

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592233

研究課題名(和文) 自然免疫を制御するToll様受容体シグナルによる骨軟骨破壊機序の解明

研究課題名(英文) Toll-like receptors signal-induced bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis

研究代表者

中島 新 (NAKAJIMA, Arata)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：60583995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)滑膜組織におけるToll様受容体(TLR)の免疫組織学的検討ではTLR-2、-4の発現を認めたが、TLR-3、-7、-8、-9の明らかな発現は認められなかった。このためTLRシグナルによっても誘導される血中酸化ストレス(ROM)とRAの臨床検査パラメーターとの関連を検討した。RAおよび糖尿病(DM)患者の血中ROMの平均値はそれぞれ455.9、390.7 U.CARR(正常値<300 U.CARR)であり、RAにおいて有意に高かった($P < 0.001$)。多変量解析の結果、血中ROM値はCRP、DAS28-ESRと関連することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical analyses using synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis (RA) demonstrated that Toll-like receptor (TLR)-2 and -4 but not TLR-3, -7, -8, -9 were expressed in the RA synovium. Then, correlation between TLR signal-induced oxidative stress (ROM) and clinical parameters associated with RA were analyzed. The mean value of serum ROM in RA and diabetes mellitus (DM) patients was 455.9 and 390.7 U.CARR (normal values <300), respectively, and there was significant differences between the groups ($P < 0.001$). The multivariate analyses concluded that serum ROM values were significantly correlated with CRP and DAS28-ESR among the clinical parameters associated with RA.

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 免疫学

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis, RA)は原因不明の炎症性疾患であり、罹病率は世界総人口の約 0.5-1%といわれている。RA の特徴は進行性の四肢関節破壊であり、ひとたび関節破壊がおこると修復は困難であることから、病態の解明が急務である。RA の病因は、炎症の首座である滑膜組織にリンパ球(T, B 細胞)が多数浸潤していることから獲得免疫系の活性化と考えられている。中でも Th1, Th17 などのヘルパーT細胞を介した炎症誘発機序が現在有力であるが、いずれも病態を十分に説明しうるものではない。

一方、自然免疫は獲得免疫とは異なり、Toll様受容体(Toll-like receptor; TLR)を介して病原体に特異的な構成成分を認識し、炎症反応を制御している。自然免疫はマクロファージを中心とした免疫機構であり、リンパ球を中心とした獲得免疫とともに生体の感染防御機構に重要な役割を果たしている。TLRは病原体(細菌、ウイルス)由来の菌体膜成分や核酸などの外因性リガンド(非自己)を認識する他、細胞外基質の破綻によって生じるヒアルロン酸、ファイブロンネクチン断片などの内因性リガンド(自己)をも認識する。リガンド結合によって活性化されたTLRの下流では NF- κ B, interferon regulatory factor (IRF), caspase-1 が活性化され、炎症性サイトカインの発現誘導、抗ウイルス反応が惹起される。近年 TLR ファミリーは、細菌などの病原体以外に細胞外基質やアポトーシスに陥った細胞由来の核酸を認識して、炎症に関わる遺伝子発現を誘導することが明らかとなり、自己免疫疾患の新たな炎症メカニズムとして注目を浴びている。

現在、関節リウマチの治療では炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6 など)を標的とした生物学的製剤による関節破壊抑制を目指す治療が中心になりつつある。生物学的製剤の使用によってこれまでコントロール不良であった RA 患者のタイトコントロールが可能になってきたことは疑う余地も無い。しかしながら、生物学的製剤でコントロール良好とされても関節破壊が進行し、数年以内に手術に至る症例が少なからず存在するのが現状である。このことから、RAにおける関節破壊機序には獲得免疫系以外の免疫異常の可能性を考える必要があるのではないか? という疑問が生じ、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では RA 患者の関節手術時に得られる滑膜、関節軟骨、軟骨下骨を用いて、TLRシグナルの活性化による炎症誘発、骨軟骨破壊のメカニズムを組織、細胞レベルで解明し、RAに対してTLRを標的にした分子治療へと展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

また本研究を進めていく過程で、TLRシグナルが酸化ストレスを誘導し、炎症性サイト

カインと抗炎症性サイトカインのアンバランスを生じるとい興味深い知見が幾つか発表されたため、RA患者の血中酸化ストレスを測定し、患者背景、臨床データのどの項目と関連があるのかを明らかにすることを新たに研究目的に加えた。

3. 研究の方法

(1) RA 滑膜、関節軟骨および軟骨下骨における Toll-like receptor (TLR)の発現と局在

人工膝関節置換術時の手術標本(滑膜、関節軟骨、軟骨下骨)を固定、脱灰後、パラフィン切片を作成し、免疫組織学的に TLR-2, -3, -4, -7, -8, -9の局在を検討した。

(2) RA 滑膜線維芽細胞における TLR を介した関節破壊機序の検討

TLR-2, -4の合成リガンドであるペプチドグリカン(PGN)とリポポリサッカライド(LPS)で刺激し、細胞内シグナル伝達系の活性化をウェスタンブロットにて検討した。また TNF- α , IL-1, IL-17, IFN- γ などの炎症性サイトカインにて同様の刺激を行い、培養上清中の MMP3 濃度を測定した。

(3) RA 患者における血中酸化ストレスと関連する臨床的パラメーターの同定

2011年3月以降東邦大学医療センター佐倉病院受診歴のある関節リウマチ(RA)患者 152名と糖尿病(DM)患者 80名を対象とした。

各患者の血液サンプルを一度だけ用いて、血中酸化代謝産物の総称である ROM (reactive oxygen metabolites)を測定する d-ROM テスト(フリーラジカル解析装置, FRAS4, ウィスマー社)により解析した。血中 ROM 値と年齢、性別、体重、BMI、罹病期間、病期、リウマトイド因子、CRP、MMP3、eGFR(推定腎糸球体濾過量)、DAS28(ESR)、SDAI、CDAI、HAQ、MTX 用量、PSL 用量につき統計学的解析を行い、関連のある因子を同定した。

4. 研究成果

(1) 滑膜組織における TLR の免疫組織学的検討では TLR-2, -4の発現を認めしたが、TLR-3, -7, -8, -9の明らかな発現は認められなかった。これはウェスタンブロットでも同様の結果であった。

RA 患者由来の滑膜線維芽細胞からの MMP3 産生は IL-17 (100 ng/mL)単独による刺激では変化がなかったが、IFN- γ (1 ng/mL)との共刺激によって有意に増加した。一方、TNF- α (10 ng/mL)単独刺激では MMP3 産生は有意に増加したが、IFN- γ との共刺激によってその増加は

キャンセルされた。IL-1 (10 ng/mL) 単独刺激では MMP3 は最も増加したが、TNF- α と異なり、IFN- γ との共刺激による増加のキャンセル効果は認められなかった (図 1)。

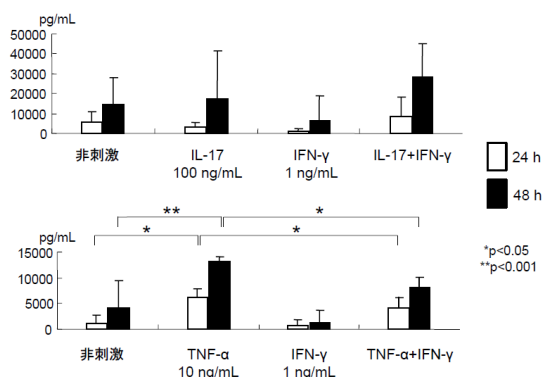


図 1 RA 滑膜線維芽細胞からの MMP3 産生

(2) RA および DM 患者の血中 ROM の平均値はそれぞれ 455.9, 390.7 U.CARR (正常値 < 300 U.CARR) であり、RA において有意に高かった ($P < 0.001$)。

血中 ROM 値は単変量解析において CRP ($r = 0.598$), DAS28(ESR) ($r = 0.553$), CDAI ($r = 0.412$) と有意な相関を認めた ($P < 0.01$) (図 2)。さらに多変量解析の結果、CRP, DAS28(ESR) が ROM と関連する因子として抽出され、重回帰式は、 $ROM = 290.58$ (定数) + $26.09 \times CRP$ + $48.44 \times DAS28(ESR)$ となった。

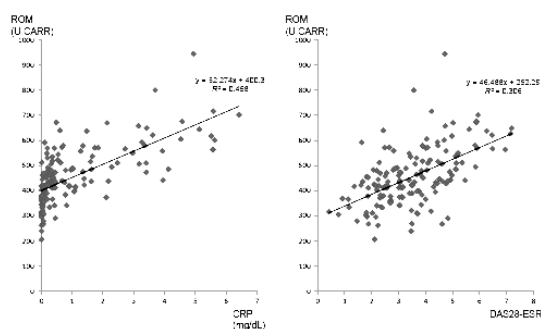


図 2 血中 ROM と CRP, DAS28(ESR) との相関

(3) RA 滑膜組織において TLR-2, -4 の発現を認めたが他の TLR ファミリーの明らかな発現が認められなかったことから研究の方向性を修正した。滑膜線維芽細胞を用いた培養実験において IFN- γ が MMP3 産生に及ぼす効果が TNF- α と IL-17 に追加添加した場合とで異なっていた。このことは関節内において TNF- α 優位または IL-17 優位の環境では他のサイトカインが関節破壊または保護の相反する作用を示すことを示唆しており、炎症性サイトカインによる関節破壊制御機構を理解す

る上で非常に興味深い。患者から得られた組織を用いたこのような研究は国内外においても珍しく、今後 T 細胞あるいはマクロファージ由来のサイトカインに分類して関節破壊機序を明らかにしたいと考えている。

(4) RA 患者の血中酸化ストレスは CRP, DAS28(ESR) と強く相関することが分かった。関節リウマチの実臨床において炎症、関節破壊のパラメーターに使用されるものは CRP, MMP3 であるが、CRP は非特異的な炎症反応を検出すること、MMP3 はステロイドや腎機能の影響を受けやすいことが問題点として指摘されていた。データは示していないが、血中 ROM は MMP3, eGFR と有意な相関を認めず、この点において ROM は RA の炎症、疾患活動性評価に有用なパラメーターになると考えられる。血中酸化ストレスと疾患活動性との関連を指摘する報告は国内外でもまだそれほど多くはない。今後は治療経過における ROM 値の推移、治療薬による違いについても検討を加えていきたいと考えている。

また、酸化ストレスが関節内で発生しているのかを確認するために、滑膜線維芽細胞を用いて炎症性サイトカインによる刺激で細胞内に活性酸素種 (ROS, reactive oxygen species) を発生させる培養実験を考えている。現在 RA の治療薬として使用される頻度が多くなってきている生物学的製剤によって滑膜線維芽細胞内に発生する ROS が低下するかを検討する予定である。

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 5 件)

Nakajima A, Aoki Y, Shibata Y, Sonobe M, Terajima F, Takahashi H, Saito M, Taniguchi S, Yamada M, Nakagawa K. Identification of clinical parameters associated with serum oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. 2014 Mar 26. [Epub ahead of print] 査読有

Nakajima A, Aoki Y, Murakami M, Nakagawa K. Changes in joint gap balances between intra- and postoperation in total knee arthroplasty. Advances in Orthop. 2014. doi: 10.1155/2014/790806. 査読有

園部正人、中島 新、窪田綾子、中川晃一、勝呂 徹. 関節リウマチ患者の荷重関節に対するエタネルセプトの関節破壊抑制効果. 関節の外科 40 : 82-86, 2013. 査読有

Aoki Y, Yamagata M, Ikeda Y, Nakajima F, Nakajima A, Nakagawa K, Ohtori S, Inaoka T, Takahashi K. Failure of conservative treatment for thoracic spine fracture in ankylosing spondylitis: delayed neurological deficit due to spinal epidural hematoma. Mod Rheumatol. 23(5):1008-1012, 2013. doi: 10.1007/s10165-012-0726-6. 査読有

Nakajima A, Tsuge S, Aoki Y, Sonobe M, Shibata Y, Sasaki Y, Nakagawa K. Intra-articular giant heterotopic ossification following total knee arthroplasty for Charcot arthropathy. Case Rep Orthop. 2013. doi: 10.1155/2013/472378. 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

中島 新, 青木保親, 園部正人, 寺島史明, 高橋 宏, 齊藤雅彦, 谷口慎治, 山田 学, 後藤 憲一郎, 田原正道, 山中 一, 玉井 浩, 小林達也, 中川晃一. 関節リウマチ滑膜組織における IL-17、IFN- γ 、TNF- α の発現と関節破壊制御のメカニズム. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013.10.17, 幕張メッセ (千葉県)

中島 新, 青木保親, 園部正人, 寺島史明, 高橋 宏, 齊藤雅彦, 谷口慎治, 山田 学, 後藤 憲一郎, 田原正道, 山中 一, 玉井 浩, 小林達也, 中川晃一. 関節リウマチ患者における血中酸化ストレスの臨床的意義と滑膜線維芽細胞における活性酸素種(ROS)産生. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013.10.17 幕張メッセ (千葉県)

中島 新, 園部正人, 谷口慎治, 中川晃一. 生物学的製剤使用・非使用下における術後創傷遅延、感染症発生の検討. 第 42 回リウマチの外科研究会 2013.8.31, 名古屋国際会議場 (愛知県)

中島 新, 柴田孝史, 園部正人, 高橋 宏, 谷口慎治, 青木保親, 中川晃一. 関節リウマチの新たな疾患活動性指標としての血中酸化ストレスの意義. 第 86 回日本整形外科学会総会 2013.5.23 広島グリーンアリーナ (広島県)

谷口慎治, 中島 新, 青木保親, 園部正人, 柴田孝史, 中川晃一. 膝単関節炎で発症した関節リウマチ症例の検討. 第 57 回日本リウマチ学会総会学術集会 2013.4.18, 京都国際会議場 (京都府)

中島 新, 青木保親, 園部正人, 柴田孝史, 谷口慎治, 後藤憲一郎, 田原正道, 山中 一, 中川晃一. 関節リウマチ滑膜組織における IL-17、IFN- γ 、TNF- α の発現と関節破壊制御. 第 57 回日本リウマチ学会総会学術集会 2013.4.18, 京都国際会議場 (京都府)

中島 新, 園部正人, 柴田孝史, 谷口慎治, 青木保親, 中川晃一. 生物学的製剤による関節リウマチの大関節破壊抑制効果. 第 57 回日本リウマチ学会総会学術集会 2013.4.18, 京都国際会議場 (京都府)

〔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

中島 新 (NAKAJIMA, Arata)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号 : 6 0 5 8 3 9 9 5

(2) 研究分担者

中川 晃一 (NAKAGAWA, Koichi)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号 : 3 0 4 0 0 8 2 3

青木 保親 (AOKI, Yasuchika)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号 : 7 0 5 8 4 0 0 1

(3) 連携研究者 該当なし