

椎間板変性における IL-17 の役割と *In Silico* 創薬による阻害療法の探索

IL-17 in intervertebral disc degeneration and exploration of IL-17 inhibitor by *In silico* Analysis

酒井 大輔

東海大学医学部・外科学系整形外科

Daisuke Sakai

Department of Orthopaedic Surgery

School of Medicine Tokai University

[要旨]

IL-17A は受容体となる IL-17RA/IL-17RC 二量体に結合し、これらの下流シグナル因子を活性化し、多様な炎症反応に関与するとされる。近年、IL-17 は変性椎間板でも増加し、椎間板変性にも関与している可能性が報告されるようになった。本研究では椎間板髄核細胞における IL-17A の作用を検討した。その結果、IL-17A は IL-6 の発現の制御に関与し、さらに IL-6 を介して COX-2 の発現に関与し、椎間板細胞の変性進行や疼痛の原因物質の産生に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

[Abstract]

Interleukin-17A (IL-17) is a member of the IL-17 cytokine family, which activates many intracellular signaling factors and mediates the induction of some inflammatory cytokines and chemokines. Recently, it was reported that IL-17A levels increase in cells of the degenerative and herniated discs, however, research on the role of IL-17 in disc cells is limited. Real time PCR analysis showed that the mRNA of IL-6 was significantly increased by treatment with IL-17A in normoxia and hypoxia. Similarly, Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA expression levels significantly increased with IL-17A treatment under both oxygenation conditions. Western blot analysis revealed that COX-2 protein expression increased significantly in IL-17A-treated cells and IL-6-treated cells. When the effects of IL-17A were down-modulated by using anti-IL-17A antibody, IL-6 and COX-2 mRNA expression levels significantly decreased compared with those in cells treated with IL-17A alone.

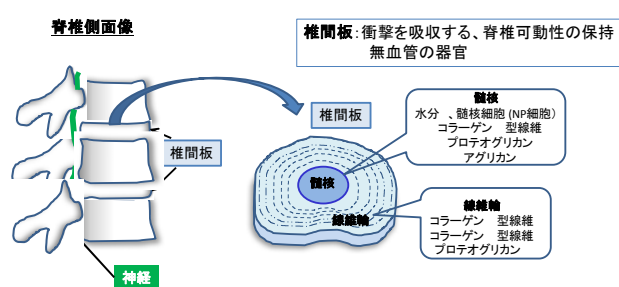
[Key Word]

intervertebral disc, Interleukin 17, inflammation, regeneration

1. はじめに

椎間板は脊椎椎体の間に存在し、衝撃を吸収するとともに脊椎可動性を保持する重要な役割を有する器官である。加齢や物理的外力によるストレス、喫煙等による化学的ストレスにより引き起こされる椎間板変性は、椎間板ヘルニア、変形性腰椎症等の腰痛を伴う疾患の主要因となる¹。しかし、これらの原因となる椎間板変や障害を予防する確実な手段は未だに確立されていないのが現状である。

椎間板は中心部にある髄核とこれを取り巻く線維輪から成る。髄核の約 8 割を水分が占め、残りは髄核細胞 (NP 細胞) とアグリカンやコラーゲンから成る細胞外マトリックスであり、線維輪はコラーゲン線維とプロテオグリカンで構成される。椎間板の変性により細胞数の減少、組織の変質、線維輪の破損、炎症性サイトカインの上昇といった様々な変化



が現れる。特にサイトカインの中で IL-1 β 、IL-6、TNF α とその下流の NF- κ B 経路を主軸とした経路が変性の進行に深く関わっている事が指摘されていたが、さらに近年、IL-17 も変性椎間板で増加するサイトカインとして新たに注目されるようになった²。

IL-17 は IL-17A ~ F の 6 つの family から成り、CD4+T 細胞集団である Th17 細胞から産生される。IL-17 family の中では IL-17A が最も多くの炎症反応にかかわることが報告されている³。IL-17A は受容

体となる IL-17RA/IL-17RC 二量体に結合し、これらの下流シグナル因子である Act1、TNF-receptor associated factor (TRAF)6、NF- κ B、JNK、Erk1/2、p38、MAPK、C/EBP 等を活性化し、多様な炎症反応に関与する。

椎間板の変性進行において主体となる IL-1 β と TNF α は、上述した NF- κ B 経路や MAPK 経路、TRAF6 に作用することにより、髄核のアグリカンやコラーゲンを減少させる因子である MMP、アグリカナゼ、IL-6 の産生を促進すると報告されている⁴。また、IL-17 は変性椎間板において炎症反応の mediator となる各因子を増強させ、ケモカインである ICAM-1 の発現を促進することによりマクロファージ集積を招き、これが椎間板ヘルニア等での疼痛の原因となる化学物質の産生増加の原因となることが報告されている。

2. 研究の概要

以上の知見からは、IL-17 の活性を制御することにより椎間板変性の進行や腰痛の原因となる炎症反応の抑制が可能となる。しかし、椎間板における IL-17 の作用やその活性制御についての詳細な報告は未だに少なく、今年度は *in vitro* で解析を行った。

3. 研究結果

椎間板髄核細胞におけ IL-17A の作用の検討

ラット尾椎より椎間板髄核細胞を採取して、通常の酸素濃度、及び 1% の低酸素濃度条件で培養した。細胞に IL-17A を 20 ~ 50ng/ml 投与して 24 ~ 72 時間培養し、サイトカインや細胞内シグナル因子の発現を、リアルタイム PCR とウエスタンブロット法で評価した。IL-17 活性抑制実験では、抗 IL-17 中和抗体を IL-17A と共に投与して評価した。IL-17A 20 ~ 50ng/ml 投与条件下では、通常酸素濃度、低酸素条件共に IL-6 と COX2 の mRNA 発現量が有意に増加した。特に IL-6 の著名な増加を示した IL-17A 50ng/ml、24 時間の条件で、抗 IL-17 中和抗体を IL-17 と共に投与して IL-6 の発現を比較した。抗 IL-17 中和抗体投与下では IL-17A 単独投与と比較して、通常酸素濃度、低酸素濃度条件ともに、有意に IL-6 と COX-2 の発現が抑制された。また、IL-17A 20ng/ml 投与 72 時間低酸素条件と IL-6 20ng/ml 投与 72 時間低酸素条件下の両方で COX-2 タンパク質の有意な発現増加を認めた。(各 n=3, p<0.05)

既存の報告では IL-6 は椎間板のマトリックスを減

少させて変性の進行に関与するとされている。今回の結果から IL-17A は IL-6 の発現の制御に関与し、さらに IL-6 を介して COX-2 の発現に関与し、椎間板細胞の変性進行や疼痛の原因物質の産生に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

3. 展望

現在、IL-17 活性阻害剤として開発されている薬剤は抗体製剤を中心とした生物学的製剤が主体である。しかしこれらは日和見感染等の重篤な副作用も大きく、薬価も高いことが問題とされている。今後我々は、*In Silico* 解析を用いることにより、IL-17 の活性部位に対する結合親和性がそれぞれ異なる複数の化合物を見出して評価し、これまでの問題点を克服できる新規薬剤を作成する予定である。

また、椎間板細胞における IL-17 の作用と反応の詳細についての研究は未だ日が浅いため不明な点が多い。研究計画の目的は IL-17 が椎間板変性に関与する主要なサイトカインと炎症反応経路に対する作用を *in vitro*, *in vivo* の両方で解析することにより、新たな知見を得ることを主眼としている。

4. 引用文献

- [1] D Sakai et al. *Nat Rev Rheumatol.*, **11**, 243-256, (2015)
- [2] MV Risbud et al., *Nat Rev Rheumatol.*, **10**, 44-56, (2014)
- [3] SL Gaffen., *Curr Opin Immunol.* **5**, 613-9, (2011)
- [4] D Sakai et al. *Adv Drug Deliv Rev.* **84**, 159-171, (2015)

5. 業績

【学会等発表】

1. 隅山香織、酒井大輔、平山令明、寺山隼人、坂部貢、渡辺雅彦：椎間板髄核細胞における IL-17A の作用の検討。第30回日本軟骨代謝学会，2017.3 京都
2. Kaori Suyama, Daisuke Sakai, Noriaki Hirayama, Kou Sakabe, Masahiko Watanabe: Interleukin-17A Induces Interleukin-6 mRNA Expression and Cyclooxygenase-2 Production In Nucleus Pulposus Cells. Orthopaedic Research Society 2017, March, San Diego, CA.