

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008-2010

課題番号：20591168

研究課題名(和文) 疾患特異的な免疫制御法および抗炎症作用を有する新規生物製剤・低分子化合物の開発

研究課題名(英文) Development of new anti-inflammatory compounds and/or biologics to achieve disease specific immune-regulation

研究代表者

臼井 崇 (USUI TAKASHI)

京都大学・大学院医学研究科・特定准教授

研究者番号：90362483

研究成果の概要(和文)：

我々は、関節炎モデル動物とヒト関節リウマチ(RA)症例における関節局所浸潤T細胞のサイトカインプロファイルを経時的に解析した。まずRAの代表的なマウスモデルであるコラーゲン誘導関節炎モデルでは、IFN-gamma産生細胞は存在せず、ほぼすべてがIL-17産生細胞であり、しかもその大部分がgamma/delta T細胞であった。しかしSKGマウスでは、IL-17産生gamma/delta T細胞は全く存在せず、純粋なTh17細胞で占められていた。次にRA手術症例で同様の解析を行ったが、IL-17産生T細胞は極少数しか存在せず、大部分はIFN-gamma産生T細胞であり、マウス関節炎モデルとはかなり異なるプロファイルであることが分かった。

研究成果の概要(英文)：

Although interleukin-17 (IL-17)-producing T cells were reported to play pathogenic roles in murine autoimmune disease models, there are few information about it in human autoimmune diseases. One of the aims of this study was to analyze which are the predominant cells, IL-17 producing T cells or IFN-gamma producing T cells in murine arthritis models as well as rheumatoid arthritis.

IL-17 producing T cells were predominant population in both collagen-induced arthritis (CIA) in mice and SKG mice in affected joints. In CIA mice, the majority of IL-17 producing T cells were not alpha/beta T cells but gamma/delta T cells, in contrast, IL-17 producing T cells were not gamma/delta T cells but alpha/beta T cells in affected joints of SKG mice. Furthermore, IFN-gamma producing T cells were predominant in the joints of RA. These results demonstrate that there were significant differences in the cytokine profile of T cells in the arthritic joints of two murine models and human RA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床免疫学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ、関節炎モデルマウス、IL-17, gamma/delta T細胞

1. 研究開始当初の背景

これまでの全身性自己免疫疾患に対する治療法は、副腎皮質ホルモン剤や免疫抑制剤投与という疾患非特異的な手法に半世紀以上も終始してきたため、重篤な感染症や骨・代謝性疾患の悪化を招いてきた。次善の策として、より疾患特異的な分子を標的にするという戦略が考えられ、関節リウマチ(RA)に対する抗 TNF- α 製剤を初めとする生物学的製剤が登場し効果を上げている。しかしこれらの製剤によってもコントロールできない症例があること、感染症・悪性腫瘍という副作用問題が存在すること、コスト面などまだまだ理想的な治療法とは言えず、より疾患特異的な治療法の確立が急務となっている。

2. 研究の目的

近年、RA に対して抗 TNF- α 製剤を初めとする生物学的製剤が次々と開発・臨床応用され大きな成功を収めている。しかしこれらの製剤によってもコントロールできない症例があることや、感染症・悪性腫瘍という副作用問題が存在すること、またコストが非常に高い点などまだまだ理想的な治療法とは言えない。最近、IL-17 を産生する Th17 細胞の膠原病への関係が示唆され注目を集めている。しかし、これまでのデータの多くはモデル動物から得られたものであり、ヒトにおけるデータはまだ少ない。例えば関節炎モデルマウスにおける IL-17 産生細胞の病態への関与は、様々な実験結果より明らかであるが、RA 症例を用いた解析では否定的な報告もあり、まだ結論が出ていない。

そこで我々は、関節炎モデルとしてコラーゲン誘導関節炎(CIA) および SKG マウスという2つの関節炎モデルと、RA における罹患関節病変局所における浸潤細胞動態を詳細に解析し、IL-17 がヒト RA の治療ターゲットに成り得るのか検証することにした。

3. 研究の方法

動物モデルを用いたこれまでの解析は、その手技の困難さから腫脹関節局所から直接浸潤炎症細胞を分離し、発症前から終息期に至るまで経時的に観察した報告が存在しなかった。このことが過去の報告に様々な乖離を生じる原因となっている可能性があると考えた。我々は、骨髓細胞のコンタミネーションなしにマウス手・足関節局所からリンパ球を分離する技術を確立した。この技術を用いて CIA および SKG マウスにおける関節局所浸潤細胞を分離し、表面マーカーとともにサイトカインプロファイルを細胞内サイトカイン染色で経時的に解析した。また RA 患者からも関節液および手術時に得られる滑膜組織中の単核細胞も分離し、同様の解析を行

った。

4. 研究成果

我々はまず、CIA マウス罹患関節局所浸潤 T 細胞の解析を行った。ウシ CII を DBA1/J マウスに免疫する通常の CIA マウスを用いたが、工夫した点として通常は尾根部に免疫するところを、片方の後肢 foot pad に免疫し、免疫局所の関節炎の変化(アジュバント効果を含む関節炎、immunized joint) とそれ以外の四肢に生じてくる関節炎(真の CIA と考えられる、swollen joint) を別個に解析することにした。関節からのリンパ球回収は注意深く表皮を剥離し、長幹骨は intact のまま抜き取り、残る手・足関節周囲組織を出発材料にコラーゲナーゼ処置、次いでフィコール分離を行い、皮内および骨髓細胞の混入を避け、また CD19 染色にてもこれらの細胞の混入のないことを確認しながら行われた。IL-17A 産生細胞は反応性に腫脹した関節局所から数多く検出されたが、驚くべきことにその大部分は CD4 を発現しておらず、CD8、DX5 も陰性であり、その後の解析で gamma/delta T 細胞であることが判明した。さらに驚いたことに CIA 発症前から終末期までどのポイントでも IFN- γ 産生細胞(Th1 細胞)の局所への浸潤は極少数でありピークを形成しなかった。我々は前述のようにまず Th1 細胞が先行浸潤し初期炎症巣を形成し、次に Th17 がリクルートされ炎症が慢性化するものと予想していたので本結果は全く予想外であった。少なくとも本結果を見る限り Th1 細胞が CIA の誘導にも維持にも重要でないことを示唆する所見であった。実際、IFN- γ ノックアウトマウスに CIA を誘導するとワイルドタイプのマウスより激しい関節炎を引き起こすことは以前から知られており、CIA の発症に IFN- γ が不要であることは周知の事実であったが、正常マウスにおける CIA においても Th1 型反応の寄与が無いと考えられたことは大きな発見であった。一方免疫した側の関節では明らかな Th1 型反応が誘導されており、Th1/Th17 混合タイプの炎症であることが分かった。これはアジュバント中に含まれる結核菌死菌成分である HSP が強く Th1 誘導作用を有することを考えると当然の結果とも言えるが、逆に強い Th1 アジュバントが局所に影響してもなお Th17 反応がドミナントであるということは、マウスが、あるいは齧歯類が、あるいは DBA1/J の遺伝子背景が元々 Th17 型反応に傾いていることを示唆している可能性が考えられた。次に IL-17A 産生 gamma/delta T 細胞の CIA における機能を解析するために、その抗原特異性とサイトカイン要求性を解析した。その結果 IL-17A 産生 gamma/delta T 細胞は gamma/delta TCR の

クロスリンクや CII にはほとんど反応せず、IL-1beta+IL-23 で相乗的に、あるいは IL-23 単独でも増殖が維持された。一方 CD4+である Th17 細胞は確かに CII 刺激に反応し、IL-23 単独刺激には gamma/delta T 細胞ほどではなかったが反応を示した。さらに IL-17A 産生 gamma/delta T 細胞の in-vivo における機能を解析するため、腫脹関節所属リンパ節より本細胞を sorting し、非免疫および CIA 誘導途中の DBA1/J マウス足関節に直接マイクロシリンジで移入し関節炎スコアの変化を観察した。すると非免疫マウスでは炎症を引き起こすことは出来なかったが、CIA 誘導途中のマウスにおいては関節炎の増悪を認め、IL-17A 産生 gamma/delta T 細胞は CIA の発症には寄与しないが病態増悪に寄与していることを証明した。以上の結果は CIA においてはまず抗原特異的な Th17 細胞が局所に浸潤し初期炎症を惹起し、その後炎症性サイトカインによって呼び集められた IL-17A 産生 gamma/delta T 細胞が、抗原非特異的に増殖し病態が悪化・維持されていることが分かった。

次に我々は全く同様の手技で SKG マウス罹患関節を解析した。SKG マウスは当初 RA に酷似した関節炎を自然発症するマウスとして坂口らによって報告された。その後の研究でその原因が T 細胞シグナル伝達に重要な分子 (ZAP70) の point mutation によるシグナル減弱による胸腺内セレクション機構異常と、それに続く自己応答性 T 細胞の増加によるものであることが証明された。本マウスはコンベンショナルな飼育環境や真菌性分による刺激により関節炎が誘導できる。我々は本マウスに真菌成分である Zymosan を前もって腹腔内投与し 7 週に腫脹関節を解析した。するとやはり IL-17A 産生細胞が IFN-gamma 産生細胞に比べ約 10 倍ドミナントであったが CIA と比較すると Th1 細胞集団も認められた。さらに驚くべきことに CIA ではドミナントであった IL-17A 産生 gamma/delta T 細胞は SKG 関節炎局所にはほとんど存在せず、いわゆる Th17 細胞で占められていることが分かった。またこの差異は DBA1/J と BALB/c というマウスの種差によるものではなく SKG マウス関節炎特有の現象である可能性が考えられたが、その機序については現在解析中である。このようにマウス関節炎モデル間でも関節局所浸潤細胞のレパートワーが大きく異なることが分かった。

我々が本解析を行っている同時期に、山田らにより RA 症例における末梢血および関節液中の T 細胞サイトカインプロファイルの解析データが報告された。この報告では変形性関節症症例を対照として、RA 症例において IL-17A 産生細胞の増加は明らかではなく、むしろドミナントなのは IFN-gamma 産生細胞

であったということで、マウス関節炎モデルの知見とは異なると結論されていた。我々は本知見を再検し、さらに関節液のみならず手術症例に限られるが滑膜組織も入手し、マウス同様組織内浸潤細胞を解析することとした。その結果、山田らの報告と同様に関節液・滑膜組織に拘わらず浸潤 T 細胞の主たる Th 細胞フェノタイプは Th1 であり Th17 細胞の割合は 1%未満と極めてマイナーと言わざるを得ない結果であった。さらには RA においても IL-17A を産生する gamma/delta T 細胞はほとんど存在しないと言って良いくらい少数であり、IFN-gamma を産生する gamma/delta T 細胞が 0.1-2.5%程度存在するに過ぎなかった。実は、関節液解析症例の中にはたった一例ではあるが急性発症かつ未治療の症例も含まれていたが、そのような症例においても、Th17 も IL-17 産生 gamma/delta T 細胞も他の症例同様少数であった。このようなマウスとヒトの差異が種差に起因するのか、観察している関節炎の違いによるものなのか、あるいは各種治療薬による修飾効果なのか現段階で結論づけることは困難であり、これらの因子を加味した解析が今後必要となると考えられた。

(結論)

CIA においては IL-17 産生 gamma/delta T 細胞が、また SKG マウス関節炎では Th17 細胞が、病態の中心であり Th1 の関与は示されなかった。しかしヒト RA 症例では、IL-17 産生 gamma/delta T 細胞は存在しないばかりか Th17 細胞もごく少数しか存在せず、Th1 細胞が主要な浸潤細胞であった。RA とそのモデル動物の病態がかなり異なる可能性と共に、各モデル動物間においても病態が異なることが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1) DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (Drosophila) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1 -analysis of their binding with TGF- β superfamily proteins. Tanaka M, Murakami K, Ozaki S, Imura Y, Tong XP, Watanabe T, Sawaki T, Kawanami T, Kawabata D, Fujii T, Usui T, Masaki Y, Fukushima T, Jin ZX, Umehara H, Mimori T. FEBS J. 2010 Oct; 277(20): 4278-89. 査読有。

2) Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. Sato T, Fujii T, Yokoyama T, Fujita Y, Imura Y, Yukawa N,

Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. Arthritis Rheum. 2010 Dec;62(12): 3730-40. 査読有.

3) RA における Th17 細胞と IL-17. 臼井崇. Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology. 2010, 第 4 巻:162-5. 査読無.

4) 関節リウマチ患者関節液中の IL-17A の役割. 臼井崇. リウマチ科. 2010, 第 43 巻: 394-401. 査読無.

5) The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Okawa K, Mimori T. Rheumatology (Oxford). 2010 Mar;49(3):433-40. 査読有.

6) Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T. Arthritis Rheum. 2009 Aug;60(8):2294-303. 査読有.

[学会発表] (計 11 件)

1) 小林志緒, 臼井崇, 橋本美季子, 村上孝作, 湯川尚一郎, 川端大介, 野島崇樹, 大村浩一郎, 藤井隆夫, 三森経世. 膠原病における血清中 IL-17F 値の測定とその意義に関する解析. 第 38 回日本免疫学会学術集会. 2008 年 12 月 2 日. 京都.

2) 小林志緒, 臼井崇, 伊藤能永, 橋本美季子, 吉藤元, 清水正和, 湯川尚一郎, 川端大介, 野島崇樹, 大村浩一郎, 藤井隆夫, 三森経世. リウマチ性疾患の検査 血清 IL-17F 値は関節リウマチの新規バイオマーカーである. 第 53 回日本リウマチ学会. 2009 年 4 月 25 日. 東京.

3) T Usui, S Kobayashi, Y Ito, M Iguchi-Hashimoto, K Murakami, and T Mimori. "Translational research in immunology" Biology of TGF- β and IL-17s in Translational Research. 第 52 回日本リウマチ学会. 2008 年 4 月 22 日. 札幌.

4) 伊藤能永, 臼井崇, 橋本美季子, 小林志

緒, 吉藤元, 三森経世. II 型コラーゲン誘発性関節炎 (CIA) 局所における IL-17 分泌細胞の解析. 第 52 回日本リウマチ学会. 2008 年 4 月 23 日. 札幌.

[その他]
ホームページ等
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~rheum/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 崇 (USUI TAKASHI)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号: 90362483

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

三森 経世 (MIMORI TSUNRYO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 10157589

若月 芳雄 (WAKATSUKI YOSHIO)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 40220826

西小森 隆太 (NISHIKOMORI RYUTA)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 70359800