

関節リウマチと変形性関節症の
ヒト滑膜マスト細胞における IL-17A の発現

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

菅 順一郎

修了年 2018 年

指導教員 長岡 正宏

目次

概要	・ ・ ・ ・ 1
略語	・ ・ ・ ・ 2
緒言	
1. 関節リウマチ	・ ・ ・ ・ 4
2. 関節リウマチと IL-17A	・ ・ ・ ・ 4
3. IL-17A, B, C, D, E, F と受容体について	・ ・ ・ ・ 5
4. 関節リウマチとマスト細胞	・ ・ ・ ・ 7
5. マスト細胞と IL-17A	・ ・ ・ ・ 8
目的	・ ・ ・ ・ 10
対象と方法	
1. 使用抗体、試薬、物品	・ ・ ・ ・ 11
2. ヒト滑膜マスト細胞の分離と培養	・ ・ ・ ・ 11
3. 免疫組織化学染色、共焦点顕微鏡での解析	・ ・ ・ ・ 12
4. total RNA 抽出、相補的 DNA (cDNA) への逆転写、定量的 reverse transcriptase-polymerase chainreaction (RT-PCR)	・ ・ ・ ・ 13
5. DNA chip 解析	・ ・ ・ ・ 13
6. ヒト T helper 17 (Th17) 細胞の誘導	・ ・ ・ ・ 14
7. 凝集 IgG の作成	・ ・ ・ ・ 14
8. 滑膜マスト細胞の活性化	・ ・ ・ ・ 14

9. 臍帯血マスト細胞の分離	・ ・ ・ ・ 15
10. Mediator assays	・ ・ ・ ・ 16
11. 統計解析	・ ・ ・ ・ 17

結果

1. OA および RA 患者の関節滑膜における IL-17A の発現	・ ・ ・ ・ 18
2. OA および RA 患者の関節滑膜におけるマスト細胞数、IL-17A 陽性マスト細胞数、IL-17A 陽性細胞数、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度	・ ・ ・ ・ 18
3. OA および RA 患者の培養滑膜マストからの IL17-A の産生の検討	・ ・ ・ ・ 18
4. 各種刺激 24 時間後の培養滑膜マスト細胞からの IL-17A と IL-8 産生	・ ・ ・ ・ 20

考察	・ ・ ・ ・ 21
----	------------

まとめ	・ ・ ・ ・ 24
-----	------------

謝辞	・ ・ ・ ・ 25
----	------------

表

1. OA および RA 患者の検査結果、治療情報	・ ・ ・ ・ 26
2. microarray を用いた OA および RA の培養滑膜マスト細胞における IL-17A mRNA の発現比較	・ ・ ・ ・ 27

3. OA および RA の培養滑膜マスト細胞における刺激前と FceRI 架橋刺激後 2h の IL-17A 発現の定量的 RT-PCR 解析 28

図

1. OA および RA 患者の関節滑膜における IL-17A の発現 29
2. OA および RA 患者の関節滑膜におけるマスト細胞数 (A)、IL-17A 陽性マスト細胞数 (B)、IL-17A 陽性細胞数 (C)、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度 (D)、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度 (E) 30
3. OA および RA 患者の培養滑膜マストにおける IL17-A の産生機序の検討 31
4. 各種刺激 24 時間後の培養滑膜マスト細胞からの IL-17A と IL-8 産生 32

図説

1. OA および RA 患者の関節滑膜における IL-17A の発現 33
2. OA および RA 患者の関節滑膜におけるマスト細胞数 (A)、IL-17A 陽性マスト細胞数 (B)、IL-17A 陽性細胞数 (C)、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻

度 (D)、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度 (E)	・ ・ ・ ・ 33
3. OA および RA 患者の培養滑膜マストにおける IL-17A の産生機序の検討	・ ・ ・ ・ 33
4. 各種刺激 24 時間後の培養滑膜マスト細胞からの IL-17A と IL-8 産生	・ ・ ・ ・ 34
引用文献	・ ・ ・ ・ 35
研究業績	・ ・ ・ ・ 42

概要

背景：Interleukin (IL)-17A は、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の病態において、滑膜線維芽細胞やマクロファージを活性化し、炎症を惹起する。また IL-17A は骨芽細胞に作用し receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL) の発現を誘導し、その RANKL は破骨細胞の分化を亢進させ過剰な骨破壊をもたらす。IL-17A の主な産生細胞は、Th17 細胞であるが、RA や変形性関節症 (osteoarthritis; OA) 患者の滑膜組織マスト細胞も、IL-17A を発現していると報告されている。しかし、滑膜マスト細胞の IL-17A の発現頻度は報告により様々であり、詳細は不明である。

目的：OA および RA 患者の滑膜組織マスト細胞における IL-17A の発現頻度について検討することと各種刺激によって滑膜マスト細胞から IL-17A が産生されるかどうかについて検討することを目的とした。

方法：RA および OA 患者の人工膝関節置換術によって得られた滑膜組織を、免疫組織化学染色を行い共焦点顕微鏡で観察し陽性細胞数を数えた。RA および OA 患者の滑膜組織から培養マスト細胞を樹立し、各種刺激後の滑膜培養マスト細胞における IL-17A の mRNA の発現と IL-17A の産生をそれぞれ定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) と enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で解析した。

結果：全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度は、RA と OA 患者の滑膜において有意差を認めなかった。培養滑膜マスト細胞は、恒常的に少量の IL-17A を分泌していたが、IgE もしくは IgG 依存性刺激、IL-33、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、complement component 5a (C5a)、lipopolysaccharide (LPS) および IL-23 + IL-1 β の刺激によって IL-17A 産生の増加はみられなかった。

結論：滑膜マスト細胞は RA における IL-17A の主な産生細胞ではないと考えられた。

略語

ACPAs: anti-citrullinated peptide antibodies

C5a: complement component 5a

C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein

CIA: collagen-induced arthritis

CRP: c-reactive-protein

CXCL1: C-X-C motif ligand 1

DMARDs: disease modifying antirheumatic drugs

EIA: enzyme immunoassay

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating Factor

IL: Interleukin

IMDM: Iscove's modified Dulbecco's medium

LPS: lipopolysaccharide

LSM: lymphocyte separation medium

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MMP: matrix metalloproteinase

MTX: methotrexate

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

NSAID: nonsteroidal antiinflammatory drug

OA: osteoarthritis

O. C. T: Optimal Cutting temperature

PBS: phosphate buffered saline

PsA: psoriatic arthritis

RA: rheumatoid arthritis

RANKL: receptor activator for NF- κ B ligand

ROR: retinoid-related orphan receptor

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

SCF: stem cell factor

SEF: similar expression to fibroblast growth factor

SEFIR: similar expression to fibroblast growth factor/IL-17receptor

TGF- β : transforming growth factor- β

TNF- α : tumor necrosis factor- α

緒言

1. 関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA)

RA は、複数の遺伝的要因に環境因子が加わり自己免疫応答が惹起され、これらの結果として慢性炎症性病態が複数の関節に対称性に生じ、進行性の破壊性関節炎に至る疾患と考えられている (1, 2)。RA 患者の血清中には抗シトルリン化蛋白抗体 (anti-citrullinated peptide antibodies; ACPAs) などの自己抗体が検出され、これらが病態発症との関連を示す全身性の自己免疫疾患である (1, 2)。RA の炎症の主病変は関節滑膜である。RA では滑膜の毛細血管周囲に抗原提示細胞と T 細胞の浸潤が起こり、続いて B 細胞の浸潤がみられる。T 細胞のなかでも Th17 細胞が病態発症に中心的な役割を担っていることが知られている (3)。Th17 細胞は、Interleukin (IL) -17A を産生し滑膜線維芽細胞を活性化して炎症を惹起する。滑膜線維芽細胞は炎症が進展するにつれ増殖し、多層化、絨毛状になる。滑膜の深部では炎症細胞の浸潤と血管の新生が起こり、肉芽組織が形成されその中で骨破壊を担う破骨細胞が活性化される (1, 2)。血管新生、滑膜表層細胞の増生、炎症細胞の活性化、骨・軟骨の破壊などの病態は、種々の細胞から分泌される種々のサイトカインやケモカインが複合的に働いた結果であると考えられている。前述した IL-17A や、マクロファージおよび滑膜細胞の産生する receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、IL-1 および IL-6 などの炎症性サイトカインが病態形成の主要因と考えられている (1, 2, 4)。1980 年代に RA に対するメトトレキサート (methotrexate; MTX) の有効性が確立され、アンカードラッグとして RA 治療の中心となってきた。また MTX の反応が十分でない症例には TNF- α 阻害薬、IL-6 受容体阻害薬などの生物学的製剤を使用して関節破壊を抑制し、寛解状態に持ち込める確率が向上した (4)。しかし生物学的製剤は、高価であり、生物学的製剤に反応しない患者も存在し、より効果的で安価な治療法は望まれる。

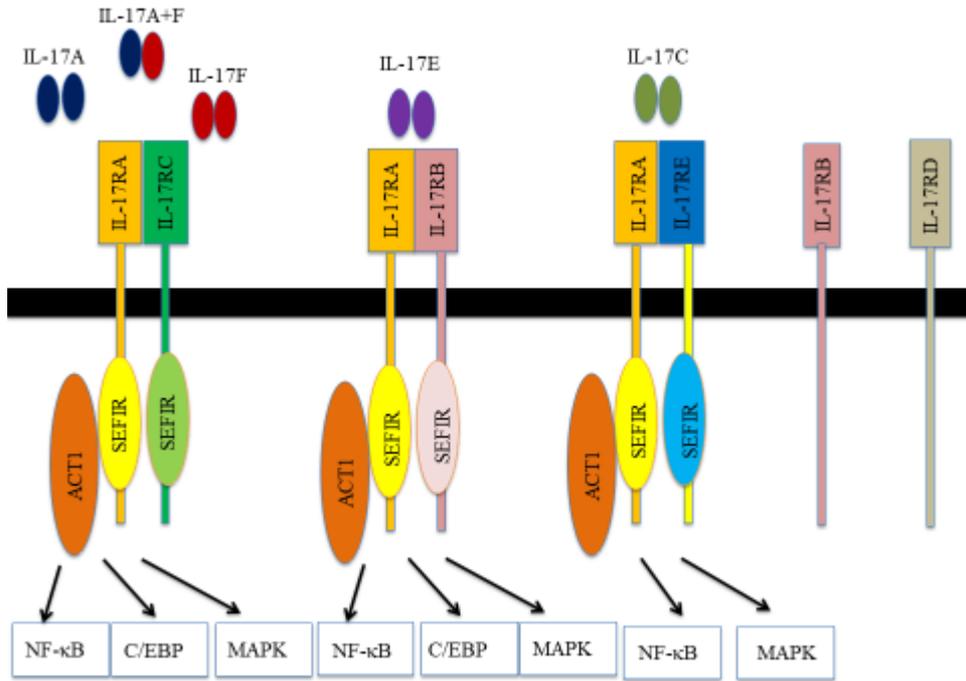
2. 関節リウマチと IL-17A

自己免疫性関節炎モデルマウスにおいて、IL-17A が欠損したマウスは関節炎が抑制されるという報告がある。また、自己免疫性関節炎の実験モデルにおいて、IL-17A の供給源は CD4⁺T 細胞 (Th17 細胞) であることが示唆されている (5, 6, 7)。IL-17A は TNF- α や IL-1 β のような炎症性サイトカインの産生や滑膜線維芽細胞やマクロファージの活性化を促進する (8, 9)。IL-17A は RA の滑膜細胞でマトリックスメタロプロテイナーゼの産生を誘導し (10)、骨芽細胞に作用し RANKL を介して破骨細胞の分化を促進する (11)。IL-17A は活動性のある RA で滑液や血液に多く検出される (12, 13)。そのため IL-17A は炎症と骨破壊を促進することが示唆されている。

3. IL-17A, B, C, D, E, F と受容体について

IL-17 は、IL-17A~IL-17F の 6 つの遺伝子からなるファミリーを形成している。これらファミリーは、IL-17A と IL-17F は 50%、IL-17A と IL-17E は 16% と様々な相動性を有する (14, 15)。

IL17 受容体ファミリーは IL-17A 受容体 (IL-17RA) ~IL17E 受容体 (IL-17RE) までの 5 つのサブユニットで構成されている。それらは細胞外フィブロネクチン III 様ドメイン、単一膜貫通ドメイン、細胞質 SEF (similar expression to fibroblast growth factor) /IL-17R (SEFIR) を含む構造的特徴を有している (15)。IL-17、IL-17A/F および IL-17F は、2 本の IL-17RA 鎖と 1 つの IL-17RC サブユニットで構成される受容体の複合体に結合する。IL-17RA および IL-17RC は、SEFIR ドメインを介してアダプタータンパク質 Act1 と相互作用する (16)。そして、nuclear factor-kappa B (NF- κ B)、mitogen-activated protein kinase (MAPK) および CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) を活性化する (14, 17)。



(Kirkham BW, Kavanaugh A, Reich K. Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. Immunology. 2013; 141: 133-142 Figure 1 を参考に作図)

IL-17A と IL-17F は、Th17 細胞やその他の免疫細胞から、ジスフィルド結合したホモダイマーまたはヘテロダイマーとして分泌される (18)。IL-17A と IL-17F には、IL-1 や IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカイン、C-X-C motif ligand 1 (CXCL1)、matrix metalloproteinase (MMP) および抗菌ペプチドの発現を誘導し、炎症誘導や細菌感染防御に関与している (14)。

IL-17B はコラーゲン誘導関節炎 (collagen-induced arthritis; CIA) の軟骨細胞に発現しており、IL-17C と同様にヒト単球系細胞株から TNF- α 、IL-1 β を誘導すること (19)、IL-17B 遺伝子を導入した CD4⁺ T 細胞をマウスに移植し、CIA を誘導すると関節炎が悪化すること、抗 IL-17B 抗体投与により CIA が抑制されることが報告されている (20)。

IL-17C は CIA において炎症局所に存在する CD4⁺ T 細胞、樹状細胞、マクロファージに発現している。IL-17C の受容体は IL-17RA と IL-17RE からなるヘテロダイマーである (21)。IL-17C が受容体に結合した後、NF- κ B や MAPK を活性化する (22)。

IL-17D は様々な細胞に発現しており、免疫細胞においてはナイーブ CD4⁺ T 細胞、

B 細胞で発現が認められ (23)、内皮細胞においては IL-6、IL-8 および granulocyte macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) の発現を誘導する。

IL-17E は Th2 細胞、マスト細胞、好酸球に作用し、IL-4、IL-5、IL-13 といった Th2 サイトカインの産生や B 細胞においては IgE 産生を誘導する。IL-17E 受容体は IL-17RA と IL-17RB からなるヘテロダイマーであり、IL-17E と相互作用すると NF- κ B、MAPK および CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) の活性化を惹起する (14)。

4. 関節リウマチとマスト細胞

RA 患者の滑膜組織では、関節疾患のない患者の滑膜組織もしくは、半月板切除術後の半月板組織と比較してマスト細胞数が増加し、マスト細胞数と臨床的な滑膜炎の程度との相関すること (24, 25)、脱顆粒像を示すマスト細胞が増加し、マスト細胞周囲に TNF- α や IL-1 が存在すること (26)、RA 患者の関節液中においてヒスタミンが検出されること (27)、RA 患者の滑液内のヒスタミンやトリプターゼの量も増加し、マスト細胞の活動性は RA の病因に関連すると報告されている (28, 29)。また MC_{TC} タイプ (tryptase、chymase の両方のプロテアーゼを持つマスト細胞) のマスト細胞数は、変形性関節症 (osteoarthritis; OA) と健常膝関節滑膜組織と比較して増加していること (30) が報告されている。RA 患者の滑膜マスト細胞は OA 患者の滑膜マスト細胞と比べ抗 IgE 抗体 (31)、アナフィラトキシン C5a (32) に反応してヒスタミンを遊離することが報告されている。これらの結果からマスト細胞が RA の病態、特に、炎症の増悪に関与していることが示唆されていた。2012 年、共同研究者の Lee らは免疫複合体が高親和性 IgG 受容体である Fc γ RI、低親和性 IgG 受容体である Fc γ RIIA を介して関節滑膜マスト細胞を活性化することを報告したが、RA と OA の関節滑膜マスト細胞表面の Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII および高親和性 IgE 受容体である Fc ϵ RI の発現量に差はなく、Fc γ RI や Fc ϵ RI の架橋によって遊離されるヒスタミン量やサイトカイン量には差がなかった (33)。また最近、RA 患者の関節滑膜組織において stem cell factor (SCF) の受容体である Kit やトリプターゼなどのマスト細胞特異的遺伝子発現と血清 c-reactive-protein (CRP) などの RA の重症度には負の相関が見られることから、マスト細胞は、RA の関節炎において抗炎症作用

を有している可能性が示唆されている (34, 35)。

共同研究者の Lee らは、凝集 IgG が Fc γ RI と Fc γ RII を介してヒト滑膜マスト細胞を活性化すると報告した (33)。さらに凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からの IL-8 と TNF- α の産生が IL-33 によって相乗的に増加すると共同研究者の Kashiwakura らは報告した (36)。

5. マスト細胞と IL-17A

IL-17A は Th17 細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、マスト細胞など多くの細胞によって分泌されていることが知られている (37)。Baarsen らは、足関節もしくは膝関節の滑膜組織の IL-17A の発現頻度は RA、psoriatic arthritis (PsA)、OA と同等であると報告している (38)。Noordenbos らは、RA の脊椎関節炎患者の滑膜マスト細胞において全 IL-17A 陽性細胞数中のマスト細胞数は 26%程度、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度は 26%と報告している (39)。Hueber らは RA の関節滑膜において全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度は 91%だったと報告しており (40)、Truchetet らは強皮症患者の皮膚組織において、IL-17⁺細胞の約 20~30%がマスト細胞であると報告している (41)。一方、ヒトマスト細胞は、IL-17A を産生しないが、外因性 IL-17A を補足し貯蔵して放出するという報告がある (42)。

IL-17A の産生誘導に関して、Hueber らは凝集 IgG、TNF- α 、C5a、および lipopolysaccharide (LPS) の刺激によりヒト臍帯血由来培養マスト細胞から 400-800 pg/mL の IL-17A 産生が惹起されると報告している (40)。さらに、Lin らは、IL-23 と IL-1 β の刺激により皮膚マスト細胞は、extracellular trap formation が惹起され、IL-17A を放出すると報告している (43)。

以上をまとめると、ヒト滑膜マスト細胞 (39, 40)、皮膚マスト細胞 (41, 43) およびヒト臍帯血由来培養滑膜マスト細胞 (40) は、IL-17A を発現しており、IgG、TNF- α 、C5a、LPS、および IL-23 と IL-1 β の刺激によって IL-17A が産生されると報告されている (40, 43) が、RA 患者の滑膜組織におけるマスト細胞が IL-17A の主な産生細胞であるのかは結論がでていない。また、ヒトマスト細胞が IL-17A を産生するという

論文は2報告 (40, 43) だけで、産生しないという報告もある (42)。したがって、本研究ではRAの滑膜マスト細胞が免疫複合体等の刺激によってIL-17Aを産生し、滑膜繊維芽細胞、マクロファージ様滑膜細胞、軟骨細胞および破骨細胞を活性化しRAの病態に関与していると仮説をたてた。そのために、OAは機械的、力学的刺激などにより軟骨の変性や摩耗を生じる非炎症性疾患であり、多くの論文 (44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53) でRAの対照疾患としてOAを用いられているためOAを対照疾患とした。OAとの比較によってRAの滑膜組織におけるマスト細胞がIL-17Aの主な産生細胞であるのかどうかを検討し、さらに既報でのマスト細胞に対してのIL-17A産生を惹起する刺激因子が滑膜マスト細胞においても同様に刺激因子として働くのかどうかを検討した。

目的

OA および RA 患者の滑膜組織マスト細胞における IL-17A の発現頻度について検討することと各種刺激によって滑膜マスト細胞から IL-17A が産生されるかどうかについて検討することを目的とした。

対象と方法

1. 使用抗体、試薬、物品

以下の抗体、試薬、物品は、それぞれ下記の会社から購入した。HistoDenz solution、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) およびC5aおよびLPSはSigma-Aldrich (St, Louis, MO, USA)、ヒトIgEは、Calbiochem (San Diego, CA, USA)、ウシ胎児血清、ペニシリン/ストレプトマイシンは、GIBCO (CA, USA)、リンパ球分離溶液 (lymphocyte separation medium; LSM) は、Organon Teknika (Durham, NC, USA)、ヒトリコンビナントSCF、ヒトリコンビナントIL-6は、PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA)、無血清Iscove's methylcellulose mediumは、Stem Cell Technologies (Vancouver, BC, Canada)、TaqManプライマーは全て、Applied Biosystems (Tokyo, Japan)、miRNeasy Mini kitはQiagen (Hilden, Germany)、抗FcγRI F(ab')₂ フラグメント(F[ab']₂αFcγRI, clone 10.1) はID Labs (London, ON, Canada)、ヒトIgG、マウスIgG1 F(ab')₂フラグメント(F[ab']₂mIgG1) および抗マウスIgG F(ab')₂フラグメント特異的ヤギF(ab')₂フラグメント (gF[ab']₂αmF[ab']₂) はJackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)、ヤギ抗ヒトIL-17Aポリクローナル抗体、TNF-α、IL-23、IL-βおよびヒトリコンビナントIL-33 (bioactivityがあることが確認された活性型IL-33) はR&D Systems (Minneapolis, MN, USA)、抗ヒトトリプターゼモノクローナル抗体および抗ヒトIgE抗体はDako Cytomation (Carpinteria, CA, USA)、抗FcεRI_α抗体はeBioscience (San Diego, CA, USA)、DAPIはInvitrogen (Carisbad, CA, USA)、臍帯血パックはRIKEN Bio Resource Center (Tsukuba, Ibaraki, Japan)。

2. ヒト滑膜マスト細胞の分離と培養

平成 22 年 2 月 8 日付けで関節滑膜組織の使用に際して、倫理委員会・臨床研究審査委員会の承認番号 RK-100115-4 を受けた。その後改訂版として平成 23 年 4 月 12 日、平成 24 年 12 月 17 日、平成 25 年 6 月 25 日付けで追加承認を受けた。平成 28 年 2 月 5 日付け承認番号 RK-160112-2 を受けた。手術前にインフォームドコンセントを患者とその家族に行い、承諾書を頂いた。その後、日本大学医学部附属板橋病院にて行われた、人工膝関節置換術で切除された関節滑膜組織の一部を実験に供し

た。滑膜組織を酵素的に処理し、細胞を単離した (マスト細胞の純度は約 5%)。マスト細胞の純度はキムラ染色 (54) を用いて算出した。マスト細胞の純度を上げるために、単離された細胞を 2%ウシ胎児血清と 100 units/ml ペニシリンと 100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Invitrogen) に再浮遊させた後、22.5% HistoDenz solution とリンパ球分離溶液 (LSM: lymphocyte separation medium) を用いて比重遠心した。滑膜マスト細胞の前駆細胞と成熟マスト細胞は、その遠心により得られた沈殿層と LSM の境界面の細胞層より回収された (33)。キムラ染色陽性細胞 (54)、すなわちマスト細胞の平均純度は $43 \pm 4\%$ (9 検体の平均 \pm 標準誤差) であった。比重遠心後に回収した滑膜マスト細胞を無血清 Iscove's methylcellulose medium に 200 ng/ml のヒトリコンビナント SCF と 50 ng/ml のヒトリコンビナント IL-6 を添加した IMDM に直接再浮遊させ培養した。42 日目には methylcellulose medium をリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS) で溶解し、0.1% BSA、100 ng/ml のヒトリコンビナント SCF、50 ng/ml のヒトリコンビナント IL-6、100 units/ml ペニシリン/ストレプトマイシンを含有した IMDM (マスト細胞 [MC] 培地と呼ぶ。以下同様) に直接再浮遊させ培養を 12 週から 15 週まで継続した。共同研究者の Lee らによって、ヒト滑膜由来マスト細胞の樹立を行った際 12~15 週で純度がほぼ 100 %となり、それ以降細胞数が緩徐に減少するという知見を得たためこの培養期間を用いた (33)。

3. 免疫組織化学染色、共焦点顕微鏡での解析

人工膝関節置換術後の新鮮な滑膜組織を径 5 mm の切片に切って、4%のparaホルムアルデヒドと 4 $^{\circ}$ Cで約 24 時間混合しその後 4 $^{\circ}$ C、10%スクロースで 4 時間、15%スクロースで 4 時間、20%スクロースで over night で置換させ、O. C. T (Optimal Cutting temperature) コンパウンドを用いて凍結させて固定した。クライオスタットを用いて 4 μ m の切片に加工し凍結した切片をプレパラートに乗せ、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。アセトンでプレパラート上の滑膜切片に 5 分間湿らせて穴あけを施行し PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。2%ノンファットスキムミルク PBS で 1 時間、37 $^{\circ}$ Cでブロッキングした。次に AlexaFluor[®]488 を結合させた抗ヒト tryptase モノクローナル抗体を 5 分暗所でインキュベートし、mouse IgG、2%ノンファットスキムミルク PBS で 5 分ずつブロッキングした。次に抗ヒト IL-17A 抗体をインキュベ

とし4°Cで over night した。PBS で3回洗浄し、抗ヒト IL-17A 抗体に AlexaFluor®555 を結合させ、2%ノンファットスキムミルクでブロッキングした。Negative コントロールとして AlexaFluor®488 を結合させたマウス IgG1 と AlexaFluor®555 を結合させたヤギ IgG を用いた。マスト細胞数や IL-17A 陽性細胞数は ProLong®Gold Antifade Reagent、DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用し Model FV1000 共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて2人の実験者がブラインドでカウントしその平均をとった。

4. total RNA 抽出、相補的 DNA (cDNA) への逆転写、定量的 reverse transcriptase-polymerase chainreaction (RT-PCR)

RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いて、OA および RA 滑膜由来マスト細胞から total RNA を抽出した。抽出した total RNA (100 ng) を 10 mM dNTP mix、oligo-dT primer (Invitrogen Life technologies)、nuclease-free water を混合し、65°C で5分反応後、4°C で急冷した。この混合液に 5×First strand buffer、0.1 M 1,4-Dithiothreitol (DTT)、RNase out、Super Script II (Invitrogen Life technologies) を添加し、42°C で50分、72°C で15分反応させ、4°C で急冷し、total RNA を cDNA に逆転写した。逆転写した cDNA (5 ng) と TaqMan Universal master Mix II (Applied Biosystems)、FAM 標識された各遺伝子に対するプローブセット (Applied Biosystems) もしくは VIC 標識された GAPDH と IL-17A に対するプローブセット (Applied Biosystems)、Nuclease free water を、96 穴プレートに添加し、定量的 RT-PCR を実施した。定量的 RT-PCR は、StepOne Plus (Applied Biosystems) を用いて測定した。定量的 RT-PCR データは、StepOne software v2.1 (Applied Biosystems) で解析し、GAPDH および IL-17A の発現量を測定した。

5. DNA chip 解析

OA マスト細胞、RA マスト細胞および臍帯血由来培養マスト細胞の発現遺伝子を DNA chip を用いて網羅的解析を行った。OA マスト細胞と RA マスト細胞から RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、前述の方法で cDNA に逆転写した。逆転写した cDNA と biotin 標識されたヌクレオチド三リン酸を用いて、ビオチン化相補的 RNA (Biotin-cRNA) を合成した。Biotin-cRNA と Human Genome

U133 (Affymetrix) を 45°C で 16 時間反応させ、ハイブリダイゼーションした。その後、streptavidin-phycoerythrin (PE) と反応させ、Hewlett-Packard Gene Array Scanner (Palo Alto, CA, USA) を用いて蛍光強度を読み取った。各プローブの蛍光強度は、GeneChip Analysis Suite 5.0 (Affymetrix) で数値化した。数値化したデータを Genespring software (Agilent Technologies) を用いて解析し、IL-17A とマスト細胞の発現している特異的遺伝子を抽出した。データは raw データを %GAPDH で示した。

6. ヒト T helper 17 (Th17) 細胞の誘導

健康人からヘパリン採血し、PBS で 3 倍に希釈した。LSM を用いて比重遠心を施行した。単核球層を回収し PBS と混和し洗浄した。Easy Sep CD3 negative selection kit (Stem Cell Technologies Inc.) を用いて、単核球層から T 細胞を単離した。4°C で overnight し、10 µg/ml の抗 CD3 抗体 (Biolegend, clone OKT3) を固層化させた 24 穴プレートに 1×10^6 個の細胞を播種した。さらに 2.5 µg/ml の抗 CD28 抗体 (clone 9.30)、50 ng/ml の IL-6 (R&D System Inc.) および 2 ng/ml の transforming growth factor (TGF)-β1 (R&D System Inc.) を添加し、37°C、5% CO₂ で細胞培養した。3 日目の細胞から上清を採取した。この細胞上清を ELISA の IL-17A の陽性コントロールに使用した。IL-17A mRNA のコントロールはこの 3 日目の細胞に 10 µg/ml の抗 CD3 抗体、2.5 µg/ml の抗 CD28 抗体、50 ng/ml の IL-6、20 ng/ml の IL-23 および 2 ng/ml の TGF-β1 で再刺激しさらに 3 日間培養した細胞から total RNA を抽出し、cDNA を作製した後に IL-17A mRNA の陽性コントロールとした。

7. 凝集 IgG の作成

凝集 IgG はヒト IgG (Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA, USA) を 63 °C、1 時間でインキュベートして、30 分で遠心分離しその上清を凝集 IgG として実験に供した。

8. 滑膜マスト細胞の活性化

マスト細胞を上記のマスト細胞培地に浮遊させマスト細胞数を 10^5 個/100 µl とした。FcεRI 架橋実験では、まずマスト細胞を 0.5 µg/ml のヒト IgE と 37°C、30 分間インキュベートし、IgE 感作をした。その細胞を 1 回洗浄しマスト細胞培地に浮遊

させた。IgE に感作されたマスト細胞を抗ヒト IgE 抗体で 30 分間もしくは 6 時間インキュベートした。

FcγRI の架橋実験では、まずマスト細胞を 1 μg/ml の抗 FcγRI F(ab')₂ フラグメント (clone 10.1)、またはマウス IgG1 F(ab')₂ フラグメントと共に 37°C、30 分間インキュベートした。その細胞を洗浄してマスト細胞培地に浮遊させ、マスト細胞を抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フラグメントと 6 時間インキュベートした。

マスト細胞を単量体 IgG、凝集 IgG、IL-33 (R&D System Inc.) で 6 時間インキュベートした。IL-33 (0, 10 あるいは 30 ng/ml) 存在下で抗 FcεRI 抗体 (clone CRA1)、単量体 IgG あるいは凝集 IgG で 6 時間インキュベートした。さらにマスト細胞を TNF-α (R&D Systems Inc.)、C5a (Sigma-Aldrich)、LPS (Sigma-Aldrich) あるいは IL-23 (R&D Systems Inc.) + IL-1β (R&D Systems Inc.) で 24 時間インキュベートした。

9. 臍帯血マスト細胞の分離

臍帯血パックを 37°C water bath で完全に解凍し、あらかじめ 20 ml のデキストランを加えた 50 ml tube に回収し転倒混和し 7 分、遠心した。上清を除去し、35 ml の PBS に懸濁させた。50 ml tube に 13 mL の LSM を加え、細胞懸濁液 35 ml を重層し比重遠心した。単核球層を 50 ml tube に回収し、MACS buffer で洗浄し MACS buffer 200 μl に懸濁させ、50 μl の FcR blocking reagent および 50 μl の MACS-beads (CD 34)を加え 4°C、30 分でインキュベートした。MACS buffer で洗浄後、MACS-Positive selection する。LS column を MACS にセットし、3 ml の MACS buffer で洗浄した。標識細胞を 500 μl の MACS buffer に懸濁させ、カラムにアプライし 3 ml の MACS buffer を加えて洗浄した。この洗浄を 3 回行った。新しい 15 ml tube にカラムを移し、5 ml の MACS buffer を加え細胞を押し出す。遠心後 CD34⁺ 細胞を 300 μl の serum free mast medium に懸濁させ、2 μg/ml の SCF および 500 ng/ml の IL-6 を含む 300 μl の serum free mast medium を 3 ml のメチルセルロース培地に加え攪拌し、10 分静置し 0.6 ml/well で 24 穴プレート 8 well にまいて 37°C、CO₂ 5%でインキュベートした。培養 2 週間毎に 200 ng/ml の SCF および 50 ng/ml の IL-6 をくわえたメチルセルロースを加え、培養した。42 日後からの培養は関節滑膜由来培養マスト細胞と同様の方法で行った。培養した臍帯血マスト細胞に対して DNA chip 解析を

行った。

10. Mediator assays

ヒト IL-17A と IL-8 は BioLegend Inc (San Diego,CA,USA)と BD Biosciences からそれぞれ購入した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットで測定した。IL-17A の最少検出度は 2 pg/ml であった。マスト細胞からのヒスタミンの分泌は histamine enzyme immunoassay (EIA) キット (Immunotech,MBL, Nagano, Japan) で測定した。

・ IL-17 ELISA 法について

抗体が固層化された 96 穴プレート を 300 μ l の wash buffer で 4 回洗浄し、50 μ l の Assay Buffer を各 well に添加した。Standard もしくはサンプルを 50 μ l ずつ各 well に加え 2 時間、室温で振動させながらインキュベートした後、300 μ l の wash buffer で 4 回洗浄した。100 μ l の Detection Antibody solution を各 well に加え 1 時間、室温で振動させながらインキュベートした後、300 μ l の wash buffer で 4 回洗浄した。100 μ l の Avidin-HRP D solution を各 well に加え 30 分、室温で振動させながらインキュベートした後、300 μ l の wash buffer で 5 回洗浄した。次に 100 μ l の Substrate Solution F を各 well に加え 30 分、室温、暗室で静置し反応させた。最後に 100 μ l の Stop Solution を各 well に加え反応を停止させた後に 450 nm の吸光度を測定した。

・ IL-8 ELISA 法について

96 穴プレート を Coating Buffer で 250 倍希釈した 100 μ l の capture antibody を各 well に添加し 4°C で over night した後、300 μ l の wash buffer で 3 回洗浄した。200 μ l の Assay Diluent を各 well に加え、1 時間室温でインキュベートした後 300 μ l の wash buffer で 3 回洗浄した。Assay Diluent で 200 倍希釈した Standard もしくはサンプルを 100 μ l ずつ各 well に加え 2 時間、室温でインキュベートした後、300 μ l の wash buffer で 5 回洗浄した。Assay Diluent で 250 倍希釈した 100 μ l の Detection Antibody+Avidin-HRP D solution を各 well に加え 1 時間、室温でインキュベートした後、300 μ l の wash buffer で 7 回洗浄した。次に 100 μ l の Substrate Solution を各 well に加え 30 分、室温、暗室で静置し反応させた。最後に 50 μ l の Stop Solution を各

well に加え反応を停止させた後に 450 nm の吸光度を測定した。

・ヒスタミン アッセイ法について

プラスチックの試験管に 25 μ l のアシル化液、100 μ l の標準液あるいは検体を加え、25 μ l のアシル化緩衝液を加えて攪乱した。抗体感作マイクロカップにアシル化した標準液あるいは検体を 50 μ l 加えさらに標識液 200 μ l を加えた後、洗浄ビンを用いて 2 回洗浄した。200 μ l の基質液を各 well に加え、抗体感作マイクロカップに蓋をして 25°C、30 分間振盪反応させた。50 μ l の反応停止液を各 well に加え、反応を停止させた後に 415 nm の吸光度を測定した。

11. 統計解析

RA と OA 患者の滑膜におけるマスト細胞数、IL-17A 陽性マスト細胞数、IL-17A 陽性細胞数、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度の違いは 2 群間のノンパラメトリックな統計解析法であるので Mann-Whitney U 検定を用いて算出した。2 群間のサイトカイン産生量の解析には One-way ANOVA と Tukey's multiple test を用いて算出した。p value は 0.05 未満を信頼区間に設定した。

結果

1. OA および RA 患者の関節滑膜における IL-17A の発現

RA 患者の滑膜マスト細胞が IL-17A を発現するかどうかについて検討した。RA 6 ドナーおよび OA 6 ドナーの関節滑膜組織を用いた。患者の概要については表 1 に示した。OA 患者は nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID)、RA 患者は MTX、disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) や抗 TNF- α 抗体で治療されていた (表1)。滑膜サンプルを抗 IL-17A 抗体と抗トリプターゼ抗体を用いて 2 重染色を施行した。対照として OA 患者の関節滑膜を用いた。OA 患者 (図.1A-c) および RA 患者の滑膜マスト細胞 (図.1B-c) が IL-17A を発現していることがわかった。

2. OA および RA 患者の関節滑膜におけるマスト細胞数、IL-17A 陽性マスト細胞数、IL-17A 陽性細胞数、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度

OA と RA 患者間で滑膜マスト細胞における IL-17A の発現頻度を比較した。OA と RA 患者の滑膜組織において、マスト細胞数 (図 2A)、IL-17A 陽性マスト細胞数 (図 2B)、IL-17A 陽性細胞数 (図 2C)、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度 (図 2D)、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度 (図 2E) には有意差を認めなかった。OA において全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度は平均 25%、RA では平均 8%であった。

3. OA および RA 患者の培養滑膜マストからの IL17-A の産生の検討

OA2 ドナー、RA2 ドナーに対して microarray を用いた培養滑膜マスト細胞における IL-17A mRNA の発現比較では、RA1 ドナーで present call であったが、OA2 ドナー、RA1 ドナーでは absent call であった。また、臍帯血由来培養マスト細胞においても IL-17A mRNA の発現は、absent call だった。マスト細胞に特異的な KIT や Fc ϵ RI α 鎖は全例 present call であった (表 2)。マスト細胞に特異的な Fc ϵ RI と Fc γ RI を介する刺激によって滑膜マスト細胞から IL-17A が産生されるかどうかを解析するために、マスト細胞に IgE と抗 IgE 抗体、抗 Fc γ RI F(ab')₂ フラグメントと

抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フラグメントを添加し刺激した。OA および RA の培養滑膜マスト細胞における刺激前と FcεRI 架橋刺激後 2 時間後の IL-17A 発現の定量的 RT-PCR 解析において、OA 患者 4 ドナー、RA 患者 3 ドナーを用いて検討した結果、刺激前の IL-17A mRNA の発現は RA の 1 ドナーのみで CT 値 41.8 と検出されたが、それ以外は検出されなかった。FcεRI 架橋刺激後では IL-17A mRNA の発現は、OA 患者 4 ドナー中 2 ドナーが CT 値 41.7、40.9 と検出され、RA 患者は 2 ドナー中 2 ドナーが検出感度以下であった。1 検体は未検だった。ポジティブコントロールとして健常者の末梢血より誘導した Th17 を用いて IL-17A mRNA の発現を確認した (表 3)。図 3 に示すように、非刺激で 6 時間培養したマスト細胞の上清では少量の IL-17A (10~20 pg/ml) が検出された。しかし、FcεRI もしくは FcγRI 架橋刺激によって IL-17A の産生は上昇しなかった (図 3A と 3B)。OA と RA 患者からの IL-17A 産生量に有意差は認めなかった (図 3A)。滑膜マスト細胞が抗 IL-17A 抗体によって染色されたことより、マスト細胞内に IL-17A が貯留されていることが考えられた。そのため脱顆粒反応と同時に IL-17A が分泌されるかどうかを調べるため、FcεRI の架橋刺激後マスト細胞が 30 分以内に IL-17A を分泌するかについて検討した。IgE に感作した RA2 ドナー、OA3 ドナーの滑膜マスト細胞を抗 IgE 抗体 0.1、1.0 および 10 μg/ml でインキュベートし、FcεRI の架橋刺激後の細胞上清中の IL-17A とヒスタミンを測定した。ヒスタミンは抗 IgE 抗体の刺激によって分泌されたが、滑膜マスト細胞から IL-17A 分泌は認められなかった。次に凝集 IgG による OA 患者滑膜マスト細胞からの IL-17A の産生について検討した。凝集 IgG、単量体 IgG 刺激のどちらでも IL-17A の産生は惹起されなかった (図 3C)。IL-33 刺激による OA および RA 患者の滑膜マスト細胞からの IL-17A 産生を検討した。IL-33 を 3、10 および 30 ng/ml で 6 時間刺激した後の細胞上清中の IL-17A を測定した。IL-33 刺激によって有意な IL-17A の産生は認められなかった。また IL-33 の 0 ng/ml と 10 ng/ml において RA 患者からの IL-17A 産生量が OA 患者からの IL-17A 産生量よりも統計学的に有意に高かったが、図 3A では非刺激時においてその産生量に有意差は認められなかったため、ドナー間による差と考えた (図 3D)。次に FcεRI 架橋刺激および凝集 IgG 刺激による滑膜マスト細胞からの IL-17A 産生における IL-33 の影響を検討した。抗 FcεRI 抗体 0.3 μg/ml、単量体 IgG 1 μg/ml、あるいは凝集 IgG 1 μg/ml と同時に IL-33 を添加し 6 時間後の細胞上清中の IL-17A

を測定した。IL-33 はこれらの刺激による IL-17A の産生に明らかな影響を及ぼさなかった (図 3E)。ポジティブコントロールとして滑膜マスト細胞からの IL-8 の産生を抗 FcεRI 抗体 0.3 μg/ml、単量体 IgG 1 μg/ml あるいは凝集 IgG 1 μg/ml と IL-33 を同時に刺激した上清を用いて ELISA で測定した。滑膜マスト細胞は抗 FcεRI 抗体、凝集 IgG の刺激によって 5.6 ng/ml および 1.9 ng/ml の IL-8 を産生し、凝集 IgG 刺激による滑膜マスト細胞からの IL-8 産生は、30 ng/ml の IL-33 の添加により有意に上昇した (図 3F)。さらに IL-17A のポジティブコントロールとして健常者の末梢血より Th17 細胞を誘導しその培養上清中に 393 pg/ml の IL-17A を検出した。一方ナイーブ T 細胞の細胞上清の IL-17A は 14.5 pg/ml であった (図 3G)。

4. 各種刺激 24 時間後の培養滑膜マスト細胞からの IL-17A と IL-8 産生

ヒト臍帯血マスト細胞を TNF-α、C5a、LPS あるいは IL-1β + IL-23 で刺激すると IL-17A の産生が惹起されるという報告 (40, 43) があり、滑膜マスト細胞からの IL-17A の産生を、同刺激を用いて検討した。しかし、これらの刺激で IL-17A は産生されなかった (図 4A)。ポジティブコントロールとして同実験における細胞上清中の IL-8 の産生量を測定したところ LPS と IL-23 + IL-1β は有意に IL-8 の産生を惹起した。 ($p < 0.05$)

考察

OA、RA 患者ともに滑膜マスト細胞は IL-17A を発現していたが、その発現頻度はドナーによって様々だった。RA 患者の滑膜の IL-17A 陽性全細胞数、IL-17A 陽性マスト細胞数と全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度は OA 患者と比較して有意差はみられなかった。今回の報告は Baarsen らの報告 (38) に合致している。彼らの報告は RA 患者の滑膜中の IL-17A 陽性全細胞数をコントロールの OA 群と比較したもので、RA と OA では IL-17A の発現数は類似しており、個々の患者によってかなりの変動が大きいいため RA 患者に抗 IL-17A 抗体による治療は効果がないことを示唆している。今回の結果では OA と RA 患者の全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度はそれぞれ 45%および 14%、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度はそれぞれ 26%および 8%だった。その結果は Noordenbos らの RA の脊椎関節炎患者の滑膜マスト細胞において全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度は 26%程度、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度は 26%という報告 (39) とほぼ一致している。一方、Hueber らは、RA の関節滑膜において全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数頻度は 91%だったと報告している (40)。

ヒト臍帯血のマスト細胞は TNF- α 、IgG 複合体、C5a および LPS の刺激により 500 ~800 pg/ml といった多量の IL-17A を産生するという報告がある (40)。滑膜マスト細胞に同一条件、同一時間、同一濃度でこれらの刺激を添加したが IL-17A の産生は認められなかった。DNChip 解析を用いて臍帯血由来培養マスト細胞の IL-17A mRNA 発現を検討したが、このマスト細胞において IL-17A の発現は認められなかった。皮膚のマスト細胞の IL-17A の発現は、IL-23 + IL-1 β の刺激により extracellular trap formation が惹起され IL-17A を放出するという報告がある (43)。ナイーブ T 細胞が transforming growth factor- β (TGF- β) + IL-6、もしくは IL-1 β の刺激を受け、Th17 細胞への転写因子である核内オーファン受容体 (retinoid-related orphan receptor; ROR) γ t を発現することによって Th17 細胞へと分化される。そして ROR γ t は Th17 細胞上に IL-23R の発現を誘導し、IL-23 がそれに作用することによって Th17 細胞は増殖し存続する (55, 56)。しかし今回の実験では IL-23 + IL-1 β の刺激による滑膜

マスト細胞からの IL-17A の産生は認められなかった。Lin らは正常皮膚の切片に IL-23 + IL-1 β を 3 日間投与して免疫組織化学染色を施行している。そこで Lin らの実験ではマスト細胞以外の細胞の影響はあった可能性を否定できない。本研究では膝関節の滑膜由来培養マスト細胞を使用し、そのマスト細胞の純度は 99 % であり、他の細胞の影響はないと思われる。IL-23 + IL-1 β の長期間の刺激が、マスト細胞に IL-17A の発現を惹起するかどうかはさらなる研究が必要となる。また、本研究に用いた滑膜培養マスト細胞は 12 週間の長期培養が必要であり、組織に存在している滑膜マスト細胞と同一の細胞ではなく、今後組織から分離した直後の滑膜マスト細胞を用いての検討が必要である。しかしながら、培養滑膜マスト細胞を抗 IL-17A 抗体で染色すると組織マスト細胞と同様に染色されたことから (data not shown)、培養滑膜マスト細胞から少量の IL-17A が産生されるという知見は、培養細胞と組織の違いだけでは説明がつかない。マスト細胞は Fc ϵ RI の架橋刺激後 30 分以内に IL-17A は分泌しないことがわかった。従って IL-17A は顆粒内に貯留されていないかあるいは貯留されていても IL-17A の量は非常に微量であると考えられた。

今回の免疫組織染色の検体に用いた滑膜組織は RA ではプレドニン、MTX、抗 TNF- α 抗体や DMARDs で治療を受けていた患者からの組織でこれら薬剤がマスト細胞の IL-17A の発現に影響があったことは否定できない。一方 OA は全例 NSAIDs で治療を受けており同一の治療であっても、IL-17A 発現細胞数の頻度にはドナー間で差異があった。培養マスト細胞は分離後 12 週間培養された細胞であり手術前の治療の影響は少ないと考えられた。

マスト細胞 (10^6 cells/ml) は非刺激では 10~20 pg/ml という少量の IL-17A を分泌していた。OA 患者 22 ドナー中 3 ドナーはこの自発的な IL-17 の分泌量は ELISA で検出感度以下だった。マスト細胞を Fc ϵ RI 架橋、Fc γ RI 架橋、凝集 IgG、C5a、TNF- α および LPS の刺激をおこなっても IL-17A の産生は惹起されなかった。IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度は RA と OA 患者間で有意差はなく、滑膜マスト細胞は RA における IL-17A の主な産生細胞ではないと考えられた。

RA 患者の血清 IL-17A 濃度はコントロールより高いことがメタアナリシスで報告され (57)、また、白色人種においては IL-17A の遺伝子多型と RA の関連が示された (57)。しかしながら RA の発症危険度と IL-17A の遺伝子多型との関連はなかった (57)。またポーランド人 (58)、アルジェリア人 (59) においては IL-17A の遺伝子

多型と RA の発症危険度には有意な相関はなく、一方、中国人 (60) ではその相関がみられたとの報告もある。また、ノルウェー人において IL-17A のプロモーターの遺伝子多型と RA との間に弱い関連がみられたという報告もある (61)。本研究では IL-17A やプロモーターの遺伝子多型と IL-17A 陽性マスト細胞数頻度との関連については検討しなかったが、今後の検討であろう。

ヒト化抗 IL-17A モノクローナル抗体 Ixekizumab は phase II 試験にて生物製剤未使用の RA 患者およびヒト化抗 TNF- α モノクローナル抗体で充分の反応がなかった RA 患者両者に対して有効であり、安全性も確認された (62)。さらにメタアナリシスでも抗 IL-17A 抗体治療は RA に有効と報告されている (63)。一方、抗 IL-17A 抗体による RA に対する治療は有効でなかったのは、IL-17A、IL-17F、とその受容体は RA のみならず OA 患者の滑膜組織と同様に発現しているからと推察している報告がある (38)。本研究においても IL-17A の発現頻度は OA と RA で差がみられず、さらに症例を増やして検討する必要がある。

本研究で滑膜組織ではその発現頻度に変動があるもののマスト細胞が IL-17A を発現しており、マスト細胞は IL-17A の産生細胞の一つであることが示唆された。しかしながら、滑膜由来培養マスト細胞は非刺激で少量 (10-20 pg/ml) の IL-17A を分泌していたが、本研究で施行した刺激ではその分泌量を増加させなかった。最近、マスト細胞は、IL-17A を産生せず捕捉し分泌するという報告があるので (42)、滑膜由来培養マスト細胞を IL-17A とインキュベートした後、IL-17A の発現を抗 IL-17A 抗体を用いて免疫染色を行い、インキュベート前後で IL-17A の発現の変化を調べたが、その差はなかった (data not shown)。今後、*in situ hybridization* 法を用いて滑膜組織のマスト細胞における IL-17A mRNA の発現確認を行う必要がある。

まとめ

OAおよび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OAとRAの両患者間で有意差はなかった。滑膜マスト細胞は、RAにおけるIL-17Aの主な産生細胞ではないと考えられた。

謝辞

本研究は日本大学医学部 IR・医学教育センター、免疫・アレルギー学プロジェクトチーム (岡山吉道准教授) において実施したものです。

本研究に関して、直接研究ならびに学位論文の御指導、御校閲を直接賜りました日本大学医学部 IR・医学教育センター、免疫・アレルギー学プロジェクトチームの岡山吉道准教授に深謝いたします。また、研究の御指導を賜りました柏倉淳一博士ならびに坂本-佐々木朋美氏に深謝いたします。本研究のために関節滑膜をご供与いただいた日本大学医学部整形外科系整形外科学分野、齋藤修准教授に深謝いたします。本研究の御指導を賜りました日本大学医学部整形外科系整形外科学分野、徳橋泰明教授に深謝いたします。

表

表 1: OA および RA 患者の検査結果、治療情報

Patient	sex	Age	Onset (year)	WBC (/mm ³)	CRP (mg/dl)	anti-CCP Ab (U/ml)	MMP3 (ng/ml)	RF (mg/dl)	Treatment
OA1	F	80	2011	6000	0.1	n.d	n.d	n.d	NSAIDs
OA2	M	77	2011	6300	0.1	n.d	n.d	n.d	NSAIDs
OA3	F	82	2002	6400	0.23	n.d	n.d	n.d	NSAIDs
OA4	F	76	2014	7800	0.1	n.d	n.d	n.d	NSAIDs
OA5	F	83	2014	6200	0.1	n.d	n.d	n.d	NSAIDs
OA6	M	72	2010	2700	0.13	n.d	n.d	n.d	NSAIDs
RA1	F	69	2001	7000	0.51	<0.6	342.8	n.d	NSAIDs+ anti-TNF- α + PSL
RA2	F	73	2012	7900	15.8	322	1490.5	15.2	MTX + anti-TNF- α
RA3	F	74	2010	4000	0.10	0.6	n.d	5.3	DMARDs + NSAIDs
RA4	F	74	2012	5700	0.59	36.4	256.5	11.1	MTX + PSL + NSAIDs
RA5	F	78	2014	8000	3.78	727	386.7	n.d	MTX
RA6	F	76	2014	4600	0.43	20.7	133.3	15.8	MTX + PSL

anti-CCP Ab: anti-cyclic citrullinated peptide antibody、 anti-TNF- α anti-tumor necrosis factor - α antibody therapy、 CRP: C-reactive protein、 DMARDs: disease modifying antirheumatic drugs、 F: female、 M: male、 MMP3: matrix metalloproteinase 3、 MTX: methotrexate、 n.d: not done、 NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs、 OA: osteoarthritis、 PSL: prednisolone、 RA: rheumatoid arthritis、 RF: rheumatoid factor、 WBC: white blood cells

表 2: microarray を用いた OA および RA の培養滑膜マスト細胞および臍帯血由来培養マスト細胞における IL-17A mRNA の発現比較

	OA1		OA2		RA1		RA2		C-mast	
KIT	1.3	P	1.3	P	1.6	P	1.2	P	0.75	P
FcεR I α鎖	0.57	P	0.56	P	0.27	P	0.30	P	0.08	P
IL-17A	8.8×10^{-4}	A	5.4×10^{-4}	A	4.6×10^{-5}	A	1.1×10^{-3}	P	8.1×10^{-3}	A

データは microarray の raw データを%GAPDH で示す。

A:absent call, P:present call

C-mast: cord blood derived-cultured mast cell

表 3: OA および RA の培養滑膜マスト細胞における刺激前と FcεRI 架橋刺激後 2h の IL-17A 発現の定量的 RT-PCR 解析

	OA1	OA2	OA3	OA4	RA1	RA2	RA3	Th17
刺激前								
IL-17A	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	41.8	N.D	34
GAPDH	28.0	26.8	23.6	25.7	24.7	25.9	25.1	22.7
FcεRI 架橋刺激後 2h								
IL-17A	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	-	N.D	
GAPDH	26.9	26.8	24.5	23.4	24.2	-	33.0	

データはC T値で示す。

N, D not detected: 50 サイクルを PCR 反応させたが、検出されなかった。

- 未検



図 1: OA および RA 患者の関節滑膜における IL-17A の発現

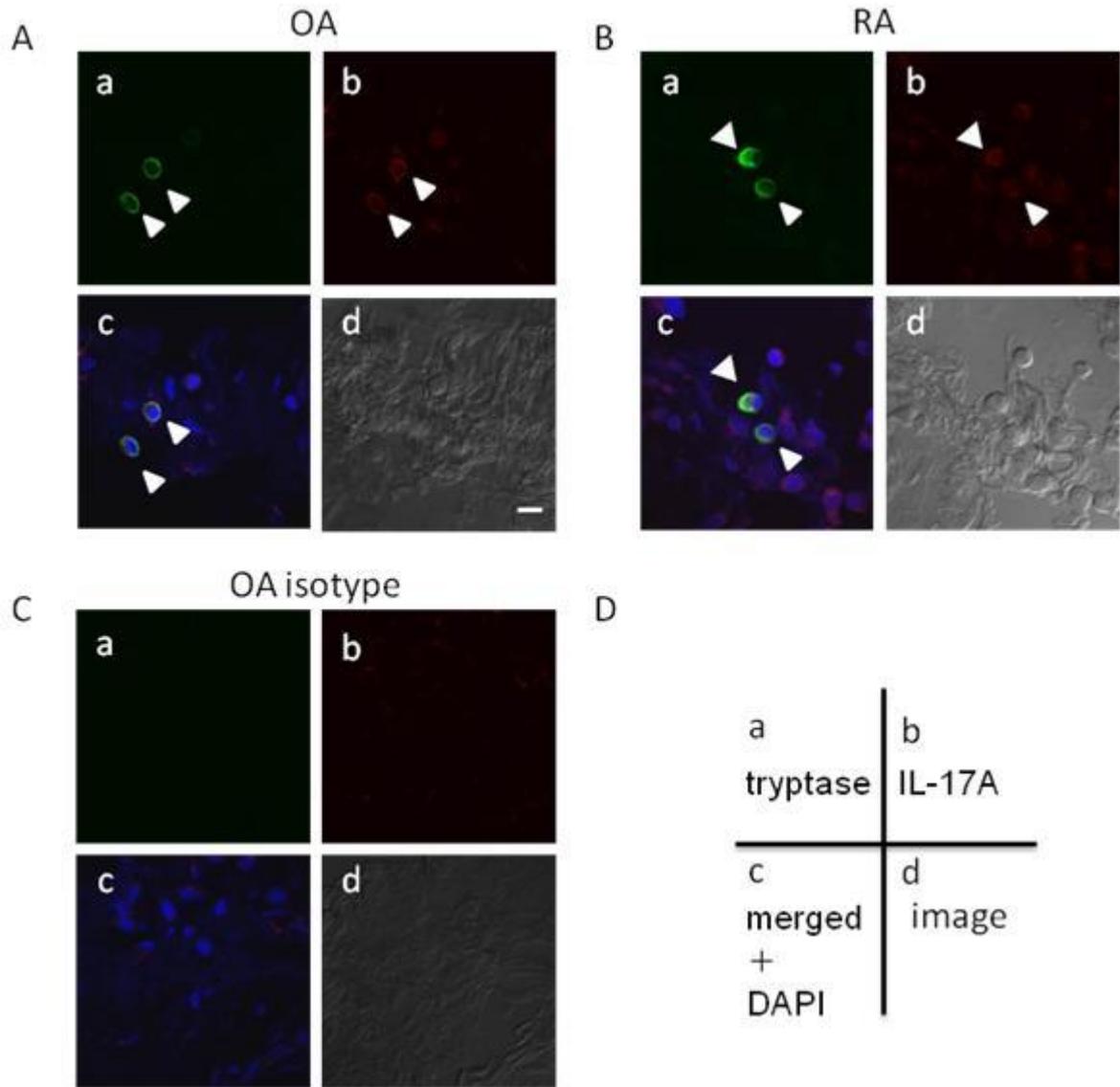


図 2: OA および RA 患者の関節滑膜におけるマスト細胞数 (A)、IL-17A 陽性マスト細胞数 (B)、IL-17A 陽性細胞数 (C)、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度 (D)、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度 (E)

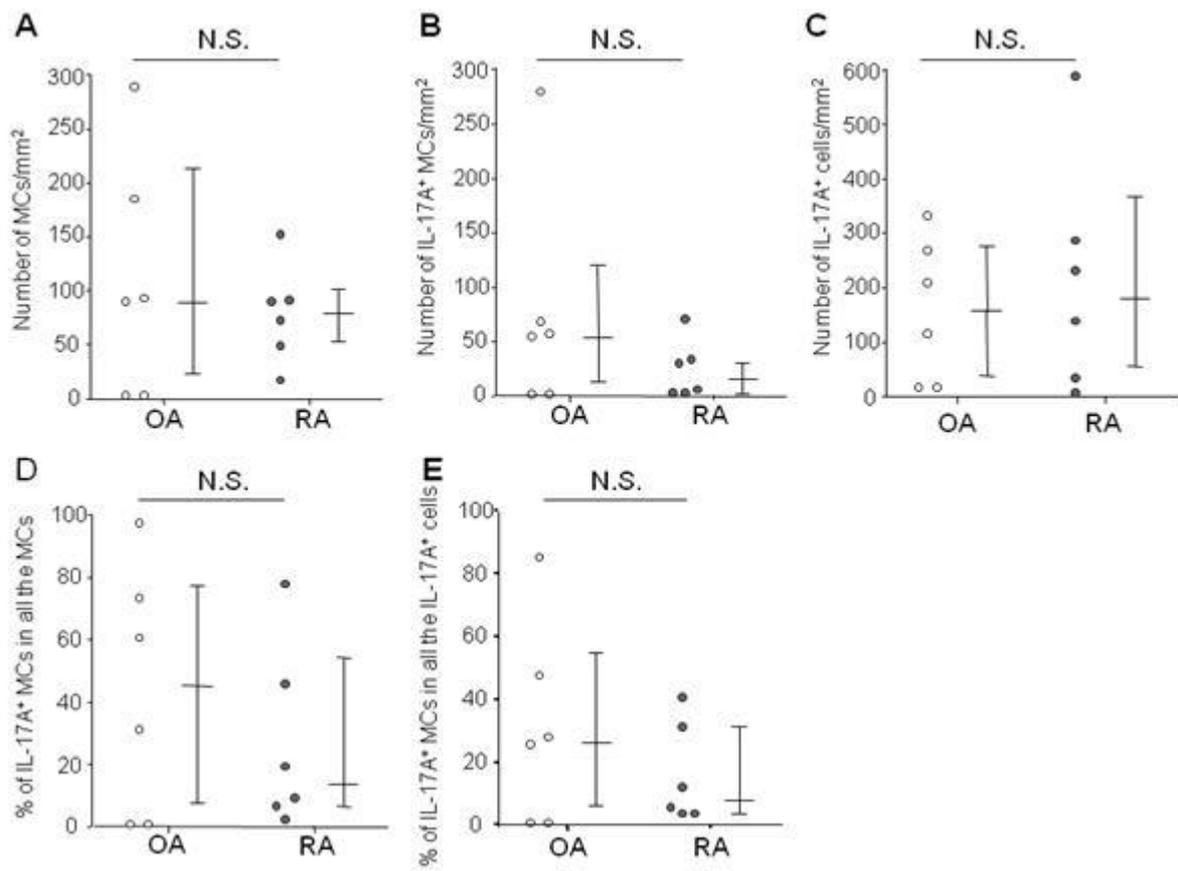


図 3: OA および RA 患者の培養滑膜マストにおける IL17-A の産生の検討

(A) FcεRI 架橋刺激による OA および RA 患者培養滑膜マスト細胞からの IL-17A 産生

(B) FcγR I 架橋刺激によるヒト OA 患者培養滑膜マスト細胞からの IL-17A の産生

(C) 凝集 IgG 刺激によるヒト OA 患者培養滑膜マスト細胞からの IL-17A 産生

(D) IL-33 刺激による OA および RA 患者培養滑膜マスト細胞からの IL-17A の産生

(E) FcεRI 架橋刺激および凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からの IL-17A 産生に対する IL-33 の影響

(F) FcεRI 架橋刺激および凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からの IL-8 産生に対する IL-33 の影響

(G) ナイーブ T 細胞および Th17 細胞の培養上清中の IL-17A の測定

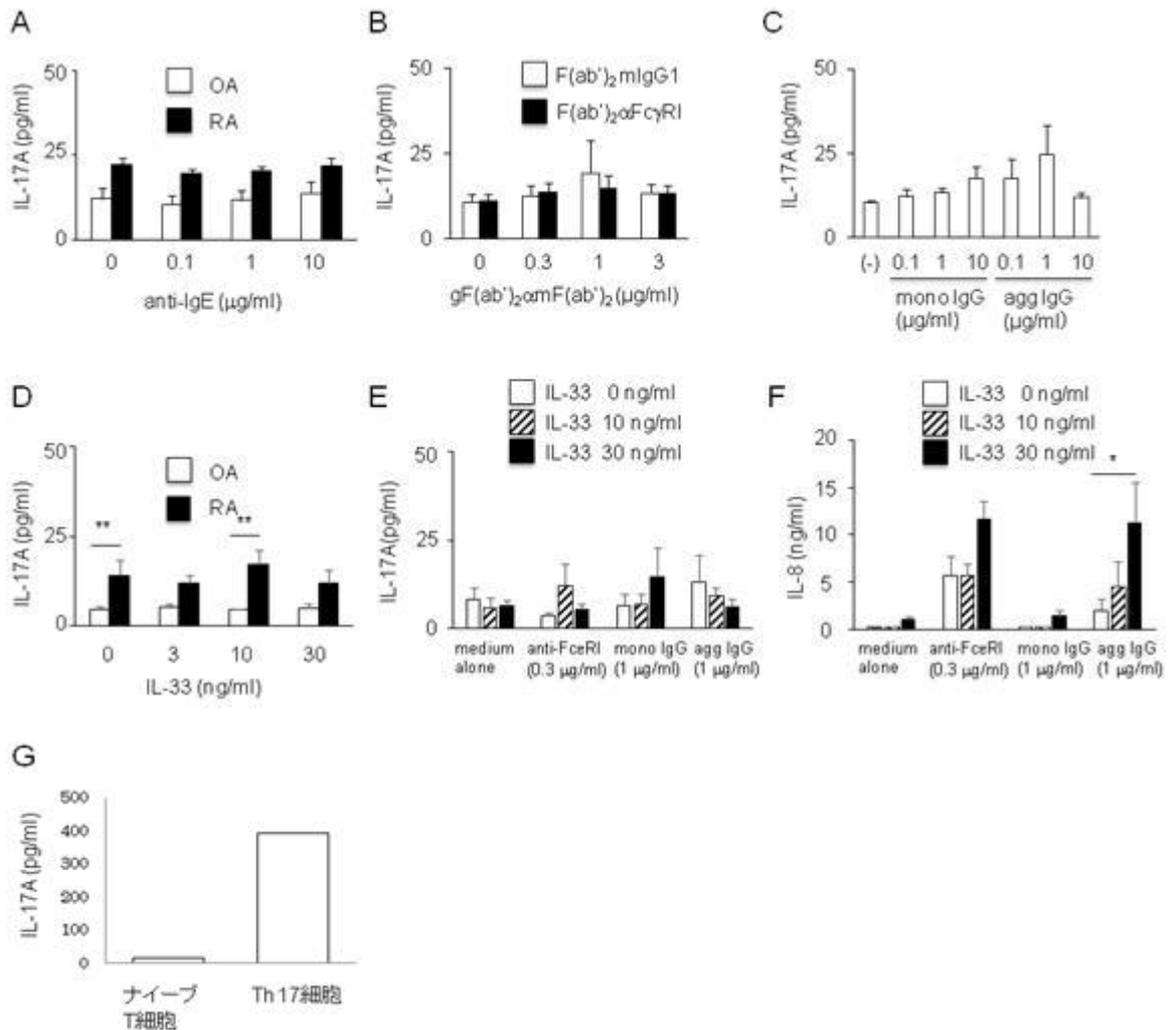
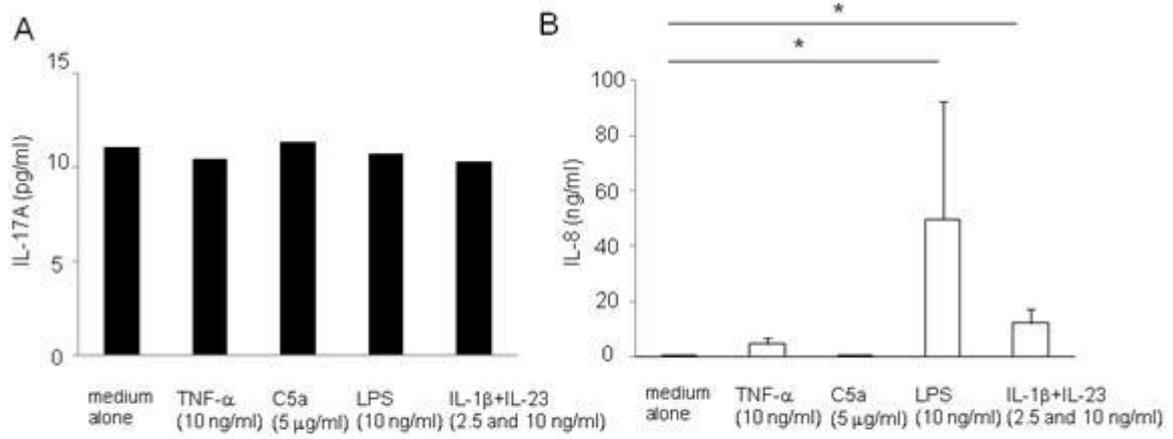


図 4: 各種刺激 24 時間後の培養滑膜マスト細胞からの IL-17A と IL-8 産生



図説

図 1: OA および RA 患者の関節滑膜における IL-17A の発現

OA (A) および RA (B) 患者の関節滑膜における IL-17A 陽性細胞 (トリプターゼ陽性細胞) の発現を免疫組織化学染色で調べた。抗トリプターゼ抗体が緑 (a)、抗 IL-17A 抗体が赤 (b)、混合した像が黄 (c)、青が核染色を示している。白矢印が示す細胞が抗トリプターゼ抗体、抗 IL-17A 抗体の両方が陽性な細胞を示している。バーは 10 μm 。ネガティブコントロールとして OA 患者の滑膜サンプルをマウス IgG1 とヤギ IgG で染色した (C)。結果は OA 6 例、RA 6 例の患者で解析した。

図 2: OA および RA 患者の関節滑膜におけるマスト細胞数 (A)、IL-17A 陽性マスト細胞数 (B)、IL-17A 陽性細胞数 (C)、全マスト細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度 (D)、全 IL-17A 陽性細胞数中の IL-17A 陽性マスト細胞数の頻度 (E) グラフは、OA (白丸 6 例)、RA (黒丸 6 例)患者の滑膜における上記の数を示している。分散図の右のバーは中央値と四分範囲を示す。N.S., not significant

図 3: OA および RA 患者の培養滑膜マストにおける IL-17A の産生機序の検討

(A) Fc ϵ RI 架橋刺激による OA および RA 患者培養滑膜マスト細胞からの IL-17A 産生

OA (白バー、n = 4 ドナー)と RA (黒バー、n = 4 ドナー)患者のマスト細胞を IgE 感作後に抗 IgE 抗体 (0.1, 1 および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 6 時間インキュベートした。上清中の IL-17A 量を ELISA で測定した。

(B) Fc γ RI 架橋刺激によるヒト OA 患者培養滑膜マスト細胞からの IL-17A の産生

OA (n = 4 ドナー) 患者のマスト細胞と 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 Fc γ RI F(ab')₂ フラグメント (黒バー) もしくはマウス IgG1 F(ab')₂ フラグメント (白バー) で 30 分間インキュベートし、洗浄後抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント特異的ヤギ F(ab')₂ フラグメント (0.3, 1 および 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 6 時間刺激した。上清中の IL-17A 量を ELISA で測定した。

(C) 凝集 IgG 刺激によるヒト OA 患者培養滑膜マスト細胞からの IL-17A 産生

OA (n = 6 ドナー) 患者のマスト細胞を単量体 IgG (0.1, 1 および 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) もしくは

凝集 IgG (0.1, 1 および 1 $\mu\text{g/ml}$) で 6 時間刺激した。上清中の IL-17A 量を ELISA で測定した。

(D) IL-33 刺激による OA および RA 患者培養滑膜マスト細胞からの IL-17A の産生
OA (白バー、n = 7 ドナー) と RA (黒バー、n = 4 ドナー) 患者のマスト細胞を IL-33 (3, 10 および 30 ng/ml) で 6 時間刺激した。上清中の IL-17A 量を ELISA で測定した。**: $p < 0.01$

(E) Fc ϵ RI 架橋刺激および凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からの IL-17A 産生に対する IL-33 の影響

(F) Fc ϵ RI 架橋刺激および凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞からの IL-8 産生に対する IL-33 の影響

OA (n = 5-6 ドナー) 患者のマスト細胞を IL-33 (0, 10 および 30 ng/ml) と抗 Fc ϵ RI 抗体 (CRA1, 0.3 $\mu\text{g/ml}$)、単量体 IgG (1 $\mu\text{g/ml}$) あるいは凝集 IgG (1 $\mu\text{g/ml}$) と同時に刺激を 6 時間行った後、上清中の IL-17A (E) と IL-8 (F) を ELISA で測定した。白、斜線、黒のバーはそれぞれ 0, 10 および 30 ng/ml の IL-33 濃度を示している。データは平均値 \pm 標準誤差で示した。*: $p < 0.05$

(G) IL-17A のポジティブコントロールとして健常者の末梢血より Th17 細胞を誘導しその培養上清中の IL-17A 濃度を測定した。

図 4: 各種刺激 24 時間後の培養滑膜マスト細胞からの IL-17A と IL-8 産生

OA 患者 (n = 3 ドナー) のマスト細胞を TNF- α (10 ng/ml)、C5a (5 $\mu\text{g/ml}$)、LPS (10 ng/ml) あるいは IL-23 (2.5 ng/ml) + IL-1 β (10 ng/ml) で 24 時間刺激した。IL-17A の値は 3 ドナー中 2 ドナーが検出感度以下だった。1 ドナーは IL-17A の産生が見られ、そのデータを示した。上清中の IL-8 の濃度 (n = 3) は、平均値 \pm 標準誤差で示した。また、IL-17A のポジティブコントロールとして健常者 (n = 1) から採取した末梢血よりナイーブ T 細胞および Th17 細胞を分化誘導しその上清中の濃度を示した。*: $p < 0.05$

引用文献

1. Karmakar S, Kay J, Gravallese EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010; 36: 385-404.
2. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014; 10: 593-601.
3. Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2007; 25: 4-11.
4. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2007; 370: 1861-1874.
5. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003; 171: 6173-6177.
6. Chu CQ, Swart D, Alcorn D, Tocker J, Elkon KB. Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 1145-1151.
7. Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med.* 2007; 204: 2803-2812.
8. 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.
9. Shahrara S, Pickens SR, Mandelin 2nd AM, Karpus WJ, Huang Q, Kolls JK, Pope RM. IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. *J Immunol.* 2010; 184: 4479-4487.
10. Moran EM, Mullan R, McCormick J, Connolly M, Sullivan O, Fitzgerald O, Bresnihan B, Veale DJ, Fearon U. 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.
11. 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.
12. van den Berg WB, Miossec P. IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5: 549-553.
 13. Metawi SA, Abbas D, Kamal MM, Ibrahim MK. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. *Clin Rheumatol.* 2011; 30: 1201-1207.
 14. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 2011; 34: 149–162.
 15. Gaffen SL. Structure and signaling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 556–567.
 16. Doyle M, Collins E, FitzGerald O, Pennington S. New insight into the functions of the interleukin-17 receptor adaptor protein Act1 in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14: 226.
 17. Hot A, Miossec P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 727–732.
 18. Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, Jala VR, Zhang H, Wang T, Zheng J, Yan J. Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. 2011; 35: 1-15.
 19. Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, Dowd P, Gurney AL, Wood WI. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 773-778.
 20. Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol.* 2007; 179: 7128-7136.
 21. Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C. Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and 13 autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity.* 2011; 35: 611-621.
 22. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD, Qian Y. IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat Immunol.* 2011; 12: 1151-1158.

23. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol.* 2002; 169: 642-646.
24. Godfrey HP, Ilardi C, Engber W, Graziano FM. Quantitation of human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 1984; 27: 852-866.
25. Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM. Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 1984; 27: 845-851.
26. Tetlow LC, Woolley DE. Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis.* 1995; 54: 896-903.
27. Malone DG, Irani AM, Schwartz LB, Barrett KE, Metcalfe DD. Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritides. *Arthritis Rheumatol.* 1986; 29: 956-963.
28. Nigrovic PA, Lee DM. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev.* 2007; 217: 19-37
29. Eklund KK. Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev.* 2007; 217: 38-52.
30. Gotis-Graham I, McNeil HP. Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MC_{TC} subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheumatol.* 1997; 40: 479-489.
31. Bridges AJ, Malone DG, Jicinsky J, Chen M, Ory P, Engber W, Graziano FM. Human synovial mast cell involvement in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Relationship to disease type, clinical activity, and antirheumatic therapy. *Arthritis Rheumatol.* 1991; 34: 1116-1124.
32. Kiener HP, Baghestanian M, Dominkus M, Walchshofer S, Ghannadan M, Willheim M, Sillaber C, Graninger WB, Smolen JS, Valent P. Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 1998; 41: 233-245.
33. 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 Fcγ receptor I and Fcγ receptor II. *Arthritis Rheumatol.* 2013; 65: 109-119.

34. Rivellese F, Suurmond J, Habets K, Dorjée AL, Ramamoorthi N, Townsend MJ, de Paulis A, Marone G, Huizinga TWJ, Pitzalis C, Toes REM. Ability of Interleukin-33 and immune complex triggered activation of human mast cells to down-regulate monocyte-mediated immune responses. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67: 2343-2353.
35. Rossini M, Viapiana O, Zanoni G, Tripi G, Idolazzi L, Fracassi E, Adami G, Adami S, Gatti D. Serum levels of tryptase suggest that mast cells might have an antiinflammatory role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68: 769.
36. Kashiwakura J, Yanagisawa M, Lee H, Okamura Y, Sasaki-Sakamoto T, Saito S, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y. Interleukin-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 production in cultured human synovium-derived mast cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013; 161 (Suppl 2): 32-36.
37. Furst DE, Emery P. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets. *Rheumatology (Oxford).* 2014; 53: 1560-1569.
38. van Baarsen LG, Lebre MC, van der Coelen D, Aarass S, Tang MW, Ramwadhoebe TH, Gerlag DM, Tak PP. Heterogeneous expression pattern of interleukin 17A (IL-17A), IL-17F and their receptors in synovium of rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis: possible explanation for nonresponse to anti-IL-17 therapy?. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16: 426.
39. Noordenbos T, Yeremenko N, Gofita I, van de Sande M, Tak PP, Canete JD, Baeten D. Interleukin-17-positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 99-109.
40. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, Melendez AJ, McInnes B. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol.* 2010; 184: 3336-3340.
41. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S, Fontao L, Meroni PL, Chizzolini C. Interleukin-17A+ Cell Counts Are Increased in Systemic Sclerosis Skin and Their Number Is Inversely Correlated With the Extent of Skin Involvement. *Arthritis Rheum.* 2013; 65: 1347-1356.
42. Noordenbos T, Blijdorp I, Chen S, Stap J, Mu I E, Canete JD, Lubberts E, Yeremenko N,

- Baeten D. Human mast cells capture, store, and release bioactive, exogenous IL-17A, *Journal of Leukocyte Biology*. 2016; 100: 453-462.
43. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, Villanueva EC, Shah P, Kaplan MJ, Bruce AT. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol*. 2011; 187: 490-500.
 44. Jahanban-Esfahian R, Mehrzadi S, Reiter RJ, Seidi K, Majidinia M, Baghi HB, Khatami N, Yousefi B, Sadeghpour A. Melatonin in regulation of inflammatory pathways in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: involvement of circadian clock genes. *Br J Pharmacol*. 2017.
 45. Huhtakangas JA, Veijola J, Turunen S, Karjalainen A, Valkealahti M, Nousiainen T, Yli-Luukko S, Vuolteenaho O, Lehenkari P. Cytokine data obtained from synovial stromal cells of patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Data Brief*. 2017.
 46. Penatti A, Facciotti F, De Matteis R, Larghi P, Paroni M, Murgo A, De Lucia O, Pagani M, Pierannunzii L, Truzzi M, Ioan-Facsinay A, Abrignani S, Geginat J, Meroni PL. Differences in serum and synovial CD4+ T cells and cytokine profiles to stratify patients with inflammatory osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017.
 47. Woo Y, Hyun MK. Evaluation of cardiovascular risk associated with SK1306X use in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Ethnopharmacol*. 2017.
 48. Frommer KW, Vasile M, Muller-Ladner U, Neumann E. The Adipokine Omentin in Late-stage Rheumatoid Arthritis and Endstage Osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2017.
 49. de jong AJ, Klein-Wieringa IR, Kwekkeboom JC, Toes REM, Kloppenburg M, Ioan-Facsinay A. Inflammatory features of infrapatellar fat pad in rheumatoid arthritis versus osteoarthritis reveal mostly qualitative differences. *Ann Rheum Dis*. 2017.
 50. Abdelhafez YG, Hagga RJ, Badawi RD, Raychaudhuri SP, Chaudhari AJ. Early and Delayed ^{99m}Tc-MDP SPECT/CT Findings in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Clin Nucl Med* 2017.
 51. DeClercq V, Cui Y, Forbes C, Grandy SA, Keats M, Parker L, Sweeney E, Yu ZM, Dummer TJB. Adiposity Measures and Plasma Adipokines in Females with Rheumatoid and Osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2017.

52. Kam NW, Liu D, Cai Z, Mak WY, Wong CK, Chiu KH, Wong KY, Tsang WL, Tam LS. Synoviocytes-derived Interleukin 35 Potentiates B Cell Response in Patients with Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2017.
53. He D, Liu J, Hai Y, Zhu Q, Shen Y, Guo S, Zhang W, Zhou X. Increased DOT 1L in synovial biopsies of patients with OA and RA. *Clin Rheumatol*. 2017.
54. Kimura I, Moritani Y, Tanizaki Y. Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin Allergy*. 1973; 3: 195-202.
55. Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G, Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunol*. 2007; 8: 942–949.
56. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, DJ Cua, McClanahan TK, Bowman EP, Malefyt RW. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol*. 2007; 8: 950-957.
57. Lee YH, Bae SC. Associations between circulating IL-17 levels and rheumatoid arthritis and between IL-17 gene polymorphisms and disease susceptibility: a meta-analysis. *Postgrad Med J*. 2017; 93: 465-471
58. Pawlik A, Kotrych D, Malinowski D, Dziedziejko V, Czerewaty M, Safranow K. IL17A and IL17F gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016; 17: 208.
59. Louahchi S, Allam I, Berkani L, Boucharef A, Abdesemed A, Khaldoun N, Nebbab A, Ladjouze A, Djidjik R. Association study of single nucleotide polymorphisms of IL23R and IL17 in rheumatoid arthritis in the Algerian population. *Acta Reumatol Port*. 2016; 41: 151-157.
60. Shen L, Zhang H, Yan T, Zhou G, Liu R. Association between interleukin 17A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Gene*. 2015; 566: 18-22.
61. Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Førre ØT, Helgetveit K, Kvien TK, Lie BA. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian

- rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48: 367-370.
62. Genovese MC, Greenwald M, Cho CS, Berman A, Jin L, Cameron GS, Benichou O, Xie L, Braun D, Berclaz PY, Banerjee S. A phase II randomized study of subcutaneous ixekizumab, an anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in rheumatoid arthritis patients who were naïve to biologic agents or had an inadequate response to tumor necrosis factor inhibitors. *Arthritis Rheumatol*. 2014; 66: 1693-1704.
63. Kunwar S, Dahal K, Sharma S. Anti-IL-17 therapy in treatment of rheumatoid arthritis: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Rheumatol Int*. 2016; 36: 1065-1075.

研究業績

菅 順一郎

I 発表

①一般発表 11 (共 11)

②特別発表 なし

II 論文

①原著論文 1 (共 1)

②症例報告 2 (共 2)

③総説 なし

III 著書

なし

以上

I 発表

① 一般発表

1. 菅順一郎、小野秀樹、西島豊
大腿骨インプラント周囲骨折における locking plate の治療経験
日本大学医学会例会、2013 年 5 月
2. 菅順一郎、鱒渕秀男、大幸俊三、吉田明生
大菱形骨と膝蓋骨に転移した稀な腎細胞癌の 1 例
関東整形災害外科学会月例会、東京、2013 年 12 月
3. 菅順一郎、齋藤修、石井隆雄、関雅之、穂坂邦大、鈴木元、徳橋泰明
寛骨臼回転骨切り術後に THA に conversion した 1 例
関東整形災害外科学会月例会、東京、2015 年 6 月
4. 矢作善之、上井浩、大島正史、間世田優文、松本光司、相馬大鋭、菅順一郎、
伊藤友久、徳橋泰明
造影 MRIT 1 脂肪抑制にて早期に信号変化を認めた脊髄梗塞の 1 例
第 56 回関東整形災害外科学会、東京、2016 年 3 月
5. 三嶋信太郎、菅順一郎、岡村祐己、李賢鎬、柳澤正彦、関雅之、齋藤修、徳
橋泰明、岡山吉道
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の相違に関
する検討
第 60 回日本リウマチ学会総会、横浜、2016 年 4 月
6. 菅順一郎、三嶋信太郎、岡村祐己、李賢鎬、柳澤正彦、関雅之、齋藤修、徳
橋泰明、岡山吉道
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
第 60 回日本リウマチ学会総会、横浜、2016 年 4 月
7. 三嶋信太郎、菅順一郎、坂本朋美、関雅之、齋藤修、羅智靖、徳橋泰明、岡
山吉道
好酸球、マスト細胞、好塩基球 関節リウマチ患者滑膜組織マスト細胞にお
ける COX の高発現
第 65 回日本アレルギー学会学術大会、東京、2016 年 6 月

8. 菅順一郎、三嶋信太郎、坂本朋美、羅智靖、徳橋泰明、岡山吉道
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 の発現と産生機構
第 65 回日本アレルギー学会学術大会、東京、2016 年 6 月
9. 矢作善之、上井浩、大島正史、間世田優文、松本光司、相馬大鋭、菅順一郎、
伊藤友久、徳橋泰明
後頭骨頸椎固定術後に固定角不良のため呼吸困難を呈した 1 例
関東整形災害外科学会月例会、東京、2016 年 6 月
10. 菅順一郎、立川裕一郎、澤田浩克
陳旧性両側大腿四頭筋腱断裂に対して再建した 1 例
第 57 回関東整形災害外科学会、東京、2017 年 3 月
11. 澤田浩克、立川裕一郎、田窪明仁、菅順一郎、徳橋泰明、網代泰充、鶴田尚
志
超高齢者(80 歳以上)における脊椎手術後死亡率の検討
第 46 回日本脊椎脊髄病学会、札幌、2017 年 4 月

② 特別発表

なし

II 論文

① 原著論文

1. Kan J, Mishima S, Kashiwakura J, 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.

② 症例報告

1. 菅順一郎、鱒淵秀男、大幸俊三、吉田明生
大菱形骨と膝蓋骨に転移した稀な腎細胞癌の1例
関東整形災害外科学会雑誌、2014年12月
2. 矢作善之、松本光司、上井浩、大島正史、間世田優文、相馬大鋭、菅順一郎、伊藤友久、徳橋泰明
造影MRI T1 脂肪抑制にて早期に信号変化を認めた脊髄梗塞の1例
関東整形災害外科学会雑誌、2016年12月

③ 総説

なし

III 著書

なし