

Title	ANTI-INTERLEUKIN-6 RECEPTOR ANTIBODY THERAPY REDUCES VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) PRODUCTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS
Author(s)	中原, 英子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43952">https://hdl.handle.net/11094/43952</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	中 原 英 子 なか はら ひで こ
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 6 4 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	ANTI-INTERLEUKIN-6 RECEPTOR ANTIBODY THERAPY REDUCES VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) PRODUCTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS (抗 IL-6 受容体抗体は関節リウマチにおいて血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生を抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 崎 和 幸  (副査) 教 授 越 智 隆 弘 教 授 荻 原 俊 男

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目的]

関節リウマチ (RA) は全身の関節をおかす慢性炎症性疾患である。罹患関節の病理学的特徴は滑膜の増殖であり、炎症細胞の浸潤と血管新生を伴う。血管新生は滑膜増殖に不可欠で、増殖した滑膜がパンヌスを形成し関節を破壊する。このような RA の病態形成に血管内皮細胞の増殖と遊走を促進し、血管透過性亢進作用を有する血管内皮増殖因子 (VEGF) の関与が示唆されているがその産生機序について十分解明されていない。

IL-6 は急性期反応、免疫反応や造血の調節など多彩な作用をもつサイトカインである。RA 患者の関節液および血中の IL-6 は他の関節炎患者や健康人に比べ高値を示す。我々のグループは難治性 RA 患者に対しヒト化抗 IL-6 受容体抗体 (抗 IL-6R 抗体) 治療を行い、臨床症状や検査値異常が著明に改善することを報告した。これらの事実から IL-6 は RA の病態に関わると考えられる。一方 IL-6 はヒト骨髄腫細胞による VEGF 産生を誘導することが知られている。また IL-6 異常産生を伴う Castleman 病患者の腫大リンパ節の血管新生が IL-6 阻害により消退すること、また腫大リンパ節に浸潤した形質細胞から VEGF が産生されることが報告されている。以上のことから IL-6 が RA においても VEGF 産生を調節している可能性が示唆される。

そこで IL-6 が RA において VEGF の産生を調節するか否かを明らかにするため、抗 IL-6R 抗体治療前後における RA 患者の血中 VEGF の推移を検討した。また *in vitro* で IL-6、IL-1 $\beta$ あるいは TNF $\alpha$ などの炎症性サイトカインが RA 滑膜繊維芽細胞からの VEGF 産生を誘導するか、さらにこれらのサイトカインの特異的阻害剤が VEGF の産生を抑制するかどうかを検討した。

#### [方法]

大阪大学先進医療審査会の許可のもと、インフォームドコンセントを得た難治性 RA 患者 8 人に対しヒト化抗 IL-6R 抗体治療を行った。治療前および治療 8 週後の血中 VEGF を測定し、IL-6 阻害による血中 VEGF の推移を調べた。また RA 患者由来滑膜繊維芽細胞 ( $2 \times 10^4$  cells/500  $\mu$ l/well) を IL-6 (1-100 ng/ml)/sIL-6R (100 ng/ml)、IL-1 $\beta$  (0.05-5 ng/ml) あるいは TNF $\alpha$  (0.1-10 ng/ml) の存在下で 24-72 時間培養し、培養上清中の VEGF を ELISA

で測定した。またこれらのサイトカインの相乗効果についても検討した。滑膜細胞を無刺激、IL-6 (100 ng/ml) /sIL-6R (100 ng/ml)、IL-6/sIL-6R と IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) の条件で 48 時間培養し、リアルタイム RT-PCR を用いて VEGF mRNA の発現を調べた。さらに IL-6/sIL-6R、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  の 3 者の共存下で、これらのサイトカインの特異的阻害剤である抗 IL-6R 抗体 (25  $\mu$ g/ml)、IL-1ra (10  $\mu$ g/ml) あるいは抗 TNF $\alpha$  抗体 (10  $\mu$ g/ml) による滑膜線維芽細胞からの VEGF 産生の抑制効果について検討した。

#### [成績]

RA 患者の血中 VEGF 値は健常人に比べ有意に高値を示した (RA 568 $\pm$ 240 pg/ml, mean $\pm$ SD, n=8; healthy controls 189 $\pm$ 130 pg/ml, n=32, P<0.0005)。抗 IL-6R 抗体投与により血中 VEGF は治療前に比べ有意に低下し、正常化した (8 週後: 228 $\pm$ 102 pg/ml, n=8, P<0.05)。

RA 滑膜細胞は無刺激でも VEGF を産生していたが、IL-6 は濃度依存性に RA 滑膜細胞からの VEGF 産生を増強した。IL-1 $\beta$  も単独で VEGF 産生を増強したが、TNF $\alpha$  単独では増強しなかった。無刺激、IL-6/sIL-6R、IL-1 $\beta$  あるいは IL-6/sIL-6R+IL-1 $\beta$  刺激で 72 時間培養したところ、経時的に培養上清中の VEGF の増加が認められた。72 時間培養後の上清中の VEGF は、IL-6 あるいは IL-1 $\beta$  単独刺激ではそれぞれ 788 $\pm$ 9 pg/ml、846 $\pm$ 59 pg/ml であったが IL-6/sIL-6R+IL-1 $\beta$  刺激では 2092 $\pm$ 134 pg/ml と有意に増加し、強い相乗効果が認められた (IL-6/IL-1 $\beta$  vs IL-6, P<0.0001; IL-6/IL-1 $\beta$  vs IL-1 $\beta$ , P=0.0001)。このような相乗効果は IL-6+TNF $\alpha$  でも認められたが IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$  では認められなかった。

VEGF 産生誘導が転写レベルで生じることを確認するため、VEGF の mRNA 発現量をリアルタイム PCR を用いて調べたところ、無刺激に比べ IL-6/sIL-6R 刺激では 1.5 倍、IL-6/sIL-6R+IL-1 $\beta$  では 2.8 倍に発現が増強した。

サイトカインの特異的阻害剤による VEGF 産生抑制効果については、抗 IL-6R 抗体だけが IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  の 3 者刺激による VEGF 産生を抑制し IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$  で刺激した場合の VEGF レベルまで低下させた。IL-1ra または抗 TNF $\alpha$  抗体では著明な産生抑制は見られなかった。

#### [総括]

抗 IL-6R 抗体治療で RA 患者の血中 VEGF が低下したことから、IL-6 が RA 患者体内での VEGF 産生に関与することが明らかとなった。IL-6 と IL-1 $\beta$  は単独でも滑膜細胞から VEGF 産生を僅かに誘導したが、TNF $\alpha$  では誘導しなかった。しかし IL-6 は IL-1 $\beta$  あるいは TNF $\alpha$  と相乗的に RA 滑膜細胞からの VEGF 産生を誘導した。一方 IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  との間には VEGF 産生になら相乗効果を示さなかった。RT-PCR により VEGF の産生誘導は転写の促進によることが確認できた。またサイトカイン特異的阻害剤の中で抗 IL-6R 抗体だけが IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  の 3 者の共存下での VEGF 産生を阻害した。以上より IL-6 はこれらの炎症性サイトカインによる VEGF 産生の誘導において pivotal なサイトカインであることが明らかになった。ヒト化抗 IL-6R 抗体による VEGF 産生抑制は IL-6 阻害が治療効果を発揮するメカニズムの一つであると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

関節リウマチ (RA) は全身の関節をおかす慢性炎症性疾患で、罹患関節の病理学的特徴は炎症細胞の浸潤と血管新生を伴う滑膜増殖である。血管新生は RA の病態形成に不可欠で、血管内皮増殖因子 (VEGF) の関与が示唆されている。

難治性 RA 患者に対しヒト化抗 IL-6 受容体抗体 (抗 IL-6R 抗体) 治療を行ったところ RA 患者の血中 VEGF が正常化したことから、IL-6 が TNF $\alpha$  や IL-1 の産生を亢進している RA 患者体内での VEGF 産生に不可欠であることが明らかとなった。In vitro の実験で、IL-6 は IL-1 $\beta$  あるいは TNF $\alpha$  と相乗的に RA 滑膜細胞からの VEGF 産生を誘導し、一方 IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  との間には VEGF 産生になら相乗効果を示さないことが明らかとなった。RT-PCR により VEGF の産生誘導は転写の促進によることが確認された。さらに IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  の特異的阻害剤の中で

抗 IL-6R 抗体だけが、これら 3 者の共存下での VEGF 産生を阻害した。以上より IL-6 はこれらの炎症性サイトカインによる VEGF 産生の誘導において *pivotal* なサイトカインであることが明らかになった。IL-6R 抗体による VEGF 産生抑制は IL-6 阻害が RA の治療効果を発揮するメカニズムの一つであると考えられる。

以上の所見は、今まで不明であった RA での VEGF 産生調節における IL-6 の役割ならびに IL-6 阻害の意味を明らかにし、抗 IL-6R 抗体の有用性を裏付けるものである。

従って、この発表は学位授与に値すると判定した。