されることを明らかにした (Int J Mol Med 32: 910-916, 2013)。

滑膜線維芽細胞における TPH-1 の発現が、DcR3 により RA で疾患特異的に抑制されることの解明

RA および OA の FLS における、DcR3 及び炎症性サイトカイン刺激による TPH1 の発現の変化について検討した。Tryptophan hydroxylase (TPH) は、セロトニン生合成の律速段階酵素であり最初の反応酵素であり、TPH1 と TPH2 の二種類のアイソフォームが存在するが、TPH1 は皮膚や腸、松果体などのセロトニンを発現する末梢組織および中枢神経に発現している。

Real-time PCR にて、RA および OA-FLS において TPH1 mRNA が発現していることを確認した。DcR3 刺激により TPH1 mRNA 発現が RA-FLS において有意に減少したが、OA-FLS においては変化しなかった。

さらに、炎症性サイトカインである TNF 、

IL-1 刺激により、RA および OA-FLS の双方で TPH1 mRNA 発現は有意に減少したが、滑膜におけるセロトニンの発現と局在を免疫組織染色にて解析したところ、RA 滑膜においては疾患特異的に重層化した滑膜表層に、OA 滑膜においては滑膜表層にのみ発現していた。

これらの結果に基づいて、DcR3 が RA-FLS における TPH1 発現を制御することを明らかにした。過形成された RA 滑膜に存在するセロトニンを介して、炎症性疼痛や骨リモデリングなどの、RA の病態へ関与することが示唆された (Mol Med Rep 12(4):5191-5196, 2015)。

滑膜線維芽細胞における IL12B の発現が、DcR3 により RA で疾患特異的に促進されることの解明

RA と OA-FLS の双方において IL-12B mRNA の発現を認めた。IL-12 は IL-12A p35 サブユニットと IL-12B p40 サブユニットから構成されるヘテロダイマーであり、Th1 を介した免疫反応に関与する。一方、IL-23 は IL-23A p19 サブユニットと IL-12B p40 サブユニットから構成され、Th17 を介した炎症経路に関与する。RA-FLS においては IL-12B mRNA は DcR3 濃度依存性に増加したが、OA-FLS において発現は変化しなかった。抗 TL1A 抗体による前処置により、RA-FLS における DcR3 による IL-12B mRNA の発現誘導は抑制された。

IL-12 および IL-23 の RA の病態形成への関与が報告されていることから、DcR3 は、細胞上の TL1A を介して RA-FLS における IL-12B の発現を調整することで RA の病態形成に関与している可能性を明らかにした (Mol Med Rep 13(3):3647-3652, 2016)。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

動物モデルでは、関節炎モデルであるコラーゲン誘導関節炎の関節液および関節の滑膜には TL1A の発現が亢進していること (J Immunol 2009; 183(8):5350-7) に加えて、DcR3 を体内で発現誘導することによってマウスモデル関節炎が抑制されることが報告されている (J Rheumatol 2011; 38(12):2522-35)。in vitro での研究報告はこれまで、限られていたが、本研究により、DcR3 がリガンドとして RA 滑膜線維芽細胞における多様な遺伝子発現を制御することにより、RA の病態形成に関わっていることが示された。DcR3-TL1A シグナル系が RA などの自己免疫疾患の発症に関わるメカニズムの解明に大いに今後役立つものと考えられる。

(3) 今後の展望

DcR3 のリガンドであり、受容体でもある TL1A は近年、RA の近縁疾患であるクローン病や乾癬の病態に関与していることが示唆されている。また、DcR3 のその他のリガンド

である LIGHT と FasL、さらに競合的受容体であるデスレセプター-3(DR3)を含めた DcR3 をコアとするシグナル伝達の解明を進めることは、RA のみならず、自己免疫疾患発症メカニズムそのものの解明に繋がることが期待される。本科研費による支援を今後の TL1A-DcR3/DR3、LIGHT-DcR3/HVEM/BTLA、FasL-Fas シグナル経路に関する研究の発展につなげて行く所存である。

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9件)

Fukuda K, Miura Y, Maeda T, Hayashi S, Kurosaka M, Interleukin-12B is upregulated by decoy receptor 3 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Mol Med Rep* 13(3):3647-3652, 2016 査読有り

Maeda T, Miura Y, Fukuda K, Hayashi S, Kurosaka M, Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Mol Med Rep* 12(4):5191-5196, 2015 査読あり

Fusama M, Miura Y, Yukioka K, Kuroiwa T, Yukioka C, Inoue M, Nakanishi T, Murata N, Takai N, Higashi K, Kuritani T, Maeda K, Sano H, Yukioka M, Nakahara H.

Psychological state is related to the remission of the Boolean-based definition of patient global assessment in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 25(5):679-82, 2015 査読有り

Matsuki F, Saegusa J, Nishimura K, Miura Y, Kurosaka M, Kumagai S, Morinobu A. CD45RA-Foxp3(low) non-regulatory T cells in the CCR7-CD45RA-CD27+CD28+ effector memory subset are increased in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. Jul;290(1):96-101, 2014 査読あり

Sakai R, Cho SK, Nanki T, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Amano K, Tanaka Y, Sumida T, Ihata A, Yasuda S, Nakajima A, Sugihara T, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Miura Y, Miyasaka N, Harigai M; For the REAL study group.

The risk of serious infection in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors decreased over time: a report from the registry of Japanese rheumatoid arthritis patients on biologics for long-term safety (REAL) database. *Rheumatol Int*. 34(12):1729-1736, 2014 査読有り

Yurube T, Sumi M, Nishida K, Miyamoto H, Kohyama K, Matsubara T, Miura Y, Hirata H,

Sugiyama D, Doita M. Accelerated development of cervical spine instabilities in rheumatoid arthritis: a prospective minimum 5-year cohort study. *PLoS One* 9(2):e88970, 2014 査読有り

Miura Y, Fukuda K, Maeda T, Kurosaka K. Gastroesophageal reflux disease in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 24(2):291-295, 2014 査読有り

林申也、三浦靖史、黒坂昌弘、DcR3 による遺伝子発現誘導 最新関節リウマチ学-寛解・治癒を目指した研究と最新治療- 関節リウマチの発症要因と発症メカニズム日本臨床 72(Suppl 3):68-72, 2014 査読なし

Fukuda K, Miura Y, Maeda T, Takahashi M, Hayashi S, Kurosaka K. Decoy receptor 3 regulates the expression of various genes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Int J Mol Med* 32: 910-916, 2013 査読有り

[学会発表](計27件)

前田俊恒、三浦靖史他、Expression of TNF-like ligand 1A (TL1A) in rheumatoid synovial fibroblasts、The 62th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society、2016年3月5-8日、オランダ(アメリカ)

前田俊恒、三浦靖史他、TL1A によるリウマチ滑膜線維芽細胞における遺伝子発現誘導の検討、第30回日本整形外科学会基礎学術集会、2015年10月22-23日、富山国際会議場(富山県)

前田俊恒、三浦靖史他、Analysis for the expression of TNF-like ligand 1A (TL1A) in rheumatoid synovial fibroblasts、The 17th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR 2015)、2015年9月6-9日、チェンナイ(インド)

福田康治、三浦靖史他、Centrosomal protein 70kDa is down-regulated by decoy receptor 3 in specifically rheumatoid synovial fibroblasts、The 16th The European League Against Rheumatism (EULAR 2015)、2015年6月10-13日、ローマ(イタリア)

前田俊恒、三浦靖史他、TL1A によるリウマチ滑膜線維芽細胞における遺伝子発現誘導の検討、第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 2015年4月23日、名古屋国際会議場(愛知県)

福田康治、三浦靖史他、Centrosomal protein 70kDa は decoy receptor 3 により関節リウマチ滑膜細胞に特異的に発現が抑制される、第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 2015年4月23日、名古屋国際会議場(愛知県)

前田俊恒、三浦靖史他、DcR3 は関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるトリプトファン水酸化酵素 TPH1 の発現を制御する、第 124 回中部日本整形外科学会災害外科学会 2015 年 4 月 10-11 日、ホテル日航金沢 (石川県)

福田康治、三浦靖史他、Centrosomal protein 70kDa is down-regulated by decoy receptor 3 in specifically rheumatoid synovial fibroblasts、The 61th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society、2015 年 3 月 28-31 日、ラスベガス (アメリカ)

福田康治、三浦靖史他、Centrosomal Protein 70kDa Is Down-Regulated By Decoy Receptor 3 in Specifically Rheumatoid Synovial Fibroblasts、78th ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2014 年 11 月 15 日-19 日、ボストン (アメリカ)

前田俊恒、三浦靖史他、Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase TPH1 in rheumatoid synovial fibroblasts、The 15th The European League Against Rheumatism (EULAR 2014)、2014 年 6 月 11-14 日、パリ (フランス)

福田康治、三浦靖史他、Interleukin-12B is up-regulated by decoy receptor 3 specifically in rheumatoid synovial fibroblasts、The 15th The European League Against Rheumatism (EULAR 2014)、2014 年 6 月 11-14 日、パリ (フランス)

福田康治、三浦靖史他 IL-12B は decoy receptor 3 により関節リウマチ滑膜細胞に特異的に発現誘導される、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014 年 4 月 26 日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都)

前田俊恒、三浦靖史他、DcR3 は関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるトリプトファン水酸化酵素 TPH1 の発現を制御する、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014 年 4 月 26 日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都)

前田俊恒、三浦靖史他、Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase TPH1 in rheumatoid synovial fibroblasts、The 16th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress APLAR 2014、2014 年 3 月 31 日-4 月 5 日、セブ (フィリピン)

福田康治、三浦靖史他、Interleukin-12B is up-regulated by decoy receptor 3 specifically in rheumatoid synovial fibroblasts、The 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society、2014 年 3 月 15-18 日、ニューオリンズ (アメリカ)

前田俊恒、三浦靖史他、Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase TPH1 in rheumatoid synovial

fibroblasts、The 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2014 年 3 月 15-18 日、ニューオリンズ (アメリカ)

前田俊恒、三浦靖史他、Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase TPH1 in rheumatoid synovial fibroblasts、77th ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2013 年 10 月 26 日-30 日、ワシントン DC (アメリカ)

福田康治、三浦靖史他、Interleukin-12B is up-regulated by decoy receptor 3 in specifically rheumatoid synovial fibroblasts、77th ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2013 年 10 月 26 日 - 30 日、ワシントン DC (アメリカ)

前田俊恒、三浦靖史他、Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase TPH1 in rheumatoid synovial fibroblasts、15th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) 2013 年 8 月 29 日-9 月 1 日、バリ (インドネシア)

前田俊恒、三浦靖史他、Decoy receptor 3 regulates the expression of tryptophan hydroxylase TPH1 in rheumatoid synovial fibroblasts、14th Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2013 年 6 月 12 日-15 日、バリ (インドネシア)

②前田俊恒、三浦靖史他、DcR3 は関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるトリプトファン水酸化酵素 TPH1 の発現を制御する、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17-18 日、幕張メッセ (千葉県)

②福田康治、三浦靖史他、DcR3 による関節リウマチ滑膜細胞における IL-12B p40 発現誘導の検討、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17-18 日、幕張メッセ (千葉県)

③前田俊恒、三浦靖史他、DcR3 は関節リウマチ滑膜線維芽細胞においてトリプトファン水酸化酵素 TPH1 の発現を制御する、第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013 年 4 月 18 日-4 月 20 日、京都国際会議場 (京都府)

④福田康治、三浦靖史他、関節リウマチ滑膜細胞における DcR3 による IL-12B p40 発現誘導の検討、第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2013 年 4 月 18 日-20 日、京都国際会議場 (京都府)

⑤福田康治、三浦靖史他、Decoy receptor 3 influences the gene expression of various key molecules including IL-12B in rheumatoid synovial fibroblasts、2013 ORS Annual Meeting、2013 年 1 月 26 日-29 日、サンアントニオ (アメリカ)

⑥前田俊恒、三浦靖史他、関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるトリプトファン水酸化酵素 TPH1 発現の検討、第 27 回日本整形外科

学会基礎学術集会 2012年10月27日、名古屋国際会議場(愛知県)

⑦福田康治、三浦靖史他、関節リウマチ滑膜細胞における DcR3 による遺伝子発現誘導の検討、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26日、名古屋国際会議場(愛知県)

〔図書〕(計3件)

三浦靖史、診断と治療社、リウマチ病学テキスト改訂第2版、2016、123-126

三浦靖史、医学書院、今日の治療指針2016年版 私はこう治療している、2016、1150-1151

三浦靖史、医歯薬出版、運動器疾患の病態と理学療法、2015、240-249

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 靖史 (MIURA, Yasushi)

神戸大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号: 6 0 3 4 6 2 4 4

(2) 研究協力者

福田 康治 (FUKUDA, Koji)

前田 俊恒 (MAEDA, Toshihisa)