

機関番号 : 12601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790941

研究課題名 (和文) サイトカイン IL-17B および IL-17C の自己免疫疾患における役割の解明

研究課題名 (英文) Analysis of cytokine IL-17B and IL-17C in autoimmune diseases

研究代表者 岡本 明子 (OKAMOTO AKIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 40431861

研究成果の概要 (和文) :

炎症性サイトカインであるIL-17は、関節リウマチ(RA)や全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患の病態に重要な役割を果たすことが知られている。IL-17BおよびIL-17CはIL-17ファミリーに属するサイトカインでIL-17と30%程度の相同性をもつ。我々のこれまでの研究では、IL-17Bは軟骨細胞や単球、IL-17Cは炎症局所のCD4⁺T細胞・樹状細胞・マクロファージに発現し、IL-17産生T細胞と共同してあるいは独立に炎症反応を増強・持続させる可能性が示唆された。

本研究では、腎炎を発症したSLEモデルマウス(NZB/W F₁マウス)脾臓および腎臓、さらに脾臓樹状細胞とマクロファージでIL-17BおよびIL-17Cの発現がみられていることを確認した。とくにIL-17Bはコントロールマウスの脾臓と比較して強く発現していた。生体内でIL-17BおよびIL-17Cが及ぼす影響を検討するため、高効率レトロウイルスによりヌクレオソーム特異的TCR、IL-17B、IL-17Cの遺伝子導入を行った活性化T細胞をNZB/W F₁マウスに養子移入し、腎炎発症率を追跡している。また、*in vitro*でIL-17BおよびIL-17Cが脾臓食細胞の自己抗原提示能や食能に与える影響につき検討を行っている。IL-17BおよびIL-17CがRAおよびSLEの病態に及ぼす影響を解明するため、臨床データベースを作成した。SLE患者のPBMCにおけるIL-17BおよびIL-17Cの発現をreal time PCRにより解析し、疾患活動性等との相関を検討するため更なる症例蓄積を行っている。

研究成果の概要 (英文) :

IL-17, a T cell-derived proinflammatory cytokine, contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE). IL-17B and IL-17C belong to the IL-17 family. In our previous study, IL-17B is expressed in the cartilage and monocytes. IL-17C is expressed CD4⁺T cells, dendritic cells (DCs) and macrophages at the inflammatory site. IL-17B and IL-17C exacerbate and maintain inflammation in cooperate with Th17 cells or by themselves. In this study, IL-17B and IL-17C are expressed in the spleen (splenic DCs and macrophages) and kidney of lupus-prone NZB/W F₁ mice with nephritis. To examine the proinflammatory effects of IL-17B and IL-17C *in vivo*, adoptive transfer of IL-17B and IL-17C transduced CD4⁺T cells into NZB/WF₁ is under examination. Assessments of modulation of phagocytosis and autoantigen-presentation capacity by IL-17B and IL-17C are in progress. Increase in IL-17B and IL-17C expression was not observed in PBMC from patients with SLE.

These ongoing experiments would clarify the pathogenic role of IL-17B and IL-17C in autoimmune disease.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症性サイトカインである IL-17 が慢性炎症性疾患の病態に重要な役割を果たすという知見が得られており、IL-17 産生 T 細胞は、新たなヘルパー T 細胞サブセット ‘Th17 細胞’ として注目されている。IL-17 は RA 患者の滑膜および滑液中に高濃度に存在しており、IL-17 産生 T 細胞は、TNF- α や IL-1 β の産生を介して、滑膜線維芽細胞の増生・炎症細胞浸潤・血管新生・破骨細胞分化促進をもたらす、関節炎誘導にも関節・骨破壊にも寄与すると考えられている。IL-17B および IL-17C は、IL-17 と同じく IL-17 ファミリーに属するサイトカインで、相同性は 30% 程度である。IL-17 が活性型 T 細胞のみに発現しているのに対し、IL-17B は成人前立腺・精巣・卵巣・小腸・膵臓および胎児腎のほかウシの軟骨、IL-17C は成人前立腺・胎児腎に発現している。IL-17 がヒトの線維芽細胞に働いて IL-6 の発現を亢進させるのに対し、IL-17B および IL-17C はヒト単球様細胞株である THP-1 に働いて TNF- α や IL-1 β の産生を亢進させること、好中球遊走を促進することが知られている (Li et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:773-778)。このような IL-17 と IL-17B, IL-17C の構造・機能の類似性から、研究代表者らは IL-17B および IL-17C が、単球やマクロファージを介して関節炎の病態形成に関与する可能性を検討した。そしてコラーゲン誘発性関節炎 (Collagen induced arthritis; CIA) マウスの解析を通し、(1) IL-17B と IL-17C が関節炎の重症化に寄与する (2) 抗 IL-17B 抗体を関節炎発症直後の CIA マウスに単回投与するのみで関節炎の進展が抑制されるという新たな知見を得た (Yamaguchi et al. Journal of Immunology.

2007;179: 7128-36.)。さらに最近リウマチ結節では IL-17A ではなく IL-17B および IL-17C がみられるという報告もなされた (Stamp et al. Arthritis and Rheumatism. 2008;58:1601-1608)。これらのことから IL-17B および IL-17C はヒトについても炎症病態に重要な役割を果たすことが予想される。

また、炎症細胞浸潤が重要臓器障害をもたらす全身性エリテマトーデス (SLE) においても、近年、(1) 患者で IL-17 の血中濃度が上昇している (Wang et al. Lupus. 2000;9:589-593) (2) ループス様症状を呈する BXD2 マウスで Th17 細胞が増加、B 細胞の IL-17 レセプターも増加し、IL-17 依存性に胚中心形成と自己抗体産生がみられる (Hsu et al. Nature Immunology. 2008;9:166-175) (3) 自然発症の SLE モデルマウスで脾臓および腎臓に Th17 細胞がみられ、トレランスを誘導するペプチド投与は腎炎発症を抑制するとともに Th17 細胞の増加を抑える (Kang et al. Journal of Immunology. 2007, 178:7849-7858)、という報告があり、IL-17 は SLE の病態形成に寄与すると考えられているが、RA ほど解析が進んでいない。研究代表者はこれまでに SLE モデルマウスである NZB/W F₁ マウスの解析を行い、(1) F4/80⁺マクロファージ・CD11b⁺CD11c⁺樹状細胞といった脾臓貪食細胞が腎炎発症前から自己抗原を提示している (2) 脾臓貪食細胞を発症直前に除去することにより蛋白尿進展が抑制され、生存が延長したという知見を得ており (Okamoto et al. Journal of Immunology. 2008;181: 5264-71.)、脾臓貪食細胞の自己抗原提示は SLE の病態形成に関与するという仮説を立てている。また、研究

代表者は腎炎のMRL/lprマウスの腎臓に浸潤するCD4⁺T細胞を再構築したところ、腎炎発症前の腎臓よりはむしろ脾臓の貪食細胞に反応して増殖するという知見を得ている（論文投稿中）。さらにIL-17BおよびIL-17Bのレセプター（IL-17RB）が腎臓に発現すること、IL-17Cが単球で産生されること（Kolls et al. *Immunity*. 2004; 21:467-476）から、IL-17BおよびIL-17CはSLEの脾臓貪食細胞の異常な抗原提示や臓器障害に寄与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IL-17B および IL-17C が、RA・SLE 患者および SLE モデルマウスの自己抗原提示や貪食細胞機能に影響を与えるか、また IL-17 ファミリーサイトカインの阻害が新規治療法の糸口となりうるか検討することである。

3. 研究の方法

(a) 自然発症SLEモデルマウスにおけるIL-17BおよびIL-17Cの発現と機能の解析

腎炎発症前後のNZB/W F₁ マウスおよびMRL/lprマウスの脾臓および標的臓器である腎臓の貪食細胞（F4/80⁺マクロファージおよび樹状細胞）からcDNA合成を行い、IL-17B、IL-17Cの発現をreal time PCRで定量的に評価する。レトロウイルスベクターを用いて、SLEの自己抗原であるヌクレオソームに特異的なT細胞レセプターを活性化脾臓細胞に導入し、ヌクレオソーム特異的CD4⁺T細胞（AN3 T細胞）を再構築する（Okamoto et al. *Journal of Immunology*. 2008;181: 5264-71）。IL-17BおよびIL-17Cの添加下にAN3 T細胞と脾臓貪食細胞の共培養を行い、³Hの取り込みによりAN3 T細胞の増殖反応をアッセイし、抗原提示能に及ぼす影響を検討する。IL-17BおよびIL-17C添加下での脾臓貪食細胞の貪食能の変化は、蛍光標識ビーズの取り込みを指標に検討する。生体内でIL-17BおよびIL-17Cの持続的な発現が生体に及ぼす影響を検討するため、IL-17Bおよび IL-17CをレトロウイルスベクターpMIGにサブクローニングしたコンストラクトを作製、骨髄細胞に遺伝子導入し、骨髄移植を行って、IL-17BおよびIL-17Cの骨髄キメラマウスを作成する。また、IL-17BおよびIL-17Cを遺伝子導入した活性化T細胞をNZB/W F₁マウスに養子移入する。これらのマウスでループス発症と自己抗体価に及ぼす影響を検討する。自己抗体価は抗DNA抗体と抗ヌクレオソーム抗体をELISA法

で測定する。腎炎発症率を追跡し、腎炎の重症度を蛋白尿の定性検査および血中尿素窒素・組織染色（HE・PASおよび免疫組織染色）で評価する。

(b) RA・SLE患者末梢血におけるIL-17BおよびIL-17Cの発現の検討

RA および SLE 患者の末梢血で、IL-17B および IL-17C の発現を real time PCR および フローサイトメトリーを用いて検討した。ELISA 法により血中濃度も測定する。以上の結果と IL-17 や、マクロファージが産生し RA の病態形成に関与する TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインとの関連を検討する。これらのデータを臨床データベースと照合し、疾患活動性との相関を検討する。

4. 研究成果

腎炎発症NZB/W F₁マウス脾臓および腎臓、さらに脾臓樹状細胞とマクロファージでIL-17BおよびIL-17Cの発現がみられていることを確認した。とくにIL-17Bはコントロールマウスの脾臓と比較して強く発現していた。ヌクレオソーム特異的TCR、IL-17B、IL-17Cの高効率レトロウイルスを作成し、骨髄細胞への遺伝子導入によりIL-17BおよびIL-17CのNZB/WF₁骨髄キメラマウスの作製を試みたが、安定した結果が得られなかったため、遺伝子導入した活性化T細胞をNZB/W F₁マウスに養子移入し、腎炎発症率を追跡している。in vitroで、IL-17BおよびIL-17Cが脾臓貪食細胞の自己抗原提示能に及ぼす影響を検討するため、サイトカイン添加量、脾臓貪食細胞の貪食能を評価する蛍光標識ビーズの取り込みなどにつき、様々なタイムコースで検討を行っている。

RA および SLE 患者の末梢血を用いた IL-17B および IL-17C の解析について倫理審査の承認を得た。SLE に関して特定疾患申請書を基に臨床データベースを作成した。SLE 患者の PBMC を用いて IL-17B および IL-17C の発現を real time PCR により解析した。疾患活動性との相関を検討するために、更なる症例蓄積を行っている。

Th17 は幅広い自己免疫性炎症疾患の病態に重要な役割を果たすことが知られており、本研究の継続により IL-17B,C の自己免疫疾患への関与が明らかとなれば、病態の理解が大きく進むと予想される。IL-17 ファミリーは IL-17 と IL-17B から F までの 6 つの分子から成り、20-50%の相同性をもつ。したがって、IL-17 ファミリーに共通するモチーフに対するモノクローナル抗体を作成すれば、

炎症がより効率的に抑制されると考えられ、自己免疫性炎症疾患の新規治療法開発の可能性が拓けると考えられる。

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4件)

1. Miki H, Okamoto A, Ishigaki K, Sasaki O, Sumitomo S, Fujio K, Yamamoto K.
Cardiopulmonary arrest after severe anaphylactic reaction to the second infusion of Infliximab in a patient with Ankylosing Spondylitis.
Journal of Rheumatology, in press.
査読有
2. Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K.
The future of lupus therapy.
Lupus. 19(12): 1474-81, 2010. 査読有
3. Naruse H, Shoda H, Okamoto A, Oka T, Yamamoto K.
A case of osteoarthropathy due to erdheim-chester disease with overlapping Langerhans' cell infiltration.
Intern Med. 49(12): 1225-8, 2010. 査読有
4. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K.
The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population.
Arthritis Rheum. 62(2):574-9, 2010.
査読有

[学会発表] (計2件)

1. Okamoto A, Fujio K, Yamamoto K.
Identification of a disease-promoting CD4⁺ T cell clone from MRL/lpr kidney using single cell analysis.
14th International Congress of Immunology 神戸 (平成22年8月23日)

2. 岡本明子、藤尾圭志、岡村僚久、山本一彦
NZB/W F₁ SLEモデルマウスにおけるCD4⁺CD25⁻LAG-3⁺制御性T細胞の修飾因子の検討
第31回 日本炎症・再生医学会 東京
(平成22年8月5日)

[図書] (計1件)

岡本明子

IL-17 ファミリーサイトカインと関節炎
臨床免疫・アレルギー科
52巻 543-547, 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~areri18/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 明子 (OKAMOTO AKIKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40431861

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし