

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590448

研究課題名（和文）サイトカイン信号異常による自己免疫性関節炎と全身性免疫異常の
時間的・空間的病態研究課題名（英文）Spatiotemporal pathophysiology of systemic immunological disorders
and autoimmune arthritis caused by aberrant cytokine signaling

研究代表者

石原 克彦（ISHIHARA KATSUHIKO）

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10263245

研究成果の概要（和文）：IL-6 受容体 gp130 の信号異常による関節リウマチマウスモデル gp130F759 が臨床的関節炎を発症する前の5ヶ月齢で最初期病変として血清中にサイトカインと自己抗体、滑膜組織に炎症性細胞の増加を認めた。関節組織では gp130 の下流の転写因子 STAT3 のチロシンリン酸化増強と自己抗体産生の誘因となる Padi4 タンパクの増加を認めた。関節リウマチの病態の理解に役立つ gp130F759 の関節炎初期病態を発見した。

研究成果の概要（英文）：A model mouse for rheumatoid arthritis, gp130F759 exhibited increases of serum cytokines and autoantibodies, and infiltration of inflammatory cells in the synovium at 5-month-old, when the clinical arthritis is hardly detectable. Furthermore, increased tyrosine-phosphorylation of STAT3, as an aberrant gp130 signaling, and production of Padi4 protein that may involve in the autoantibody production, were detected in the joints. We found the earliest changes in the joints of gp130F759, which is informative for the understanding of the early pathophysiology of rheumatoid arthritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物、自己免疫疾患、

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は、多発性関節炎を主徴とする頻度の高い(有病率約1%)慢性炎症性自己免疫疾患である。遺伝性因子と感染症等の環境因子が関与する多因子疾患であり、本態は関節滑膜細胞の異常増殖と骨・関節の破壊である。臨床ではRAの組織破壊に直結する慢性炎症のエフェクターサイトカイン(TNF α , IL-6)の作用を抑制する抗サイトカイン療法

関節リウマチ、サイトカイン

の画期的な有効性が認められ実用化された。しかし一部のRAで病態に関連する自己抗原が報告されたものの、RA全体として関節滑膜に局在した病変の発生、炎症の慢性化等における免疫異常の役割とその分子機構の詳細は不明なままであり、発症早期の病態を特異的に修正する治療法の開発には病態の理解が不足している。この難しさの理由の一つに、様々な遺伝子改変マウスが最終的に良く

似た RA 様関節炎を発症するように、ヒト RA も異なる病因遺伝子異常に様々な組み合わせの病態修飾遺伝子異常が加わり、最終的に RA として共通の病態が形成される疾患群である可能性がある。またヒトでは自覚症状が出て初めて医療機関を訪れるため RA 発症早期の病態は不可知である。あるマウスモデルの発症前〜早期における局所病変と全身性変化の詳細な解析は、RA 全体に普遍的とは言えないまでもヒト RA 亜型の発症早期病態を類推する上で有用なモデル構築に繋がる貴重な知見を提供する可能性がある。

申請者は IL-6 ファミリーサイトカインに共通する受容体 gp130 の免疫制御機構を発生工学的的手法により解析する過程でその信号伝達経路に異常を持つマウス gp130F759 が、RA 様自己免疫性関節炎を発症することを発見し、その病態解析を行って来た。これまでの病態解析は、細胞系譜やサイトカインを欠損する gp130F759 の表現型解析を中心に進められた。この手法は強力であるが、発生初期からの遺伝子欠損で得られるのは発症に必須か否かの情報のみであり関節局所における病変の進行過程と全身の免疫異常の時間的空間的関連に関する情報はほとんど得られない。特に 8 ヶ月齢頃より緩徐に臨床的関節炎を発症する gp130F759 における関節局所の最初期の病態を全身の詳細な解析との対比により時間的空間的に把握することが重要と考え、本申請研究を計画した。

2. 研究の目的

関節炎マウスモデル gp130F759, *pX-Tg/gp130F759* の滑膜組織と全身免疫系を免疫分子生物学及び組織病理学的手法を駆使して包括的に解析し、造血系・非造血系細胞の相互作用、全身性自己免疫疾患における局所と全身の免疫異常・組織障害の時間的空間的連関を明らかにする。

特に gp130F759 マウスの RA 様関節炎初期病変の発生時期と起因となる細胞を同定して病変の進行過程を詳細に解析し、発現遺伝子の変動、末梢リンパ組織の免疫応答状態、滑膜-リンパ組織間の免疫担当細胞及び間葉系細胞の動態と相互作用、サイトカイン・ケモカインの時間的空間的変動を解明して自己免疫性関節炎の病態における局所病変と全身病変の免疫系を中心とした連関を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 関節炎初期病変の時間的空間的な絞り込み: SPF 環境下に gp130F759 と対照野生型 C57BL/6 を 12 ヶ月間飼育し、毎月、臨床的関節炎を評価しスコア化した。スコアは四肢関節の可動域制限と発赤・腫脹を指標に設定

した。gp130F759 の関節炎初期病変を絞り込むために 3-8 ヶ月齢の末梢血白血球数と血清サイトカイン濃度を測定した。

(2) フローサイトメーター解析: 膝関節の滑膜組織をコラゲナーゼで処理して滑膜細胞浮遊液を調製し、多重染色フローサイトメーター解析により関節炎の初期に滑膜組織へ浸潤する細胞を同定した。また、骨髄、脾臓、鼠径部及び腸間膜リンパ節などのリンパ組織の細胞と滑膜細胞の細胞構成や活性化状態を比較した。リンパ組織細胞には細胞内染色法を行い、IL-17, IFN γ , TNF α 等のサイトカイン産生細胞を検出した。

(3) 関節炎局所と全身免疫系組織における発現遺伝子変動の網羅的解析: 関節炎初期に変動する遺伝子を探索するために、gp130F759 (5 ヶ月齢♀; n=3) の足関節 (スコア 0-1) 及び骨髄の総 RNA より cDNA を合成し、C57BL/6 を対照としてマイクロアレイ解析を行った。滑膜組織で変動する遺伝子候補が濃縮されるように、関節における変動遺伝子から骨髄における変動遺伝子を除外し、得られた候補遺伝子は、gp130F759 及び対照の雌雄 (各 n=6) の関節及びリンパ組織 (鼠径部・腸間膜リンパ節、脾臓、小腸) より調製した cDNA を用いたリアルタイム PCR で発現量の差異を定量し、発現部位の特異性を検討した。

(4) 関節初期病変におけるタンパク解析: 初期病変を発生している月齢の関節或は滑膜組織を凍結粉砕し、界面活性剤を含む緩衝液を用いて可溶化し、タンパク画分の試料を調製した。イムノブロット法により、3) で検出した *Padi4* 遺伝子産物の存在や STAT3 のチロシンリン酸化状態を解析した。

(5) 滑膜線維芽細胞の機能異常の解析: gp130F759 の関節炎発症には非造血系細胞における gp130 の Y759F 変異が必要である。gp130F759 の病態解析により得られた知見を RA の病態の理解に役立てるために、関節滑膜組織における非造血系細胞である滑膜線維芽細胞の機能異常はヒト RA 及び変形性関節症由来の滑膜線維芽細胞株を解析した。

4. 研究成果

(1) 関節炎初期病変の時間的空間的な絞り込み: 川崎医科大学の SPF 飼育環境において gp130F759 は 8 ヶ月齢頃より理学的所見として明瞭な関節可動域制限が出現した。*pX-Tg/gp130F759* は非 SPF 環境で飼育されていたため以後の解析は gp130F759 で行った。関節炎発症前から発症期までを含む 3-8 ヶ月齢の血清サイトカインの Bio-plex による測定の結果、4 ヶ月齢の gp130F759 では野生型 C57BL/6 と差を認めなかったが、5 ヶ月齢では gp130F759 の血清中に IL-17, IL-6, IL-12p70, IL-9 の一過性濃度上昇を認めた。

一部の5ヶ月齢 gp130F759 の関節においても *IL-17* 遺伝子の発現が認められたことから、最初期関節病変は5ヶ月齢に始まることが示唆された。5ヶ月齢の gp130F759 の関節において変動する遺伝子を DNA マイクロアレイで網羅的に解析したところ、34,383 個の解析遺伝子の中で、2倍以上に発現増加する遺伝子 2,425 個、発現減少する遺伝子 3,027 個を得た。その中で4倍以上に発現増加或は減少した遺伝子はそれぞれ 334 個、278 個であった。骨髄で変動する遺伝子を除外した後に関節で発現増加を示したものとして、骨髄系細胞、B 細胞、T 細胞などの細胞系譜特異的遺伝子やマトリックスメタロプロテアーゼの遺伝子を認めた。定量的な発現遺伝子解析により、一部の5ヶ月齢 gp130F759 の関節において *IL-6*, *IL-17*, *MMP-8*, *MMP-9* の遺伝子発現増加を認めた。コラゲナーゼ処理にて調製した滑膜細胞のフローサイトメーター解析で骨髄系細胞(好中球, マクロファージ, 好酸球)と B 細胞の増加は認められたものの T 細胞はほとんど検出されなかった。同時期のリンパ組織における細胞構成の変化はほとんど認められなかったことから、5ヶ月齢の gp130F759 の関節組織において、全身性免疫系の異常に先行して炎症に関与し得る細胞が局在することが明らかとなった。

(2) 全身免疫系のフローサイトメーター解析: 5ヶ月齢の gp130F759 の脾臓、肘・腸間膜リンパ節における免疫担当細胞の頻度を7種の蛍光標識抗体を用いた多重染色により野生型対照と比較したところ、細胞分画の割合に差は認められなかった。CD62L・CD44の発現を指標にT細胞の活性化状態を解析したところ、細胞の割合に差は認められなかったもののナイーブT細胞中のCD62Lの発現量が gp130F759 において低下していた。5ヶ月齢前後で認められる末梢白血球数の減少と関連した gp130F759 T 細胞の異常な動態変化が示唆された。さらに細胞内サイトカイン染色法により Th17 細胞の頻度を解析したが、gp130F759 の各種リンパ臓器において増加は認められなかった。

(3) 関節炎局所と全身免疫系組織における発現遺伝子変動の網羅的解析: 全身における免疫関連遺伝子の変動との関連を把握するために、鼠径部と腸間膜のリンパ節、脾臓、小腸における発現遺伝子の網羅的解析を追加し、関節、骨髄を含めた6臓器で変動遺伝子を比較した。その結果、関節特異的な7つのパスウェイ(計80遺伝子を含む)を同定した。現在、関節炎初期病態における意義を解析中である。

(4) 関節初期病変におけるタンパク解析: 興味深いことに5ヶ月齢の gp130F759 の関節組織に

おいて RA の疾患関連遺伝子である *Padi4* の発現が増加していた。*Padi4* はタンパク質をシトルリン化する酵素であり、シトルリン化されたタンパク質に対する自己抗体、抗CCP抗体が RA の早期診断に有用であることから注目されている。同時期の gp130F759 の血清中に抗CCP抗体が検出されたことから、*Padi4* による自己抗原の修飾を介した自己抗体産生機構の発生している可能性が示唆された。さらに関節組織を可溶化して得たタンパク質のウェスタンブロット解析で、*Padi4* タンパク質の増加と STAT3 のチロシンリン酸化の増強が認められたことから関節局所において変異 gp130 による信号異常の作動が確認された。5ヶ月齢の gp130F759 における早期 RA 類似病態の存在が明らかとなり、モデルの有用性が示された。

(4) RA 滑膜線維芽細胞における、AID の異所性発現による P53 変異誘導を介した腫瘍様形質獲得機構や NF- κ B 信号抑制分子 A20, ABIN の予想外の炎症促進機能を明らかにした。類似した病態形成機構が gp130F759 の非造血系細胞に存在するか、解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び研究分担者に下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Igarashi H, Yahagi A, Saika T, Hashimoto J, Tomita T, Yoshikawa H, Ishihara K. A pro-inflammatory role for A20 and ABIN family proteins in human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.*, 141, 2011, 246-253 <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2011.10.011>

② Igarashi H, Hashimoto J, Tomita T, Yoshikawa H, Ishihara K. TP53 mutations coincide with the ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase in the fibroblast-like synoviocytes derived from a fraction of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 161, 2010, 71-80.

DOI:10.1111/j.1365-2249.2010.04163.x

③ Tsuji F, Yoshimi M, Katsura O, Takai M, Ishihara K, Aono H. Point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor, gp130, augments collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *BMC Musculoskelet Dissord*, 10・23, 2009 <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/10/23>

[学会発表] (計13件)

① Igarashi H, The pro-inflammatory function of A20 and ABINs in a subtype of fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, パシフィコ横浜(横浜)

② 矢作綾野、サイトカイン受容体変異を持つ gp130F759 マウスの自己免疫性関節炎初期病変. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, パシフィコ横浜(横浜)

③ Igarashi H, A subtype of fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis exhibits a pro-inflammatory phenotype by A20 and ABINs. 第40回日本免疫学会総会・学術集会, 2011年11月28日, 幕張メッセ(千葉)

④ 石原克彦, gp130F759 マウスの関節における網羅的発現遺伝子解析, 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2011年7月20日, 神戸ポートピアホテル(神戸)

⑤ 五十嵐英哉, RA 滑膜線維芽細胞株において ABIN1 は炎症促進性に機能する. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2011年7月18日, 神戸ポートピアホテル(神戸)

⑥ Igarashi H, The classification of rheumatoid arthritis based on the response to TNF α by the fibroblast-like synoviocytes. 13th International TNF Conference, 2011年5月16日, 淡路島(兵庫)

⑦ 五十嵐英哉, TNF α 応答性と NF- κ B 経路関連分子の発現誘導に基づく関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞の亜型分類 第33回日本分子生物学会総会, 2010年12月9日, 神戸ポートピアホテル(神戸)

⑧ Hideya Igarashi, Comparative analysis of gene expression in a subtype of fibroblast-like synoviocytes between rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 第14回国際免疫学会, 2010年8月24日, 神戸ポートピアホテル(神戸)

⑨ Katsuhiko Ishihara, Heterogeneity of gene expression profiles in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis and osteoarthritis, 第14回国際免疫学会, 2010年8月24日, 神戸ポートピアホテル(神戸)

⑩ 石原克彦, gp130F759 マウスの自己免疫性関節炎自然発症経過における IL-17 の産生, 第54回日本リウマチ学会, 2010年4月24日, 神戸ポートピアホテル(神戸)

⑪ 五十嵐英哉, 線維芽細胞様滑膜細胞株亜型に発現する RA 関連遺伝子の探索, 第54回日本リウマチ学会, 2010年4月23日, 神戸ポートピアホテル(神戸)

⑫ Ishihara K, 関節リウマチ及び変形性関節症に由来する滑膜線維芽細胞株の亜型別発現遺伝子解析, 第39回日本免疫学会, 2009年12月4日, 大阪国際会議場(大阪府)

⑬ 五十嵐英哉, 関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞における異所性 AID 発現と p53 遺伝子の体細胞突然変異との関連について, 第39回日本免疫学会, 2009年12月4日, 大阪国際会議場(大阪府)

[図書] (計1件)

① Ishihara K & Igarashi H, InTech, Molecular mechanisms of rheumatoid arthritis revealed by categorizing subtypes of fibroblast-like synoviocytes. in Rheumatoid Arthritis - Etiology, and Consequences and Co-morbidities, 2012, 73-96

<http://www.intechopen.com/articles/show/title/molecular-mechanisms-of-rheumatoid-arthritis-revealed-by-categorizing-subtypes-of-fibroblast-like-synoviocytes>

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称: 発明者: 権利者:
種類: 番号:
出願年月日: 国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称: 発明者: 権利者:
種類: 番号:
取得年月日: 国内外の別:

[その他]

ホームページ等

http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/en/research/basic_112.html#02

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 克彦 (ISHIHARA KATSUHIKO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10263245

(2) 研究分担者

五十嵐 英哉 (IGARASHI HIDEYA)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40291538