

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K16214

研究課題名(和文) 関節リウマチ患者におけるProkineticin2-receptor系の解析

研究課題名(英文) Prokineticin-receptor systems in patients with rheumatoid arthritis

研究代表者

野田 健太郎 (Noda, Kentaro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30547914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症由来の滑膜線維芽細胞において炎症性サイトカインの曝露下でPKR1の発現が増加し、PK2の刺激により滑膜線維芽細胞からの炎症性サイトカインの分泌を抑制したのに対し、関節リウマチ由来の滑膜線維芽細胞において炎症性サイトカインの曝露下でPK2、PKR1の発現が低下し、PK2刺激による炎症性サイトカインの分泌抑制が生じないことが明らかになった。以上より関節リウマチ由来の滑膜線維芽細胞においてPK2の感受性が低下することにより、PK2の感受性が低下することにより炎症抑制起点が作用せず炎症が慢性化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ患者の関節滑膜においてPK2-PKR1系による炎症抑制効果がPKR1の発現低下により減少するため、関節炎の慢性炎症を継続させる可能性が考えられた。関節局所のPKR1の発現を高めることが関節における局所の炎症をコントロールするための戦略となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we collected synovial tissue, plasma, synovial fluid, and synovial fibroblasts (SF) from RA and OA patients to analyze the function of PK2 using immunohistochemistry, enzyme-linked immunosorbent assays, and tissue superfusion studies. PK2 and its receptors prokineticin receptor (PKR) 1 and 2 were expressed in RA and OA synovial tissues. PKR1 expression was downregulated in RA synovial tissue compared with OA synovial tissue. The PK2 concentration was higher in RA synovial fluid than in OA synovial fluid but similar between RA and OA plasma. PK2 suppressed the production of IL-6 from TNF α -prestimulated OA-SF, and this effect was attenuated in TNF α -prestimulated RA-SF. This phenomenon was accompanied by the upregulation of PKR1 in OA-SF. This study provides a new model to explain some aspects underlying the chronicity of inflammation in RA.

研究分野：リウマチ・膠原病学

キーワード：prokineticin2 prokineticin receptor 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) の増殖滑膜には豊富な新生血管が認められており、血管新生を阻害することで関節炎を抑制できる可能性がある。Bonbina variegata peptide (Bv8)/Prokineticin2(PK2) はキバラスズガエルの皮膚分泌物より単離された蛋白質である。PK2 は血管新生、腸管収縮、神経新生、サーカディアンリズムの調節、疼痛閾値の調節、免疫調節作用、好中球の遊走等、関節リウマチの病態と一致する多彩な機能を持っている。最近、Ferraraらは、悪性腫瘍における血管新生にPK2が関与していることを報告した。そこで、我々はPK2が関節リウマチにおける病態に関与しているという仮説をたてた。そして、PK2が関節炎モデルマウスの炎症性滑膜、骨髄に高発現していることを報告し(BMC Musculoskelet Disord. 2009;10:45-2474-10-45.)、更にPK2 antagonistを投与することにより関節炎が抑制されることを明らかにした(BMC Musculoskelet Disord. 2016;17:387-016-1243-0.)。しかし、関節炎モデルマウスは急性関節炎モデルであり炎症細胞の浸潤が強く、その炎症細胞の主体が好中球であるのに対し、ヒト関節リウマチは慢性関節炎であり浸潤している病態のメインとなる細胞は好中球ではなくマクロファージや、線維芽細胞である(Fig.1)。以上よりPK2がヒト関節リウマチにおいてどのように関与しているかは不明である。慢性炎症性関節炎である関節リウマチと非炎症性疾患関節症である変形性関節症患者におけるPK2の役割を比較することにより、その生理的意義を検討した。

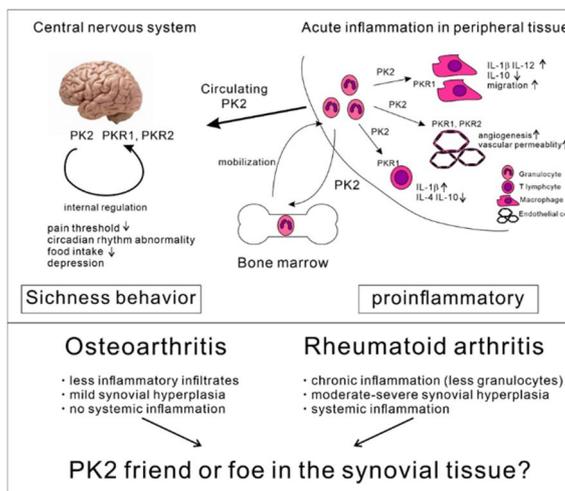


Figure 1. Prokineticin 2 as regulators of inflammation and sickness behavior

2. 研究の目的

- (1) 変形性関節症 (OA)、関節リウマチ (RA) 滑膜、OA、RA 由来滑膜由来滑膜線維芽細胞 (SF) における PK2、PK2 の受容体である PKR1、PKR2 の発現を検討する。
- (2) OA、RA 患者における血漿、関節中の PK2 濃度を検討する。
- (3) 炎症性サイトカイン曝露による OA-SF、RA-SF における PK2、PKR1、PKR2 の発現の変化を検討する。
- (4) 炎症性サイトカインで前刺激した OA-SF、RA-SF を PK2 で刺激した際の炎症促進因子、炎症抑制因子の変化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 患者

患者血漿、関節液、滑膜検体は人工膝関節置換術を施行された RA 患者 67 名 (男性 19 名、女性 48 名、平均年齢 62.6 ± 10.6 歳)、OA 患者 79 名 (男性 31 名、女性 48 名平均年齢 68.0 ± 8.07 歳) より得た。RA の診断は ACR の分類基準にて診断された。患者は本研究の目的を理解し、書面でのインフォームドコンセントが行われた。RA、OA 患者の平均 CRP はそれぞれ 15.8 ± 26.7 mg/l、2.18 ± 3.02 mg/l であり RA 患者では OA 患者と比較し有意に CRP が高値であった。RA 患者 67 名中 51 名がグルココルチコイド、34 名がメトトレキサート、13 名が生物学的製剤、7 名がレフルノミド、3 名がスルファサラゾピリンの投与を受けていた。一方 OA 患者においては 1 名がグルココルチコイドの投与を受けていた。

(2) 滑膜組織の処理、滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblast: SF) の誘導

RA と OA 患者の滑膜組織を約 9cm² 摘出した。組織の一部はメスにて細切り liberase TM にて処理し単細胞化し初代培養を行った。Passage5 - 8 で実験に使用した。組織のその他の部分は免疫染色に用いた。

(3) 免疫染色

a) 滑膜組織の免疫染色

OA、RA 患者から得られた滑膜組織の免疫染色を行った。滑膜組織を 3.7%ホルマリンにて浸漬固定し、rabbit anti-PK2 polyclonal antibody、rabbit anti-PKR1、anti-PKR2 polyclonal antibody を使用し免疫染色を行い、DAB で発色させた。ヘマトキシリンにて対比染色した。

b) SF の免疫染色

OA、RA 患者より誘導した SF よりサイトスピン標本を作製し、冷アセトンにて固定した。rabbit anti-PK2 polyclonal antibody、rabbit anti-PKR1 polyclonal antibody、mouse anti-PKR2 monoclonal antibody を使用し免疫染色を行った。その後、DAPI で核染色を行った。切片は光学顕微鏡にて観察した。

c) 評価

関節滑膜の PK2、PKR1、PKR2 の発現を検討するため半定量解析を行った。滑膜表層細胞 (lining layer) と滑膜表層下細胞 (sublining layer) における PK2、PKR1、PKR2 陽性細胞を高倍率視野にて 5 視野カウントした。陽性細胞数 / 全細胞数を計算し以下のような 0 - 4 のグレードに分類した。0 = 陽性細胞なし、1 = 0-25 % 陽性、2 = 26-50 % 陽性、3 = 51-75 % 陽性、4 = 76-100 % stained cells。

(4) Cell-based ELISA

OA-SF、RA-SF における炎症性サイトカイン曝露による PK2、PKR1、PKR2 の発現の変化を調べるため 96well プレートに SF を播種した。そして、翌日 TNF α (10 ng/ml)、IL-1 β (200 pg/ml)、TGF β (10 ng/ml) にて 24 時間、または 48 時間刺激した。その後、細胞を PK2 染色に関しては 3.7%ホルマリンにて 20 分、PKR1 と PKR2 に関しては冷メタノール 10 分にて固定した。一次抗体は SF の免疫染色で使用した抗体を使用した。翌日細胞を 2 次抗体で反応させ、その後 TMB で発色させた。2M 硫酸にて発色を停止後、吸光度をプレートリーダーにて測定した。

(5) SF の刺激

炎症性サイトカインの曝露下の SF に対する PK2 の影響を検討するため RA-または OA-SF を 96well プレートに 1×10^4 細胞/well 播種した。翌日 TNF α 10 ng/ml で刺激した。刺激後 48 時間に PK2、DMSO、Prokineticin receptor 1 antagonist (PC-7) を追加し、その 24 時間後に培養上清を採取した。そして、培養上清を ELISA で解析した。

(6) ELISA

培養上清中の IL-6、MMP-3、osteoprotegerin (OPG)、TIMP-1、患者血漿、関節液中の PK2 濃度を ELISA にて測定した。

(7) 統計学的検討

全てのデータは mean \pm SEM で示した。箱ひげ図においては 10、25、中央値、75、90 パーセントアイルを示した。2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。対応ある 2 群間の比較は Wilcoxon signed rank 検定を用いた。Cell-based ELISA における各炎症性サイトカインの刺激による PK2、PKR1、PKR2 の発現と 100%コントロールとの比較は one-sample Wilcoxon signed rank test を用いた。ELISA における IL-6 濃度、MMP-3 濃度、TIMP-1 濃度、OPG 濃度の PK2 + DMSO 群、PK2 + PC-7 群それぞれと 100%コントロールの比較は one-sample Wilcoxon signed rank test を用いた。血漿と関節液の PK2 濃度の相関関係の解析は Spearman rank correlation にて行った。ELISA における PC-7 と DMSO 投与群の比較は two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test を用いた。p < 0.05 で統計学的有意差があるとした。

4. 研究成果

(1) OA、RA 患者滑膜の PK2、PKR1、PKR2 の発現の検討

以前われわれは、マウスコラーゲン関節炎において関節局所に PK2、PKR1、PKR2 が発現していることを示した。そこで、まず最初に OA、RA 患者における滑膜の PK2、PKR1、PKR2 の発現を免疫染色にて検討した (Figure 2)。

PK2 陽性細胞は OA、RA 滑膜の lining layer と sublining layer の一部の細胞で陽性であった (A 左)。しかし、OA と RA における lining layer と sublining layer の PK2 陽性細胞の割合は半定量法にて差はなかった (B 左)。PKR1 陽性細胞は OA 滑膜においては lining layer と sublining layer のほぼ全ての細胞で陽性であったが RA 滑膜においては一部の細胞で陽性であった (A 中)。半定量法にて OA 滑膜は RA 滑膜より PKR1 陽性細胞の割合が有意に高かった (B 中)。PKR2 陽性細胞は OA、RA 滑膜共に存在しており、その発現細胞の割合に差はなかった (A 右、B 右)。以上より OA、RA 滑膜において PK2、PKR1、PKR2 が発現しており、RA 滑膜においては OA 滑膜と比較し PKR1 の発現が低下していることが明らかになった。これは、PK2 が関節滑膜局所において何らかの作用を有している可能性があることを示唆した。

(2) OA、RA 滑膜由来 SF における PK2、PKR1、PKR2 の発現

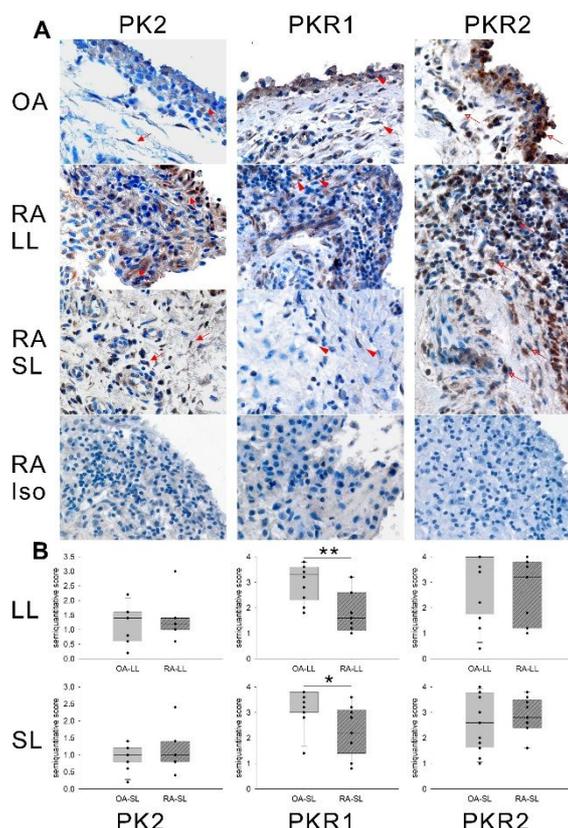


Figure 2. PK2, PKR1, and PKR2 expression in OA and RA synovial tissues.

次に OA、RA 滑膜由来 SF における PK2、PKR1、PKR2 の発現を免疫染色で検討した (Figure 3)。PK2、PKR1 は OA-SF、RA-SF 共に陽性であった (左: PK2、中: PKR1)。一方 PKR2 は OA-SF、RA-SF 共に陰性であった (右)。

(3) 炎症性サイトカイン曝露による SF における PK2、PKR1、PKR2 の発現の変化

一般的に RA 患者滑膜は様々な炎症性サイトカインに曝露されている。また、OA 患者においても特定の状況下 (感染症などの全身の炎症性疾患、外傷、強負荷の運動) において炎症性サイトカインに曝露されることがある。そのため、OA-SF と RA-SF を RA に関連する代表的なサイトカインである TNF、IL-1、TGF で刺激し 24、48 時間後の PK2、PKR1、PKR2 の発現の変化を cell-based ELISA で検討した (Figure 4)。OA-SF における各サイトカインの刺激による PK2 の発現は刺激後 24、48 時間後に変化はなかった。一方 RA-SF における各サイトカインの刺激による PK2 の発現は 24 時間後に低下した。そして、IL-1 刺激においては 48 時間後も PK2 の発現低下が持続した (A)。OA-SF における各サイトカインの刺激による PKR1 の発現は刺激後 24 時間後に変化はなかった。しかし、48 時間後に TNF、TGF 刺激により PKR1 の発現が増加した。一方 RA-SF における各サイトカインの刺激による PKR1 の発現は 24 時間後では変化なかったが、48 時間後に IL-1 β 刺激においては PKR1 の発現が低下した (B)。OA-SF における各サイトカインの刺激による PKR2 の発現は TGF においては刺激後 24 時間後、48 時間後に増加した。一方 RA-SF における各サイトカインの刺激による PKR2 の発現は TGF においては刺激後 24 時間後、48 時間後、TNF においては刺激後 48 時間後に増加した (C)。未刺激の SF における PKR2 の発現は免疫染色で認めなかったが、(Figure 3) TGF 刺激後は陽性化した (D)。以上より炎症性サイトカインの曝露により、RA-SF においては PK2、PKR1 の発現が低下し、OA-SF においては PKR1 の発現が増加することが明らかとなった。これは、OA-SF と RA-SF において炎症性サイトカインの曝露により PK2、PKR1 の発現の変化が異なることを示している。

(4) OA、RA 患者血漿、関節液、そして滑膜灌流液中の PK2 濃度の検討

OA、RA 患者の血漿中の平均 PK2 濃度はそれぞれ $1.07 \pm 1.47 \times 10^{-9}$ M、 $0.965 \pm 0.918 \times 10^{-9}$ M であり両群で差はなかった (Figure 5A 左)。一方 OA、RA 患者の関節液中の平均 PK2 濃度はそれぞれ $8.36 \pm 1.31 \times 10^{-11}$ M、 $3.50 \pm 7.37 \times 10^{-10}$ M であり、RA 患者の関節液中の PK2 濃度は OA 患者と比較し有意に高値であった (A 右)。PK2 濃度は OA、RA 両群において血漿と比較し関節液で有意に低値であった (B)。さらに、血漿中の PK2 濃度は OA 患者において関節液中の PK2 濃度と有意な相関を認めたが (C 左) RA 患者においては相関を認めなかった (C 右)。このことは、OA 患者において関節液中の PK2 は血漿からの漏出によるものであるが RA 患者においては血漿からの漏出に加え関節腔内局所での産生されていることを示唆した。

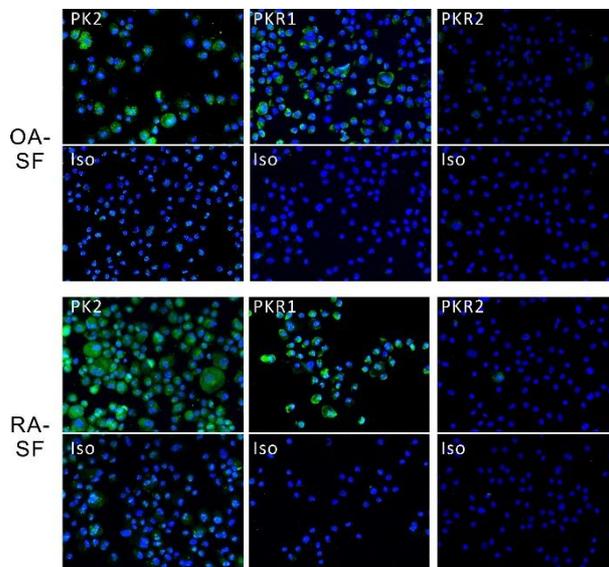


Figure 3. Immunofluorescent staining of PK2, PKR1, and PKR2 proteins in OA and RA SF.

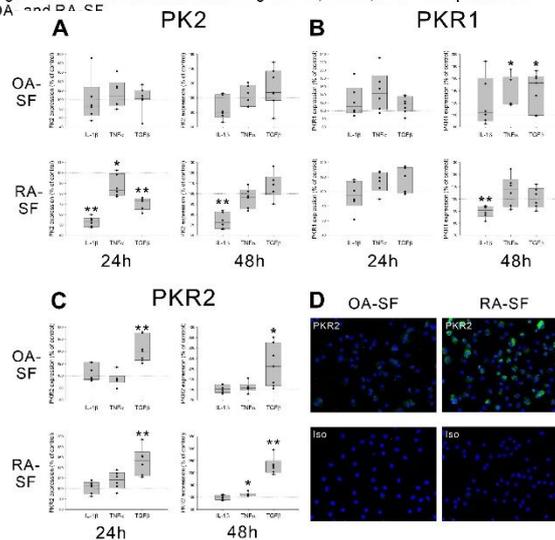


Figure 4. Modulation of PK2, PKR1, and PKR2 expression in OA- and RA-SF under proinflammatory conditions.

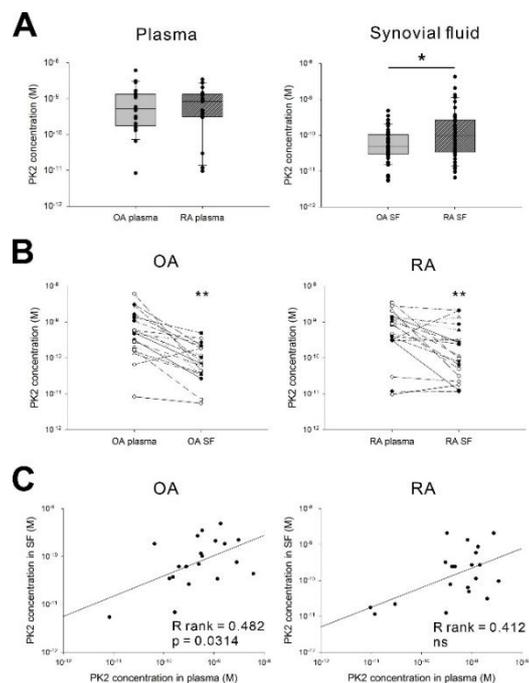


Figure 5. The PK2 concentration in plasma and synovial fluid from OA and RA patients.

(5) TNF 前刺激 OA、RA-SF の PK2 による IL-6、MMP-3、osteoprotegerin、TIMP-1 の産生能の検討

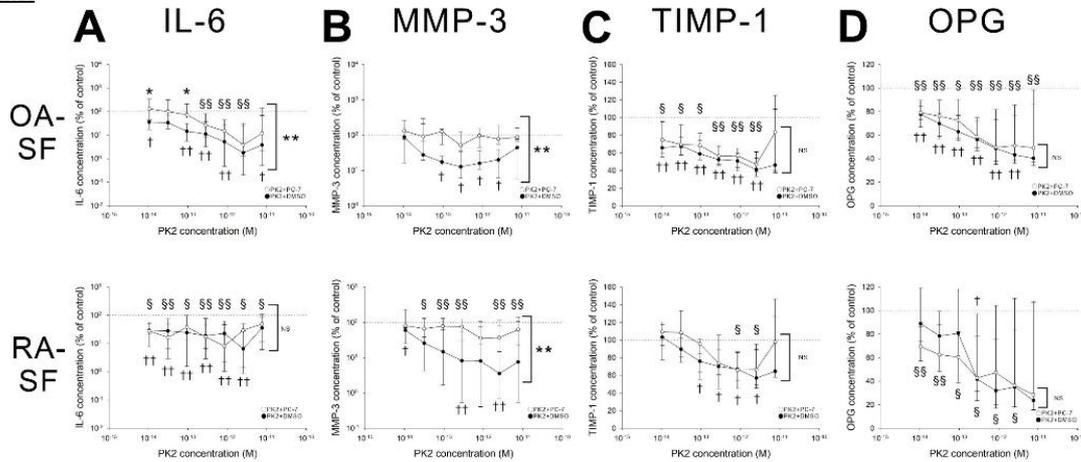


Figure 6. Influence of PK2 and PC-7 (or DMSO) on IL-6 (A), MMP-3 (B), TIMP-1 (C), and OPG (D) production from TNF α -prestimulated OA- and RA-SF.

血漿、関節液の PK2 濃度より我々は PK2 は滑膜組織においてかなり低い濃度で作用しているという仮説を立てた。そして、炎症下における PK2 の OA-、RA-SF に対する作用を調べるため、TNF で前刺激した OA-、RA-SF を 10^{-11} ~ 10^{-14} M の PK2 で刺激し、培養上清中の関節炎における炎症促進因子 (IL-6、MMP-3) と炎症抑制因子 (TIMP-1、osteoprotegerin) を ELISA で測定した (Figure 6)。PK2 は強力に OA-SF からの IL-6 分泌を PK2 濃度依存的に抑制した (A)。そして、その抑制作用は PKR1 アンタゴニストである PC-7 により拮抗された。一方 PK2 は RA-SF からの IL-6 分泌を軽度抑制したが、その効果は PC-7 により拮抗されなかった。OA-、RA-SF からの MMP-3 の分泌は PK2 により抑制された。そして、その作用は IL-6 と同様 PC-7 により拮抗された (B)。一方 OA-、RA-SF からの TIMP-1 と osteoprotegerin の分泌は PK2 により抑制されたが PC-7 により拮抗されなかった (C、D)。PKR1、PKR2 アンタゴニストである PKRA7 による拮抗作用も検討したがその結果は PC-7 と同様であった (data not shown)。これらの結果は PK2 が OA-SF において炎症促進因子を抑制するが、炎症抑制因子には影響しないことを示す。そして、この作用は、主に PKR1 を介した作用と考えられた。なぜなら、OA-、RA-SF は PKR2 をほとんど発現していないこと、PC-7 と PKRA7 の効果が同様であったためである。

(6) 本研究の研究成果の考察

本研究により RA、または OA の関節滑膜に PK2、PKR1、PKR2 が発現していることを示した。これまで、マウスコラーゲン関節炎の関節組織にて PK2、R1、R2 の発現が確認されていたが、ヒトの滑膜における発現を初めて証明した。このことは PK2 が関節局所にて autocrine または paracrine で作用していることを示す。さらに、RA、OA-SF においても、非刺激下において PK2、PKR1 が発現していることを示した。さらに、炎症性サイトカインに曝露された状態において OA-SF と RA-SF の PK2 の反応性が異なることを示した。OA-SF では PK2 により IL-6 や MMP-3 といった滑膜炎を促進する因子が低下するのに対し、RA-SF においてはこれらの因子が低下しなかった。一方 OPG や TIMP といった炎症抑制因子には影響しなかった。これは、炎症性サイトカインの曝露 (例えば、強い運動や感染症、外傷など) に対し OA では炎症が自然に改善 (resolution) する方向に向かうのに対し、RA においては炎症が遷延しやすいのに関連しているのかもしれない。そして、この原因としては OA-SF においては PKR1 が炎症性サイトカインの曝露において upregulate しているが、RA-SF においては PK2、PKR1 とともに downregulate しているのに関連しているのかもしれない (Figure7)。

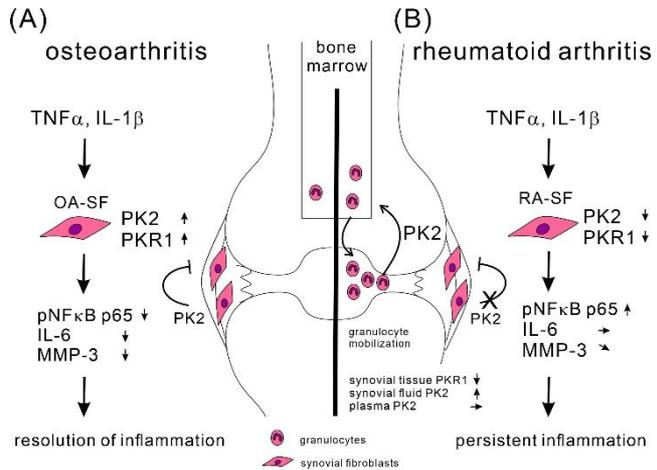


Figure 7. Model describing the dysregulation of endogenous inflammation by PK2 in RA.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noda Kentaro, Dufner Bianca, Ito Haruyasu, Yoshida Ken, Balboni Gianfranco, Straub Rainer H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Differential inflammation-mediated function of prokineticin 2 in the synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis compared with osteoarthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97809-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Noda, Bianca Dufner, Rainer H. Straub
2. 発表標題 Differential inflammation-mediated function of prokineticin 2 in the synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis compared with osteoarthritis.
3. 学会等名 American College of Rheumatology Convergence. USA. Nov.（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田健太郎
2. 発表標題 関節炎におけるプロキネチシン2の役割の解明.
3. 学会等名 第138回成医会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慈恵医大 リウマチ膠原病内科
<https://www.jikeir.website/>
関節リウマチにおける神経免疫連関の解明
<https://www.jikeir.website/research/basic/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------