

シンポジウム

神経—免疫—内分泌 膠原病とサイトカイン

東京女子医科大学 膠原病リウマチ痛風センター

ハラ マサ子

(受付 平成8年1月9日)

Cytokine in Collagen Diseases

Masako HARA

Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical College

Cytokine has an important role on the regulation of immune response and contribute to induction and perpetuation of collagen diseases, one of the autoimmune diseases. Systemic lupus erythematosus (SLE) characterized by various kinds of autoantibodies production. In vitro production of IL-1 and IL-2 by lymphocytes is decreased and IL-6 and IL-10 is increased. Increased expression of IL-6 receptor induce high responsiveness of SLE B cells to IL-6. Therefore B cells from SLE proliferate and differentiate into antibody producing cells and result in autoantibody production.

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammation of synovium. Lymphocytes and macrophages infiltrated in synovium and synovial cells themselves produce IL-1, IL-6, IL-8 and $TNF\alpha$, so called inflammatory cytokines. Synovial cells activated and proliferated by cytokines produce prostaglandin E2 and collagenase and induce chondrocyte destruction. Activated B cells produce rheumatoid factor, of which immune complexes enhance the inflammation. Neutrophils migrated by cytokines into joint space release lysosomal enzyme and activate lymphocytes. Furthermore metaroprotease produced by neutrophils affect on chondrocytes.

The mechanism of the production and regulation of these cytokines are most important to understand collagen diseases and treat them.

はじめに

サイトカインは免疫応答の調節に重要な役割を果たしており、免疫系が関与する疾患の病態にはその過剰産生や過少産生が深く関わっている。自己抗原に対する免疫反応にも重要な役割を果たすため、特に自己免疫疾患の発症やその持続に関与していると考えられる。自己免疫疾患の発症原因は未だ判明していないが、遺伝や環境因子を背景に、何らかの機序で活性化された T 細胞からサイトカインが放出され、標的細胞上に class II 抗原が発現し、抗原提示細胞の機能も発現し、自己反

応性の T 細胞が活性化される。産生されたサイトカインが B 細胞に働き抗体産生を促し、細胞障害性の T 細胞や NK 細胞に働けば直接細胞障害を起こす。サイトカインネットワークが起動して免疫系が一斉に活性化されて、自己免疫現象が起こると考えられている (図1)。

ここでは自己免疫疾患の代表として全身性エリテマトーデス (SLE)、慢性関節リウマチ (RA) についてサイトカインの病態への関与を自験例を中心に報告する。

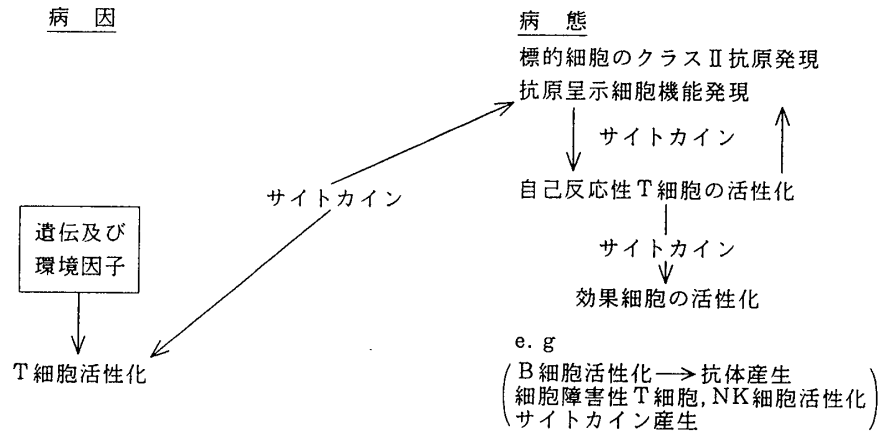


図1 自己免疫現象のメカニズム

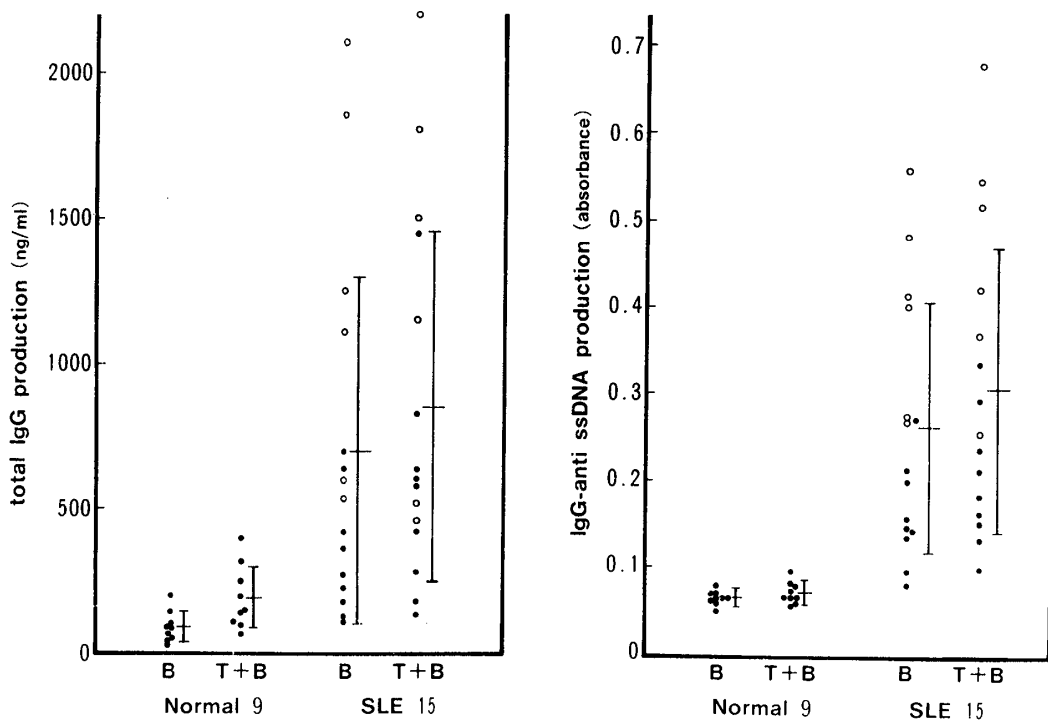


図2 リンパ球による抗体産生能

1. SLE

SLEは種々の自己抗体、特にDNA抗体を産生し、その抗原抗体免疫複合体が組織障害に働くIII型のアレルギーが主役となる病態である。

1) 抗体産生能

図2はリンパ球の抗体産生能を示す。末梢血リンパ球を分離し、無刺激で培養した上清中のIgG、およびDNA抗体をELISAで定量した。正常人、非活動期SLEに比べ、活動期SLEリンパ球は有意に高いIgG、DNA抗体を産生した。

2) サイトカイン産生能

B細胞の成熟、分化には種々のサイトカインが関わっている(図3)。B細胞の活性化にはIL-1, IL-2, IL-4が、分裂、増殖過程にはIL-2, IL-4, 抗体産生細胞への分化にはIL-5, IL-6が働く。そこでこれらのサイトカインの産生と反応性を調べた。SLE末梢リンパ球をPHAとともに72時間培養し、上清中のIL-1, IL-2産生量を定量した。IL-1は活動期SLEで正常人、非活動期SLEに比し有意に低く、IL-2は非活動期、活動期とも正常人より低かった(図4)。T細胞をPHAで刺激培養した上清中にはB細胞を抗体産生細胞に分化させ

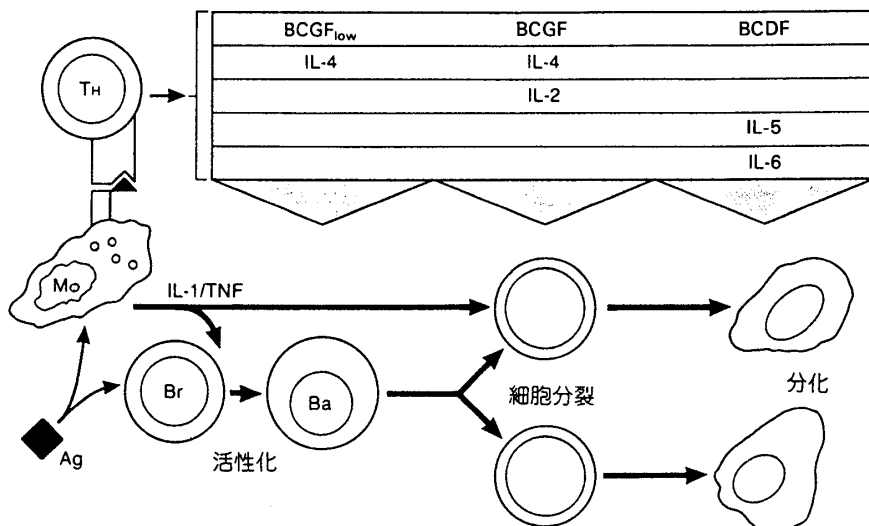


図3 ヒト B 細胞の成熟過程とサイトカイン

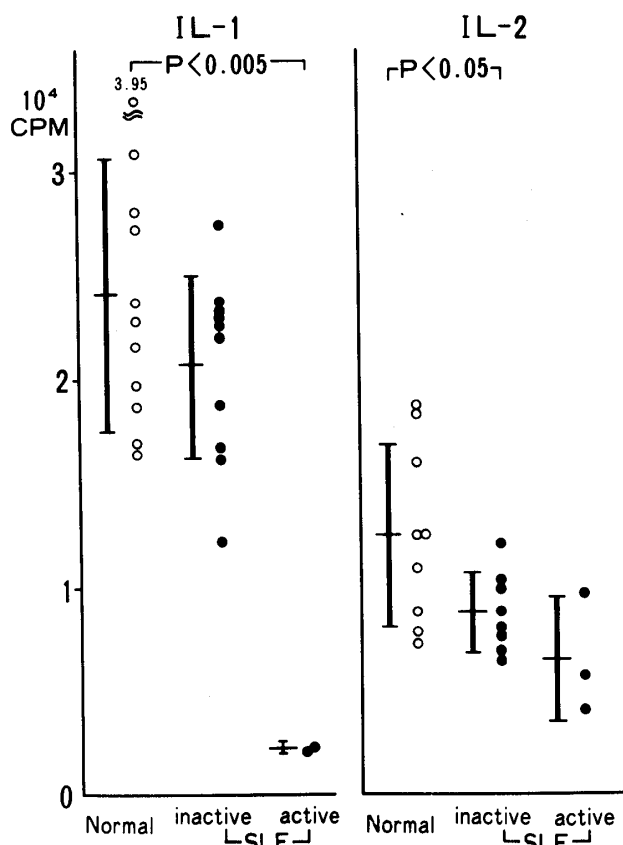


図4 リンパ球による IL-1, IL-2 産生能

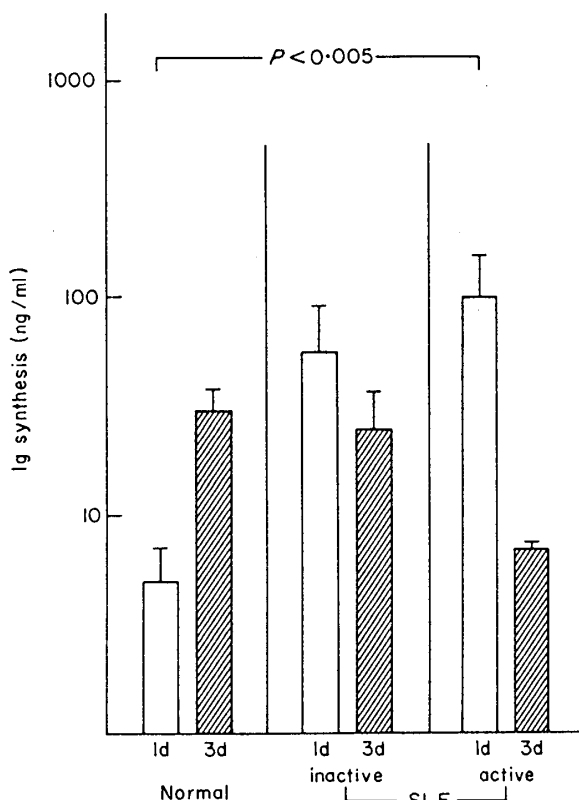


図5 SLET 細胞の BCDF 活性¹⁾

る BCDF 活性を有する。活動期 SLE では無刺激でもこの BCDF 活性が高かった¹⁾ (図 5)。

3) サイトカインに対する反応性

B 細胞は活性化されると大きくなって比重が軽くなる。この low density B 細胞を比重遠心法に

より分離し、IL-2, IL-4, IL-6 に対する反応性を IgG および IgG DNA 抗体産生量を指標に検討した。IL-2, IL-4, IL-6 刺激により SLE の low density B 細胞で high density B 細胞より高い IgG 産生がみられた²⁾。IL-6 抗体を作用させると無刺激の IgG 産生のみならず DNA 抗体価も低下し、

表1 サイトカインとその抗体のSLE由来末梢血B細胞に対する作用

	Percoll density fractionated cells	Cultured with cytokine	Antibody	Production of total IgG (ng/ml)	IgG anti-ssDNA (O.D.)	
Case 1	High density B cells	—	—	20	n.d.	
		rIL-2 (1U/ml)	—	30	n.d.	
		rIL-4 (100U/ml)	—	25	n.d.	
		rIL-6 (20U/ml)	—	35	n.d.	
	Low density B cells	—	—	380	0.549	
		rIL-2 (1U/ml)	—	175	0.336	
		rIL-4 (100U/ml)	—	740	0.231	
		rIL-6 (20U/ml)	—	1,300	0.669	
Case 2	High density B cells	—	control Ig (10 μ g/ml)	110	0.207	
		rIL-2 (1U/ml)	control Ig	90	0.181	
		rIL-4 (100U/ml)	control Ig	170	0.065	
		rIL-6 (20U/ml)	control Ig	200	0.217	
	Low density B cells	—	control Ig	840	0.337	
		rIL-2 (1U/ml)	control Ig	1,070	0.284	
		rIL-4 (100U/ml)	control Ig	1,030	0.126	
		rIL-6 (20U/ml)	control Ig	1,860	0.380	
		—	anti IL-2 (10 μ g/ml)	780	0.212	
		—	anti IL-6 (10 μ g/ml)	120	0.079	
		rIL-2 (1U/ml)	anti IL-6 (10 μ g/ml)	165	0.113	

(文献2より)

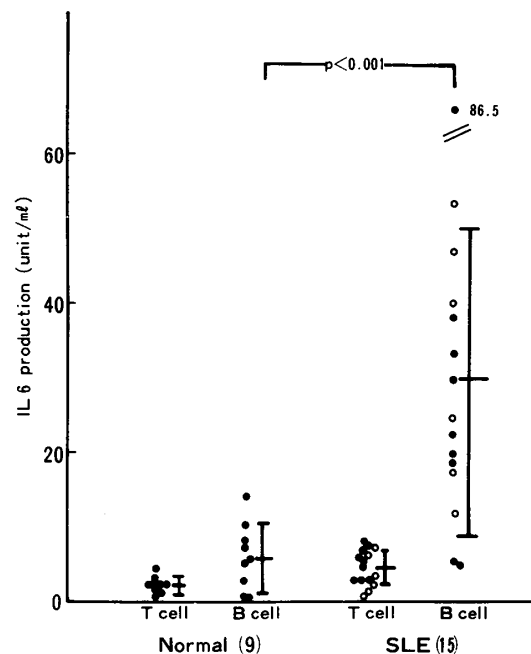
IL-2刺激で上昇した抗体産生も抑制した(表1)。

4) IL-6の役割

リンパ球によるIL-6産生能をT, B細胞に分離して検討した。SLE由来末梢血B細胞はT細胞より多くのIL-6を産生し、正常人B細胞より有意に高かった(図6)。そこでSLEリンパ球の培養系に抗IL-6抗体を加えたところIgGの産生は容量依存的に抑制された。またIgG抗ssDNA抗体の産生も同様に抑制された(図7)。

IL-6に対する反応性が高いことよりそのレセプターの発現をflow cytometerにて解析した。IL-6 receptor (IL-6R)の発現は活動期SLE B細胞、特にlow density B細胞で正常人より高かった(図8)。そこでIL-6R抗体を加えてリンパ球を培養し抗体産生量を測定した。活動期SLEリンパ球のIgG抗ssDNA抗体産生が容量依存的に抑制された(図9)。SLE B細胞ではIL-6がauto-crineに働き、抗体産生を増幅していると考えられる³⁾。

Llorenteら⁴⁾はSLEではIL-10に対する増殖反

図6 リンパ球によるIL-6産生³⁾

応が亢進しており、抗IL-10抗体でIgM, IgG, IgAの無刺激下の産生が抑制されると報告している。

従ってSLEではIL-1, IL-2の産生は低く、IL-6,

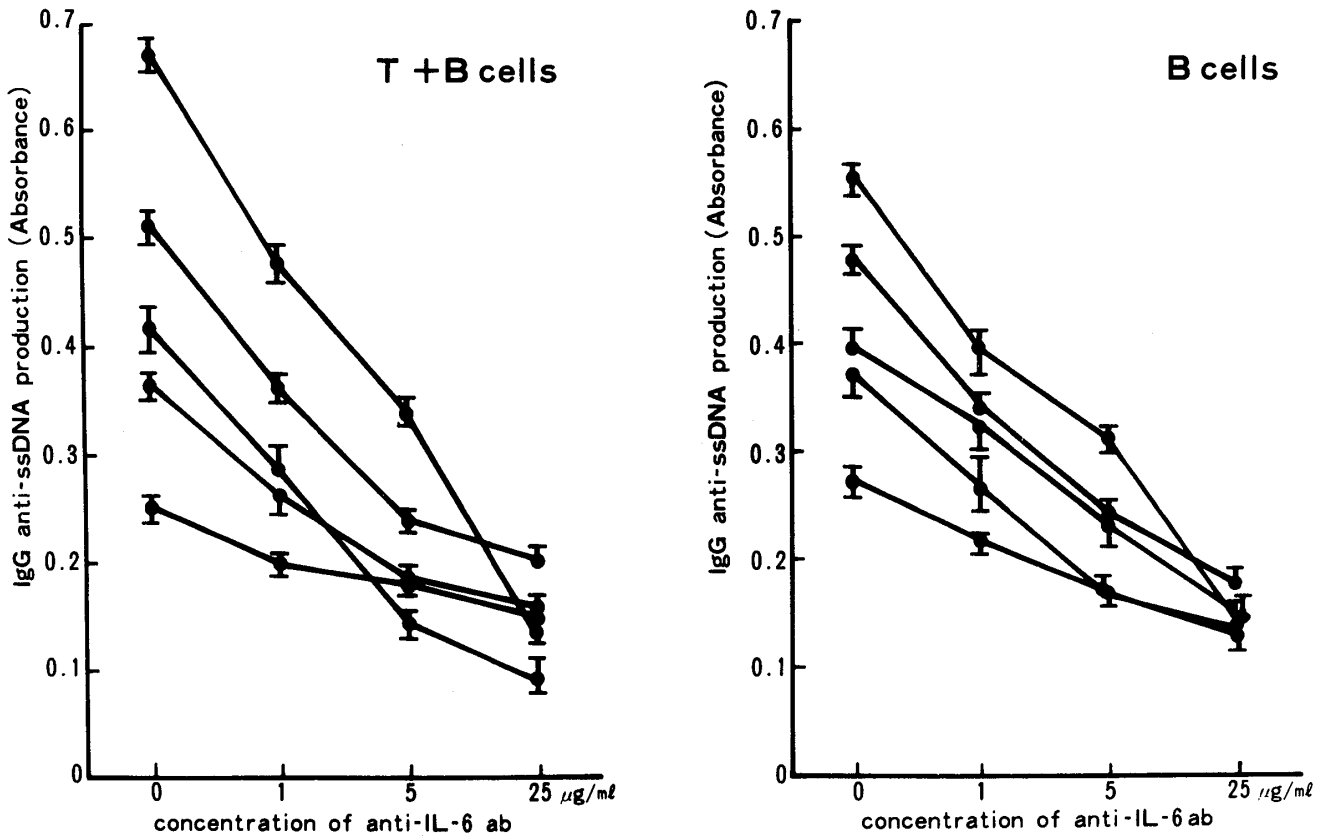


図7 DNA 抗体産生に対する抗 IL-6抗体の作用³⁾

IL-10の産生は高く、抗体産生系を主とする Th2 優位で、B 細胞は抗体産生細胞に向かって増殖、分化し、自己抗体が産生されるものと考えられる⁵⁾ (図10).

2. 慢性関節リウマチ

慢性関節リウマチ (RA) は関節滑膜の慢性炎症が主体の病気である。図11のように滑膜組織に何らかの機序で炎症が起こると、血管から炎症性細胞、初期はヘルパーT細胞、B細胞とマクロファージが浸潤し、いわゆるリンパ濾胞を形成する。滑膜細胞は増殖し、パンヌスを形成し血管が新生される。その結果軟骨、骨を破壊し、変形、機能障害に至る。

1) 関節液中のサイトカイン

関節液の中には表2のような種々のサイトカインが検出される。中でも IL-1, IL-6, IL-8, TNF は種々の炎症の主役をなし炎症性サイトカインと言われる。これら滑液のなかで認められたサイトカインは血管周辺に集簇している T 細胞やマクロファージは勿論、滑膜細胞自身によっても産生

表2 滑液中のサイトカイン

cytokine/inhivitor	cellular origin	present
IL-1 α	macrophage synovial cell	+
IL-1 β		
IL-1 inhibitor	macrophage	+
IL-2	T cell	+
IL-2 inhibitor	unknown	+
IL-3	T cells	-
IL-4	T cells	-
IL-6	T cells	+
	synovial cell endothelial cell	
IL-8	mononuclear cell	+
IFN α	macrophage	+/-
IFN β	fibroblast	+
	macrophage	
IFN γ	T cell	+/-
TNF α	macrophage	+
CSF1	macrophage	+
	fibroblast	
GMCSF	macrophage	+
	(T cell?)	
MCGF	unknown	+
MCGF inhibitor	unknown	+
PDGF A, B	unknown	+
TGF β	ubiquitous	+

(文献11より)

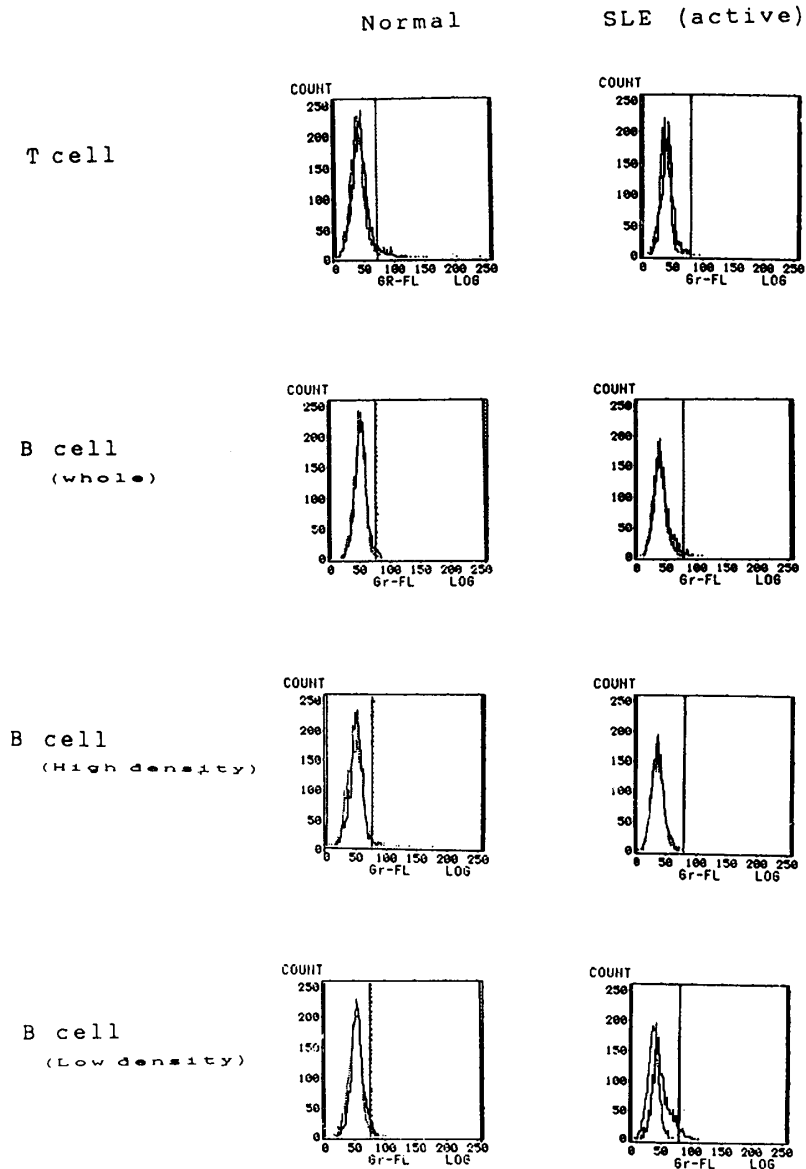


図8 SLEリンパ球におけるIL-6 receptorの発現³⁾

される^{6)~9)}。

2) 滑膜細胞によるサイトカインの産生

図12は滑膜組織をIL-1抗体で染めたものだが、表層細胞、血管内皮、血管周辺のマクロファージ、滑膜組織がIL-1を産生しているのがわかる。浸潤しているT細胞やマクロファージにより産生されたサイトカインにより、活性化された滑膜細胞自体もサイトカインを産生して、炎症過程が増幅されると考えられる。図13はRAの滑膜細胞を培養して産生されるサイトカインを定量したものである¹⁰⁾。マクロファージを遊走させるMCP-1も滑膜細胞により産生され、IL-1, IL-6, TNFの産生

量と比例した。

3) 血中サイトカイン

RA患者血中에서도IL-1 α , β , IL-6, IL-8, TNFが病初期高値を示している(図14)。

4) RAの病態とサイトカイン

RAの病態とサイトカインの関わりを表3にまとめた。初期の血管新生の過程では、TNF, FGF, PDGFなどの細胞増殖活性を有するgrowth factorが作用し、GM-CSFも局所で産生される。IL-8は血管新生やT細胞の浸潤に働く。好中球の浸潤にはIL-8, TGF β が、マクロファージの浸潤にはマクロファージ activating factorやTGF β ,

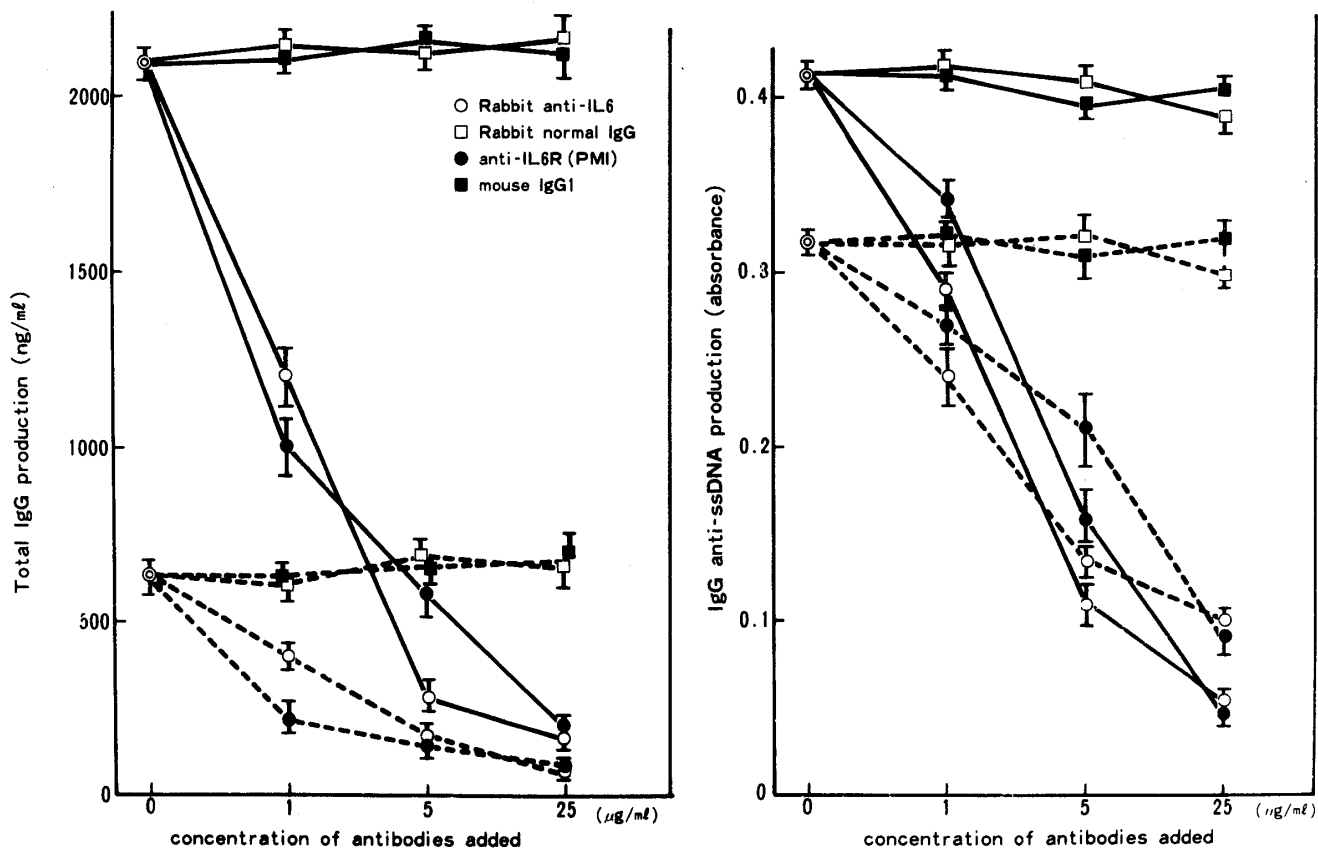


図9 抗IL-6 receptor抗体によるIgG抗ssDNA抗体産生の抑制³⁾

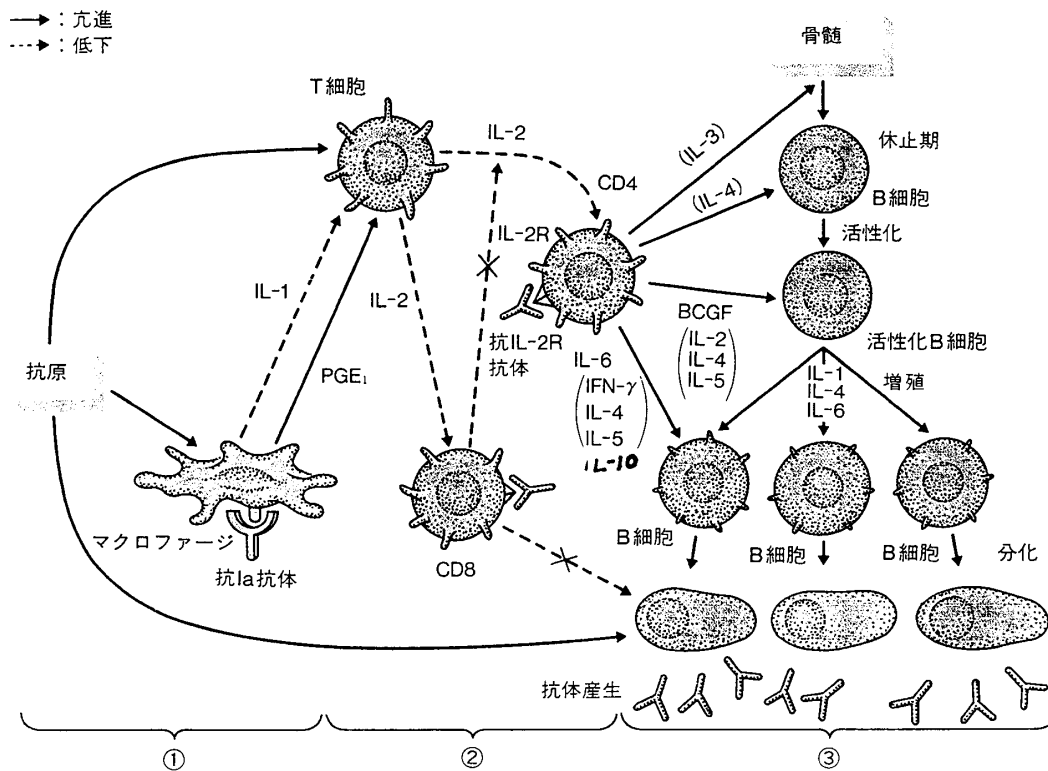


図10 SLEにおける免疫異常⁵⁾

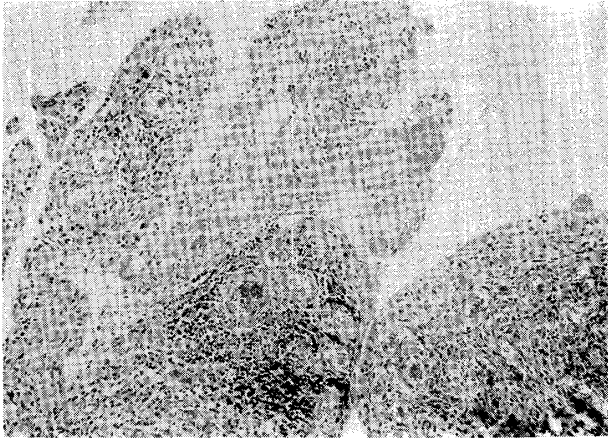


図11 慢性関節リウマチの滑膜組織

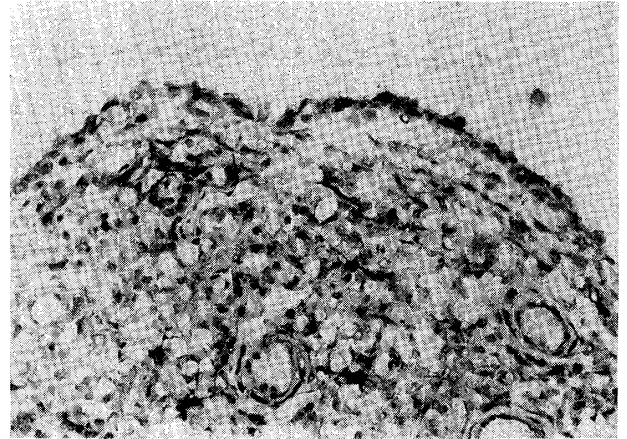


図12 滑膜組織による IL-1産生

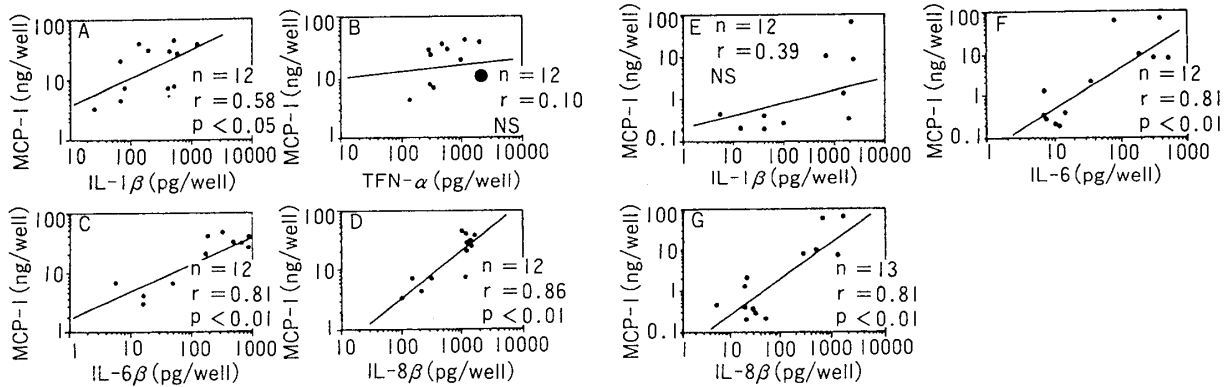


図13 RA 滑膜初代培養および RA 滑膜組織培養上清中のサイトカイン¹²⁾

RA 滑膜細胞 (A~D), 滑膜組織 (E~G) を48時間培養し, 上清中のサイトカインを測定した. 各グラフは MCP-1と他のサイトカインの相関を示している.

表3 RAの病態とサイトカイン

血管新生	TNF, FGF, TGF-β, GM-CSF, PDGF, IL-8
好中球浸潤	IL-8, TGF-β
T細胞浸潤	IL-8
マクロファージ浸潤	MCAF, TGF-β, GM-CSF, MCP-1
滑膜増殖	IL-1, TNF, TGF-β, PDGF, IFN-γ
軟骨破壊	IL-1, TNF, TGF-β, IL-6, IL-8
骨吸収	IL-1, TNF
抗体産生	IL-6, IL-2, IL-4

GM-CSFが作用する。滑膜の増殖にはIL-1, TNF, TGFβ, PDGF, IFNγが関与する。TNF, TGFβ, IL-1, IL-6, IL-8は軟骨破壊にも働く。RAの全ての病態にサイトカインが関わり, 関節内にサイトカインネットワークが生じる(図15)。何ら

かのきっかけで炎症が起こると血管から炎症性細胞が滑膜組織に浸潤する。増殖した血管内皮とそこに集まったマクロファージやT細胞から炎症

表4 サイトカイン制御

1) 抗サイトカイン療法	抗サイトカイン抗体 可溶性レセプター レセプターアンタゴニスト non-peptic antagonist mutated cytokine genetic modification
2) サイトカイン産生抑制	細胞内シグナル伝達阻害剤 転写因子の抑制 アンチセンス療法 抑制性サイトカイン(IL-4, IL-10, IL-13, TGF)

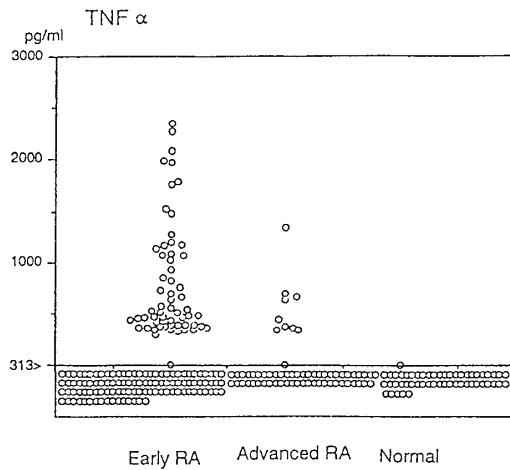
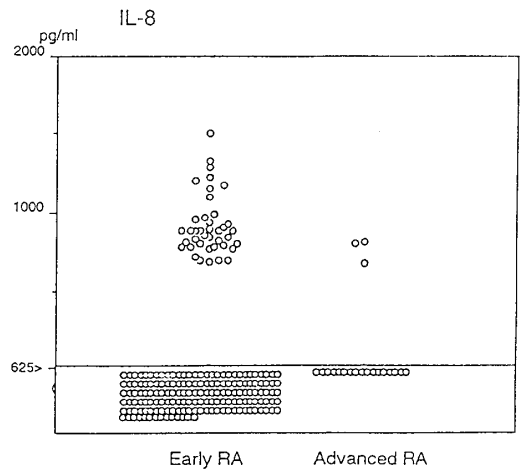
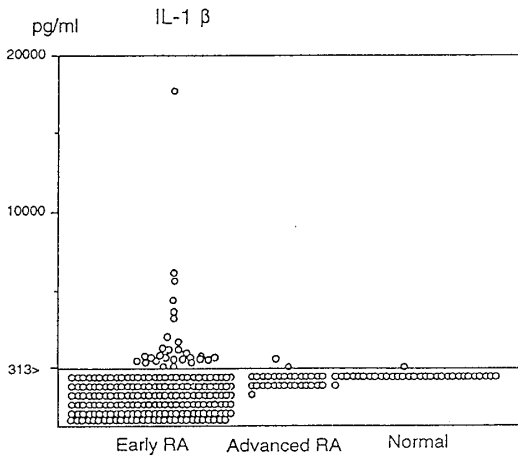
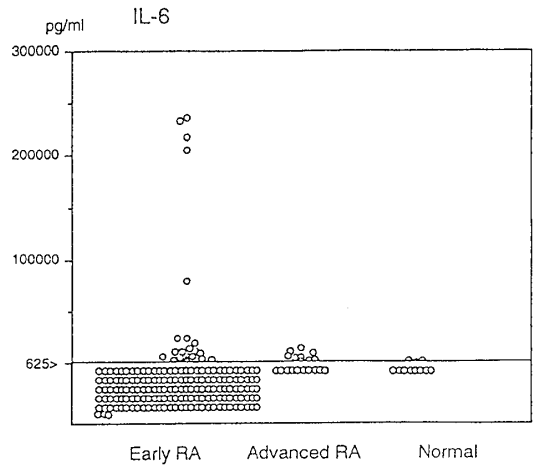
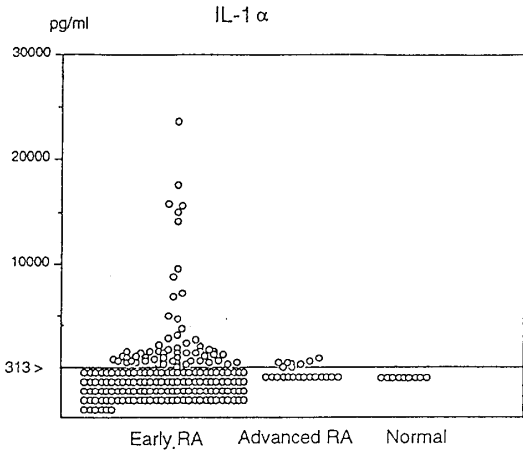
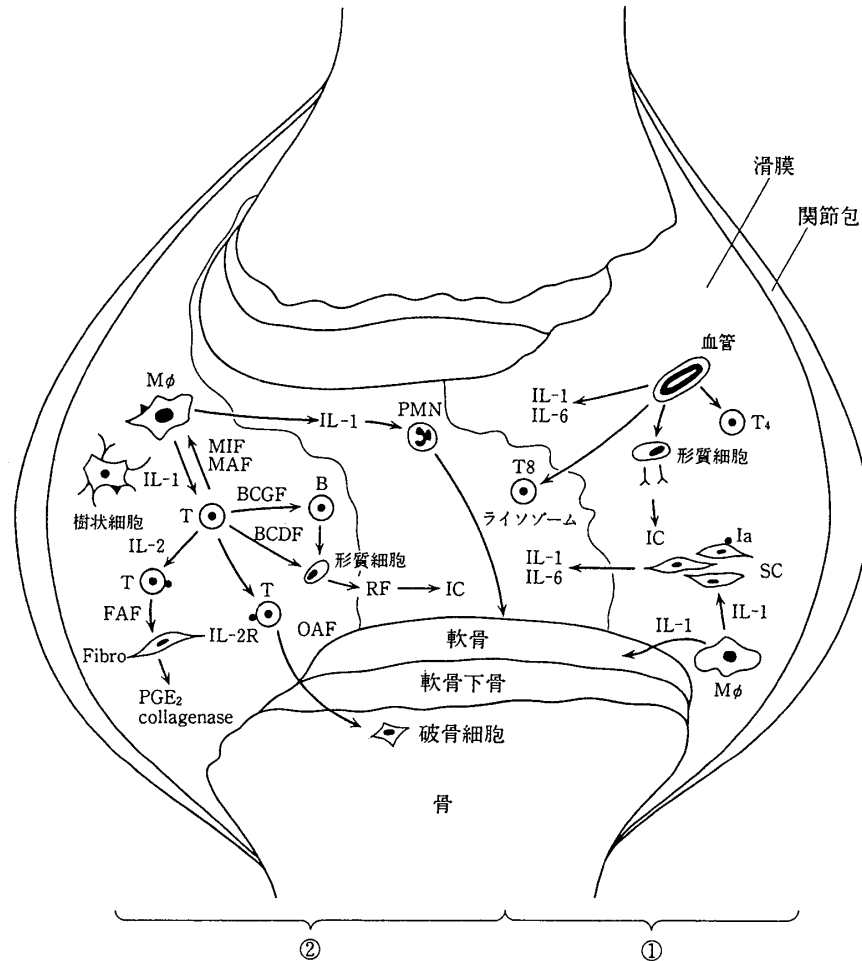


図14 RA 患者血清中サイトカイン



MIF: マクロファージ遊走阻止因子, MAF: マクロファージ活性化因子, FAF: 線維芽細胞活性化因子, OAF: 破骨細胞活性化因子, RF: リウマチ因子, IC: 免疫複合体, BCGF: B細胞増殖因子, BCDF: B細胞分化因子, Mφ: マクロファージ, SC: 滑膜細胞, Fibro: 線維芽細胞, PMN: 好中球.

図15 RA 関節内のサイトカインネットワーク⁹⁾

性サイトカインが産生される。T細胞はIL-2を産生して増殖する。IL-1, TNFにより滑膜は増殖し、活性化された線維芽細胞はプロスタグランジンE₂やコラゲナーゼを産生して軟骨破壊に働く。集簇し活性化したB細胞はリウマチ因子を産生し、免疫複合体を作ることによってさらに炎症を増幅する。関節内に遊走した好中球は、ライソゾームを放出してT, B細胞を活性化する一方、軟骨に対してはメタロプロテアーゼなどの酵素を介して作用する¹¹⁾。

5) サイトカインの治療的応用

従ってRAの病態に関わるこれらサイトカインを制御することは治療につながる(表4)。抗サイトカイン抗体, 可溶性レセプター, レセプター

アンタゴニスト, 変異サイトカインなどによるサイトカインの作用の抑制と細胞内シグナル伝達阻害剤や転写因子の抑制, アンチセンスによるサイトカインの産生抑制¹²⁾, またはIL-4, IL-10, IL-13, TGFβなどの抑制性サイトカインによる治療が考えられる。

新しいDMARDもサイトカイン産生を抑制することで抗リウマチ効果を示すものが開発されている。現在治験中のKE298を24週間服用前後で末梢リンパ球によるIL-1β, IL-6, TNFの産生が治療後有意に低下するのがわかる(図16)。

おわりに

サイトカインは非特異的なものであり, これにより疾患特異的自己抗体の産生機序を説明するこ

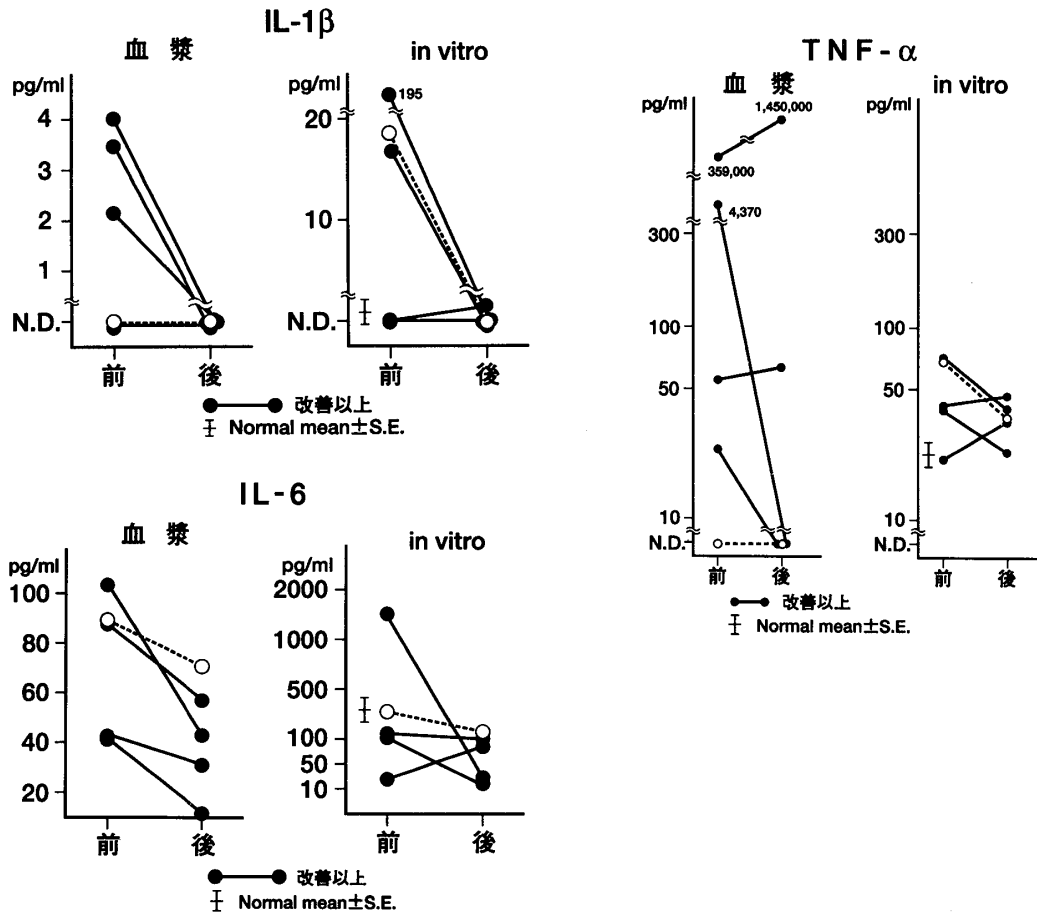


図16 KE298治療前後のサイトカイン産生能

とはできないが、膠原病における免疫異常の永続化に果たす役割は大きい。その産生機序の解明と制御は膠原病を理解する上で重要であると考えられる。

文献

- 1) Hirose T, Hara M, Kitani A et al: Abnormal production of and response to B-cell growth factor and B-cell differentiation factor in patients with systemic lupus erythematosus. Scand J Immunol 21 : 141-150, 1985
- 2) Kitani A, Hara M, Hirose T et al: Heterogeneity of B cell responsiveness to interleukin 4, interleukin 6 and low molecular weight B cell growth factor indiscrete stages of B cell activation in patients with SLE. Clin Exp Immunol 77 : 31-36, 1989
- 3) Kitani A, Hara M, Hirose T et al: Auto-stimulatory effects of IL-6 on excessive B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus ; analysis of IL-6 production and IL-6R expression. Clin Exp Immunol 88 : 75, 1992
- 4) Llorente L, Zou W, Levy Y et al: Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human Systemic Lupus Erythematosus. J Exp Med 181 : 839-844, 1995
- 5) 原まさ子: 膠原病における免疫異常。「免疫・炎症・膠原病」(水島 裕編), pp144-147, メディカルサイエンス出版, 東京(1991)
- 6) Kitani A, Hara M, Hirose T et al: Synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis possessed B cell differentiation activity contributing to synthesis of rheumatoid factor in vitro. J Rheumatol 14 : 873-879, 1987
- 7) Harigai M, Kitani A, Hara M et al: Rheumatoid adherent synovial cells produce B cell differentiation factor activity neutralizable by antibody to B cell stimulatory factor-2/interleukin 6. J Rheumatol 15(11) : 1616-1622, 1988
- 8) Harigai M, Hara M, Norioka K et al: Stimulation of interleukin 6-like B-cell

- differentiation factor production in human adherent synovial cells by recombinant interleukin 1. *Scand J Immunol* 29 : 289-297, 1989
- 9) **Harigai M, Hara M, Kitani A et al**: Interleukin 1 and tumor necrosis factor- α synergistically increase the production of interleukin 6 in human synovial fibroblast. *J Clin Lab Immunol* 34 : 107-113, 1991
- 10) **Harigai M, Hara M, Yoshimura Y et al**: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of Rheumatoid synovium. *Clin Immunol Immunopathol* 69(1) : 83-91, 1993
- 11) **原まさ子**: 慢性関節リウマチの理解のために一免疫異常. 「Common Disease Series 慢性関節リウマチ」(水島 裕 編集), pp223-231, 南江堂, 東京 (1989)
- 12) **針谷正祥, 原まさ子**: 慢性関節リウマチ滑膜組織におけるサイトカイン産生異常と antisense oligodeoxy nucleotide による制御. シンポジウム. 炎症と免疫 2(2) : 55-60, 1994
-