

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591944

研究課題名（和文） DcR3 を介した滑膜増殖制御による関節リウマチ治療の検討

研究課題名（英文） Study for the treatment of rheumatoid arthritis by regulating synovial proliferation with DcR3.

研究代表者

三浦 靖史 (YASUSHI MIURA)

神戸大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：60346244

研究成果の概要（和文）：

我々は、TNF 受容体に属するおとり受容体である DcR3 が、単球・貪食細胞系細胞 THP-1 において Fas 誘導性アポトーシスを抑制するとともに、細胞接着分子 VLA4 の発現を促すことにより、シクロヘキシミド誘導アポトーシスを抑制することを明らかにした。また、関節リウマチ (RA) 患者の血清中 DcR3 が、健常者と比較して高値であることも明らかにした。さらに、DcR3 が炎症性サイトカインによる RA 滑膜線維芽細胞の増殖促進作用と細胞内 MAPK 活性化作用を、細胞表面の TL1A を受容体として抑制することを明らかにした。DcR3 は Fas リガンドのおとり受容体として細胞死を抑制して炎症の促進に作用するだけではなく、直接作用として細胞接着促進による細胞死抑制及び炎症性サイトカインによる細胞増殖の抑制作用といった多面的な作用機序により、RA の病態に深く関与していることを明らかにして、RA 治療ターゲットとしての DcR3 の重要性を解明した。

研究成果の概要（英文）：

We reported that decoy receptor 3 (DcR3), a member of TNF receptor superfamily, inhibits Fas-induced apoptosis in THP-1 monocyte/macrophage cells and that DcR3 increases VLA4 adhesion molecule in THP-1 inhibiting cycloheximide-induced apoptosis. We also reported that serum DcR3 is elevated in patients with RA. Further, we reported that DcR3 inhibits the proliferation of RA synovial cells induced by inflammatory cytokines and the activation of MAPK by using TL1A expressing on the cell surface as a receptor. DcR3 is deeply involved in the pathogenesis of RA by not only as a decoy receptor against Fas ligand, but also as a ligand to inhibit apoptosis by increasing cell adhesion and to inhibit cytokine-induced cell proliferation. We revealed that DcR3 is a possible treatment target of RA.

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	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：リウマチ病学

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis ;RA) は、膠原病のうち最も患者数の多い疾患であり、国内だけで約 70 万人の患者が存在する。RA の病変の主体をなす慢性滑膜炎により、発症数年以内に関節破壊が進行し、重篤な肢体障害を来す。そのため、患者の ADL や QOL は著しく低下し、社会的、経済的影響は甚大である。近年、炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  や IL-6 を抑制する生物学的製剤が登場し、RA の治療法は過去と比較して飛躍的に強力になった。しかし、サイトカインの抑制は、関節炎を抑制すると同時に、本来、生体防御に必要な免疫も抑制してしまうため、重篤な感染症や、悪性腫瘍の誘導が報告されている。そこで、免疫を抑制せず、関節炎のみを抑制する治療法の開発が期待されているが、関節炎を特異的に抑制するためには、異常増殖を起こしているリウマチ滑膜細胞の更なる病態の解明が不可欠である。

RA 滑膜細胞には、アポトーシスを誘導するデスドメインを持つデスレセプターの 1 つである Fas が過剰発現されている (Arthritis Rheum. 1995;38:485-491)。にもかかわらず、RA 滑膜細胞はアポトーシスに抵抗性を示し、それにより滑膜の異常増殖がもたらされると考えられている (Curr. Opin. Rheumatol. 2003;15:274-9)。抗 Fas 抗体を用いて Fas を介したアポトーシスを誘導することにより、SCID マウスに移植したリウマチ滑膜組織がアポトーシスに陥ったと報告されているが (J Rheumatol. 2002;29:1609-14)、関節炎に対する有効性は明らかでない。また、我々は、RA 滑膜細胞において、デスレセプターの 1 つである DR3 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドが、疾患特異的にメチル化をうけて、DR3 の発現が低下していることを報告している (Arthritis Rheum.;54:779-787,2006)。これらのことから、デスレセプターを介するアポトーシスの不良が、滑膜細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが示唆される。Fas リガンド、DR3 の特異的リガンドである TL1A、及び LIGHT の 3 つの TNF ファミリーに対する共通のデコイレセプターとして同定された Decoy receptor3(DcR3)は (J. Biol. Chem. 1999;274:13733-6)、さまざまな腫瘍細胞で過剰発現することにより、Fas 誘導性アポトーシスを抑制して異常増殖を誘導すると考えられている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000;97:1230-5)。一方、近年、DcR3 は、おとりレセプターとして機能するだけでなく、直接的な作用として、単球系細胞の破骨細胞への分化促進や (Cell Death Differ. 2004;Suppl 1:S97-107)、eparan sulfate proteoglycan への結合を介した樹状細胞へのアポトーシス誘導など

(Blood.2008;111:1480-8)の多面的な機能が明らかになりつつある。

我々は、RA における DcR3 の機能に着目し、TNF $\alpha$  の刺激により RA 滑膜線維芽細胞が DcR3 を過剰発現して、Fas 誘導アポトーシスに抵抗性を示すことを明らかにした (Arthritis Rheum. 56,1067-1075,2007)。さらに、DcR3 の特異的リガンドのひとつの TL1A が RA 患者血清中で高値であることが、ギリシャのグループから報告され (Clin. Immunol.2008 129:249-55)、DcR3 と RA との関連が、国外でも、注目を集めていることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

RA 滑膜は、DcR3 を過剰発現して増殖する腫瘍のような強い細胞増殖能を示すこと、Fas 誘導アポトーシスが RA 滑膜細胞では十分に生じていないこと、また、DcR3 はヒトで同定されているが、マウスなどの他の哺乳動物に存在せず、ヒトに種族特異的に発症する RA との関連が示唆されることから、我々は DcR3 と RA との関連に着目した。

DcR3 の制御を介して強い免疫抑制を伴わずに、滑膜細胞にアポトーシスを誘導して関節炎を抑制することは、副作用の少ない新たな RA 治療法の開発に役立つことが期待される。線維芽細胞様滑膜細胞について検討した我々の報告も含めて、DcR3 と RA との関連についてはまだ限られた報告しかないが、線維芽細胞様滑膜細胞とマクロファージ様滑膜細胞、浸潤リンパ球などの複数の細胞から構成される滑膜炎における DcR3 の機能の多くは不明であることから、本研究は、DcR3 の滑膜炎における多面的な役割を明らかにして、新治療法へ繋がる基礎データを確立することを目的とする。

具体的には、RA 滑膜を構成する線維芽細胞様滑膜細胞とマクロファージ様滑膜細胞それぞれにおける、DcR3 のアポトーシス抑制作用とリガンド作用を検討し、滑膜細胞の種類の違いが、DcR3 を介した増殖と Fas 誘導性アポトーシスに及ぼす相違について *in vitro* のレベルで明らかにするとともに、両者を共培養して、生体内に類似させた条件下での、DcR3 の発現と細胞増殖の変化を明らかにすることを目標とする。

## 3. 研究の方法

手術検体から分離した線維芽細胞様滑膜細胞ならびにマクロファージ様滑膜細胞、及び、マクロファージ系細胞株をそれぞれ培養し、DcR3 リコンビナントタンパクにより刺激を加え、Fas 誘導アポトーシスへの影響と、細胞増殖と分化誘導、シグナル伝達へのリガンド作用について、TUNEL 染色、PARP、カスパーゼのウェスタンブロット法による検出、分

化マーカー及び接着分子遺伝子発現の RT-PCR、Real-Time PCR、MAPK の活性化のウェスタンブロット法による検出により、それぞれ検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

##### ①マクロファージ系細胞に対する DcR3 の作用の解明

炎症性サイトカイン IL-6、TNF $\alpha$ 、TNF $\alpha$  + IL-6、LPS、PMA の各刺激により THP-1 細胞は分化したが、DcR3 の発現は PMA 刺激でのみ確認された。また PMA 刺激時のみ細胞の集合体が観察された。real-time PCR では DcR3-Fc 刺激により接着分子のうち VLA4 を構成する integrin  $\alpha$ 4 の発現のみがコントロールと比較して有意に増加していた。未分化の THP-1 細胞及び分化したマクロファージの双方で DcR3-Fc 及び PMA 刺激により細胞の集合体が形成された。IL-6、TNF $\alpha$ 、TNF $\alpha$  + IL-6、PMA、DcR3-Fc 刺激によりコントロールと比較してアポトーシス誘導に有意に抵抗性を示した。anti-VLA4 抗体で前処置を加えると PMA、DcR3-Fc 刺激を行っても細胞の集合体は形成されなかった。anti-VLA4 抗体の前処置は DcR3-Fc 刺激によるアポトーシス抑制作用と低下させた。

接着分子の内 VLA4 や VLA5 は、Fas 誘導性アポトーシスの抑制に関与しており RA 滑膜にも発現していること、THP-1 細胞から DcR3 が発現し、DcR3-Fc 刺激により integrin  $\alpha$ 4 が増加すること、また分化の状態に関わらず THP-1 細胞に DcR3 は細胞集合体形成を誘導しシクロヘキシミド誘導アポトーシスに抵抗性をもたらせたことから、我々は、DcR3 は VLA4 の発現を誘導することによって THP-1 細胞にアポトーシス抵抗性をもたらすというデコイレセプターとして Fas 誘導性アポトーシスを抑制している以外の、新しいアポトーシス抑制作用機序を明らかにした。

##### ②リウマチ滑膜線維芽細胞 (RA-FLS) の細胞増殖に対する DcR3 の直接作用の解明

DcR3 は単独では RA-FLS の細胞増殖に影響を与えなかったが、TNF $\alpha$  刺激による細胞増殖促進ならびに IL-1 $\beta$  刺激による細胞増殖促進を、それぞれ濃度依存性に部分的に抑制した。また、DcR3-Fc による抑制効果は抗 TL1A 抗体での細胞の前処置により消失した。

##### ③DcR3 の直接作用に対する RA-FLS 上の受容体の解明

元々 DcR3 のリガンドとして同定されている TNF ファミリーに属する Fas-L、LIGHT および TL1A の mRNA の RA-FLS における発現を Real-Time PCR 法で解析したところ、いずれの mRNA も発現を認めたが、その中で TL1A の発現が有意に高値を示した。次に、RA-FLS に対して DcR3-Fc で刺激を行ったところ、

p38MAPK のリン酸化と、ERK のリン酸化がそれぞれ促進され活性化が確認された。これらの活性促進は抗 TL1A 抗体で細胞を前処置することで消失した。

DcR3 は直接作用として炎症性サイトカインによる RA-FLS 増殖を部分抑制したこと、DcR3 は RA-FLS における MAPK と ERK 活性化を促進させること、さらにはこれらの作用が、RA-FLS の細胞表面に発現する TL1A を抗 TL1A 抗体でブロックすることにより消失することから、DcR3 は、RA-FLS に対しておとりレセプターとして Fas 誘導アポトーシスを抑制して RA-FLS の増殖を促進させるだけではなく、炎症性サイトカインによる細胞増殖誘導を、RA-FLS 上の膜結合型 TL1A をレセプターとして結合することにより炎症性サイトカインによる細胞増殖誘導をリガンド作用として部分抑制し、促進と抑制の両面から RA-FLS 増殖の調節に関与している可能性を示唆した。

##### ④RA 患者血清中の DcR3 発現の検討

RA 患者と健常者の血清中 DcR3 の発現を ELISA 法で検討したところ、RA 患者においては、健常者と比較して高値であることが明らかになった。

##### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

関節炎モデルであるコラーゲン誘導関節炎の関節液および関節の滑膜には TL1A の発現が亢進していること (J Immunol 2009;183(8):5350-7)に加えて、新たに DcR3 を体内で発現誘導することによってマウスモデル関節炎が抑制されることが報告された (J Rheumatol 2011;38(12):2522-35) が、in vivo での結果を裏付ける in vitro での研究報告は極めて限られている。本研究により、DcR3 と TL1A を介したシグナルが RA の病態形成に関わる複数の作用機序を示したことは、DcR3 や TL1A が自己免疫疾患に関わるメカニズムの解明に大いに今後役立つものと考えられる。

##### (3) 今後の展望

DcR3 のリガンドであり、受容体でもある TL1A は近年、RA の近縁疾患であるクローン病や乾癬の病態に関与していることが示唆されている。そのため、DcR3-TL1A シグナル系の解明を進めることは、RA のみならず、自己免疫疾患発症メカニズムそのものの解明に繋がることが期待される。本科研費による支援を今後の DcR3 及び TL1A に関する研究の発展につなげて行く所存である。

#### 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6件)

- ① Takahashi M, Miura Y, Hayashi S, Tateishi K, Fukuda K, Kurosaka M. DcR3-TL1A signalling inhibits cytokine-induced proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. (2011) Int. J. Mol. Med. 28(3):423-427 査読有り
- ② 高橋完靖、三浦靖史、林申也、福田康治、立石耕司、黒坂昌弘、分子レベルからみた整形外科疾患(シリーズ VIII) DcR3 と関節リウマチ. 整形・災害外科 54(6) 672-673, 2011 査読なし
- ③ Hayashi S, Nishiyama T, Miura Y, Fujishiro T, Kanzaki N, Hashimoto S, Matsumoto T, Kurosaka M, Kuroda R. DcR3 induces cell proliferation through MAPK signaling in chondrocytes of osteoarthritis. (2011) Osteoarthritis Cartilage. Epub 2011 Mar 17 査読有り
- ④ 三浦靖史、RA と TL1A. リウマチ科 44(2):212-218, 2010 査読なし
- ⑤ Hayashi S, Miura Y, Tateishi K, Takahashi M, Kurosaka M. Decoy receptor 3 is highly expressed in patients with rheumatoid arthritis. (2009) Mod Rheumatol. 20(1):63-68 査読有り
- ⑥ Tateishi K, Miura Y, Hayashi S, Takahashi M, Kurosaka M. DcR3 protects THP-1 macrophages from apoptosis by increasing integrin alpha4 (2009) Biochem Biophys Res Commun. 389:593-598、査読有り

[学会発表] (計9件)

- ① 高橋完靖、三浦靖史他、DcR3 は TL1A を介してサイトカインによるリウマチ滑膜細胞の増殖を抑制する、第 55 回日本リウマチ学会学術総会、2011 年 7 月 19 日、神戸
- ② 福田康治、三浦靖史他、関節リウマチ滑膜細胞における TL1A と DcR3 の発現に関する検討、第 55 回日本リウマチ学会学術総会、2011 年 7 月 19 日、神戸
- ③ 高橋完靖、三浦靖史他、TL1A expressed on the rheumatoid fibroblast-like synoviosytes mediates signalling induced by DcR3.、74th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology、2010. 11. 8、アトランタ
- ④ 高橋完靖、三浦靖史他、DcR3 はサイトカインによるリウマチ滑膜細胞の増殖を抑制する、第 54 回日本リウマチ学会、2010 年 4 月 24 日、神戸
- ⑤ 立石耕司、三浦靖史他、DcR3 protects THP-1 macrophages from apoptosis by increasing integrin  $\alpha$  4、56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society、2010. 3. 6-9、ニューオリンズ
- ⑥ 立石耕司、三浦靖史他、マクロファージ系

細胞におけるデコイレセプターDcR3 の機能解析、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009 年 11 月 5 日、静岡

⑦ 高橋完靖、三浦靖史他、DcR3 は Fas-L を介してサイトカインによるリウマチ滑膜細胞増殖を抑制する、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009 年 11 月 5 日、静岡

⑧ 立石耕司、三浦靖史他、デコイレセプター DcR3 は THP-1 マクロファージのアポトーシスを阻害する、第 53 回日本リウマチ学会学術総会、2009 年 4 月 25 日、東京

⑨ 高橋完靖、三浦靖史他、Fas-L を介してのリウマチ滑膜線維芽細胞に対する DcR3 の増殖抑制作用の検討、第 53 回日本リウマチ学会学術総会、2009 年 4 月 25 日、東京

[図書] (計1件)

① 三浦靖史、診断と治療社、一般社団法人日本リウマチ学会生涯教育委員会・財団法人日本リウマチ財団教育研修委員会編集リウマチ病学テキスト、2011、425-427

[その他]

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 靖史 (YASUSHI MIURA)  
神戸大学・大学院保健学研究科・准教授  
研究者番号：60346244

(2) 研究協力者

立石 耕司  
高橋 完靖  
福田 康治  
林 申也