

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32651
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24791007
研究課題名(和文) 関節炎モデルマウスにおける Bv8 の役割の検討

研究課題名(英文) Role of Bv8 in rheumatoid arthritis

研究代表者

野田 健太郎 (Noda, Kentaro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30547914

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)： 関節リウマチ患者において末梢血白血球のBv8mRNAの発現を検討した。本研究で、関節リウマチ患者では末梢血白血球のBv8mRNAの発現が亢進し、関節炎の活動性が高い患者では発現が高い傾向があることが明らかになった。Bv8が関節炎の活動性のマーカーとなる可能性が示唆された。

関節炎モデルマウスにおいてBv8レセプターの発現を検討した。そして、Bv8に対する好中球、単球の遊走能を検討した。本研究で関節炎部でBv8レセプターが発現しており、Bv8が関節局所に作用している可能性があることが明らかとなった。また、Bv8が好中球を遊走させることにより関節炎を悪化させている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1) We studied the Bv8mRNA expression of leukocyte in the patient of rheumatoid arthritis(RA). Bv8mRNA expression was elevated in leukocyte of RA patients, especially in high disease activity patients, suggesting that Bv8 may be a marker of disease activity in RA patients.
2) We examined the expression of prokineticin receptor in collagen induced arthritis(CIA) mice and whether Bv8 recruits polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and monocytes in vitro and induces inflammatory arthritis in vivo. Prokineticin receptor 2(PKR2) mRNA expression was elevated in CIA mice. Bv8 recruited PMNs in vitro and induced neutrophil-driven inflammatory arthritis. Bv8 may have a previously unrecognised pathogenesis in RA by recruiting PMNs. Targeting Bv8 may provide a new therapeutic strategy to treat rheumatoid arthritis.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：関節リウマチ Bv8

1. 研究開始当初の背景

Bombina variegata peptide 8(Bv8)は Bombina variegata という蛙の皮膚の分泌物より単離された蛋白質である。Bv8は血管新生、腸管収縮、神経新生、サーカディアンリズム、ホルモン産生、痛みの閾値調節等、多様な機能を持っている。Ferraraらは、悪性腫瘍における血管新生に Bv8 が関与していることを報告した(Shojaei et al., Nature; 2009)。関節リウマチの炎症性滑膜においても血管新生が見られることより我々は、Bv8が関節リウマチの病態に関与している可能性に着目した。そして、世界で初めて関節炎部の滑膜、骨髄に Bv8 が発現していることを報告した(Kurosaka et al., BMC Musculoskeletal Disord.; 2009)。このことから、Bv8が関節リウマチの病態にどのように関与しているかを明らかにすることを目標とした。

2. 研究の目的

(1) 関節リウマチ患者において、末梢白血球中の mRNA の発現、血清中 Bv8 濃度を検討し、臨床症状との関連を検討する。

(2) 関節リウマチモデルマウスにて Bv8 のレセプターである PKR1、PKR2 の発現を検討する。

(3) 好中球と単球の Bv8 に対する遊走性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 関節リウマチ患者における末梢血中の Bv8 発現の検討

東京慈恵会医科大学附属病院リウマチ膠原病内科外来に通院中の患者のうちアメリカリウマチ学会、ヨーロッパリウマチ学会による関節リウマチ診断基準を満たした 20 才以上の成人患者より末梢血採血を施行し、白血球中の RNA を抽出し real-time PCR 法により Bv8 の発現を検討した。また、ELISA 法にて検体中の Bv8 濃度を測定した。コントロールとしてボランティアの健常人を対象とした。検体を採取した際、被検者のサーカディアンリズムを MEQ 質問表、気分障害の有無を SDS 質問表、疼痛を VAS、関節リウマチの疾患活動性を DAS28CRP で評価した。各臨床症状と Bv8 mRNA、Bv8 濃度との関連を検討した。

(2) 関節リウマチモデルマウスにおける Bv8 レセプター発現検討

① コラーゲン誘導性関節炎(CIA)マウスの作製：マウスは6週齢、雄の DBA/1j を使用した。同等量の 0.3%ウシ2型コラーゲンと完全 Freund's アジュバンドを用いてエマルジョンを作製した。作製したエマルジョンをマウスの尾根部に 100 μ l 皮内注射した(Day0)。Day 21 に完全 Freund's アジュバンドを不完全 Freund's アジュバンドに変えたエマルジョンを作製し、同様に注射した。コントロー

ルとして関節炎を誘導しない同週齢の正常マウスを使用した。

② Real-time PCR : Day28、35 CIA マウスの両側手関節、足関節を摘出し mRNA を抽出した。そして、cDNA に逆転写し Real-time PCR を行った。Day28、35 CIA マウスにおける PKR1、PKR2 mRNA の発現量をコントロールマウスと比較した。

③ 免疫染色 : Day35 CIA マウスの足関節を摘出し抗 PKR1 抗体、抗 PKR2 抗体を用いて免疫染色を行った。

(3) Bv8 に対する好中球と単球の遊走能の検討

① 健常者の末梢血から好中球と単球を比重遠心法で分離した。Recombinant Bv8 (r Bv8, 濃度 10^{-7} ~ 10^{-16} M) に対する好中球と単球の遊走能を Boyden chamber を用いて測定した。PBS を陰性コントロールに使用した。1 カラムあたり 400 倍視野、3 箇所を遊走した細胞数をカウントし、平均値を求めた。各濃度で遊走した細胞数の平均値/陰性コントロールで遊走した細胞数の平均値を計算し、その値を用いて各濃度に対する好中球、単球の遊走能を比較した。

② Bv8 誘導性関節炎モデルマウス : DBA/1j マウスを PBS 投与群と rBv8 (10^{-10} M) 投与群に分けた。PBS 投与群、Bv8 投与群ともに膝関節腔に 20 μ l の PBS または rBv8 (10^{-10} M) を注射した。同時に膝関節周囲径を測定した。PBS または rBv8 を投与した 24 時間後に同様な方法で膝関節周囲径を測定した。投与前と投与 24 時間後の膝関節周囲径の差を PBS 投与群と rBv8 投与群で比較した。

③ H&E 染色と免疫染色 : Bv8 誘導性関節炎モデルマウスでは、PBS または rBv8 投与後 24 時間後に膝関節からパラフィン切片を作製した。H&E 染色と好中球のマーカーである Gr-1/Ly6G と単球のマーカーである F4/80 を免疫染色した。染色された細胞数を PBS 投与群と Bv8 投与群で比較した。

4. 研究成果

(1) 関節リウマチ患者における末梢血中の Bv8 発現の検討

① 関節リウマチ患者における Bv8 mRNA の発現の検討

関節リウマチ患者 66 例、健常人対象者 24 例より末梢血を採取した。白血球中の Bv8 mRNA を realtime PCR 法にて測定したところ関節リウマチ群にて Bv8 mRNA の発現が高い傾向を認めた。特に DAS28CRP にて疾患活動性が高い群では Bv8 mRNA の発現が高い傾向を認めた。しかし、統計学的有意差は認めなかった(図 1)。関節リウマチ患者 4 例で tocilizumab 治療前後の末梢血 Bv8 mRNA の発現の推移を検討したところ 4 例中 3 例にて Bv8 mRNA の発現が低下していた(図 2)。

以上より関節リウマチ患者の白血球中 Bv8 mRNA の発現はコントロール群と比較し亢

進しており治療により低下する可能性があることが示唆された。

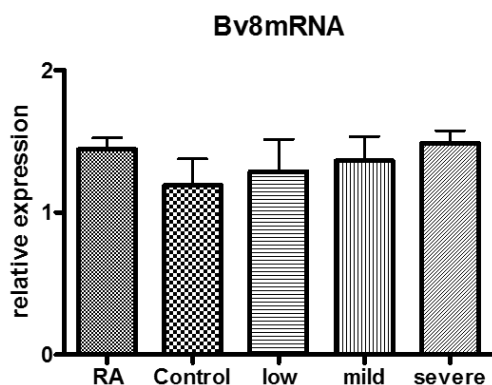


図1 関節リウマチ患者における Bv8mRNA の発現

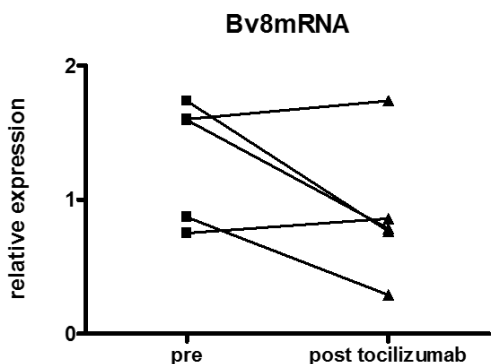


図2 関節リウマチ患者における治療前後の Bv8mRNA の発現の推移

②関節リウマチ患者における血清中 Bv8 濃度の検討

血清中 Bv8 濃度は関節リウマチ患者と健常人コントロールとで差はなかった。

関節リウマチ患者 1605±494.6pg/ml

健常人 1932±340.2pg/ml

本結果より関節リウマチ患者の血清中の Bv8 濃度は上昇しないことが明らかとなった。

③末梢血 Bv8mRNA と臨床症状の関連についての検討

関節リウマチ患者 66 例について VAS、SDS、MEQ、STAI と Bv8mRNA との発現との関連を検討した。関節リウマチ患者では有意に VAS が高値であった(図 3 A)。関節リウマチ患者では有意に抑うつ傾向が強かった(図 3 B)。サーカディアンリズムが夜型になる傾向があった(図 3 C)。しかし、Bv8mRNA との関連は認めなかった。

本結果より Bv8mRNA の発現と疾患活動性については関連する可能性があるが疼痛、サーカディアンリズム、抑うつ傾向とは関連しないことが明らかとなった。

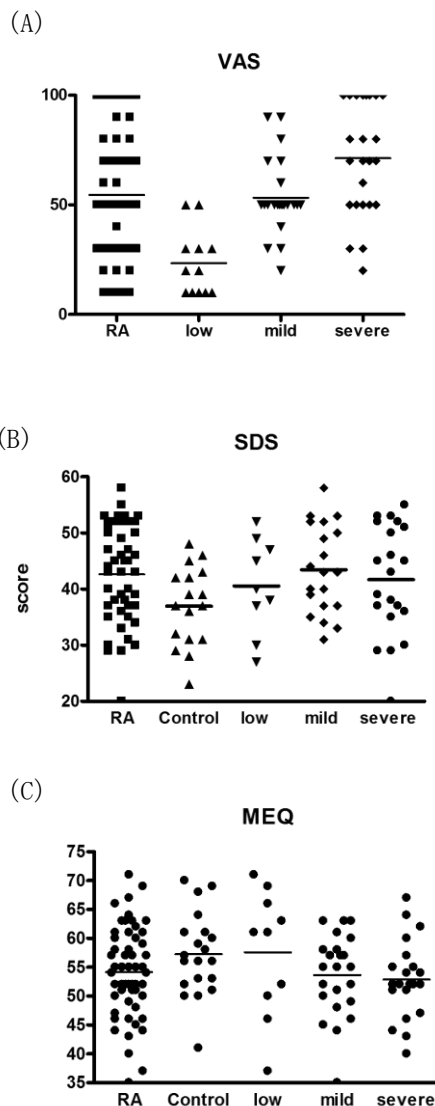
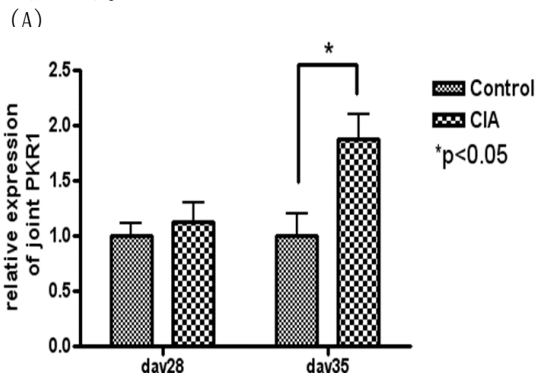


図3 関節リウマチ患者の疾患活動性による (A) VAS、(B) SDS、(C) MEQscore の分布

(2) 関節リウマチモデルマウスにおける Bv8 のレセプターの解析

①関節炎モデルマウスにおける PKR1、PKR2 mRNA の発現解析

CIA マウスにおいて PKR1mRNA の発現は day28 ではコントロール群と差はなかったが、day35 にて有意に亢進していた(図 4 A)。一方 PKR2mRNA は day28、35 共に発現が亢進していた(図 4B)。



(B)

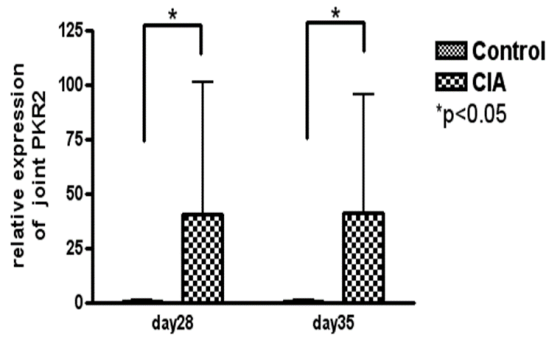


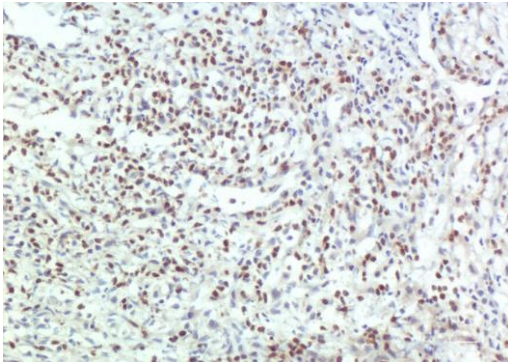
図4 CIA マウス day28、35 における PKR1、PKR2mRNA の発現

(A) PKR1mRNA の発現、(B) PKR2mRNA の発現

②CIA マウス関節炎部における PKR1、PKR2 免疫染色

CIA マウスにおいて PKR1 は関節炎滑膜に浸潤している好中球に発現していた (図 5 A)。一方 PKR2 は関節炎における増殖したマクロファージ様の滑膜細胞に発現していた (図 5 B)。以上より、CIA マウスにおいて関節炎部では PKR1、PKR2 が発現していることが明らかとなり、関節炎部にて増加している Bv8 が関節炎局所に作用していることが示唆された。

(A)



(B)

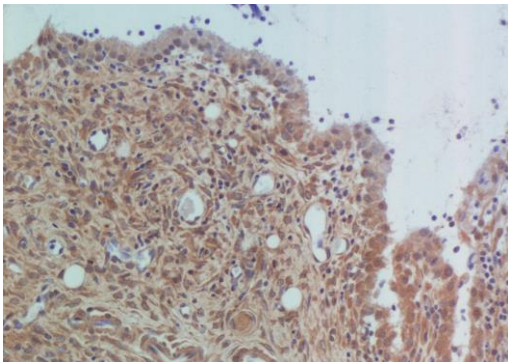


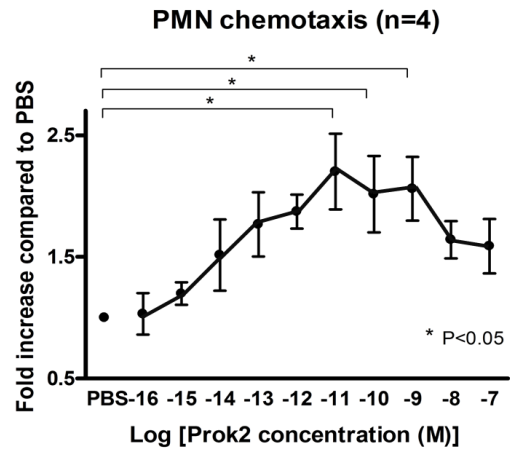
図5 CIA マウス関節炎滑膜における PKR1、PKR2 免疫染色 (A) PKR1、(B) PKR2

(3) Bv8 に対する好中球と単球の遊走能の検討

①in vitro における Bv8 に対する好中球と単球の遊走能の検討

rBv8 は、正常ヒト末梢血から分離した好中球を誘導したが、単球は誘導しなかった。好中球の遊走能は、陰性コントロールである PBS と比較して rBv8 10^{-9} - 10^{-11} M で有意に高くなっていた (図 6 A)。一方、単球の遊走能は、好中球と同様に rBv8 10^{-9} - 10^{-11} M で高くなる傾向があったが有意差は認められなかった (図 6 B)。

(A)



(B)

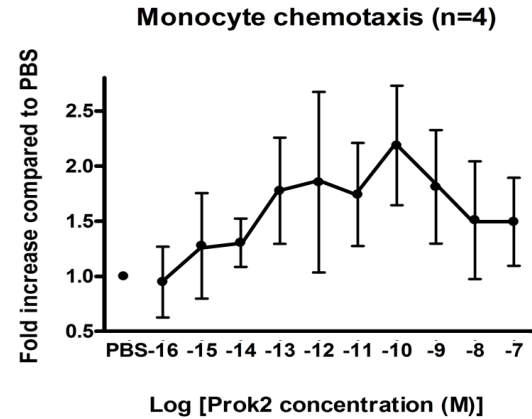


図6 in vitro における Bv8 に対する好中球、単球の遊走能の検討

(A) 好中球の遊走能、(B) 単球の遊走能

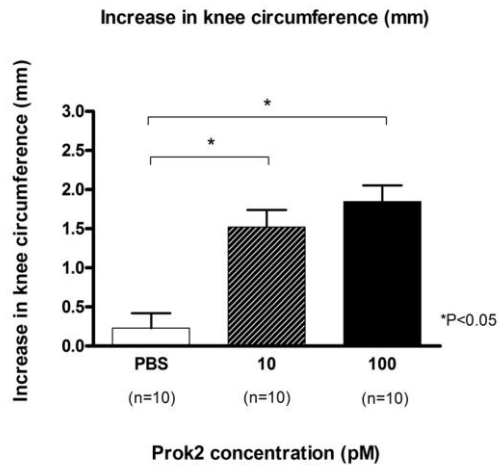
②in vivo における Bv8 に対する炎症細胞の遊走能の検討 (Bv8 誘導性関節炎モデルマウス)

rBv8 を膝関節腔に投与すると、炎症細胞が誘導され関節炎が発症した。投与前と投与後の膝関節周囲径の差は、PBS 投与群と比較して、rBv8 10 pM、100 pM で有意に増加していた (図 7 A)。rBv8 投与群の膝関節の H&E 染色では高度の炎症細胞浸潤を認めた (図 7 B)。rBv8 投与群の膝関節滑膜部に浸潤している

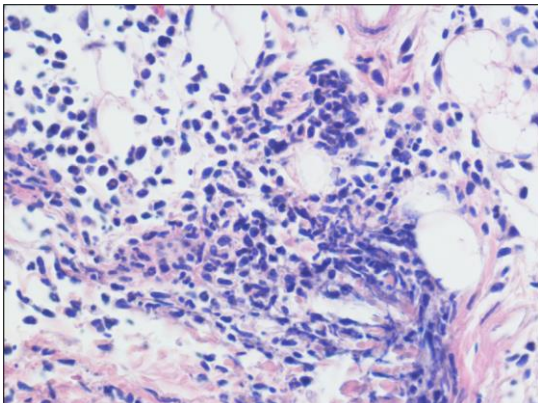
Gr-1/Ly6G 陽性細胞数は PBS 投与群と比較して有意に多かった(図 7C)。PBS 投与群と rBv8 投与群の膝関節滑膜部に浸潤している F4/80 陽性細胞数を比較すると両群に有意差はなかった(図 7D)。

以上より、Bv8 が in vitro、in vivo において好中球を局所に遊走させ、関節炎を惹起しうることが明らかになった。

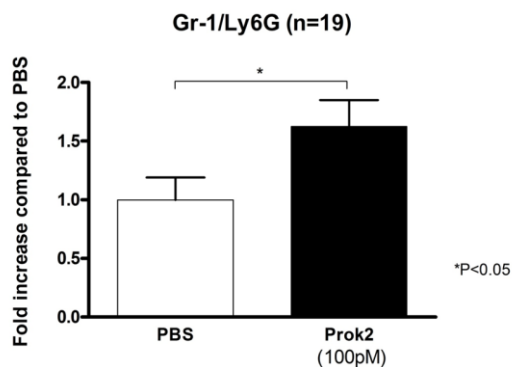
(A)



(B)



(C)



(D)

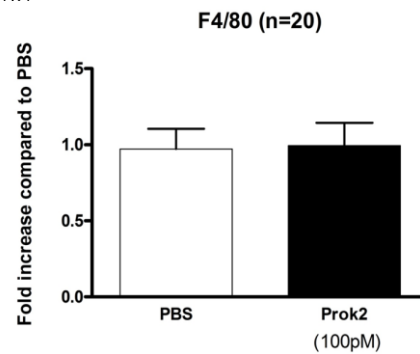


図 7 膝関節 Bv8 投与に対する炎症細胞の遊走の検討、(A)膝関節周囲径、(B)Bv8 投与群における膝関節の H&E 染色、(C)膝関節の Gr-1/Ly6G 陽性細胞数、(D)膝関節の F4/80 陽性細胞数

(4) 研究成果のまとめ

①関節リウマチ患者の白血球中 Bv8mRNA の発現はコントロール群と比較し亢進しており治療により低下する可能性があることが示唆された。

②CIA マウスにおいて関節炎部では PKR1、PKR2 が発現していることが明らかとなり、関節炎部にて増加している Bv8 が関節炎局所に作用していることが示唆された。

③Bv8 が in vitro、in vivo において好中球を局所に遊走させ、関節炎を惹起しうることが明らかになった。

以上より関節リウマチにおいて滑膜に発現している Bv8 は、関節炎滑膜に作用しており、好中球を遊走させることにより関節炎を悪化させている可能性があると考えられた。これらの結果は、Bv8 が関節リウマチの新たな病因となっている可能性があり、Bv8 が新たな治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ito H, Yoshida K, Noda K, Kurosaka D. Bombina variegata peptide8/prokineticin 2: a novel arthritis-inducible chemokine. American College of Rheumatology: S142, 2014. 11. 14, Boston
- ② 伊藤晴康, 吉田健, 野田健太郎, 黒坂大太郎 関節炎における Bombina variegata peptide8/Prokineticin2 の働き. 日本リウマチ学会総会・学術集会: 2015 年 4 月 23 日, 名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 健太郎 (KENTARO NODA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：30547914