

椎間板変性における IL-17 の役割と阻害療法の探索

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

Division 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、COX-2、mPGES1、MMP-3、MMP-13 の発現の制御に関与し、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. In this study, Real time PCR, Western blot analysis and promoter assay showed that the expression levels of IL-6, COX-2, mPGES1, MMP-3 and MMP-13 were significantly increased by treatment with IL-17A in hypoxia. When the effects of IL-17A were down-modulated by using anti-IL-17A antibody, IL-6, COX-2, mPGES1, MMP3 and MMP13 expression levels significantly decreased compared with those in cells treated with IL-17A alone. Our results indicated that IL-17A regulated the factors which mediate disc degeneration.

[Key Words]

intervertebral disc, Interleukin 17, inflammation, regeneration

1. はじめに

腰痛は患者の Quality of life (QOL) を下げるのみならず社会生産性を低下させ医療費増加にも深く関与する。本邦における腰痛の生涯有病率は約 83%¹とされ、厚生労働省による業務上疾病発生状況等調査（休業 4 日以上）では腰痛の件数が最も高い。

腰痛の要因として重要となるのが椎間板の変性である。脊椎の椎間板は脊椎椎体の間に存在し、中心部の髄核とこれを取り巻く線維輪から成る無血管の器官であり、衝撃を吸収し脊椎可動性を保持する役割を有する。加齢や物理的外力等の様々なストレスに曝された椎間板組織では、IL-1 β 、IL-6、TNF α を中心としたサイトカインが上昇して様々な細胞内シグナル経路を活性化することにより変性を進行させ、椎間板ヘルニア、

変形性腰椎症等の腰痛を伴う疾患を惹き起こす²。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³（図 1）。

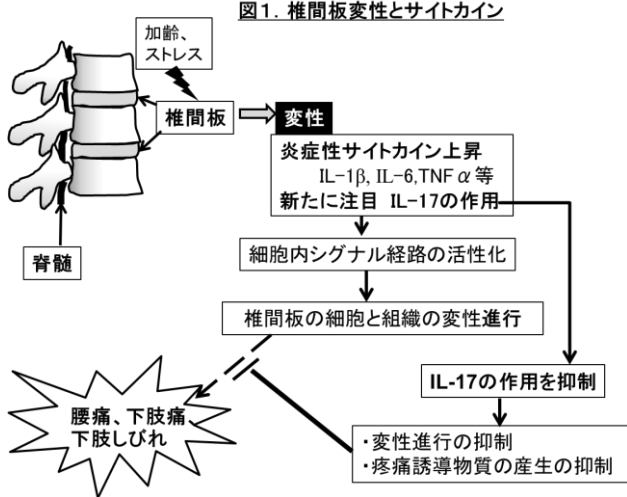
IL-17 は A~F の 6 つの family を有し、このうち IL-17A は MAP-キナーゼ経路や NF- κ B 等を活性化して多様な炎症反応に関与していると報告されている⁴。

本研究の目的は、椎間板髄核細胞における IL-17A の作用を解析し、椎間板疾患において IL-17A が治療標的と成り得るかについて評価することである。

2. 結果の概要

これまでの知見からは、IL-17 の活性を制御することによって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と考えられる。しかし、椎間

図1. 椎間板変性とサイトカイン



板における IL-17A 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い。今回、我々はラット椎間板より採取した髄核細胞 (NP 細胞) を生体内における椎間板の環境と近似した 1% の低酸素条件下で培養し、IL-17A の作用、及び、IL-17A 活性を抑制した場合の反応を解析した。

NP 細胞に IL-17A を 50ng/ml 投与して 24 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、ウエスタンブロット法、プロモーターアッセイ法で評価した。IL-17A 活性抑制実験では、抗 IL-17A 中和抗体を IL-17A と共に投与して評価した。

IL-17A で刺激すると、IL-6、COX-2、mPGES1、MMP-3、MMP-13 の mRNA 発現が無処置群と比較して有意に増加し、IL-6 と COX-2 のタンパク質発現も無処置群より有意に増加した (n=4, p<0.05)。また、IL-17A によって mRNA の著明な増加を呈した IL-6 を NP 細胞に 50ng/ml 投与して同様の条件下で培養すると、24 時間後の COX-2、MMP3、MMP13 の mRNA 発現は無処置群と比較して有意に増加した (n=4, p<0.05)。

次に、抗 IL-17A 中和抗体 5μg/ml と IL-17A 50ng/ml を共に投与すると、24 時間後の IL-6、COX-2、mPGES1、MMP-3、MMP-13 の mRNA 発現が IL-17A 単独投与と比較して有意に抑制される現象を認めた (n=4, p<0.05)。

同様に、IL-17A 投与群における COX-2 の転写活性は無処置群と比較して有意に増強し、IL-17A 中和抗体投与条件下では、IL-17A 投与群と比較して有意に抑制された (n=3, p<0.05)。

COX-2 は炎症反応や疼痛の原因物質の一つであり、COX-2 阻害剤は消炎鎮痛剤として既に臨床の現場で使用されている。mPGES1 は膜結合型プロスタグラン

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences, Vol.2, March 2018

ジン 2 合成酵素であり、COX-2 と共役して炎症反応や疼痛に関与するとされる。MMP-3、MMP-13 は炎症性サイトカインにより発現が促進され、椎間板組織のマトリックスの変性を進行させる因子として知られている^{5,6}。本研究の結果から、IL-17A は椎間板変性に関わる因子の発現や、疼痛の原因物質の産生を制御している可能性が示され、IL-17A は椎間板変性の有効な治療標的と成り得ると考えられた。

3. 展望

今回の結果から、IL-17A の活性を制御することは椎間板変性を抑制し、腰痛の治療手段として有望であると考えられる。しかし、現状では、既存の IL-17 阻害剤は抗体成分としての生物学的製剤が主体であり、副作用として重篤な感染症や高い薬価が問題とされている。また、椎間板変性進行に主要な役割を果たすとされている IL-1β、IL-6、TNFα に対する生物学的製剤の効果については臨床研究が行われているが、未だ臨床での実用化はされていない。IL-1β、IL-6、TNFα が作用する細胞内シグナル経路に IL-17 も作用している可能性が報告されており、IL-17A の活性制御は腰痛の鎮痛効果や椎間板変性抑制といった様々な治療に対して有効と考えられる。

我々はこれまでの研究結果を踏まえた上で、今後、インシリコ (in silico) 解析を用いて既存の IL-17A 活性阻害剤の弱点を克服した新規 IL-17 活性阻害剤を開発する予定である。

4. 引用文献

- [1] 松平ら, 日本職業・災害医学会会誌, **63**, 329-336, (2015)
- [2] Risbud et al., Nat Rev Rheumatol., **10**, 44-56 (2014)
- [3] Shamji, et al., Arthritis Rheum., **62**, 1974-1982 (2010)
- [4] Gu et al., Cytokine, **64**, 477-485 (2013)
- [5] Weiler et al., Eur Spine J., **11**, 308-320 (2002)
- [6] Wang et al., Am J Pathol., **184**, 2560-2572 (2014)

5. 業績

【学会等発表】

- 1) 隅山香織、酒井大輔、平山令明、坂部貢、渡辺雅彦：椎間板変性に対する IL-17 の作用。第 32 回 日本整形外科学会基礎学術集会、2017.10. 沖縄

- 2) Kaori Suyama, Daisuke Sakai, Noriaki Hirayama, Kou Sakabe, Masahiko Watanabe : Effects of interleukin-17A on intervertebral disc degeneration: Interleukin-17A can be a potential therapeutic target for treating degenerative discs. Orthopaedic Research Society 2018, March, New Orleans, LA.