

平成20年6月16日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591197
 研究課題名（和文） 小児期の成長板における軟骨細胞の分化に及ぼす炎症性サイトカインの影響
 研究課題名（英文） The effect of inflammatory cytokines on the differentiation of chondrogenic progenitor cells in the growth plates

研究代表者
 森 雅亮(MORI MASAAKI)
 横浜市立大学附属市民総合医療センター・准教授
 研究者番号：30254204

研究成果の概要：

全身型 JIA の成長障害や関節破壊（単純 X 線像における骨端部の不整像）はともに骨端部における軟骨内骨化不全に起因すると考えられた。ATDC5 細胞株による検討結果から、IL-6 は成長軟骨板における軟骨細胞の初期分化を抑制し、軟骨内骨化不全をきたすこと、および抗 IL-6 受容体抗体・トシリズマブ治療により軟骨内骨化が回復し、成長障害や関節炎の改善に寄与することが推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000 円	0 円	1,100,000 円
2007年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2008年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
総計	3,400,000 円	690,000 円	4,090,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：成長板、軟骨細胞、炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 若年性関節リウマチ(若年性特発性関節炎)の成長障害に対するヒト化抗 IL-6 レセプター・モノクローナル抗体の効果

若年性関節リウマチは慢性炎症性疾患である。大きく関節型と全身型とに病型分類されるが、いずれも成長障害が著しい。とくに全身型は発症と同時に成長は停止し、ステロイド薬の影響も加わり、年間数 mm の成長も

期待できない。病態形成に炎症性サイトカインとくにインターロイキン(IL)-6 (IL-6) が関わり、患児に対しヒト化抗 IL-6 レセプター・モノクローナル抗体(anti-IL-6RmAb)を用いたところ、炎症を迅速に終息に向かわせることを確認した。また anti-IL-6RmAb の3年以上の投薬を行ったところ、抗炎症効果と同時に例外なく年間 15~18cm という驚異的な身長伸びを認めた。すなわち成長期に炎

症性サイトカイン IL-6 に持続的に曝されることが成長起点（成長軟骨板）に抑制的な作用を及ぼし、成長阻害を起こすことが証明されたことになる。

(2) 軟骨細胞の分裂・増殖・分化過程における炎症性サイトカインの関わり

軟骨細胞の分裂・増殖・分化の過程に、炎症性サイトカインがどのように関わり、小児の成長にどのような影響を与えているかについての研究はこれまでみられていない。全身型若年性関節リウマチ患者で必発する成長障害はこれまで治療薬として使用されてきたステロイド薬に起因するものと推測されていた。

しかし、成長軟骨細胞の分化過程のある段階から IL-6 の生物学的機能発現レセプターである gp130 が発現しており、また IL-6 の転写因子である CCAAT/enhancer binding proteins がその細胞内の基質産生に関わっている証拠がある。持続的な IL-6 高値が、ホルモンや成長因子の軟骨細胞に対する作用と拮抗して、あるいは過剰な機能誘導を介して成長障害に関わっている可能性は十分に考えられ、当院で行った約 70 例の本疾患患者の解析により、原病の炎症反応が強いときはステロイド薬を使用していなくても成長障害が生じ、逆に原病の安定が図ればたとえステロイド薬の投与を行っていてもある程度の成長が期待できることが判明した。このことより、本疾患には炎症反応を惹起させる因子すなわち炎症性サイトカインが成長障害に関与している可能性があるのではないかと推察するに至った。

(1), (2) より、軟骨芽細胞系の cell line を用いて、分化ステージ特異蛋白を指標に転写因子レベルでの分析により IL-6 シグナルが成長にどのような影響を与えているかを検討した。

2. 研究の目的

軟骨細胞の分裂・増殖・分化を方向付ける外的因子と受容体、細胞内シグナル機構、転写因子、産出される蛋白質などの同定を指標にして、各分化時期の細胞に炎症性サイトカイン、とくに IL-6 を加えその変化を観察し、炎症性サイトカインの成長阻害の機構を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いた in vitro での検討

全身型 JIA 患者における著しい成長障害や単純 X 線像の特徴的所見は、ともに軟骨内骨化不全に起因すると考えられた。そこで IL-6 の軟骨内骨化への直接作用を調べる目的で、マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いた in vitro での検討を行った。

マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 は、未分化細胞から軟骨細胞への分化のみならず、軟骨細胞の肥大化・石灰化を in vitro で効率よく再現する培養系であり、軟骨内骨化を解析するスタンダードな系として国際的に用いられている。ATDC5 は insulin により分化が誘導される。そして前軟骨細胞から軟骨細胞への分化が始まると type II collagen, aggrecan などの軟骨分化マーカー遺伝子を発現し、さらにその後肥大化軟骨細胞へと分化するに伴い、肥大化軟骨細胞に特異的な type X collagen 遺伝子を発現するようになる。

① 定量的 RT-PCR を用いた軟骨分化マーカー遺伝子の発現量の測定

IL-6 が ATDC5 細胞の分化におよぼす影響について、これらの軟骨分化マーカー遺伝子の発現量を qRT-PCR (quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction) を用いて検討した。まず insulin

による分化誘導開始を Day 0 とし、軟骨分化マーカー遺伝子の発現量の経時的な推移を検討した。

その結果、Day 2 までは軟骨分化マーカーの発現を認めないものの、Day 6 には type II collagen, aggrecan mRNA が最大量発現するようになり、その後経時的に発現量は徐々に低下した。type X collagen mRNA は、Day 6 ではまだ発現量は少なく、Day 10, 14 にかけて発現量が増加した。ATDC5 細胞では、軟骨内骨化における前軟骨細胞から増殖軟骨細胞へ、そして肥大化軟骨細胞へと分化する過程を再現できていることが確認された。

②IL-6 存在下における軟骨分化マーカー遺伝子の発現についての検討

次に IL-6 (100 ng/ml) 存在下におけるこれら軟骨分化マーカー遺伝子の発現について検討した。

その結果、type II collagen mRNA の発現は、Day 6, 10 において有意に抑制され、aggrecan mRNA の発現は、Day 6 において有意に抑制された ($p < 0.05$)。さらに type X collagen mRNA の発現は、Day 10, 14 において有意に抑制された ($p < 0.05$)。IL-6 がつねに流血中に検出される病態では、盛んに軟骨内骨化がすすんでいる小児において、その軟骨内骨化が抑制され、IL-6 が直接に骨化不全、骨粗鬆症が進行するのを司っている可能性が窺われた。

③マウス抗 IL-6 受容体抗体である MR16-1 を用いた blocking test

ついで IL-6 の直接作用であることを確かめるために、マウス抗 IL-6 受容体抗体である MR16-1 を用いた blocking test を行った。MR16-1 は濃度依存性に IL-6 の作用を中和し、これに伴い各々の遺伝子の発現は回復した ($p < 0.05$)。

以上より、IL-6 が ATDC5 細胞の軟骨内骨化

における前軟骨細胞から軟骨細胞への分化を再び抑制することが明らかとなった。

4. 研究成果

これまでの報告では、IL-6 には成長板軟骨細胞に対する直接的な作用はなく、慢性炎症では、IL-6 は GH/IGF-1 を介する全身的なメカニズムによって成長に影響を与えると考えられていた。しかし本研究の結果から、IL-6 が成長軟骨板における前軟骨細胞から、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞への初期の分化を直接的に抑制することが推察され、このことは抗 IL-6 レセプター抗体 (トシリズマブ) による炎症抑制により、成長が回復し骨粗鬆症が改善した臨床試験の結果とも符合する所見であった。

またマウス抗 IL-6 受容体抗体 (MR16-1) を使用した blocking test の結果から、抗 IL-6 受容体抗体療法が、成長軟骨板における軟骨内骨化の回復に寄与していることが裏付けられた。

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 1 件)

- ①Shoko Nakajima, Takuya Naruto, Takako Miyamae, Tomoyuki Imagawa, Masaaki Mori, Shigeru Nishimaki, Shumpei Yokota .
Interleukin-6 inhibits early differentiation of ATDC5 chondrogenic progenitor cells.
Cytokine (CYTO-09-49R1) 2009 (accepted, in print), 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 雅亮 (MORI MASA AKI)

横浜市立大学附属市民総合医療センター・准教授

研究者番号：30254204

(2) 研究分担者

横田 俊平 (YOKOTA SHUMPEI)

横浜市立大学医学研究科・教授

研究者番号：10158363

今川 智之 (IMAGAWA TOMOYUKI)

横浜市立大学附属病院・准教授

研究者番号：20336548

成戸 卓也 (NARUTO TAKUYA)

横浜市立大学医学研究科・博士研究員

研究者番号：60438124

(3) 連携研究者

該当せず