

機関番号：32653

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791421

研究課題名 (和文) 関節リウマチにおけるアディポネクチンの病態意義の解明

研究課題名 (英文) Research of adiponectin in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

研究代表者

岩本 卓士 (IWAMOTO TAKUJI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10348675

研究成果の概要 (和文)：関節リウマチは進行性の関節破壊を生じる難治性の疾患であり，病態はいまだ解明されていない．脂肪細胞から分泌され，メタボリックシンドロームにおいていわゆる善玉と考えられているアディポネクチンが，関節リウマチ患者と変形性関節症患者を比較すると血液中には差が見られなかったが，関節内において関節リウマチ患者で高濃度に存在しており，関節リウマチにおいては炎症促進に関与していると考えられた．

研究成果の概要 (英文)：Rheumatoid arthritis is an intractable disease that causes progressive joint destruction. The pathogenesis of rheumatoid arthritis is still unknown. We examined the concentrations of the adiponectin secreted by the adipose cell that is considered to be a beneficial cytokine in metabolic syndrome. Although there is no difference in the concentration of serum adiponectin between rheumatoid arthritis patients and osteoarthritis patients, the concentration of intraarticular synovial adiponectin was higher in rheumatoid arthritis patients than in osteoarthritis patients. The adiponectin was thought to play some role in joint inflammation of patients with rheumatoid arthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：関節リウマチ・アディポネクチン・脂質代謝・関節液

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ（以下 RA）は多関節に炎症を生じる自己免疫疾患であり、進行性の関節破壊を生じる難治性の疾患である。近年の治療薬の進歩、特に生物学的製剤の導入により以前に比べ疾患活動性の制御が可能になりつつあるものの、未だその病態は解明されていない。RA においては滑膜組織に浸潤・存在する免疫系細胞が炎症の中心的役割を担うと古くから考えられており、近年では軟骨細胞の関与も注目されている。このほか関節内に豊富に存在する脂肪組織はこれまでエネルギー代謝調節に関わる結合組織としてしか認識されておらず、とりわけ関節内においては骨組織間のギャップを埋める組織と考えられておりその生理活性に関しては注目されていなかった。ところが近年、脂肪組織は炎症性物質、成長因子、接着分子などの様々な生理活性物質（これらを総称して adipocytokine と呼ばれる）を分泌する内分泌組織でもあることが解明され、組織における炎症への関与が研究されるようになった。脂肪細胞から分泌される adipocytokine の 1 つであるアディポネクチンは抗炎症作用、インスリン感受性の改善作用を示すいわゆる善玉のサイトカインであることが近年解明され、糖尿病、心血管病変、メタボリックシンドロームにおける治療ターゲットとして非常に注目されている。

アディポネクチンは 244 アミノ酸からなる蛋白で構造的に補体 C1q および TNF- α と類似する C1q-TNF スーパーファミリーに属し、2 種類のレセプター（AdipoR1 および R2）に結合し AMPK、PPAR α 細胞内シグナル伝達経路を介して生理活性を示す。2 型糖尿病、メタボリックシンドローム、心血管病変に伴う慢性炎症下においては健常者に比較してアディポネクチンの血中濃度が低く、さらに BMI と負の相関を示すことが知られている。ノックアウトマウスを用いた研究においても動脈硬化病変の抑制および糖脂質代謝の改善が報告されている。In vitro での実験においてもアディポネクチンは血管内皮細胞からの TNF- α 依存性の ICAM-1、VCAM-1 といった接着分子の発現の抑制、マクロファージでの TNF- α 、IL-6 産生抑制、単球・樹状細胞における抗炎症サイトカイン（IL-10、IL-1RA）の誘導などが示されている。これらのことから関節内および滑膜組織に存在する脂肪組織も炎症に何らかの作用を持つものと考えられる。

しかしながら RA、全身性エリテマトーデス等の慢性炎症を生じる自己免疫疾患においては逆に局所および全身性にアディポネクチンは上昇しているとの報告もあり、RA の

滑膜細胞においてはアディポネクチンが IL-6 および MMP-1 を誘導し炎症を惹起する方向に作用する可能性も示唆されている。また骨組織に対してアディポネクチンは骨芽細胞から autocrine/paracrine で分泌される場合には骨形成促進に作用し、脂肪組織からの endocrine の場合には骨形成抑制と骨形成促進の双方に作用することが報告されている。また抗 TNF- α 療法によって血中アディポネクチン濃度は増加することも報告されている。RA においてはアディポネクチンの上昇が病態形成に果たす意義については未だ明らかとされていないのが現状である。

以上のように状況によって異なる作用を示すアディポネクチンは研究対象として多くの分野において非常に注目されており現在も解明されていない点が多い。RA においてはアディポネクチンが炎症の促進に作用するのか、あるいは炎症に対するフィードバックとして抑制的に作用するのか一定の見解は得られていない。

2. 研究の目的

本研究は国内最大級の RA 診療機関である当施設において豊富に入手可能であるサンプルを用いて、臨床データ、in vitro での基礎実験により RA におけるアディポネクチンの炎症に関する作用につき解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 人工関節置換術を施行する関節リウマチおよび変形性関節症 (OA) 患者より、手術前に詳細な病状説明および試料採取に関する説明を患者本人に対して直接行いインフォームド Consent のもとに生体組織サンプルを収集する。試料には試料番号を振った上で連結可能匿名化を行い、試料等からは氏名、住所、生年月日、カルテ番号などの提供者の特定が可能な情報を廃棄する。収集するサンプルは血液、関節液、滑膜組織、関節内脂肪体、軟骨組織とする。

(2) 血液は遠心分離後に血清を凍結保存し、関節液はヒアルロニダーゼ処理後に凍結保存を行う。滑膜組織、関節内脂肪体、軟骨組織は一部を免疫組織染色の試料として凍結保存し、また別の一部の組織を凍結・粉碎し組織内の total mRNA を抽出し逆転写酵素により cDNA ライブラリーを作成する。残りの組織はコラーゲナーゼ処理にて細胞を単離し細胞培養を行い、均質な細胞が得られた

段階で凍結保存する。

(3) 十分なサンプル数の確保後に ELISA 法にて各サンプル中のアディポネクチン濃度を測定する。得られたデータにより疾患、年齢、BMI、CRP 等の他の生化学データとのアディポネクチン濃度の相関について検討を行う。

(4) RA においてアディポネクチンが他の疾患と異なり炎症を惹起する作用をもつという過去の報告に基づいて、RA において病態の中心をなすと考えられている炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 との関連を検討する。

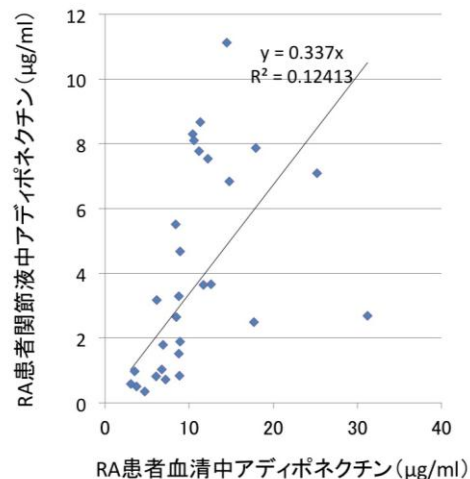
4. 研究成果

東京女子医科大学病院および附属青山病院にて人工関節置換術を施行した関節リウマチ患者および変形性関節症患者より、詳細なインフォームドコンセントを行い血液、関節液、滑膜組織、関節内脂肪体、軟骨組織の採取を行った。血液は遠心分離後に血清を凍結保存し、関節液はヒアルロニダーゼ処理後に凍結保存を行った。滑膜組織、関節内脂肪体、軟骨組織は一部を免疫組織染色の試料として凍結保存し、また別の一部の組織を凍結・粉碎し組織内の total mRNA を抽出し逆転写酵素により cDNA ライブラリーを作成した。残りの組織はカラーゲナーゼ処理にて細胞を単離し細胞培養を行い、均質な細胞が得られた段階で凍結保存した。

得られたサンプルを用いて、はじめに RA 患者 77 (女性 73 名、男性 4 名) 名の血清中アディポネクチン濃度を ELISA 法にて測定し、血清中の総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、CRP とアディポネクチンとの関連を単回帰分析を用いて検討した。結果として血清中アディポネクチン濃度は平均 8.84 $\mu\text{g/ml}$ であり、HDL コレステロール ($P=0.0002$) と中性脂肪 ($P=0.01$) で関連がみられたが、その他のマーカーとの関連は認めず、血清中では炎症マーカーである CRP との相関は見いだせなかった。アディポネクチンはメタボリックシンドロームや動脈硬化において善玉のサイトカインと考えられているが、今回の RA 患者サンプルにおいては BMI および頸動脈エコーによる動脈硬化の所見とは明らかな相関は認めなかった。本成果について第 54 回日本リウマチ学会にて発表を行った。

次に採取した関節液をヒアルロニダーゼ処理後に保存し、血清・関節液のサンプルがともに収集可能であった RA 患者 22 名 (女性 20 名、男性 2 名) においてアディポネクチン濃度を ELISA 法にて測定したところ、関節液

中にもアディポネクチンは存在することが確認された。関節液中においては血清中と比較すると低濃度であったが (血清中: 平均 11.7 $\mu\text{g/ml}$, 関節液中: 平均 4.56 $\mu\text{g/ml}$), 血清中と関節液中でのアディポネクチン濃度に有意な相関を認めた ($R^2=0.12$, $P<0.05$, 下図参照)。



対照群として変形性関節症 (OA) 患者 6 名 (女性 5 名、男性 1 名) におけるアディポネクチン濃度を測定したところ、血清中では RA 患者において比較的高濃度に存在したものの統計学的有意差を認めなかったが (RA 患者血清中: 平均 11.7 $\mu\text{g/ml}$, OA 患者血清中: 平均 7.06 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0.06$), 関節液では RA において有意に高濃度に存在しており (RA 患者関節液中: 平均 4.56 $\mu\text{g/ml}$, OA 患者関節液中: 平均 1.28 $\mu\text{g/ml}$, $P<0.01$), RA の関節炎に関与するものと考えられた。

さらに RA の病態に関与する代表的なサイトカインとして TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 を関節液にて測定し、アディポネクチン濃度との正の相関を示す傾向は認められたものの、各サイトカイン濃度の関節液中におけるばらつきが大きく、関節液中アディポネクチンとの統計学的に有意な相関は認めなかった。このことから RA 患者の関節内において何らかの炎症に関与している可能性は示唆されたものの、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 との関連は証明されず、症例数を増やしてのさらなる解析が課題であると考えられた。

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0件)

[学会発表] (計1件)

廣島亮, 岩本卓士ほか. 関節リウマチ患者における血清アディポネクチン濃度. 第54回日本リウマチ学会, 2010.4.23, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 卓士 (IWAMOTO TAKUJI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10348675