科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　５　月　２２　日現在

機関番号：　１３３０１
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2012～2013
課題番号：　２４７９０９９５

研究課題名（和文）ケモカインによる関節炎の制御

研究課題名（英文）Effect of intra-articular injection of MCP-1 on arthritis

研究代表者
藤井　博（Fujii, Hiroshi）

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：２０５９６８９５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円、（間接経費）　　990,000円

研究成果の概要（和文）：関節炎自然発症マウス（IL-1ra-/-マウス）で、炎症性ケモカインレセプターであるCCR2遺伝子を欠損することで関節炎はむしろ増悪するため、CCR2のリガンドであるMCP-1投与することで関節炎が改善しないか検討した。MCP-1を100pg関節内に投与したところ関節炎はむしろ増悪し、関節内には好中球とマクロファージが増加した。高齢のCCR2を欠損した関節炎発症マウスの関節内サイトカイン、ケモカインタンパク濃度を測定したところ、IL-4、IL-10など抑制性のサイトカイン低下していた。

研究成果の概要（英文）：Previously, we reported that ablation of an inflammatory chemokine receptor, CCR2, led to aggravation of the arthritis of IL-1ra-/- mouse. We assume that MCP-1, the ligand of CCR2, may resolve the arthritis in IL-1ra-/- and injected repeatedly 100pg of MCP-1 into the joint of IL-1ra-/- mouse. Unexpectedly, more severe arthritis was observed after injection of MCP-1, accompanying severe accumulation of neutrophils and macrophages into the joint. Multiplex analysis of cytokine levels in the joint of mature IL-1ra-/-CCR2-/-mouse (20-week-old) revealed decreased levels of regulatory cytokines, such as IL-4 and IL-10, indicating regulatory roles of macrophages during late stage of arthritis. Collectively, CCR2+ macrophages may serve as pro-inflammatory during early stage and later, as anti-inflammatory during late stage of arthritis.

研究分野：　医歯薬学

科研費の分科・細目：　内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：　リウマチ学

１．研究開始当初の背景

RAの治療法としては、近年TNF-αをターゲットとした生物学的製剤の出現により、治療のパラダイム・シフトがもたらされた。しかしながらこれらの生物学的製剤も全員の患者に奏功するわけではないため、病態の解析結果に基づく、新たな治療法の開発が強く望まれている。RAにおいては、マクロファージはTNF-αやIL-1β、IL-6の主要な産生細胞であり、病態の中心的な働きをしていると考えられている。MCP-1は代表的な炎症性ケモカインであり、主にマクロファージが発現している。RA患者の関節内ではMCP-1濃度は高くなっており、実際にMCP-1と、そのレセプターであるCCR2の作用を阻害することでコラーゲン誘導関節炎（CIA）を始めとする動物モデルにおける関節炎が減弱することが知られていることから、その有用性が期待されている。これらの背景から我々はRAのモデルマウスであるIL-1ra欠損マウスに対し、CCR2遺伝子を欠損することで関節炎の改善効果がないか検討した。実験の結果、CCR2を欠損するとIL-1ra欠損マウスの関節炎はむしろ増悪した（下図：Arthritis Rheum 63: 96-106, 2011）。同様にコラーゲン誘導関節炎のモデルマウスにてCCR2をノックアウトすると、著明な関節炎の増悪が観察されており（J. Clin. Invest. 113:856-866, 2004）、また同モデルに対しCCR2に対する抗体を投与することでも関節炎は増悪したと報告されている（Arthritis Rheum 56: 2975-85, 2007）。これらの結果は、MCP-1-CCR2のシグナルが関節炎に対しむしろ保護的に働く可能性を示唆している。ケモカインの作用としては炎症細胞の遊走活性だけでなく、細胞増殖、分化、活性化など多様な機能を持つと考えられているため、ケモカインを投与することで関節炎が改善する可能性がある。

２．研究の目的

関節リウマチ（以下 RA）のモデルマウスである IL-1 レセプターアンタゴニスト(ra)欠損マウスを用いて、ケモカインである MCP-1 が関節炎に対する治療効果がないか検討する。MCP-1 は従来炎症性ケモカインとして知られているが、我々の研究結果を含め、関節炎においてむしろ保護的に働く可能性が報告されている。本研究では MCP-1 を IL-1ra 欠損マウスにおける関節炎に直接投与し、治療効果の有無を検討し、MCP-1 の RA に対する治療応用についての基礎的な知見を得ることを目的とする。

３．研究の方法

（1）　MCP-1 の関節内注射

12～16 週令の IL-1ra 欠損マウスに、週 2 回、合計 8 回 100pg の MCP-1 を PBS に溶解し関節内注射した。コントロール群には PBS を関節注射した。経時的に関節炎スコア、ノギスによる関節径測定、体重を測定し、16 週の時点で sacrifice し、関節標本を作成した

（2）　関節炎の評価

関節の肉眼的観察（関節炎スコア）---腫脹・発赤・強直により関節炎スコアを算定して、関節炎の程度を評価した。

（3）　組織学的検索

HE 染色

免疫染色による関節腔に浸潤してきた炎症細胞の種類の同定と算定

（4）　関節局所でのタンパク発現の検討

関節組織抽出液でのフローサイトメトリーによる炎症性及び制御性サイトカイン濃度の測定（TNF-α・IL-1α・IL-1β・IL-6・IFN-γ・IL-4・IL-10・TGF-βならびにケモカイン）

（5）　関節浸潤細胞からの炎症性サイトカインの産生の評価

関節組織抽出液より single cell suspension を作成し、CD11b+陽性細胞について細胞内染色 FCM にて IL-10 をはじめとするサイトカイン産生を評価した。

（6）　ヒト難治 RA におけるサイトカインの検討

基礎知識としてヒト関節リウマチにおいても関節炎増悪時のサイトカイン濃度の変化

を検討することが重要と考えられたため、ヒト関節リウマチに対して抗 TNFα阻害薬を投与後のサイトカイン変動をマルチプレックスで検討した。対象は ACR/EULAR 分類基準を満たし、アダリムマブ（ADA）投与を受けた RA 患者 11 名。有効例 5 例、一次無効例 3 例、二次無効例 3 例を検討した。ADA 投与後 56 日以内に DAS28(CRP)が 1.0 以上低下し、2.8 以下となった症例を有効と判断し、この条件を満たさない症例を一次無効と判断した。投与 56 日以後 DAS（CRP）が 3.2 以上となるか、前値より 1.0 以上の上昇を二次無効と判断した。有効例及び一次無効例について投与前、投与後 14 日、28 日、56 日以降のサイトカインを、二次無効例については二次無効となる直前、その後 28 日、56 日、84 日以降のサイトカインを flowcytomix 13plex にて検討した。

４．研究成果

IL-1ra-/-マウスの関節に MCP-1 を投与したところ関節炎スコアはむしろ増悪し、ノギスで測定した関節腫脹も増悪した。HE 染色においても、有意に MCP-1 投与群で骨破壊、軟骨破壊が増悪した。免疫染色にて MCP-1 投与群では関節内 F4/80 陽性マクロファージの増加が認められた。以前の研究結果と整合性が得られない結果であったため、まず FACS で関節内の CCR2 陽性細胞が何かを検討した。結果 CCR2 陽性細胞は 70%が Ly-6C+Ly-6G int マクロファージであり、15%が Ly-6C+Ly-6G high マクロファージ、CD11c+ DC と CD68+ synoviocyte が 6%程度であった。関節炎が増悪したのはマクロファージの増加が原因であると考え、検討をすすめた。MCP-1 100pg 関節内投与 12 時間後に sacrifice、関節組織より single cell suspension を作成し、FACS で検討した。この結果、MCP-1 投与後 12 時間で Ly-6C+Ly-6G+マクロファージ及び好中球が有意に増加していた。CCR2 を KO すると関節炎が増悪し、MCP-1 を投与しても関節炎はやはり増悪するという結果を説明するため、「MCP-1 で急性期に遊走されたマクロファージは M1 で、関節内で長くとどまると途中で M2 に変化し、IL-10 など抑制性のサイトカインを放出する」という仮説を立てた。まず、関節ホモジネートの複数項目のサイトカイン、ケモカインタンパク濃度を、関節炎の起きる 12 週から 20 週まで 4 週おきに測定したところ、IL-1ra-/-CCR2-/-マウスでは 20 週において IL-1ra-/-マウスに比べ、優位に IL-4、IL-10、IFN-γが低下していることが確認された。IL-10 は過剰な炎症反応の抑制や一連の免疫反応の終息に関与していると考えられているサイトカインであり、M2 マクロファージからも産生されることが知られている。このため IL-1ra-/-マウスにおいて IL-10 の産生細胞をフローサイトメトリーにて検討したが、関節内の CD11b 陽性細胞には IL-10 を産生する細胞は認められなかった。フローサイトメトリーの条件に問題があると考え、条件を変えて検討したが、IL-1ra-/-マウスの関節内細胞から IL-10 を産生する細胞を証明することはできなかった。IL-1ra-/-CCR2-/-マウスにおける関節炎の増悪の原因としては IL-10 の関与が強く疑われたため、今後の検討としてリンパ球からの IL-10 産生の可能性、マクロファージを MCP-1 で刺激した場合の IL-10 の産生などを検討している。

IL-10 の保護的な働きが示唆されたため、ヒト関節リウマチで同様の変化が認められるか検討するため、TNF 阻害薬投与後治療有効例、無効例で血中サイトカインの変動を検討した。無効例では有効例と比べ、投与 28 日以降で有意に INF-γ、IL-17A、IL-2、IL-5、TNF-α が高値であった。無効例では TNF 阻害薬投与後有意に IL-5、IL-1β、TNF-αの上昇が認められた。再発例においては IFN-

γ、IL-17A、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-13、TNF-αなどで上昇傾向が認められ、TNF 以外の炎症性サイトカインが代償して関節リウマチを増悪させた可能性が示唆された。IL-1ra-/-CCR2-/-マウスでは関節炎増悪症例で関節空内の IL-10 の低下が認められたが、ヒト高活動性 RA の血清サイトカインの評価では IL-10 の変化は認められなかった。

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）

〔学会発表〕（計　1　件）

藤井　博、藤澤　雄平、北田　欽也、鈴木　康倫、伊藤　清亮、水島　伊知郎、濱野　良子、山田　和徳、山岸　正和、川野　充弘，アダリムマブ投与有効例、無効例、再発例における血中サイトカイン濃度の変化，第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会，東京，Apr 24-26, 2014

６．研究組織
(1)研究代表者
藤井　博（FUJII HIROSHI）
金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：20596895