関節リウマチ滑膜の各種 cytokine 産生能に対する 疾患修飾性抗リウマチ剤の影響

黄田道信・吉野慎一・小岩政仁^{*1)}、浅野伍朗^{*2)}

Effect of DMARDs on cytokine production by cultured synovial cells

We investigated the production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α by cultured synovial cells, and the effect of disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) on the production of those cytokines. Sulfasalazine (SASP), amethopterin (MTX), gold sodium thiomalate (GST), and bucillamine (BU) were used as DMARDs. Dexamethasone (DEX) and lipopolysaccharide (LPS) were used as negative and positive controls.

IL-1 β and IL-6 were detected in the culture supernatant but TNF- α was not. LPS stimulated the production of IL-6 while DEX suppressed it. They did not modulate the production of IL-1 β , GST suppressed the production of IL-1 β at a concentration of 10⁻³M. SASP and GST suppressed the production of IL-6 at the same concentration.

This result showed that SASP, MTX, GST and BU could not suppress synovial cells to produce IL-6 and IL-1 β at the level of clinical dosages.

Michinobu Kohda・Shin-ichi Yoshino・

Masahito Koiwa^{*1)}, Goro Asano^{*2)}

key words : *rheumatoid arthritis, culture, lipopolysaccharide, dexamethasone, DMARDs*

関節リウマチ(RA)は、関節滑膜の病変によって軟骨と骨に破壊が生じ、ときには身体障害者に至る疾患である。RA滑膜の病変は、血管新生、リンパ球などの細胞浸潤、滑膜細胞増殖を特徴としている¹⁾。そして、RA滑膜の特徴的な組織所見の成因には、主に滑膜細胞由来の各種 cytokine が重要な役割を演じている。

そこで今回、筆者らはRAの病態進展に深く関与していると考えられているIL-1 β , IL-6, TNF- α に注目し、手術時に採取したRA滑膜を用いて、

これら cytokine の産生能と、この産生能に対するDMARDsの影響を調べたので報告する²⁾。

対象と方法

(1) RA滑膜培養細胞

滑膜細胞の培養は Abrahamsen らの方法に準じて行った³⁾。すなわち、人工膝関節全置換術(TKR)時に無菌的に採取したRA滑膜組織をハサミで細切し、collagenase 0.5 mg/ml (Sigma 社, type I, CO130)とDNase I 0.15 mg/ml (Sigma 社, type II, D4527)濃度のRPMI1640培養液(Gibco 社)に入れ、37°C 1時間振盪分散した。そして得られた細胞浮遊液をmeshを用いて濾過し、同じ培養液を用いて2回洗浄した。

つぎに、組織培養用フラスコ(Corning 社, 25115FK, 75 cm²)に得られた細胞をstreptomycin 100 μ g/ml, penicillin 100 U/ml および10%胎児ウシ血清(Gibco 社)を含むRPMI培養液(complete medium)で、37°C 5% CO₂ 下にて24時間培養し、プラスチックに付着した細胞のみをRA滑膜培養細胞として今回使用した。なお、実験にはRA 8人から得られた滑膜細胞の第2世代の培養細胞を用い、個々の培養細胞に対しつぎの実験を行った。

(2) 滑膜培養細胞の各種 cytokine 産生能

組織培養用フラスコ内でほぼconfluentの状態となったRA滑膜培養細胞(G2)をtrypsin処理後、細胞密度5.0 $\times$ 10⁴ cells/cm²で植え込み、24時間後に得られた上清液を検体とし、IL-1 β , IL-6, TNF- α を測定した。検体は採取後、-20°C以下で保存した。IL-1 β はRIA(IRMA)法にて、IL-6およびTNF- α はELISA法にて測定した。

なお、IL-1 β , IL-6, TNF- α の測定限界値は、それぞれ10, 4, 5 pg/mlである。また、これら cytokine 産生能をより詳細に知るため産生能を

^{*1)} Department of Joint Disease, Nippon Medical School
日本医科大学リウマチ科学教室

^{*2)} Department of Pathology, Nippon Medical School 日
本医科大学第二病理学教室

図 1 Effect of DEX and LPS on IL-1 β production

Cultured cells were incubated in the presence of DEX (10^{-7} g/ml) and LPS (10^{-7} M) for 24 hours.

Unstimulated cells were used as the control. IL-1 β production in the supernatant was detected by RIA. Values are expressed as means $\pm$ SD.

図 2 Effect of DEX and LPS on IL-6 production

Cultured cells were incubated in the presence of DEX (10^{-7} g/ml) and LPS (10^{-7} M) for 24 hours. Unstimulated cells were used as the control. IL-6 production in the supernatant was detected by ELISA. Values are expressed as means $\pm$ SD.

亢進させる lipopolysaccharide (LPS) 10^{-7} g/ml および、反対に抑制する dexamethasone (DEX) 10^{-7} M を別々に添加して、上記培養条件にて産生能を調べた。

(3) 滑膜培養細胞の各種 cytokine 産生能に対する DMARDs の影響

(2)と同じ条件下の RA 滑膜培養細胞(G2)に各種 DMARDs を種々の濃度で添加し、24 時間後に得られた上清液を検体として IL-1 β , IL-6, TNF- α を測定した。また、trypan blue を用い培養細胞の viability を調べたが、染色細胞はすべて 5 % 以下であった。

なお、使用した DMARDs およびその濃度はつぎの通りである。

① sulfasalazine (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} g/ml, 参天製薬)

② amethopterin (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} g/ml, Sigma 社)

③ gold sodium thiomalate (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}

g/ml, 塩野義製薬)

④ bucillamine (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} g/ml, 参天製薬)

以上、添加した薬物濃度は各薬剤の血中濃度の約 1,000 倍を上限として設定した。

結 果

(1) RA 滑膜培養細胞より産生された cytokine の濃度

無添加の RA 滑膜細胞における IL-1 β 産生濃度は 94.1 ± 28.9 pg/ml, IL-6 産生濃度は $5,076.3 \pm 1,823.9$ pg/ml を示した。しかし、TNF- α は全例測定限界値以下であった。

(2) LPS と DEX 添加時の各種 cytokine の濃度

LPS を添加した際の IL-1 β 産生濃度は 97.5 ± 31.4 pg/ml, IL-6 産生濃度は $27,737.5 \pm 16,024.7$ pg/ml と、IL-6 のみ無添加 RA 滑膜細胞に比較し有意に増加した ($P < 0.01$) (図 1, 2)。

図3 Effect of GST on IL-1 β production
Various concentrations of GST were added to cultured cells. They were incubated for 24 hours. IL-1 β production in the supernatant was detected by RIA.

図4 Effect of GST on IL-6 production
Various concentrations of GST were added to cultured cells. They were incubated for 24 hours. IL-6 production in the supernatant was detected by ELISA.

図5 Effect of SASP on IL-6 production
Various concentrations of SASP were added to cultured cells. They were incubated for 24 hours. IL-6 production in the supernatant was detected by ELISA.

DEX を添加した際の IL-1 β 産生濃度は 100.6 ± 28.5 pg/ml, IL-6 産生濃度は 911.5 ± 325.8 pg/ml と、無添加 RA 滑膜細胞に比較し IL-6 のみ有意に低下した ($P < 0.01$) (図2)。

TNF- α は DEX, LPS 添加時とも、測定限界値以下であった。

(3) 滑膜培養細胞より産生される cytokine に対する各種 DMARDs の影響

IL-1 β 産生濃度は gold sodium thiomalate (GST) を 10^{-3} g/ml 添加した際、 39.9 ± 11.8 pg/ml と有意に減少した ($P < 0.01$)。他の DMARDs 添加例では IL-1 β の有意の減少は認められなかった (図3)。

IL-6 は、GST および sulfasalazine (SASP) をおのおの 10^{-3} g/ml 添加したとき 759.0 ± 343.0 pg/ml, $1,175.1 \pm 677.4$ pg/ml と有意に減少した ($P < 0.01$)。

その他の bucillamine (BU), amethopterin (MTX) 添加例では、有意の減少はみられなかった (図4, 5)。

考 察

生体は炎症刺激を受けると、その局所の血管透過性が亢進し、白血球や macrophage の遊出、浸潤がおき、肉芽形成がみられる。これらの反応には cytokine が重要な役割を果たしているが、滑膜細胞ならびに macrophage 由来の IL-1 β , IL-6, TNF- α などが RA 滑膜組織と関節液中に多く認められるのに対して、リンパ球由来の cytokine はほとんど認められない⁴⁾。

筆者らはまず RA 滑膜培養細胞、主に adherent cells の cytokine 産生機序に変化が起きているか否かを知る一つの手段として、LPS と corticosteroid に対する反応を調べた。LPS 添加では IL-1 β と TNF- α の産生の増加は認められなかったが、IL-6 の産生はコントロールに比較して有意に増加した。一方、glucocorticoids として DEX を加えたところ IL-6 のみ有意に減少した。

Zhong らは、macrophage を用いて各種 cytokine 産生に対する LPS の調節機構を検索したところ、IL-1 β mRNA の発現は LPS 0.01 ng/ml の低濃度でも起こるが、その産生は 10 ng/ml と濃度を高めてもほとんど認められなかった。この原因として、IL-1 が細胞膜に結合しており、培養上清液中にはあまり出現しない可能性や、転写しても必ずしもただちに翻訳はされない可能性が推測された。また、IL-6 は反対に LPS がより高濃度である 0.1 ng/ml で mRNA は発現するが、mRNA の発現が減弱したあとでも IL-6 産生は着々と増加すると報告されている⁵⁾。

一方、IL-1 β , IL-6, TNF- α の産生細胞である macrophage には glucocorticoid receptor が存在すること、そしてこれら cytokine の mRNA への転写を glucocorticoids が抑制することが知られている⁶⁻⁸⁾。

筆者らの結果は、RA 滑膜培養細胞も正常な macrophage と同様な機序で LPS と glucocorticoids に反応することを示唆した。

つぎに、RA 滑膜培養細胞の IL-1 β , IL-6, TNF- α 産生能に対する GST, BU, SASP, MTX など DMARDs の影響を調べたところ、IL-1 β 産生に対し GST が、また IL-6 に対して GST と SASP が抑制効果を示した。なお、MTX と BU は IL-1 β , IL-6 産生になんら影響を与えなかつ

た。TNF- α は今回の実験では測定値限界以下であったので、DMARDs に対する影響を言及することはできなかった。

Drakes らは、LPS で刺激した単核球を用いて GST による IL-1 抑制効果を検討したところ、培養 72 時間後にコントロールと比較して 2×10^{-5} g/ml の GST が IL-1 産生を抑制すると報告している⁹⁾。筆者らの実験では培養時間が 24 時間と短く、また LPS で刺激していないことなどにより、GST 低濃度で IL-1 β 産生の抑制ができなかったのではないかと考えられた。

IL-6 産生に対する DMARDs 産生抑制について、水谷らは滑膜細胞に IL-1 と同時に SASP を添加すると、IL-1 による IL-6 産生誘導を抑制すると報告している¹⁰⁾。そして、直接 IL-6 産生を抑制するにはより高濃度な SASP が必要となる可能性を推測させていた。

今回、IL-1 β , IL-6 について抑制効果を認めた GST と SASP は非常に高濃度であり、臨床的にはこれら DMARDs が RA 滑膜細胞の IL-1 β , IL-6 産生を直接抑制していないことが示唆された。GST 投与で RA 患者血清中の IL-6 濃度が低下するとの報告があるが、この機序として GST の細胞内蓄積や、間接的な抑制作用によるものと考えられた¹¹⁾。

TNF- α は骨破壊などにも関与し、RA 患者の関節液中において高値を示すことが発表されている¹²⁾。宮坂らは、RA 滑膜組織培養上清液中にはほとんど TNF- α は検出できず、特異抗体を用いた免疫組織化学的検索においても TNF- α は検出されなかったと述べている¹³⁾。一方、和田らは単核球の IL-1, TNF- α 産生に対する DMARDs の影響をイムノアッセイ法で報告しているが、TNF- α については BU がこの産生を抑制すると報告している¹⁴⁾。しかし、TNF- α の RA 滑膜細胞からの産生そのものについては、筆者らの結果同様否定的な意見が多かった。

結 語

① RA 滑膜細胞、主に adherent cells を 24 時間培養したところ、その上清液中に IL-1 β と IL-6 は検出された。しかし、TNF- α は測定限界値以下であった。

② RA 滑膜培養細胞で LPS と DEX でその産生が左右されるのは IL-6 のみであった。

③ 滑膜培養細胞で IL-1 β 産生は高濃度の GST で、また、IL-6 産生は高濃度の GST ならびに SASP で抑制された。なお、MTX, BU にはこれら抑制効果はみられなかった。

文 献

- 1) Schumacher, H. R., Kitridou, R. C. : Synovitis of recent onset. A clinicopathologic study during the first month of disease. *Arthritis Rheum.* 15 : 465, 1972.
- 2) 清水史郎 : サイトカインと慢性関節リウマチ. *リウマチ* 29 : 297-302, 1989.
- 3) T. G. Abrahamsen, P. M. Johnson, J. B. Natvig : Membrane characteristics of adherent cells dissociated from rheumatoid synovial tissue. *Clin. exp. Immunol.* 28 : 474-483, 1977.
- 4) Gary S. Firestein, Nathan J. Zvaifler : How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?. *Arthritis Rheumatism* 33 : 768-773, 1990.
- 5) W. William Zhong, Peter A. Burke, A. Teresa Hand, Mark J. Walsh, Laura A. Hughes, R. Armour Forse : Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *Archives of Surgery* 128 : 148-163, 1993.
- 6) Werb, Z., Foley, R., Munck, A. : Interaction of glucocorticoids with macrophages. Identification of glucocorticoid receptors in monocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 147 : 1684-1694, 1978.
- 7) Schaffner, A. : Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to gamma interferon. *J. Clin. Invest.* 76:1755-1764, 1985.
- 8) Knudsen, P. J., Dinarello, C. A., Strom, T. B. : Glucocorticoids inhibit transcriptional and posttranscriptional expression of interleukin 1 in U 937 cells. *J. Immunol.* 139 : 4129-4134, 1987.
- 9) Maureen L. Drakes, Nanfred Harth, Sally, B. Galsworthy, Glenn A. McCain : Effects of Gold on the Production of and Responses to Human Interleukin-1. *J. Rheumatol.* 14 : 1123-1127, 1987.
- 10) 水分庸子, 赤星 透, 柏崎禎夫 : 抗リウマチ薬による滑膜細胞 IL-6 産生抑制. *医学のあゆみ* 157 : 491-492, 1991.
- 11) Dasgupta, B. : Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systematic disease in rheumatic arthritis. *Journal of Rheumatology.* 19 : 22-25, 1992.
- 12) Tetta, C., Caumussi, G., Modena, V., Divittorio, C., Baglioni, C. : Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 49 : 665-667, 1990.
- 13) 宮坂信之 : 自己免疫疾患のサイトカイン. サイトカイン—基礎からの最新情報まで—. (笠倉新平・編), 日本医学館, 1992, p 155-162.
- 14) 和田哲也, 神宮政男, 江崎一子, 延永 正 : 単球・単核球の IL-1 および TNF 産生に対する寛解導入剤の影響. *炎症* 2 : 139-140, 1990.