慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | インターロイキン32の炎症性関節炎における役割と治療標的分子としての可能性 |
| Sub Title | The role of interleukin-32 on inflammatory arthritis and the possibility of being a therapeutic target |
| Author | 二木, 康夫(Niki, Yasuo)<br>中山, 政憲(Nakayama, Masanori)<br>川崎, 俊樹(Kawasaki, Toshiki) |
| Publisher | |
| Publication year | 2012 |
| Jtitle | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2011. ) |
| JaLC DOI | |
| Abstract | インターロイキン32はNFκB/ERKシグナルを介してTNFαを誘導し、プロテオグリカンの消失と滑膜増殖を惹起し関節炎の病態に関与すると考えられた。また、経時的にIL-32によるTNFα誘導が減少し、IL-10の誘導が増加することから、初期には炎症を増悪させるが、その後炎症を抑える作用をもっている可能性が考えられた。 |
| Notes | 研究種目：基盤研究(C)<br>研究期間：2009～2011<br>課題番号：21591959<br>研究分野：医歯薬学<br>科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学 |
| Genre | Research Paper |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21591959seika |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

# 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2009～2011
課題番号：21591959
研究課題名（和文）　インターロイキン３２の炎症性関節炎における役割と治療標的分子としての可能性
研究課題名（英文）The role of interleukin-32 on inflammatory arthritis and the possibility of being a therapeutic target.
研究代表者
二木　康夫（NIKI YASUO）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10276298

研究成果の概要(和文):インターロイキン 32 は NFκB/ERK シグナルを介して TNFα を誘導し、プロテオグリカンの消失と滑膜増殖を惹起し関節炎の病態に関与すると考えられた。また、経時的に IL-32 による TNFα 誘導が減少し、IL-10 の誘導が増加することから、初期には炎症を増悪させるが、その後炎症を抑える作用をもっている可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：IL-32 induces TNF・ via NF・B and ERK signaling pathway and contributes to developing inflammatory arthritis through loss of proteoglycan and provocation of synovitis. Since IL-32 induced TNF・ had gradually reduced and IL-10 had gradually increased, IL-32 might develop inflammation in early stage and resolve subsequently.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 総　計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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、炎症性サイトカイン

## １．研究開始当初の背景

インターロイキン 32(以下 IL-32)は 2005 年に Kim らによって報告された新規サイトカインである。初期の文献によると、IL-32 は TNFα を初めとする炎症性サイトカインを誘導し、関節リウマチ、炎症性腸疾患、閉塞性肺疾患、マイコプラズマ感染、ウィルス感染などの病態に関与すると考えられている。一方受容体やマウスにおける相似分子は発見されていない。

２．研究の目的

IL-32 の炎症性関節炎における作用の詳細とその機序について明らかにする。

３．研究の方法

(1)トランスジェニックマウスの作製

CAG プロモーター制御下に、アイソタイプの１つである IL-32α を過剰発現するトランスジェニックマウス (background：C57BL/6) を作製した[8]。各臓器の病理組織学的検索と、IL-32α 発現量 real time PCR で解析し、また TNFα 発現量についても同様に解析した。IL-32α タンパク量を ELISA で測定した。

(2)関節炎モデルの作製

①IL-32α トランスジェニックマウス(以下 Tg)と C57BL/6 の野生型マウス(Wt) の膝関節に、Toll 様受容体(TLR)4 のアゴニストである LPS を 1 回注射し､対側には対照として PBS を同量注射した。2 週間後に病理組織学的検索と膝滑膜中の TNFα mRNA を real time PCR 法で測定した。

②リコンビナント IL-32α (rIL-32α)を作製し、これを野生型マウス 2 系統(C57BL/6・Balb/C)の膝関節に注射し、対側に対照として PBS を同量注射した。2 週間後に病理組織学的検索と膝滑膜中の TNFα mRNA を real time PCR 法で測定した。

(3)マウス細胞を用いた実験

①マウスマクロファージのセルラインである RAW264.7 細胞と rIL-32α を共培養し、24～96 時間後の上清中の TNFα 量ならびに抗炎症性サイトカインとして知られる IL-10 量を ELISA にて測定した。

②シグナル伝達経路の解明のため、マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 細胞を用いて、TLR シグナル下流分子である NFκB と MAPKs(ERK1/2、p38、JNK)のインヒビターと rIL-32α を加え、24 時間後の上清中の TNFα 量を測定し、また各分子のリン酸化の有無を調べた。

４．研究成果

(1)トランスジェニックマウスの解析

われわれが作製した Tg マウスの各臓器における IL-32α の発現が mRNA ならびに ELISA で確認された。また TNFα の発現量は臓器によりばらつきはあるが、Wt の 2～7 倍程度高発現していた。しかし一方で明らかな表現系の異常を認めず、病理組織学的にも野生型との相違を認めなかった。

(2)IL-32α は TNFα を誘導し関節炎を増悪させる。

①病理組織学的所見において、Tg マウスに LPS を投与した群において関節軟骨の菲薄化と滑膜炎を認めた。Wt マウスまた PBS を注射した側ではとくに変化は見られなかった(fig.1A)。膝滑膜中の TNFα mRNA 量は Tg において有意に増加していた(fig.1B)。

fig.1A

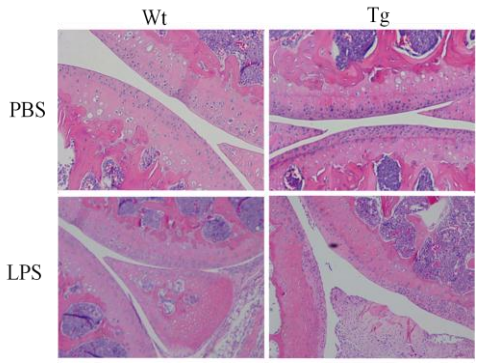
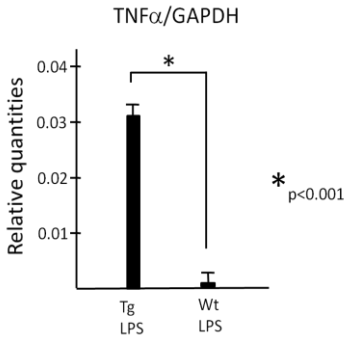



fig.1B



②病理組織学的所見において、rIL-32αを注射した群で両系統ともプロテオグリカンの消失と軽度の滑膜炎を認めた(fig2A:C57BL/6)。また膝滑膜中の TNFαmRNA 量はrIL-32α注射側において有意に増加していた(fig.2B)。

fig.2A

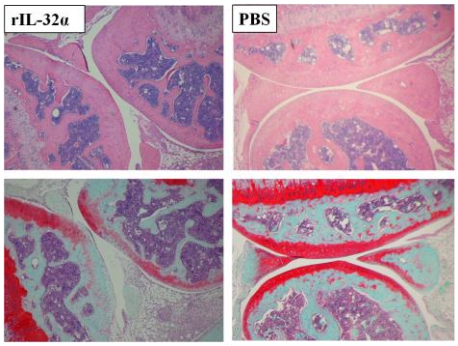
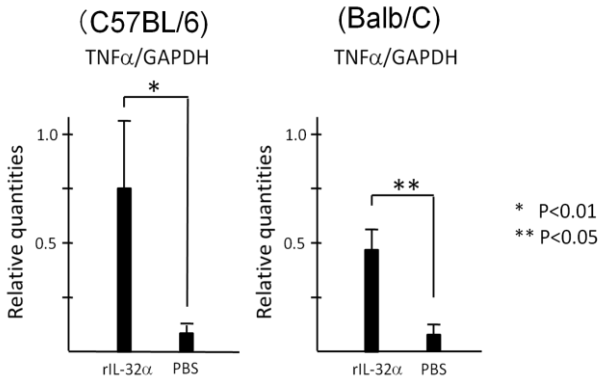



fig.2B




(3)IL-32αはサイトカインを誘導し炎症性関節炎の病態に関与する。

①RAWcell に rIL-32αを投与後 12 時間をピークに TNFαの誘導が増加し、その後徐々に減少していくのに対して、IL-10 は rIL-32 投与後、経時的に増加した。

②Raw264.7 細胞においては IL-32αによる TNFα誘導が NFκB と ERK1/2 のインヒビターにより阻害された。また Western blot にて IκB および ERK1/2 の IL-32 添加によるリン酸化を確認した。

[考察]

われわれが行った関節炎モデルの実験では、いずれも IL-32 により関節炎の増悪がみられたが、これらの実験系は長期的な観察が難しく、IL-32 の初期の作用のみを反映している可能性がある。またとくに野生型に rIL-32αを注射したモデルではプロテオグリカンの消失の程度に比べ滑膜炎の程度が弱く、すでに回復傾向にある時期を見ている可能性がある。

またマウス細胞を用いた実験から、IL-32 の作用として初期には TNFαを誘導し炎症を増悪させるが、後期以降は IL-10 を誘導しむしろ炎症を終息に向ける可能性が示された。

IL-32 のシグナル経路についてもその一端を解明することができた。さらなる検索を行っているところである。

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１件）

①M. Nakayama, Y. Niki, et al,” Enhanced susceptibility to lipopolysaccharide-induced arthritis and endotoxin shock in interleukin-32 alpha transgenic mice through induction of tumor necrosis factor alpha” Arthritis Research and Therapy, 査読あり, 2012（投稿中）

〔学会発表〕（計５件）

① 中山政憲、二木康夫他 “IL-32αは NFκB/ERK シグナルを介して TNFαを誘導し関節炎の病態に関与する”、第 25 回日本軟骨代謝学会、愛知、2012.3.9-10.

② M. Nakayama, Y. Niki, et al, “The effects of interleukin-32 alpha on development of inflammatory arthritis and endotoxin shock in mice” ,Orthopaedic Research Society 2012 annual meeting, San Francisco, USA, 4-7 February(2012)

③ 中山政憲、二木康夫他 ”IL-32αのマウスにおける関節炎ならびに敗血症性ショックの誘導効果について” 、第26回日本整形外科学会基礎学術集会、群馬、2011.10.20-21.

④ 中山政憲、二木康夫他、”IL-32αのマウスにおける関節炎誘導効果について“、第54回日本リウマチ学会学術総会、神戸、2010.4.22－24.

⑤ M. Nakayama, Y. Niki, et al, “The effects of interleuikin-32 alpha on development of inflammatory synovitis and cartilage destruction in mice”, American College of Rheumatology 2009 scientific meeting ,Philadelphia, USA,16-21 October(2009)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

６．研究組織

(1)研究代表者

二木　康夫（NIKI YASUO）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10276928

(2)研究分担者

中山　政憲（NAKAYAMA MASANORI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70528249

川崎　俊樹(KAWASAI　TOSHIKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30365291