

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08420

研究課題名(和文)炎症と骨吸収に関与するIL-34は関節リウマチの治療の標的分子となりうるのか？

研究課題名(英文) Could IL-34, which is involved in inflammation and bone resorption, be a target molecule for the treatment of rheumatoid arthritis?

研究代表者

永淵 裕子 (NAGAFUCHI, Hiroko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：80278001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症と骨吸収に関与するサイトカインであるInterleukin(IL)-34のRAの病態における役割を検討した。IL-34は変形性関節症(OA)に比べRA患者血清で有意に増加し、RA初代滑膜細胞の培養上清で自発的にIL-34を産生していた。RA線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)はIL-34の受容体であるCSF-1Rを発現し、IL-1,TNF 刺激でIL-34を産生した。RAFLSはIL-34刺激でIL-6を産生した。IL-1で刺激したRAFLS から産生されるIL-6は抗IL-34抗体、抗CSF-1R抗体で抑制された。RA患者においてIL-34が病態形成に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-34は慢性炎症と骨吸収に関与するサイトカインである一方で、肺がん患者や免疫チェックポイント阻害薬で治療抵抗性の獲得に関与するサイトカインであることが知られている。IL-34は肺がんでの治療標的になることも報告がある。今回研究者は関節リウマチ(RA)患者でIL-34が治療の標的となる可能性を明らかにした。担癌RA患者でのRA治療はガイドラインがなく、また免疫抑制剤は腫瘍免疫の抑制が懸念される。IL-34を標的にしたRA治療の開発は担癌RA患者でも有用である可能性があり、有意義な研究成果であったと考える。

研究成果の概要(英文)：Regulation of inflammation and bone destruction are important in the treatment of rheumatoid arthritis (RA).The role of Interleukin (IL)-34 is a cytokine involved in chronic inflammation and bone resorption. I investigated the role of IL-34 in the pathogenesis of RA. IL-34 was significantly increased in RA patient serum compared to osteoarthritis (OA) and spontaneously produced IL-34 in the culture supernatant of RA primary synovial cells. RA fibroblast-like synoviocytes (FLS) express CSF-1R, a receptor for IL-34, and produced IL-34 upon IL-1 and TNF stimulation; RAFLS produced IL-6 upon IL-34 stimulation; IL-6 produced by RAFLS stimulated with IL-1 was suppressed by anti-IL-34 and anti-CSF-1R antibodies The results indicate that IL-34 is involved in the pathogenesis of RA patients.IL-34 is a potential target for RA therapy.

研究分野：リウマチ・膠原病学

キーワード：IL-34 関節リウマチ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リウマチ性疾患では免疫異常と炎症がその病態形成に大きく関与している。炎症において多くの炎症性サイトカインや炎症性メディエーターが炎症の進展と収束に働く。近年、抗体医薬品開発の技術が進歩し、実際に関節リウマチ患者に投与できる抗体製剤(生物学的製剤)が次々と開発されて、臨床で大きな成果を上げている。しかし現在そのターゲット分子は Tumor necrosis factor(TNF) $\alpha$ 、IL-6、CD28-CD80,86 の相互作用の抑制に限られたものであり、これらの治療に抵抗性の症例もいまだ多く存在している。一方 JAK 阻害薬によって、シグナル伝達系を抑制することで、マルチなサイトカインの抑制が治療に役立つこともわかってきた。このため新たな炎症性サイトカインの関節リウマチの病態形成への解析をすすめることは治療応用へ直結する重要な研究になる。また骨粗鬆症治療薬であるデノスマブが関節リウマチの骨吸収を抑制する薬剤として新たに承認され、骨吸収の制御も関節リウマチの治療の重要な課題であることが認識されてきた。慢性炎症と骨吸収の両者に関与する IL-34 は関節リウマチの病態を阻止できる新たな標的分子であるのか? が本研究における学術的な問いである。

関節リウマチは慢性炎症性疾患でその病態形成に様々なサイトカインの関与が報告されている。滑膜炎による関節炎の増悪と滑膜による軟骨・骨破壊が病気の主座を占めており、関節リウマチの治療には炎症の制御と骨破壊の制御が重要である。Interleukin-34 (IL-34) は Colony-Stimulating Factor-1 Receptor (CSF-1R) (c-Fms)の第2リガンドとする分子量 80kDa の二量体蛋白である。CSF-1 と受容体を共有するがその作用は CSF-1 とは必ずしも同じではない。IL-34 は単球、マクロファージおよび破骨細胞の分化、増殖および生存を促進し、慢性炎症や骨吸収への関与が報告されており、関節リウマチにおける IL-34 の発現や機能を解析する研究は大変意義あるものと考えられる。

### 2. 研究の目的

IL-34 は単球、マクロファージおよび破骨細胞の分化、増殖および生存を促進し、慢性炎症や骨吸収への関与が報告されており、関節リウマチにおける IL-34 の発現や機能を解析する研究は大変意義あるものと考えられる。関節リウマチのヒト滑膜組織での病態に関わる IL-34 の役割はまだ十分にわかっていない。慢性炎症と骨吸収の両者に重要な IL-34 の関節リウマチの病態における役割を明らかにすることを目的に本研究を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 関節リウマチ滑膜組織由来の初代滑膜細胞培養上清中の IL-34 産生

関節リウマチ滑膜組織由来の初代滑膜細胞からの spontaneous な IL-34 産生を ELISA 法で測定する。

#### (2) 線維芽細胞様滑膜細胞培養上清中の IL-34 産生および影響を与える因子の解析

線維芽細胞様滑膜細胞培養上清中の spontaneous な IL-34 産生および TNF や IL-1 あるいはその中和抗体等の存在下での IL-34 産生を ELISA 法で測定する。

#### (3) 線維芽細胞様滑膜細胞のサイトカイン産生における IL-34 の影響

IL-34 存在あるいは非存在下で線維芽細胞様滑膜細胞を培養し、培養上清中の IL-6 産生に対する IL-34 作用を ELISA 法で検討する。

#### (4) サイトカインで刺激した線維芽細胞様滑膜細胞からの IL-6 産生に対する IL-34 阻害抗体による影響の検討

IL-1, IL1+TNF $\alpha$  刺激線維芽細胞様滑膜細胞培養系に IL-34 阻害抗体を添加し、培養上清中の IL-6 産生を調べた。

#### (5) 関節リウマチ患者血清中の IL-34 濃度の測定

現在、生物学的製剤の導入は疾患活動性の高い症例を選択し、一律に行われており、症例の特徴による選別が行われていないが、今後は治療の選択の指標となるマーカーが必要になると考える。そこで将来関節リウマチ患者において IL-34 をターゲットとする治療を行う妥当性を検討する際に患者血清中の IL-34 濃度を測定したデータは必要になってくる。患者血清 IL-34 濃度を ELISA 法で測定する。対照群として変形性関節症患者血清を用いる。

#### (6) 他のリウマチ性疾患患者や担癌患者での血清中の IL-34 濃度の測定

#### (7) 血清 IL-34 と血清 CRP・血沈との相関

### 4. 研究成果

(1)関節リウマチ滑膜組織由来の初代滑膜細胞培養上清中の IL-34 産生  
RA初代滑膜細胞の培養上清で IL-34 を測定した。IL-34 は  $4.96 \pm 3.78$  pg/ml、TNF は  $92.8 \pm 37.9$  pg/ml であった。RA 初代滑膜細胞は自発的に IL-34 を産生していた。

(2)線維芽細胞様滑膜細胞培養上清中の IL-34 産生および影響を与える因子の解析  
線維芽細胞様滑膜細胞は自発的に IL-34 を産生し、IL-1, TNFa 刺激により IL-34 産生は増加した (図 1 (a))。IL-1+TNFa 刺激は相乗効果があり、線維芽細胞様滑膜細胞からの IL-34 産生はさらに増加した (図 1 (b))。

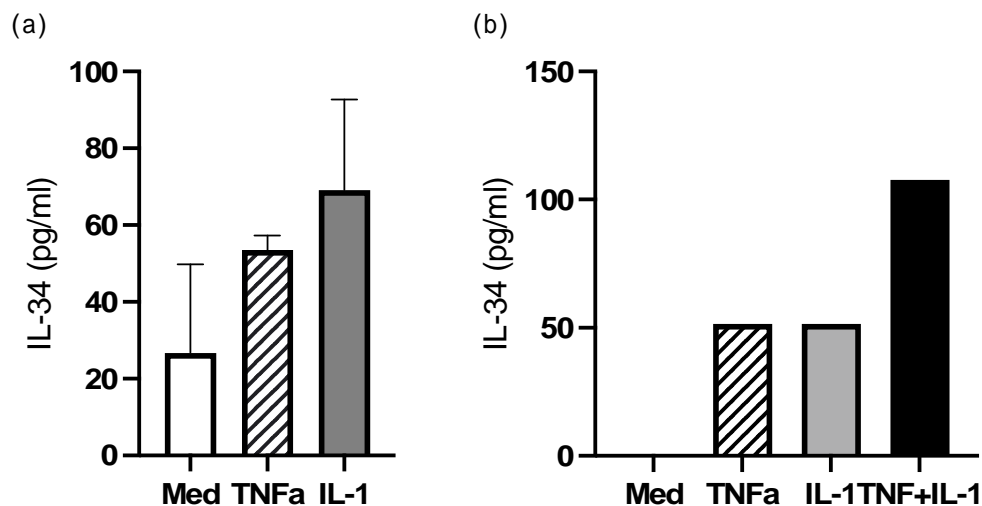


図 1 線維芽細胞様滑膜細胞からの IL-34 産生 (a)TNFa 刺激、IL-1 刺激による IL-34 産生 (b) TNFa 刺激、IL-1 刺激、TNFa+ IL-1 刺激による IL-34 産生

(3)線維芽細胞様滑膜細胞のサイトカイン産生における IL-34 の影響  
IL-34 刺激により線維芽細胞様滑膜細胞からの IL-6 産生が増加した。

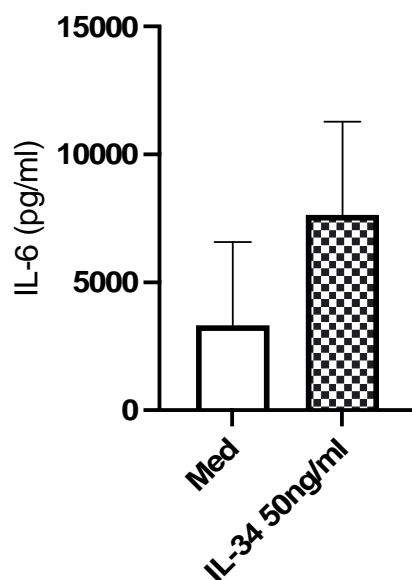


図 2 IL-34 刺激による線維芽細胞様滑膜細胞からの IL-6 産生

(4)サイトカインで刺激した線維芽細胞様滑膜細胞からの IL-6 産生に対する IL-34 阻害抗体による影響の検討

IL-1, IL1+TNFa 刺激線維芽細胞様滑膜細胞培養上清中の IL-6 産生は抗 IL-34 中和抗体および抗 CSF-1R 抗体の添加で抑制された。

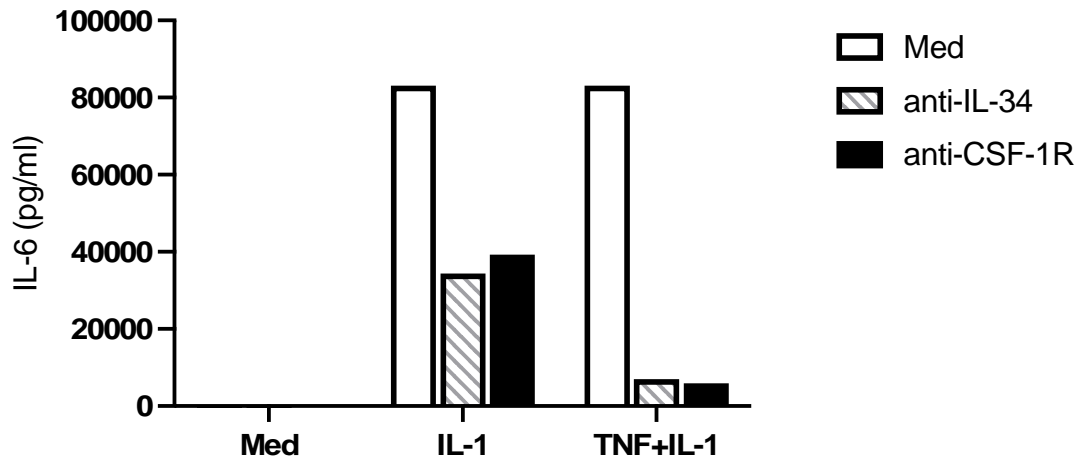


図3 IL-1, IL-1+TNF 刺激による線維芽細胞様滑膜細胞からの IL-6 産生に対する抗 IL-34 中和抗体および抗 CSF-1R 抗体の影響

(5) 関節リウマチ患者血清中の IL-34 濃度の測定

関節リウマチ (RA) 患者血清において自発的に IL-34 産生を認めた。対照群である変形性関節症 (OA) では血清 IL-34 産生は低下していた。(p=0.0001)

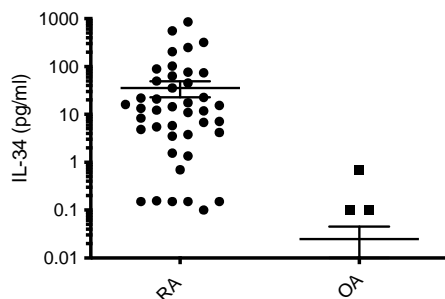


図4 関節リウマチ患者血清中の IL-34 産生の増加

(6) 他のリウマチ性疾患患者や担癌患者での血清中の IL-34 濃度の測定

RA 以外のリウマチ性疾患患者での血清 IL-34 の産生を検討した。一部の症例を除き IL-34 は RA のような産生は認められなかった。リウマチ性多発筋痛症 (PMR) 症例で IL-34 産生が認められなかった。PMR は高齢発症関節リウマチとの鑑別が困難なことが多く、血清 IL-34 は鑑別診断のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

PMR 手指こわばりを主訴に来院した肺癌患者では血清 IL-34 は 935.6pg/ml であった。結腸癌患者 1 例では血清 IL-34 は検出されなかった。担癌患者については今後さらに症例を蓄積する必要がある。

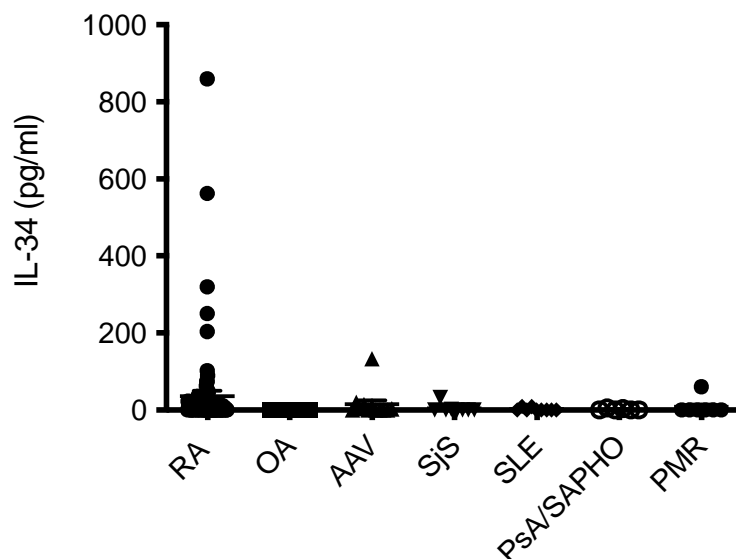


図5 他のリウマチ性疾患患者血清中の IL-34 産生 AAV: ANCA 関連血管炎, SjS: シェーグレン症候群, SLE: 全身性エリテマトーデス, PsA/SAPHO: 乾癬性関節炎/SAPHO 症候群, PMR: リウマチ性

## 多発筋痛症

### (7)血清 IL-34 と血清 CRP・血沈との相関

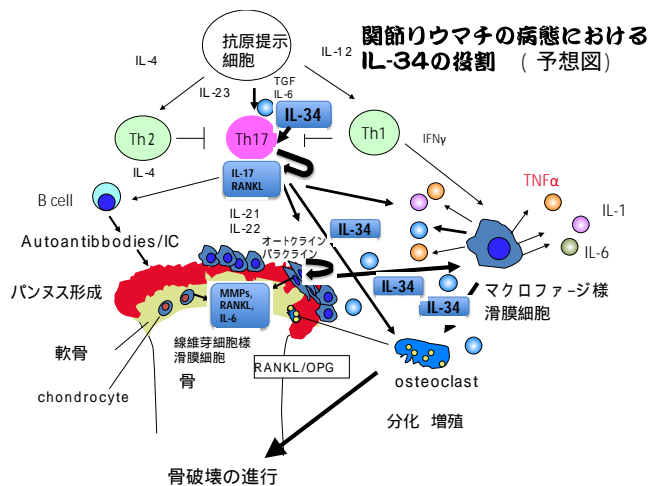
- 《症例 1》 39 歳女性 未治療 初診  
 血沈 13mm/h CRP<0.03, RF17 ACPA0.7  
 MRI,エコーで活動性滑膜炎  
 IL-34 73.70 pg/ml
- 《症例 2》 69 歳女性 未治療 初診  
 血沈 11mm/h CRP0.04 RF8 ACPA64.1  
 MRI で活動性滑膜炎  
 IL-34 11.10 pg/ml
- 《症例 3》 64 歳女性 生物学的製剤目的で紹介初診。RA 疾患活動性あり。  
 血沈 33mm/h CRP1.36 RF 未検 MTX-LPD の既往  
 IL-34 63.20 pg/ml

症例 1,2 のように炎症所見陰性で活動性滑膜炎のある症例に血清 IL-34 高値症例がある可能性はある。57 例の RA 患者での検討でも血清 IL-34 と血沈との間にも相関関係は認められなかった(相関係数: -0.01222)。RA・PMR・他の膠原病患者 23 例での検討の結果、血清 IL-34 と血清 CRP の間には相関関係は認められなかった(相関係数: -0.1217)。

このことから患者での血清 IL-34 は単なる炎症による増加ではなく、それぞれの疾患の病態に応じて IL-34 が変動していることがわかった。この他血清 IL-34 と RF や CCP 抗体との相関も認められなかった(data not shown)。

IL-34 は慢性炎症と骨吸収に關与するサイトカインである一方で、IL-34 は肺がんでの治療標的になることも報告がある。今回研究者は関節リウマチ患者で IL-34 が治療の標的となる可能性を明らかにした。免疫チェックポイント阻害薬に対する治療抵抗性の獲得した癌が IL-34 を産生することで治療抵抗性を獲得していることが報告され、IL-34 の抑制による癌の抑制効果の可能性が報告されている。担癌 RA 患者での RA 治療はガイドラインがなく、また免疫抑制剤は腫瘍免疫の抑制が懸念され、担癌状態での関節リウマチの治療は免疫抑制療法が十分に行えず、治療に難渋する症例があった。IL-34 をターゲットにする治療法はこれまでの免疫抑制剤とは異なり、悪性腫瘍増悪のリスクの少ない治療の開発につながる可能性が期待される。

IL-34 を標的にした RA 治療の開発は担癌 RA 患者でも有用である可能性があり、有意義な研究成果であったと考える。また腫瘍随伴症候群での関節炎出現の病態に IL-34 が關与している可能性もあり、今後さらに検討していきたい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagafuchi Hiroko, Goto Yutaka, Kiyokawa Tomofumi, Ooka Seido, Kawahata Kimito	4. 巻 41
2. 論文標題 Pregnancy outcomes in patients with rheumatoid arthritis who discontinue methotrexate treatment to conceive	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 669 ~ 675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10067-021-05985-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagafuchi Hiroko, Goto Yutaka, Suzuki Shotaro, Sakurai Keiichi, Imamura Mitsuru, Suzuki Takeshi, Yamasaki Yoshioki, Shibata Tomohiko, Kawahata Kimito	4. 巻 31
2. 論文標題 Rheumatoid arthritis relapse in patients with other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders and its treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1087 ~ 1093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2021.1879367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroko Nagafuchi, Yutaka Goto, Tomofumi Kiyokawa, Kimito Kawahata	4. 巻 -
2. 論文標題 Reasons for discontinuation of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis and challenges of methotrexate resumption: a single-center, retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Egyptian Rheumatology and Rehabilitation	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） 10.1186/s43166-022-00162-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永淵裕子、尾崎承一、川畑仁人
2. 発表標題 関節リウマチの病態形成におけるIL-34の役割
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------