

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791008

研究課題名(和文)炎症性サイトカインとしてのレプチンの作用機序に関する研究

研究課題名(英文)Effect of leptin as proinflammatory cytokine

研究代表者

楠 夏子(KUSUNOKI, Natsuko)

東邦大学・医学部・博士研究員

研究者番号：10328924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織より分泌されるレプチンの炎症増悪作用について、関節リウマチ患者から得た滑膜線維芽細胞(RSF)を用いて検討した。RSFにはレプチン受容体があることを確認し、レプチンを作用させると炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン(IL)-6の遺伝子発現およびタンパク産生が亢進した。またレプチン処置によって、転写因子STAT3のリン酸化が亢進し、このリン酸化酵素であるJAK2の阻害剤を加えると、レプチンによるIL-6産生作用が抑制された。以上よりレプチンは、JAK2-STAT3経路を介して、RSFのIL-6産生を促す炎症性サイトカインとして作用していることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the influence of leptin on the production of proinflammatory cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts (RSF). We detected leptin receptor mRNAs in RSFs. Expression of IL-6 mRNA was enhanced in a concentration-dependent manner by addition of leptin to RSF. IL-6 secretion by RSF showed an increase after leptin stimulation. A JAK2 inhibitor decreased leptin-induced IL-6 production. Enhanced phosphorylation of STAT3 was observed in RSF after stimulation by leptin. Leptin may be one of the proinflammatory cytokines that up-regulates IL-6 production in RSF via activation of JAK2/STAT3. Leptin and JAK/STAT pathway may represent a new alternative therapeutic target in the treatment of rheumatoid arthritis.

研究分野：医歯薬学

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：レプチン 関節リウマチ 炎症性サイトカイン IL-6 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) レプチンとは

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、一般にアディポカインと呼ばれる様々な生理活性物質を分泌する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。レプチンはアディポカインの一つとして知られており、これまで、糖代謝やエネルギー恒常性調節における役割について積極的に研究されてきた。

(2) 関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の病態における炎症性サイトカインの役割

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であるが、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組織の炎症である。RA の病態形成に関わる炎症性サイトカインとしては、インターロイキン (interleukin; IL)-1、IL-6 および tumor necrosis factor (TNF) などがあり、実際これらを標的とするモノクローナル抗体や可溶性受容体などの生物学的製剤が RA 患者で著効することが臨床にて証明されている。しかしこれらの最新治療にもかかわらず、症状の改善しない患者はなおも認められ、RA の全ての病態をこれらの炎症性サイトカインのみで説明することは出来ない。

(3) RA の病態におけるアディポカインの役割

肥満は変形性関節症 (osteoarthritis; OA) などの関節病変のリスク因子であることはこれまで指摘されていた。しかしこれらの関節病変は、膝などの加重関節に限って認められるのではなく、手指や手首などの比加重関節でも見られることから、肥満に由来する内分泌系の変化が関連することが指摘されていた。そこで我々は、RA の病態形成に種々のアディポカインが関与していることを仮定し、RA 患者の血中アディポカイン濃度を測定し解析を行った。すると、レプチン濃度は男女の別無く、RA 患者において健常コントロールより高値であることが認められた。また、RA 患者血中レプチン濃度は、炎症の指標となる血中 C-reactive protein (CRP) 値と正相関を示し、Body mass index (BMI) 等で補正をしても有意に認められた。しかし RA 患者由来滑膜組織におけるレプチンの作用を検討した報告は少なく、レプチンの直接作用については未だ明らかでない点が多い。

2. 研究の目的

我々は、脂肪組織が分泌するアディポカインに注目し、その代表的分子であるレプチンが、RA 患者滑膜において炎症を惹起する作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RA 患者由来滑膜線維芽細胞 (RA synovial fibroblasts; RSF) の培養

本学整形外科にて行われた関節置換術時

に得られた余剰の滑膜組織を酵素処理し、雑多な細胞群を得た。10%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地で 37℃、5%CO₂ の条件にてこれらを数日間培養し、非接着細胞を除き、接着細胞である RSF を得た。3-4 継代後の RSF を実験に用いた。

(2) Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

IL-1β、IL-6 および TNFα の mRNA 発現を半定量的に検討するため、TaqMan 法にて Real-time PCR を行った。種々の条件にて培養した RSF より市販のキットを用いて total RNA を抽出し、さらに cDNA を合成した。この cDNA を鋳型とし、IL-1β、IL-6 および TNFα に特異的な TaqMan プローブを用いて増幅した。検量線より Ct を求め、ハウスキーピング遺伝子である β-actin 遺伝子発現量にて補正後、目的遺伝子の発現量を比較した。

(3) Reverse transcription-PCR

市販のキットを用いて RSF より total RNA を抽出し、さらに cDNA を合成した。この cDNA を鋳型とし、レプチン受容体 (Ob-Rb、Ob-Re) および β-actin 遺伝子を増幅した。PCR 産物はアガロース電気泳動後、エチジウムブロマイド染色にて確認した。

(4) ウェスタンブロット法

種々の条件にて培養した RSF から、脱リン酸化酵素阻害剤を添加した試薬にてタンパク抽出を行った。総タンパクを定量後、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行い、さらにメンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング後、抗 signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 抗体または抗リン酸化 STAT3 抗体と反応させ、対応する HRP 標識二次抗体を結合させた。検出は ECL 試薬を用いて行った。

(5) サイトカイン測定

種々の条件にて RSF を培養し、培養上清中のサイトカインを市販の Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) キットにて測定した。

(6) RNA 干渉によるレプチン受容体発現抑制

RSF にレプチン受容体 (Ob-Rb) 遺伝子に対する small interfering RNA (siRNA) を導入し、Ob-Rb の発現を抑制した細胞を得た。対照としてノンコーディングの siRNA を導入した細胞を作成した。これらの細胞を用いて、上述の方法にてサイトカイン産生量を検討した。

4. 研究成果

(1) 炎症性サイトカイン発現におけるレプチンの作用

ヒトリコンピナントレプチンの存在下培養した RSF における炎症性サイトカインの mRNA 発現について Real-time PCR にて検討した。すると、レプチンは濃度に依存して IL-1β および IL-6 の mRNA 発現を増加させた。一方、TNFα の mRNA 発現には変化は認めなかった。

さらに、RSF の培養上清中のサイトカイン産生におけるレプチンの影響について検討した。レプチンは濃度依存的に RSF からの IL-6 産生を増加させた(図 1)が、IL-1 β および TNF α の産生には変化を認めなかった。

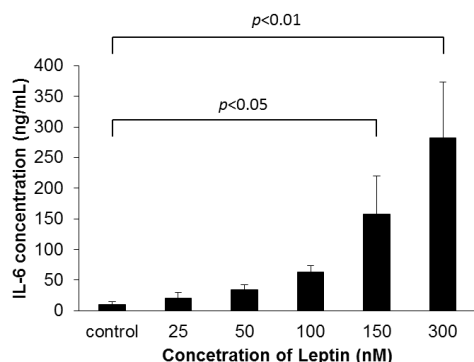


図 1 レプチンによる IL-6 産生亢進作用値は 3 回検討した平均値および標準誤差を示す。有意差検定は Dunnett 検定を行った。

(2) レプチン受容体発現抑制による影響

RSF には細胞内シグナル伝達に關するレプチン受容体である Ob-Rb が存在することを RT-PCR 法にて確認した。そこで、RNA 干渉の手法を用いてレプチン受容体の発現を抑制し、レプチンによる IL-6 産生誘導作用に及ぼす影響を検討した。すると、対照であるノンコーディング siRNA を導入した細胞で認められた IL-6 産生誘導作用が、Ob-Rb 発現を抑制した RSF では減弱していた(図 2)。

以上のことから、RSF においてレプチンは、Ob-Rb 受容体を介して IL-6 産生を亢進していることが示された。

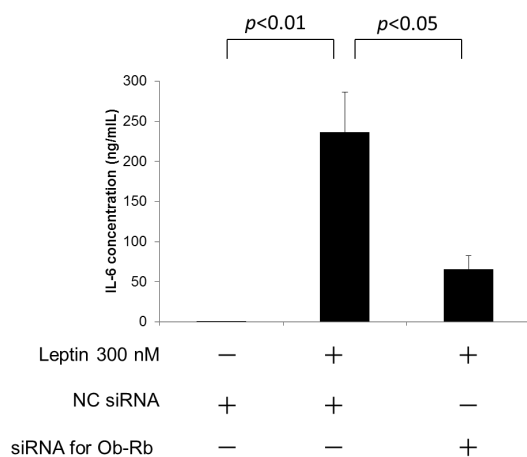


図 2 レプチン受容体発現抑制による影響値は 3 回検討した平均値および標準誤差を示す。有意差検定は Bonferroni 検定を行った。NC, non-coding.

(3) シグナル伝達機構の解析

レプチン受容体下流には、janus kinase 2(JAK2)-STAT3 経路によるシグナル伝達機構があることが報告されている。そこで、RSF

においてレプチンが STAT3 のリン酸化を誘導するか否かをウェスタンブロット法にて検討した。レプチン存在下培養した RSF では、レプチンの濃度に依存して STAT3 のリン酸化が認められた。

IL-6 も、その受容体下流のシグナル伝達には STAT3 リン酸化が存在することが示されている。レプチンによる STAT3 のリン酸化は、あらかじめ抗 IL-6 抗体を添加していても抑制されないことから、レプチンにより産生が誘導された IL-6 による二次的なものではないことが示された。

さらに詳細な機序について検討するため、JAK2 阻害剤 AG490、phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K) 阻害剤 LY294002、または mitogen-activated protein kinase(MAPK)阻害剤 PD98059 の影響について検討した。RSF において、レプチンによって誘導される IL-6 産生亢進作用は、AG490 によって有意に抑制された(図 3)が、LY294002 および PD98059 では有意に抑制されなかった。

これらのことから、レプチンは JAK2-STAT3 経路を介して、RSF の IL-6 産生を誘導することが示唆された。

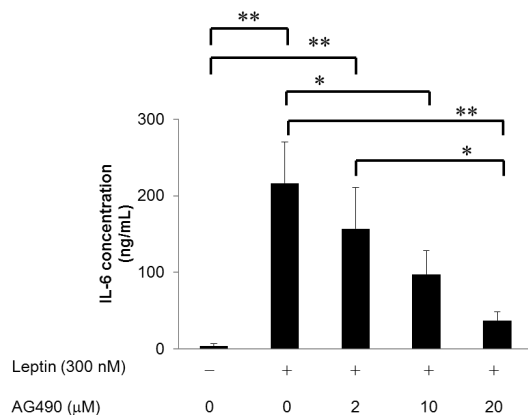


図 3 AG490 による影響

値は 3 回検討した平均値および標準誤差を示す。有意差検定は Bonferroni 検定を行った。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

(4) まとめ

レプチンは、糖代謝やエネルギー代謝調節において重要なホルモン様作用を示す生理活性物質であることはこれまでに報告されてきた。さらに近年、炎症・免疫反応におけるレプチンの役割について検討が進められている。例えば、レプチン欠損マウスでは、実験的に誘導させた関節炎の重症度が、野生型に比較して軽度であり、関節の炎症をレプチンが増悪させる可能性が示されている。また我々は、RA 患者の血中レプチン濃度が健常コントロールに比べて有意に高く、血中 CRP 値と有意な正相関を示すことを報告している。これらの報告は、炎症性サイトカインとしてのレプチンの役割を示唆している。しかしこれまで、RSF におけるレプチンの直接的

な炎症増悪作用を示した報告は少なく、その局所での役割については不明な点が多かった。本研究では、RSFのIL-6産生をレプチンが誘導することを初めて示し、炎症性サイトカインとしてのレプチンの役割について明らかにすることが出来た。

RAは、関節局所における炎症を主たる病態とする全身性炎症性疾患であり、その発症要因は未だ不明である。病態が進行すると、関節破壊がもたらされ、患者のQuality of Lifeを著しく低下させる。RAの治療は、抗炎症効果や免疫調節作用を持つ薬物が使用され、従来使用されてきたステロイド、非ステロイド抗炎症薬および疾患修飾抗リウマチ薬などに加え、抗サイトカイン抗体などのいわゆる生物学的製剤が用いられている。近年治療の選択肢が増えたことにより、病勢のコントロールは可能になりつつあるが、治療薬への反応性が患者個々で異なることも事実である。

その理由としては、RAが多様な因子によって規定される疾患であることが考えられる。多くの基礎研究および臨床研究にて、その病態への関与が明らかにされたTNF α やIL-6の他にも、RAの発症や増悪に関わる生体内物質が存在する可能性がある。

この観点より、本研究にてレプチンの新たな炎症増悪作用が示されたことは意義がある。既知の炎症性サイトカインに加え、レプチンを標的とするRAの新たな治療戦略のきっかけになるものと考えている。

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) Muraoka S., Kusunoki N., Takahashi H., Tsuchiyaa K., Kawai S., Leptin stimulates interleukin-6 production via janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 in rheumatoid synovial fibroblasts. Clin Exp Rheumatol., 2013, 31(4):589-595, <http://www.clinexprheumatol.org/pubmed/find-pii.asp?pii=23622344>, 査読あり。

[学会発表](計3件)

- (1) Muraoka S., Kusunoki N., Shikano K., Kaburaki M., Kitahara K., Tanaka N., Kaneko K., Yamamoto T., Kusunoki Y., Takagi K., Hasunuma T., Endo H., Kawai S., JAK2/STAT3 is a major pathway of leptin-induced interleukin-6 production by rheumatoid synovial fibroblasts. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2013, 15th June 2013, FERIA DE MADRID (Madrid, Spain)
- (2) 村岡成, 楠夏子, 鎗田利香, 勝呂徹, 川合眞一. レプチンは JAK-STAT 経路を介

して関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞のIL-6産生を増加させる. 第33回日本炎症・再生医学会, 2012年7月6日, ホテル日航福岡(福岡, 日本)

- (3) 村岡成, 楠夏子, 鎗田利香, 鹿野孝太郎, 鎗木誠, 北原加奈子, 金子開知, 田中菜穂子, 山本竜大, 楠芳恵, 高木賢治, 遠藤平仁, 勝呂徹, 川合眞一. Leptinは滑膜細胞のIL-6産生を増加させる. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会・第21回国際リウマチシンポジウム, 2012年4月26日, グランドプリンスホテル新高輪(東京, 日本)

[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

- (1) 東邦大学教育・研究業績データベース
<http://gyoseki.toho-u.ac.jp/thuhp/KgApp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠 夏子 (KUSUNOKI, Natsuko)
東邦大学・医学部・博士研究員
研究者番号: 10328924