

シンポジウム

## 免疫学の進歩—基礎と臨床—

## 慢性関節リウマチの病態の免疫学的解析と治療への考察

東京女子医科大学 附属膠原病リウマチ痛風センター

ハリガイ マサヨシ ハラ コ フカサワ チ カコ カシワザキ サダオ  
針谷 正祥・原 まさ子・深澤千賀子・柏崎 禎夫

(受付 平成9年1月25日)

**Analysis of the Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis and its  
Application to Novel Experimental Therapy****Masayoshi HARIGAI, Masako HARA, Chikako FUKASAWA and Sadao KASHIWAZAKI**  
Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical College

In synovia of patients with rheumatoid arthritis (RA), synoviocytes and infiltrating lymphocytes produce a variety of cytokines and contribute to the immunopathogenesis of the disease. *In vitro* culture of rheumatoid synovial cells revealed the following results; (1) Pro-inflammatory cytokine cascade exists in rheumatoid synovia. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin (IL)-1 $\beta$  locate upstream of the cascade, while IL-6, IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 locate downstream of it. (2) IL-4, IL-10, IL-13 and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) modulate the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, IL-6 and IL-8 by rheumatoid synovial cells. (3) IL-10, but not IL-4, IL-13 or IFN- $\gamma$ , is produced by rheumatoid synovia and IL-10 is the major anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovia. (4) Peptide containing nuclear localization sequence of NF- $\kappa$ B p50 inhibits TNF- $\alpha$ -induced IL-6 and IL-8 production. These data indicates that imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines would contribute to the persistence of synovial inflammation of RA and that NF- $\kappa$ B is a novel target of therapeutic approach against RA.

**1. 慢性関節リウマチ (RA) とは**

RAの主たる症状は、進行性に経過する原因不明の慢性多関節炎で、しばしば骨・軟骨破壊と関節機能の低下が認められる<sup>1)2)</sup>。

典型的なRA患者の罹患関節は、左右対称性の紡錐形腫脹を示し、炎症の兆候である発赤、熱感、圧痛を伴っている。

関節は関節包という袋の中に存在し、正常の関節では関節包の内面は1ないし2層の滑膜に覆われている。一方、RA患者の腫脹した関節では滑膜が増殖・肥厚し、パンヌスと呼ばれる特殊な組織を形成する。RAのパンヌスの病理学的な特徴は、滑膜表層細胞の増殖と重層化、滑膜下の毛細血管

新生、炎症細胞浸潤とリンパ濾胞形成である<sup>3)</sup>。

**2. RA 滑膜炎の免疫学的病態**

RA滑膜にはマクロファージ様のA型滑膜細胞、線維芽細胞様のB型滑膜細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、血管内皮細胞、好中球が存在し、互いに細胞表面分子および液性因子を通じて情報交換を行っている<sup>4)</sup>。図1にRA滑膜炎の成立機序を示す。遺伝的素因を持った人に何らかのトリガーが働き、CD4陽性T細胞が活性化される。活性化T細胞は滑膜組織に浸潤して、そこでA型滑膜細胞やマクロファージを活性化し、それらがさらに、他のA型・B型滑膜細胞・好中球・リンパ球・血管内皮細胞を活性化させ、炎症反応が拡

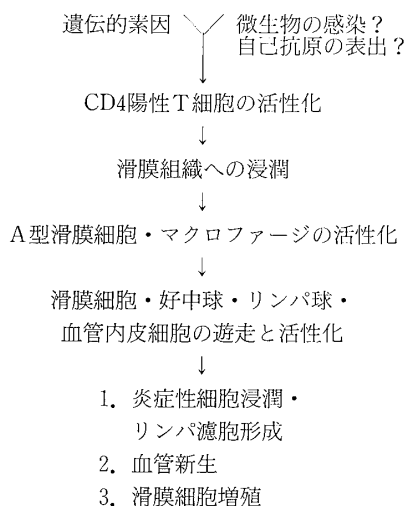


図1 RA 滑膜炎の成立機序

大していくと考えられている<sup>5)</sup>。かかる免疫担当細胞の遊走・活性化の過程にサイトカインが重要な働きをしている。

### 3. RA 滑膜炎とサイトカイン

RA の滑膜から産生されるサイトカインを表に示す<sup>6)</sup>。RA 滑膜炎の病態を解析する上で、これらのサイトカインの炎症巣における役割と相互関係が重要である。そこで私達は滑膜炎の成立に特に関係が深いと考えられる interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の産生について検討した<sup>7)</sup>。

関節置換術時に得られた滑膜組織を酵素処理し、24穴プレートに撒き、無刺激で48時間培養し、上清中のサイトカインをELISAで測定した。各サイトカイン産生量間の相関を図2に示す。MCP-1とIL-1 $\beta$ , MCP-1とIL-6, MCP-1とIL-8の産生量の間には有意な正の相関関係が認められた。

そこで、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  による MCP-1 mRNA の誘導を northern blot で検討した。滑膜細胞を2~3継代するとマクロファージ様のA型細胞は消失し、線維芽細胞様のB型細胞のみが残る。そのような滑膜線維芽細胞にIL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  を添加すると図3に示すように4時間でMCP-1 mRNA の誘導が見られる。図には示していないが、IL-6, IL-8のmRNAも同様に誘導されてくる。

表 RA 滑膜にて産生されるサイトカイン

IL-1	TNF- $\alpha$
IL-1ra	LIF
IL-2	GM-CSF
IL-4	bFGF
IL-6	TGF- $\beta$
IL-8	MCP-1
IL-10	MIP-1 $\alpha$
IL-12	RANTES
IL-15	GRO
IL-18	ENA78
	VEGF
	IFN- $\gamma$

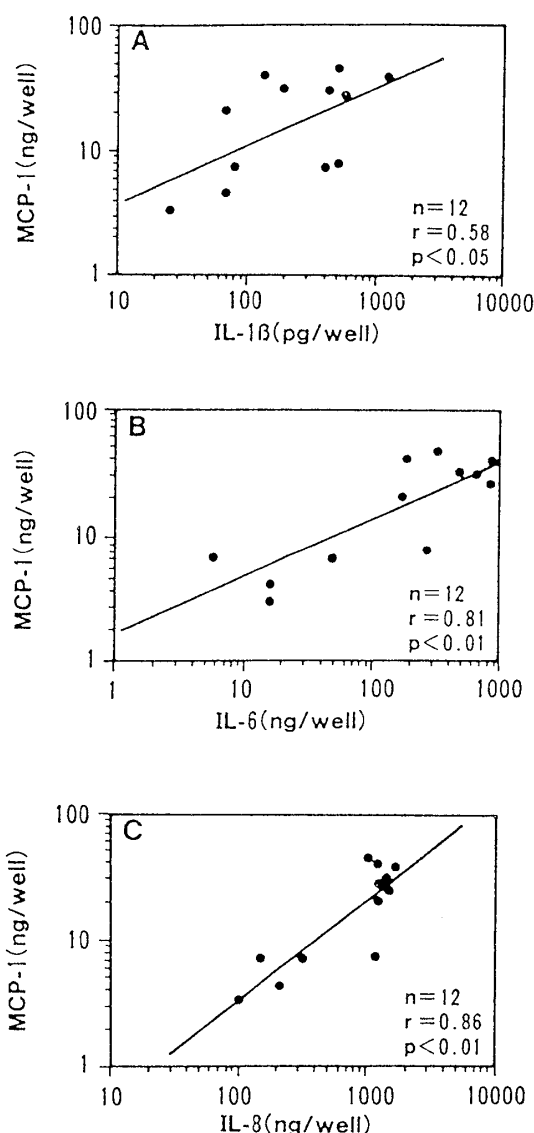


図2 RA 滑膜により産生される IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP-1の産生量の相関関係  
MCP-1とIL-1 $\beta$ , MCP-1とIL-6, MCP-1とIL-8の間に有意な正の相関関係を認める。

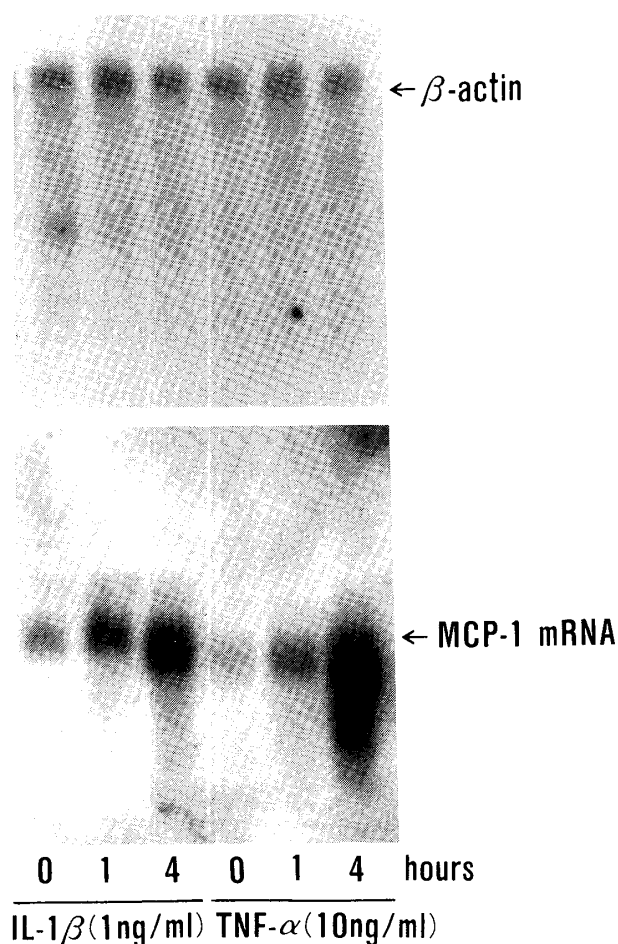


図3 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ によるMCP-1 mRNAの誘導  
滑膜線維芽細胞をIL-1 $\beta$  (1ng/ml), TNF- $\alpha$  (10ng/ml)で刺激し, northern blotによりMCP-1 mRNAを検出した. 刺激後4時間でMCP-1 mRNAの著明な誘導が認められる. 上段は $\beta$ -actinを検出した blotである.

以上の実験結果から, RA滑膜ではまずマクロファージ系の滑膜細胞の活性化によりIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ が産生され, 次いで, それらにより他の滑膜細胞が活性化され, IL-6, IL-8, MCP-1などを産生するというサイトカインカスケードが存在すると思われる.

#### 4. RA滑膜炎と抗炎症性サイトカイン

炎症に関与するサイトカインは, 炎症反応を成立・進展させる pro-inflammatory cytokine (起炎症性サイトカイン) と, 炎症反応を縮小, 消滅させる anti-inflammatory cytokine (抗炎症性サイトカイン) の2種類に分類される. 前述のIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1などは起炎症性サイトカインに, IL-1 receptor antagonist (IL-1ra),

IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ などは抗炎症性サイトカインに分類される<sup>8)</sup>. そこで, RA滑膜細胞による起炎症性サイトカインの産生に及ぼす抗炎症性サイトカインの効果を調べると共に, RA滑膜炎における両者のバランスを検討した.

RA滑膜より分離直後の滑膜細胞をIL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ と共に48時間培養し, 上清中のTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-8の産生量を測定した. IFN- $\gamma$ は抗炎症性サイトカインには分類されないが, いろいろな調節機能を持っているので, 併せて検討した.

TNF- $\alpha$ の産生はIL-4, IFN- $\gamma$ により促進されたが, IL-10, IL-13により抑制された. IL-1 $\beta$ の産生はIL-10, IL-13により抑制された. IL-1raの産生はIL-4, IL-13により著明に増強された. IL-6, IL-8の産生は程度に差はあるが, いずれのサイトカインによっても抑制された(図4). 図4の結果のなかではIL-10によるTNF- $\alpha$ の抑制効果が特に顕著であった.

次にRA滑膜細胞からのこれらのサイトカインの産生を検討した. RA滑膜細胞を無刺激で48時間培養した上清中には86.1 $\pm$ 113.9ng/mlのIL-10が存在したが, IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ は測定感度以下であった(図5).

RA滑膜細胞から産生される内因性IL-10の機能を見るために, 滑膜細胞培養開始時に抗IL-10中和抗体を添加し, 48時間後の培養上清中のIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ を測定した.

2症例の実験結果を図6に示した. 抗IL-10抗体の添加によりIL-1 $\beta$ の産生は3.0~4.6倍に(図6A), TNF- $\alpha$ の産生は2.1~3.2倍に(図6B)上昇し, 滑膜細胞から産生される内因性のIL-10がIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の産生を抑制していることが示唆された. 無添加, あるいはコントロール抗体, 抗IL-4抗体の添加ではIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ 産生の有意な変化は認められなかった.

以上のデータから活動性のRA滑膜炎においては, 起炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスが起炎症性サイトカインの方に傾いていることが考えられる(図7). したがって, このバランスを正常化させるような作用を有する生物

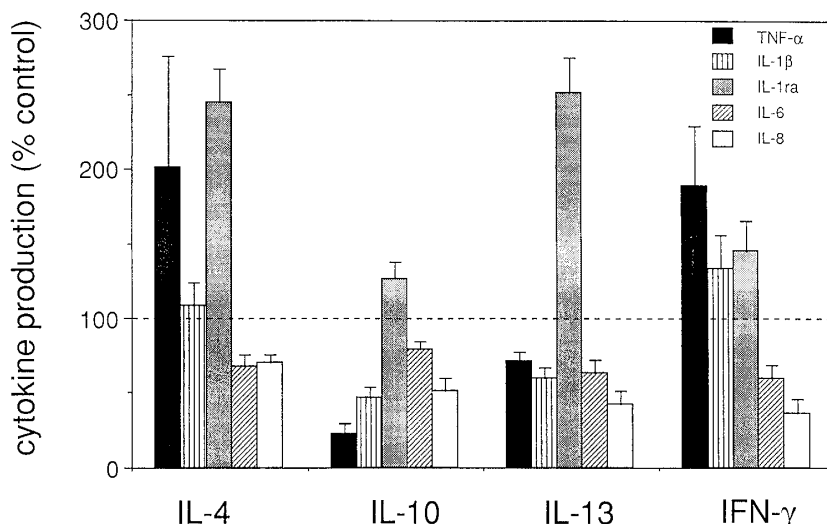


図4 IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  による滑膜細胞のサイトカイン産生量の変化  
10ng/ml の IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  を滑膜細胞に添加し, 48時間培養後の TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-8産生量を ELISA で測定した. 結果は, 各患者における無刺激時の各サイトカインの産生量を100%として算出した値の平均 $\pm$ 標準偏差で表示してある. TNF- $\alpha$  の産生は 8 例中 5 例にのみ認められた (n=5). 他のサイトカインは n=8 である.

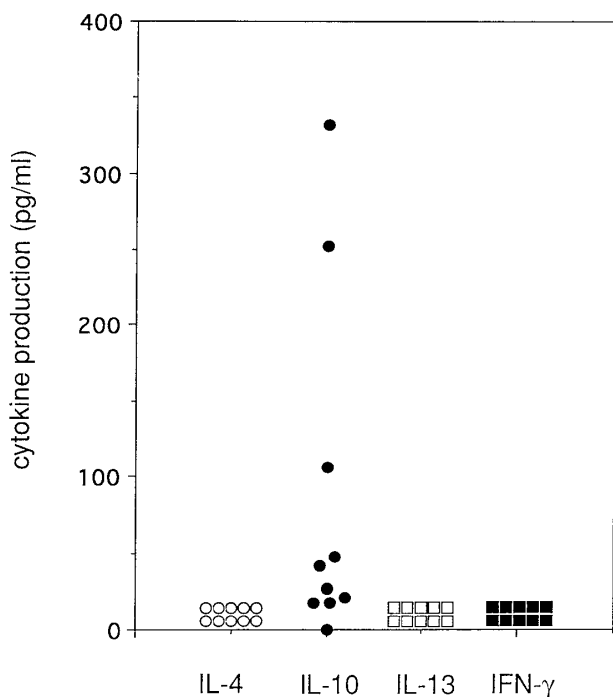


図5 RA 滑膜細胞からの IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  の産生  
滑膜細胞を無刺激で48時間培養後のサイトカイン産生量を ELISA で測定した.

学的製剤や抗リウマチ薬の開発が今後期待される。

### 5. RA 滑膜におけるサイトカインの人為的制御

最近の抗 TNF- $\alpha$  抗体, あるいは可溶性 TNF- $\alpha$  受容体による RA の治療成績から, RA 滑膜炎における TNF- $\alpha$  の重要性が注目されている. 図 8 は TNF- $\alpha$  の刺激伝達系を示している. 炎症反応においては, TNF- $\alpha$  は主に type I TNF-receptor に結合し, いくつかの細胞内蛋白を活性化したのち, p65と p50からなる NF $\kappa$ B を活性化する. 活性化された NF $\kappa$ B は核へ移行し, そこで標的遺伝子, たとえば IL-8などの発現を増強する<sup>9)</sup>. そこで私達は NF $\kappa$ B をターゲットに TNF- $\alpha$  の作用を抑制する方法を検討した. NF $\kappa$ B の構成分子である p50の一部に核への移行を司る nuclear localization sequence (NLS) とよばれるアミノ酸配列が存在する. 細胞内にこのアミノ酸配列と同じ配列を持つペプチドが多量に存在すると NF $\kappa$ B の核への移行が阻止されることが報告されている<sup>10)</sup>. 図 9A に以下の実験で用いたペプチド, SN50を示す. C 末端側(四角で囲まれた配列)は NF $\kappa$ B p50の NLS, N 末端側(下線の配列)は Kaposi fibroblast growth factor の signal peptide 内の疎水性アミノ酸配列を使用したペプ

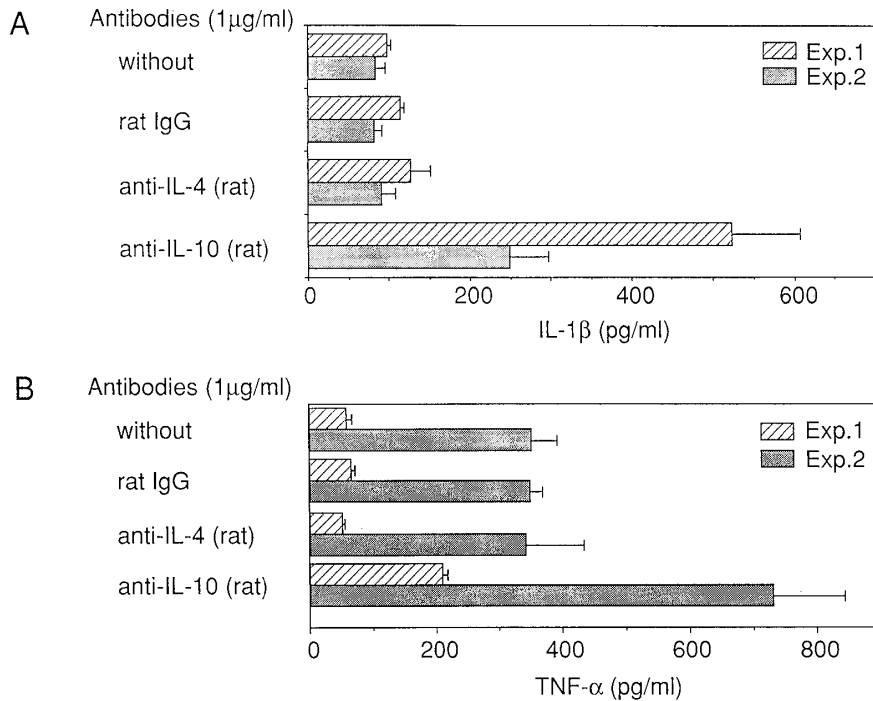


図6 RA滑膜細胞によるIL-1β (A), TNF-α (B)の産生に及ぼす抗IL-10抗体の効果  
滑膜細胞を各種抗体(1μg/ml)存在下で48時間培養後のサイトカイン産生量をELISAで測定した。抗IL-10抗体の添加によりIL-1β, TNF-αの産生が増加した。

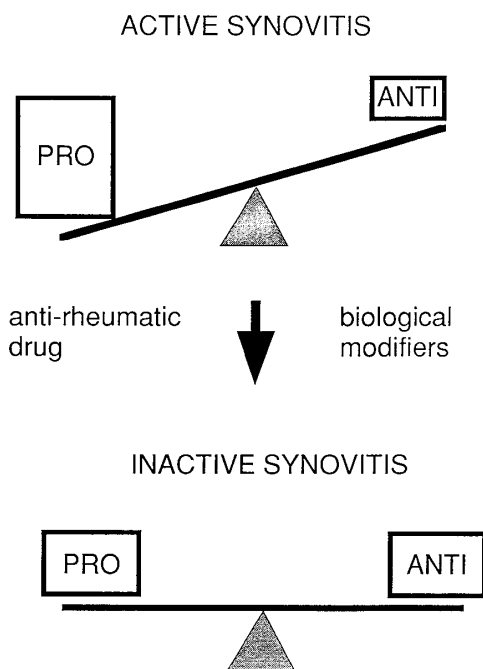


図7 RA滑膜炎における起炎症性サイトカイン(PRO)と抗炎症性サイトカイン(ANTI)の不均衡  
RA滑膜では起炎症性サイトカインが優位になっている。この不均衡を正常化させるような薬物あるいは生物学的製剤の開発が期待される。

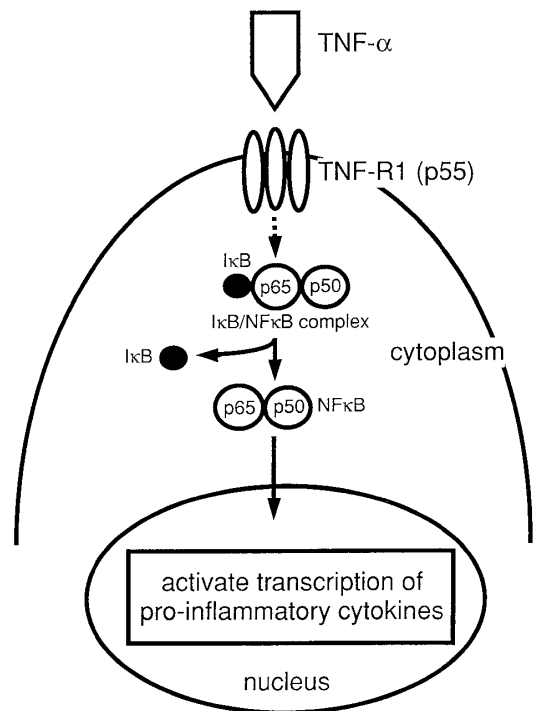


図8 TNF-αの細胞内刺激伝達経路  
TNF-αはI型TNF受容体に結合し、IκB/NFκB complexを解離させる。活性化されたNFκBは核へ移行し、転写因子として作用する。



本研究を行うにあたり、当センター整形外科井上教授以下リウマチ関節外科の諸先生より RA 滑膜の御供与をいただきました。また、中沢さん、田北さんにはサイトカインの測定で、車田さんには培養で御協力していただきました。ここに深甚なる謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 橋本 明：慢性関節リウマチ 病態から治療。「ペーロードサイドリウマチ学」(柏崎禎夫, 山本 真編), pp342-355, 南江堂, 東京(1994)
- 2) Fuchs HA, Sergent JS: Rheumatoid arthritis: The clinical picture. *In* Arthritis and Allied Conditions (Koopman WJ ed) pp1041 - 1070, Williams & Wilkins, Baltimore (1997)
- 3) Jasin HE: Mechanisms of tissue damage in rheumatoid arthritis. *In* Arthritis and Allied Conditions (Koopman WJ ed) pp1017 - 1039, Williams & Wilkins, Baltimore (1997)
- 4) 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. 炎症と免疫 2 : 143-148, 1994
- 5) Ivashkiv LB: Cytokine expression and cell

activation in inflammatory arthritis. *In* Advances in Immunology (Dixon FJ ed) pp337-376, Academic Press, San Diego (1996)

- 6) Brennan FM, Maini RN, Feldmann M: Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bull* 51 : 368-384, 1995
- 7) Harigai M, Hara M, Yoshimura T et al: Monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory joint disease and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin Immunol Immunopathol* 69 : 83-91, 1993
- 8) 上坂 等：抗炎症性サイトカインを用いた遺伝子治療の可能性. 炎症と免疫 3 : 593-600, 1995
- 9) Bazzoni F, Beutler B: How do tumor necrosis factor receptors work? *J Inflamm* 45 : 221-238, 1995
- 10) Lin Y-Z, Yao SY, Veach RA et al: Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kB by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 270 : 14255-14258, 1995