

## 関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)患者滑膜組織マスト細胞における IL-17A の発現

### Comparison of features of synovial mast cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis

管順一郎<sup>1), 2)</sup>、三嶋信太郎<sup>1), 2)</sup>、坂本朋美<sup>1), 3), 4)</sup>、柏倉淳一<sup>1), 5)</sup>、李 賢鎬<sup>2)</sup>、齋藤 修<sup>2)</sup>、岡山吉道<sup>1), 3), 4)</sup>

Jun-ichiro KAN<sup>1), 2)</sup>, Shintaro MISHIMA<sup>1), 2)</sup>, Tomomi SAKAMOTO-SASAKI<sup>1), 3), 4)</sup>, Jun-ichi KASHIWAKURA<sup>1), 5)</sup>, Hyunho LEE<sup>2)</sup>, Shu SAITO<sup>2)</sup>, Yoshimichi OKAYAMA<sup>1), 3), 4)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、<sup>2)</sup>日本大学医学部 整形外科、<sup>3)</sup>日本大学医学部 医学教育センター、<sup>4)</sup>日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、<sup>5)</sup> 北海道大学大学院薬学研究院衛生化学研究室

#### [要旨]

IL-17A は関節リウマチ(RA)の病態に重要な役割を果たしている。IL-17A の主たる産生細胞は Th17 細胞であるが、近年ヒトマスト細胞からの IL-17A の産生の報告が数件あり、RA 患者の滑膜マスト細胞が IL-17A を産生しているかどうかを変形性関節症 (OA) 患者の滑膜組織マスト細胞との比較を免疫組織化学染色および *in vitro* の実験系を用いて行った。OA と RA 患者の滑膜マスト細胞における IL-17A 発現頻度は様々であり、IL-17A 陽性マスト細胞数とその頻度に両患者間において有意な差を認めなかった。RA および OA 患者由来培養滑膜マスト細胞  $10^5$  個から 40 - 50 pg 程度の少量の IL-17A が刺激なしで 24 時間培養後の細胞上清中に分泌されたが、IgE および IgG 依存性の刺激、TNF- $\alpha$ 、C5a、LPS、IL-23+IL-1 $\beta$  の刺激によって IL-17A 産生の増加はみられなかった。従って、RA の病態において滑膜マスト細胞は、IL-17A の主たる産生細胞ではないと考えられた。

#### [背景]

IL-17A は Th17 細胞が産生するサイトカインで、マクロファージや線維芽細胞に作用して IL-1 $\beta$  や IL-6、TNF- $\alpha$  の産生を促進させる。<sup>1), 2)</sup> IL-17A は間葉系細胞に作用してマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の発現を亢進させ骨融解を促進する。<sup>3)</sup> また、骨芽細胞に作用して RANK の発現を亢進させ、RANKL を介して破骨細胞への分化を促進する。<sup>4)</sup> 関節リウマチ患者では、滑膜組織中のマスト細胞数の増加、関節液中のヒスタミン量およびトリプターゼ量の増加を認める。我々は、滑膜マスト細胞が Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII を発現しており、凝集 IgG は Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA を介して滑膜マ

スト細胞を活性化し TNF- $\alpha$  を産生することを報告した。<sup>5)</sup> 臍帯血マスト細胞が凝集 IgG, TNF- $\alpha$ , アナフィラトキシン C5a, LPS の刺激で IL-17A (400-800 pg/mL) を産生するという報告がある。<sup>6)</sup> また、皮膚マスト細胞は IL-23 と IL-1 $\beta$  の刺激により extracellular trap formation が惹起され IL-17A を分泌するという報告があるが<sup>7)</sup> 詳細は不明である。

### [目的]

RA と OA 滑膜マスト細胞における IL-17A の発現頻度と各種刺激による滑膜マスト細胞からの IL-17A の産生について詳細に検討することを目的とした。

### [対象及び方法]

#### (1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-160112)。

#### (2) 細胞

ヒト滑膜マスト細胞は、RA および変形性関節症(OA)の滑膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織を採取後ただちに 2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさみを用いてできるだけ細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後 recombinant human (rh) SCF (200 ng/mL, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) と rhIL-6 (50 ng/mL, PeproTech) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM) で培養した。42 日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、rhSCF (100 ng/mL) と rhIL-6 (50 ng/mL) を含んだ IMDM で培養した。また、滑膜組織を酵素で細胞を分散後培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

#### (3) 免疫化学組織染色と共焦点顕微鏡による解析：

共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った。滑膜組織を固定して、膜の穴あけをした後、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 標識マウス抗 tryptase モノクローナル抗体(clone AA1; DakoCytomation Inc. , Carpinteria, CA, USA)、Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 標識ウサギ抗 IL-17A ポリクローナル抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、アイソタイプコントロール Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 標識マウス IgG1 および Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 標識ウサギ IgG とインキュベートした。FV1000 型共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いた。

#### (4) 滑膜マスト細胞の活性化

IgE (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Calbiochem, San Diego, CA, USA) で 30 分感作した OA および RA 患者の滑膜マスト細胞を 0.1, 1.0, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗 IgE ポリクローナル抗体 (DakoCytomation Inc.) で 24 時間刺激した。Fc $\gamma$ RI の架橋は、マスト細胞を 0.1, 1, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗ヒト Fc $\gamma$ RI 抗体の F(ab')<sub>2</sub> fragments (F(ab')<sub>2</sub> $\alpha$ Fc $\gamma$ RI, clone 10.1; ID Labs Inc., London, ON, Canada) で 30 分間刺激した。コントロールとしてマウス IgG1 の F(ab')<sub>2</sub> fragments (F(ab')<sub>2</sub>mIgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA) で 30 分間刺激した。細胞を 1 度洗浄後 Fc $\gamma$ RI の架橋のため抗マウス IgG F(ab')<sub>2</sub> fragments のヤギ F(ab')<sub>2</sub> fragments (gF(ab')<sub>2</sub> $\alpha$ mF(ab')<sub>2</sub>, Jackson Immune Laboratory) を添加しさらに 24 時間刺激した。滑膜マスト細胞を 3, 10, 30 ng/mL の rhIL-33 (R&D Systems Inc.) で 24 時間刺激した。抗 Fc $\epsilon$ RI 抗体 (0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , clone CRA1, eBioscience, San Diego, CA, USA) と単量体 IgG (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) あるいは凝集 IgG (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と同時に IL-33 (30 ng/mL) を添加し 24 時間刺激した。滑膜マスト細胞を rhTNF- $\alpha$  (10 ng/mL, R&D Systems Inc.), アナフィラトキシン C5a (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), LPS (10 ng/mL, Sigma-Aldrich) で 24 時間刺激した。また、rhIL-23 (10 ng/mL, R&D Systems Inc.) と rhIL-1 $\beta$  (2.5 ng/mL, R&D Systems Inc.) の同時刺激を 24 時間行った。IL-17A または IL-8 産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。

#### (5) IL-17A と IL-8 産生量の測定

IL-17A と IL-8 産生量の測定は ELISA (R&D Systems Inc.) を用いた。

#### (6) 統計解析

OA と RA の 2 群間の検定においては正規分布に従っていない分布の中心分布の差を検定するため、Mann-Whitney の *U* 検定を用いた。解析には、GraphPad Prism 6 (MDF, Tokyo, Japan) を用いた。  $p < 0.05$  を統計学的に有意差があるとした。

### [結果]

OA と RA 患者の滑膜マスト細胞における IL-17A 発現頻度は様々であり、IL-17A 陽性マスト細胞数とその頻度に両患者間において有意な差を認めなかった。RA および OA 患者由来培養滑膜マスト細胞  $10^5$  個から 40 - 50 pg 程度の少量の IL-17A が刺激なしで 24 時間培養後の細胞上清中に分泌されたが、IgE および IgG 依存性の刺激、TNF- $\alpha$ 、C5a、LPS、IL-23+IL-1 $\beta$  の刺激によって IL-17A 産生の増加はみられなかった。

### [考察]

OA と RA 患者の滑膜マスト細胞における IL-17A 発現頻度は様々であり、IL-17A 発現陽性滑膜組織マスト細胞数およびその頻度は両患者間で有意差はなかった。また、IL-

IL-17A が各種刺激によってヒトマスト細胞から産生されるという報告<sup>6),7)</sup>があるが、我々の実験系では確認できなかった。マスト細胞の培養条件の違いがあるが、その理由は不明である。滑膜マスト細胞は、構成的に少量の IL-17A を分泌しているが、IL-17A 産生を増加させる機序は現時点では不明である。

#### [結論]

RA の病態において滑膜マスト細胞は、IL-17A の主たる産生細胞ではないと考えられた。

#### [参考文献]

- <sup>1)</sup>Toh ML, Kawashima M, Hot A, Miossec P, Miossec P: Role of IL-17 in the Th1 systemic defects in rheumatoid arthritis through selective IL-12Rbeta2 inhibition. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 1562-1567.
- <sup>2)</sup>Shahrara S, Pickens SR, Mandelin AM, 2nd, Karpus WJ, Huang Q, Kolls JK, et al: IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. *J Immunol.* 2010; 184: 4479-4487.
- <sup>3)</sup>Moran EM, Mullan R, McCormick J, Connolly M, Sullivan O, Fitzgerald O, et al: Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11: R113.
- <sup>4)</sup>Kotake S, Yago T, Kawamoto M, Nanke Y: Role of osteoclasts and interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: crucial 'human osteoclastology'. *J Bone Miner Metab.* 2012; 30: 125-135.
- <sup>5)</sup>Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y: Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. *Arthritis Rheum.* 2013; 65 (1): 109-119.
- <sup>6)</sup>Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, et al: Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol.* 2010; 184: 3336-3340.
- <sup>7)</sup>Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al: Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol.* 2011; 187: 490-500.
- <sup>8)</sup>Kan J-I, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, Ra C, Tokuhashi Y, Okayama Y: Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Allergol Int.* 2016; 65(Suppl): S11-16.