

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19591153

研究課題名 (和文) 自己免疫誘導性関節炎の制御機構と治療

研究課題名 (英文) Mechanisms and potential therapy of autoimmune arthritis

研究代表者

松本 功 (MATSUMOTO ISAO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号 30343081

研究成果の概要：

GPI誘導関節炎モデルをもちいて、生物学的製剤に対する治療効果がRAに近似しており、病因、および治療効果のメカニズムを探索する上で優れた動物モデルと考えられた。またIL-6は T_H17 を選択的に誘導することによりGPI誘導性関節炎の発症に重要な役割を果たしていることが明らかになり、抗原特異的CD4+細胞の増殖や自己抗体の産生誘導にも関わる可能性が示唆された。また、adoptive transferモデルではB細胞は抗体産生細胞として機能していると考えられ、B細胞以外の脾細胞が産生するTNF α やIL-6と協調して、自己抗体が関節炎を誘導している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：リウマチ学

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は発症頻度が高い自己免疫疾患である。昨今、炎症性サイトカインを抑制する生物製剤、特に TNF を制御する薬剤の効果が評価されているが、関節炎抑制効果は認められるものの病態を完治させる薬ではない。また、何故ここまで生物学的製剤の効果が認められるのかも含めて、病因についてはいまだ明らかでないことが多い疾患である。現在までの我々の検討で、より RA に近い動物モデルと考えられる抗原 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) を免

疫しておきるマウスに注目し、RA を制御する分子の同定、治療法の開発を目的として研究を進める。GPI 免疫による関節炎においては、サイトカインの依存性が RA に近似し、種差が非常に強く、何故それらが特定のマウスにのみ起き得るのかを明らかにすることで、関節炎発症、病態の遷延に重要な因子を同定し、治療に結びつけることを目的とする。また、それをヒト RA の知見、あるいは抗 GPI 抗体依存性モデルである K/BxN マウスと比較解析することにより、現在の生物製剤を凌駕する次世代の治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

ヒト RA に近似したモデルと考えられる GPI 免疫関節炎モデルマウスを中心に検討していく。現在までに得られた抗 GPI 抗体陽性者の RA 患者と比較検討していきながら、抗 GPI 抗体の関節炎への関与のメカニズムや、自己抗原特異的なその他細胞群との係わり合いを検討し、研究を進めていく。特に、TNF α と IL-6 依存性が明らかに強い GPI 免疫関節炎モデルを中心に、以下の4つのテーマに関して検討を進める。

(1) GPI 免疫マウスにおける TNF α 制御機構

(2) 自己反応性 T 細胞、特に発症直後の関節炎における Th17 細胞と自己免疫性関節炎との関係—IL-6 とのリンク

(3) SCID マウスを介した GPI 免疫モデルにおける B 細胞の役割—自己抗体、及び Fc γ R の役割

(4) 関節炎特異的 TNF 調整因子 TIARP (TNF α -induced adipose related protein) の解析、関節炎制御機構との関連

3. 研究の方法

(1) DBA/1 マウスにヒトリコンビナント GPI を免疫し、関節炎を誘導した。関節炎発症直後 (day8) に各種生物製剤、特に RA に対する効果が注目されている抗 TNF α 抗体、CTLA-4 Ig、抗 IL-12 抗体などを投与し効果を追跡した。また、治療群での 1 週後の抗 GPI 抗体価を測定し、自己抗体産生抑制効果を比較検討した。

(2) GPI 免疫後 day7, day14 に抗 IL-17 抗体投与を行った。また、その分化に必要である IL-6 に対する受容体抗体 (MR16-1) を用いて、関節炎に対する予防的効果 (day0, day3)、および治療的効果 (day8, day14) を詳細に検討した。予防的投与に関しては各 effector T 細胞 lineage への分化 (Th1, 2, 17, Treg) を所属リンパ節のサイトカイン及び Foxp3 細胞内染色で同定し、さらに MR16-1 投与治療群における抗原特異的 T 細胞の増殖を CFSE ラベルにて確認し、同時に抗 GPI 抗体産生への影響を検討した。

(3) GPI 誘導マウス脾臓を d14 に摘出し、脾細胞、あるいは CD19+ 細胞や CD4+ 細胞を除去した脾細胞群 (10^7 細胞) を抗原 GPI と同時投与し、関節炎発症及び組織学的に検討した。さらに、CD19+ 細胞除去群に関節炎マウスより得られた IgG や アフィニティー精製した抗 GPI 抗体 3 mg を SCID マウス腹腔内に投与し、関節炎の発症を検討した。また SCID マウス血清中の抗 GPI 抗体価を測定した。また、脾細胞 (CD19+ 除去、CD4+ 除去) を抗原 GPI あるいはコントロール蛋白と *in vitro* で培養し、TNF, IL-6 の産生を ELISA で検討した。

(倫理面への配慮)

筑波大学の医の倫理特別委員会はすでに承認済みである。

4. 研究成果

(1) GPI 免疫モデルでは発症後でも抗 TNF 抗体、CTLA-4Ig が著効した。また、抗 GPI 抗体に関してはこれら治療薬の抑制効果は、統計的には CTLA-4 Ig に認められた。一方、抗 IL-12 抗体では効果は殆ど認められなかった。(Matsumoto I, et al. Arthritis Res Ther. 2008)

(2) 抗 IL-17 抗体を day 7 に投与することにより関節炎は有意に抑制された。また MR16-1 を day 0 または day 3 に投与した群では GPI 誘導性関節炎の発症はほぼ完全に抑制され、day 8 に投与した群でも関節炎は減弱された。MR16-1 を day 0 または day 3 に投与した群では所属リンパ節中の Th17 細胞への分化のみ著明に抑止され、その他の Th1, 2, Treg 分画には影響を与えなかった。MR16-1 投与群では抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖が抑制され、抗 GPI 抗体産生の抑制効果も認めた。(Iwanami K, et al. Arthritis Rheum. 2008)

(3) 関節炎を起こした DBA/1 マウスの脾細胞と抗原の移入により、SCID マウスにおいて関節炎が認められ、組織学的に滑膜増生や関節軟骨表面への IgG, C3 の沈着が観察された。GPI 誘導マウスの脾臓から CD19+ 細胞や CD4+ 細胞を除去した細胞群の移入では SCID マウスに関節炎を誘導できなかった。GPI 誘導マウスの IgG のみの移入では SCID マウスに関節炎は誘導されなかったが、CD19+ 細胞を除去した細胞群と上記 IgG、あるいは抗 GPI 抗体を腹腔内投与した SCID マウスで関節炎が誘導された。In vitro の解析では脾細胞で GPI 特異的な TNF α , IL-6 の産生が認められ ($p < 0.05$) 特に CD19+ 細胞を除去した細胞群での産生が多く認められた。(Tanaka Y, et al. Clin Exp Immunol. 2009)

(4) 関節炎マウス脾臓における TNF 関連遺伝子の発現変動を DNA マイクロアレイ法を用いて解析し、TNF α -induced adipose-related protein (TIARP) 分子が他の TNF 関連因子と比べて約 20 倍以上の差をもって関節炎マウス脾臓で高発現していた。TIARP の組織発現は GPI 誘導関節炎マウスの炎症臓器である脾臓および関節局所にも発現していることが判明した。脾臓においては関節炎発症初期 (day7) に発現が増強しその後は元のレベルまで低下する。TNF 中和抗体を投与し関節炎を治療したマウス脾臓での TIARP 発現について検討したところ、コントロール抗体投与後の推移は発現がいったん上昇し、その後は低下する経過をたどる一方、TNF 中和抗体投与群では発現上昇は認

められず、低値のまま推移した。以上のことから、GPI 誘導関節炎マウス脾臓における TIARP 発現は、TNF α が強く関与していることが考えられる。また、TIARP 分子は関節炎マウス脾細胞の中で特に CD11b 陽性細胞に強く発現していたことも判明した（現在 review 中）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 23 件）

1. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara M. Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility *Ann Rheum Dis.* (in press) 2009, 査読有
2. Tsutsumi A, Kobayashi T, Ito S, Goto D, Matsumoto I, Yoshie H, Sumida T. Mannose binding lectin gene polymorphisms and the severity of chronic periodontitis. *Jap. J. Clin. Immunol* 32:48-52, 2009, 査読有
3. Horikoshi M, Ito S, Ishikawa M, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T. Efficacy of mizoribine pulse therapy in patients with rheumatoid arthritis who show reduced or insufficient response to infliximab. *Mod Rheumatol*(in press)2009, 査読有
4. Suzuki T, Ito S, Handa S, Kose K, Okamoto Y, Minami M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T. A new low-field extremity magnetic resonance imaging and proposed compact MRI score- Evaluation of anti-tumor necrosis factor biologics on rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*(in press)2009, 査読有
5. Tanaka-Watanabe Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. B cell play crucial role as antigen presenting cells and collaborating with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 155: 285-294, 2009 , 査読有
6. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Geoffrey Hom, Robert R. Graham, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J, Timothy W. Behrens, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of the Association between C8orf13-BLK Region and Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population. *Arthritis Rheum.* 60:553-558, 2009, 査読有
7. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 10:R130, 2008 , 査読有
8. Furuya T, Matsumoto I, Tsuchiya N, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Sumida T, Kamatani N, Kotake S. : Anti-glucose-6-phosphate isomerase, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and HLA-DRB1 genotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis *Clin Exp Rheumatol.* 26:918-921,2008 , 査読有
9. Kawasaki A, Ito I, Hikami K, Ohashi J, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Koga M, Arinami T, Robert R Graham, Geoffrey Hom, Takasaki Y, Hashimoto H, Timothy W Behrens, Sumida T, Tsuchiya N. Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of STAT1-STAT4 region. *Arthritis Res Ther.* 10:R113, 2008 査読有
10. Ishii W, Ito S, Kondo Y, Tsuboi H, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T, Okoshi Y, Hasegawa Y, Kojima H, Sakashita S, Aita K, Noguchi M. Intravascular large B-cell lymphoma with acute abdomen as a presenting symptom in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Clin Oncol.* 26:1553-1555,2008 査読有
11. Iwanami K, Matsumoto I, Watanabe Y, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T, Sumida T. :Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. *Arthritis Rheum.* 58:754-763 ,2008 査読有
12. Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Iwanami K, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Therapeutic effects of antibodies to TNF alpha and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 10:R66, 2008 査読有
13. Matsui H, Tsutsumi A, Sugihara M, Suzuki T, Iwanami K, Kohno M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Visfatin(pre-B cell colony-enhancing factor) gene expression in patients with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis.* 67:571-572, 2008 査読有
14. Wang Y, Ito S, Chino Y, Iwanami K,

Yasukochi T, Goto D, Matsumoto I, Hayashi T, Uchida K, Sumida T. Use of Laser Microdissection in the Analysis of Renal-infiltrating T cells in MRL/lpr Mice. Mod Rheumatol. 18:385-393, 2008 査読有

15. Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Ohnishi Y, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Taniguchi M, Sumida T. Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. Int J Mol Med. 22:369-374, 2008 査読有

16. Nakamura Y, Wakamatsu E, Matsumoto I, Tomiita M, Kohno Y, Mori M, Yokota S, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. High prevalence of autoantibodies to muscarinic-3 acetylcholine receptor in patients with juvenile-onset Sjogren's syndrome. Ann Rheum Dis. 67:136-137, 2008 査読有

17. Enami T, Suzuki T, Ito S, Yoshimi A, Sugihara M, Mamura M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T. Cyclosporine treatment in the refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with systemic lupus erythematosus. Intern Med. 46:1033-1037, 2007 査読有

18. Sugihara M, Tsutsumi A, Suzuki E, Suzuki T, Ogishima H, Hayashi T, Chino Y, Ishii W, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. The gene expressions of TNF α TTP, TIA-1 and HuR in the peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis before and after infliximab therapy. Arthritis Rheum. 56:2160-2169, 2007 査読有

19. Wakamatsu E, Nakamura Y, Matsumoto I, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. DNA microarray analysis of labial salivary gland of patients with Sjogren's syndrome. Ann Rheum Dis. 66:844-845, 2007. 査読有

20. Yamada H, Ishii W, Ito S, Iwanami K, Ogishima H, Suzuki T, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T. Sarcoid myositis with muscle weakness as a presenting symptom Mod Rheumatol. 17: 243-246, 2007 査読有

21. Matsuyama M, Suzuki T, Tsuboi H, Ito S, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T. Anti-interleukin-6 receptor antibody (tocilizumab) treatment of multicentric Castleman's disease. Intern Med. 46, 771-774, 2007 査読有

22. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Shima Y,

Takada K, Matsumoto I, Saito K, Koike T. A multi-center phase I/II trial of rituximab for refractory systemic lupus erythematosus Mod Rheumatol. 17:191-197, 2007 査読有

23. Hayashi T, Matsumoto I, Yasukochi T, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Biased usage of synovial immunoglobulin heavy chain variable region 4 by the anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody in patients with rheumatoid arthritis. Int J Mol Med. 20:247-253, 2007 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 松本 功: 自己免疫性関節炎における IL-6 と Th17-関節リウマチでの制御の現状- 第 38 回日本免疫学会総会クリニカルセミナー 3 (京都) 12 月 2 日、2008
2. 松本 功: 自己免疫関節炎における炎症性サイトカイン制御メカニズム-TH17 細胞の関与を含めて- 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会イブニングセミナー 3 (札幌) 4 月 22 日、2008

[図書] (計 1 件)

1. 松本 功、岩波慶一 自己免疫性関節炎における IL-6/IL-17 の役割 リウマチ科 4 1 巻 96-103, 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: “関節炎誘発ペプチド”

発明者: 松本 功、住田孝之、岩波慶一

権利者: 国立大学法人筑波大学

種類: 特願

番号: 2008-022714 号

出願年月日: 2008 年 2 月 1 日

国内外の別: 国内

[その他]

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/rheumatology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 功 (MATSUMOTO ISAO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号: 30343081

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし