

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592226

研究課題名(和文)関節炎症に及ぼす脂質サイトカインの影響

研究課題名(英文)Effect of lipid cytokine on arthritis

研究代表者

小池 達也(Koike, Tatsuya)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50271177

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)：関節リウマチ患者のうち、肥満者に炎症程度が軽いという臨床経験から脂肪組織が産生するレプチンが炎症を抑制する可能性があると考えた。まず、レプチンを全く産生していないob/obマウスに関節炎を誘導しても、関節炎は全く発生しなかった。次に、高脂肪食により肥満を誘導し、血中レプチン濃度を高くしたマウスに同様に関節炎を誘導したが、これも関節炎の程度は軽かった。最後に、レプチンを強制的に産生しているトランスジェニックマウスに関節炎を誘導しても、その程度は軽かった。その際に、炎症を惹起していると考えられるIL-6産生をレプチンが抑制することを見いだした。レプチン濃度が高いことは炎症を抑制する。

研究成果の概要(英文)：Among rheumatoid arthritis patients, fatty patients show relatively low inflammation. So we thought that leptin derived from fat tissue might reduce the inflammation. At first ob/ob mouse, which has no leptin in the body, did not show any kind of arthritis induced by anti-collagen antibody. Next we created acquired leptin resistance mice by high fat diet. They got higher leptin concentration and showed lower grade of arthritis induced by anti-collagen antibody. At last, we could not induce arthritis in leptin transgenic mice, which showed hyperleptinemia. Finally we found that leptin decreased the production of IL-6, pro-inflammatory cytokine. Hyperleptinemia reduces inflammation.

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：肥満 炎症 レプチン マウス

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) 患者において、Escalante らは BMI (Body mass index) が高い RA 患者ほど、死亡率が低いことを報告している (Arch Intern Med, 2005)。通常、高 BMI は心血管系イベントのリスクファクターであり、パラドキシカルな結果といえる。さらに、体重の減量により CRP (C reactive protein) が低下することも確認され (Selvin ら, Arch Intern Med, 2007)、RA・炎症・心血管病変をめぐる議論は混迷を深めている。そこでわれわれは、マウスを用いて、「炎症と肥満」という新しいテーマに関する研究を行うという着想を得た。その中でも、レプチンという脂肪細胞から分泌され、食欲を制御するアディポサイトカインに注目し、レプチンと関節炎の関係についての研究を開始した。

## 2. 研究の目的

これまでの研究 (2008-9 年度挑戦的萌芽研究) で我々は、脂肪細胞から分泌される食欲抑制サイトカインであるレプチンシグナルが関節炎を増悪させる事実を明らかにした。しかし、作用機序は不明であり、第一の研究目的は、他の脂質系サイトカインとの関係を含めたレプチンシグナルの関節炎制御機序の解明である。

## 3. 研究の方法

(1) 単純性肥満マウスでもレプチン抵抗性が成立するか否かを検証する。高脂肪食 518 Kcal/100g を自由摂取で与えて、単純性肥満マウスを作成する。通常食群は 342 Kcal/100g。通常は肥満マウス作成には 8 週間が必要であるが、4 週齢から飼育を開始したとして、関節炎を誘導するのが 12-13 週齢となってしまう。これは、効率よく関節炎を生じる週齢をかなりオーバーしているため、肥満誘導は 6 週までとする。C57/B6 系を用いる。関節炎は、抗 II 型コラーゲン抗体カクテル (5 種類の II 型コラーゲンに対するモノクローナル抗体のカクテル) を 3mg ずつ第 0-1 日に腹腔内投与し、第 3 日に LPS を投与して誘導する (Nishida ら, Arthritis Rheum, 2004)。単純性肥満マウスでレプチン濃度は高く、関節炎症状は少ないことは確認済みであり、in vivo capture assay 法にて各種サイトカインの増減を比較し、通常組織検査に加えて免疫組織検査にて脂質関連タンパクの局在を調べる。これまでの研究 (Lord ら, Nature, 1998) で、レプチンは Th-2 抑制方向に作用すると考えられているので、IFN $\cdot$ IL-2 $\cdot$ IL-4 を測定対象とし、レプチン抵抗性が出現している状態での増減を調べる。

関節破壊進行に重要な破骨細胞系の動態に關しても TRAP 染色にて検討を加える。レプチンの脳室内投与も検討する。

(2) 全身性脂肪萎縮症マウスである A-ZIP/F-1 マウス (バックグラウンドは FVB/N マウス) は脂肪細胞の分化に重要な B-ZIP タンパクのドミナントネガティブ体である A-ZIP タンパクを脂肪細胞に特異的に発現させることにより、全身の脂肪細胞が消失した遺伝子改変動物であるが、このマウスにも同様に関節炎を誘導し経過を観察する。このマウスは痩せていて血中レプチン濃度は低く、インスリン抵抗性を示す。血中レプチン濃度は正常の 1/20 程度。

(3) 血中レプチン濃度が野生型マウスの 10 倍程度となるレプチントランスジェニックマウスおよびその野生型マウスを用いて、RA モデルであるコラーゲン抗体関節炎 (CAIA) を誘導した。レプチン遺伝子に変異のある ob/ob マウスをネガティブコントロールとして使用した。CAIA は II 型コラーゲンに対する 5 種類のモノクローナル抗体カクテル 5mg を day 0 にマウスの腹腔内に投与し、さらに day 3 にリポポリサッカライド (LPS) 12.5  $\mu$ g を腹腔内投与した。関節炎の評価は肉眼所見評価 (Terato 法) および四肢の厚さを測定して day 0-14 まで行った。その他軟 X 線での関節破壊評価、組織の染色 (H-E 染色 $\cdot$ トルイジンブルー染色) およびその評価 (Modified Mankin's histological score)、末梢血中サイトカイン濃度の測定をおこなった。

(4) (3) の実験結果から、レプチンと IL-6 の関連が確認されたため、in vitro でのその作用について確認することとした。方法としては THP-1 細胞を PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 100nM で 72 時間処理した後にマクロファージに分化させ、そこに LPS を 100ng/ml で投与して IL-6 を発現させる。その後 Leptin を投与し、IL-6 の mRNA 発現量を real-time PCR で評価した。

## 4. 研究成果

(1) この研究で作成したレプチン抵抗性マウスは、末梢にレプチンを投与しても食欲減少がおこらず、中枢投与すると食欲抑制作用がおきるというモデルマウスであり、これらのマウスに関節炎を誘発するとコントロールマウスと比較し有意に関節炎の発症進展が抑制された。さらに、末梢にレプチンを補充しても関節炎の進展は変化なく、中枢に投与することにより関節炎が増悪したことより、レプチンの反応性と関節炎の進展には関連があることを証明した。

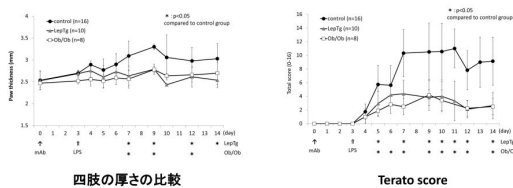
(2) 全身性脂肪萎縮症マウスに種々の用量の抗 II 型コラーゲン抗体カクテルを投与しても、関節炎が全く惹起されなかった。これが、レプチン濃度が低いために生じたことを証明するため、バックグラウンドである

FVB/N マウスで関節炎発症を確認したところ、これらのマウスにも関節炎が生じず、マウス系統による現象であることが判明したので、実験を中止した。

(3) 血中レプチン濃度は野生型マウスが  $7.2 \pm 0.5$  ng/ml であったのに対し、レプチントランスジェニックマウスではその約9倍の  $62.0 \pm 20.7$  ng/ml であった。ob/ob マウスの血中レプチン濃度は検出限界以下であった。肉眼所見評価および四肢の厚さにおいて、レプチントランスジェニックマウスは野生型マウスよりも関節炎は抑制された。ob/ob マウスにおいても関節炎は野生型マウスより抑制されていた(図1)。さらに組織学的検討でも、レプチントランスジェニックマウスおよびob/ob マウスでは、野生型マウスよりも関節軟骨の変性が軽度であり、Modified Mankin's score でも有意差を認めた(図2)。サイトカイン濃度の測定では、レプチントランスジェニックマウスおよびob/ob マウスでは関節炎初期から極期にかけてIL-6濃度の上昇が抑制されていることがわかった(図3)。これらの結果からCAIAモデルマウスにおいて、ob/ob マウスおよびレプチントランスジェニックマウスでは関節炎が抑制されることを確認した。レプチンの関節炎に対する作用は、通常の濃度の範囲では関節炎を増悪させたが、過剰な状態では関節炎が抑制されることが示唆された。そのメカニズムとしては血清IL-6濃度の変化を介していると考えられた。



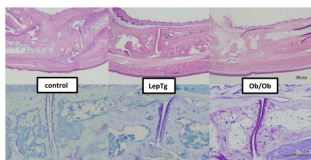
Day 9における四肢の肉眼所見



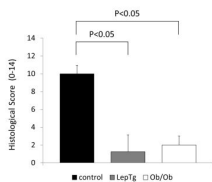
四肢の厚さの比較

Terato score

図1 関節炎による肉眼所見の比較



上段:H-E染色、下段:トルイジンブルー染色



Modified Mankin's histological score

図2 組織の比較

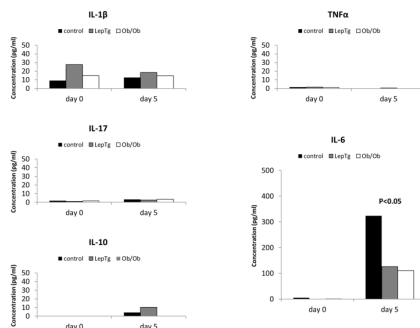
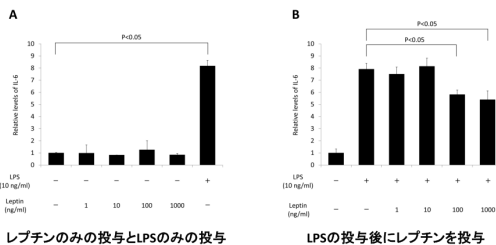


図3 末梢血中サイトカイン濃度

(4) まずレプチンのみでマクロファージから炎症性サイトカインが産生されるかどうかを確認するために、レプチン濃度を1から1,000 ng/mlまで変えてマクロファージに投与したが、IL-6の上昇は認められなかった(図4 A)。次に、マクロファージにLPS 10 ng/mlのみとLPS 10 ng/mlの投与後にレプチン濃度を1から1,000 ng/mlまで変えてマクロファージに投与した。すると、レプチン濃度が100と1000 ng/mlのものでは、LPSのみのもものと比べてIL-6のmRNA発現量が有意に減少した(図4 B)。これらのことから、高濃度のレプチンはマクロファージからのIL-6発現を抑制する働きがあることが確認された。



レプチンだけの投与とLPSだけの投与

LPSの投与後にレプチンを投与

図4 マクロファージからのIL-6のmRNA発現量の検討

上記の結果から高レプチン血症はマクロファージからのIL-6産生を抑制し、関節炎の重症化が抑制され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1件)

Sugioka Y, Okano T, Tada M, Nakamura H, Koike T: Acquired leptin resistance by high-fat feeding reduces inflammation from collagen antibody-induced arthritis in mice. Clin Exp Rheumatol. 2012; 30: 707. 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

Okano T, Koike T, Inui K, Tada M, Sugioka Y, Mamoto K, Nakamura H: Hyoerleptinemia suppresses aggravation of arthritis of collagen antibody-induced arthritis in mice. Eular 2014, 2014.6.13, Paris 採択  
岡野匡志、小池達也、多田昌弘、杉岡優子、沖花裕行、中村博亮：高用量レプチンによって関節炎の重症化は抑制される 第27回日本整形外科学会基礎学術総会 2012.10.27 名古屋  
杉岡優子、脇谷滋之、真本建司、岡野匡志、多田昌弘、神山敦子、中村博亮、小池達也：関節リウマチ患者においてレプチンの骨代謝、炎症に与える影響について第84回日本整形外科学会学術集会, 2011.5.12 福岡

〔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

小池 達也 (KOIKE, Tatsuya)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・特任教授  
研究者番号：50271177

(2) 研究分担者

海老原 健 (EBIHARA, Ken)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：70362541

多田 昌弘 (TADA, Masahiro)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講

師

研究者番号：20514235

(3) 連携研究者  
なし