

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 5月 18日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790388

研究課題名（和文） ケモカインを分子標的とした炎症性骨関節疾患の新規治療法開発に向けた基礎研究

研究課題名（英文） Chemokines as novel therapeutic targets in inflammatory arthritis

研究代表者

乾 匡範（INUI MASANORI）

東北大学・加齢医学研究所・講師

研究者番号：80443985

研究成果の概要（和文）：本研究では、関節リウマチなど炎症性骨関節疾患の発症ならびに骨破壊機序を明らかにすることを目的とし、誘導性関節炎マウスモデルを用いて関節炎の病態形成および破骨細胞分化・活性化におけるケモカイン-ケモカインレセプターの役割を検討した。MIP-1 α -CCR1 を介するシグナルは炎症性関節炎ならびに破骨細胞分化を亢進させることが明らかとなった。このように、MIP-1 α -CCR1 は炎症性関節疾患の治療の分子標的となりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the physiological roles of C-C chemokines in antigen-induced arthritis and osteoclast development. MIP-1 α -CCR1 signaling enhanced inflammatory bone destruction and osteoclast development. Thus, CCL3-CCR1 signaling might be a molecular target for the treatment of inflammatory arthritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011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：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症・骨破壊

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチに代表される慢性炎症性骨関節疾患は全世界の人口の約1%に認められる最も頻度の高い自己炎症性疾患の一つである。全身の関節の腫れや痛み、さらに骨変形を伴う慢性の進行性難治性疾患で、病態が悪化すると骨破壊により関節の機能が障害されるため、患者の quality of life (QOL)は著しく低下する。病態生理学的には、関節滑膜組織へのマクロファージやT細胞など免疫系細胞の浸潤とそれに伴う炎

症性サイトカインやケモカインの発現亢進が認められ、炎症反応の増強が関節リウマチの病態の進展に寄与することが知られている。一方で、関節局所の骨浸食部には多数の骨吸収細胞である破骨細胞が観察される。破骨細胞の機能亢進と炎症性骨関節疾患の増悪は密接に関連することから、破骨細胞分化および機能の制御機構を理解することは新規治療法の開発において重要である。しかしながら、破骨細胞の分化・活性化機構、特に炎症局所における破骨細胞の

分化機構や骨破壊機序については殆ど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

ケモカイン MIP-1 α およびそのレセプター CCR1 は関節リウマチ患者の関節滑膜に高レベルで発現すること、さらに破骨細胞の分化に伴い発現上昇することが報告されている。このように、MIP-1 α -CCR1 を介する応答は骨関節疾患の病態形成に深く関与していることが示唆されるが、その病態生理学的役割については明らかとなっていない。本研究では、関節リウマチなど炎症性骨関節疾患の発症ならびに骨破壊の機序を明らかにすることを目的とし、遺伝子改変動物を用いて関節炎の病態形成および破骨細胞分化・活性化におけるケモカイン・ケモカインレセプターの役割を解明する。本研究の追究は炎症性骨関節疾患の発症機序の解明、さらには新規治療薬の開発に繋がることが期待できる。

3. 研究の方法

1) 野生型およびケモカイン MIP-1 α やケモカインレセプター CCR1, CCR5 の遺伝子欠損マウスの関節に抗原を免疫することで関節炎を誘導後、組織切片を作製し、関節炎の重症度や関節滑膜に浸潤した細胞におけるケモカイン、ケモカインレセプターの発現を蛍光抗体法により確認した。また、TRAP 染色を行い、破骨細胞数を計測した。

2) 破骨細胞分化におけるケモカイン-ケモカインレセプターの役割を明らかにするため、RAW マクロファージ細胞株を RANKL で刺激した後、ケモカインレセプターの遺伝子発現の変化を RT-PCR により測定した。また、骨髄より RANKL/M-CSF で誘導される破骨細胞にリコンビナント MIP-1 α 、および抗 MIP-1 α 中和抗体を投与し、破骨細胞分化に与える影響を検討した。

3) 破骨細胞分化における MIP-1 α , CCR1, CCR5 の生理的役割を明らかにするため、これらの遺伝子欠損マウスを用い、*in vitro* における破骨細胞分化誘導試験を行った。破骨細胞数は TRAP 染色を行い、破骨細胞数を計測した。

4. 研究成果

1) 抗原誘導性関節炎モデルにおいて、MIP-1 α および CCR1 遺伝子欠損マウスでは関節炎の重症度が野生型と比較して有意に減弱していた (図 1)。関節局所には多数の好中球やマクロファージなど炎症性細胞の浸潤が認められ、MPO 陽性好中球および F4/80 陽性マクロファージにはいずれも CCR1 と MIP-1 α の発現が確認された。また、関節局所の骨破壊部には多数の破骨細胞が認められ

た。このように、MIP-1 α と CCR1 は炎症性骨破壊に重要な役割を果たしていることが示唆される。

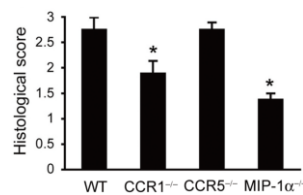


図 1. 抗原誘導関節炎におけるケモカインの役割
MIP-1 α , CCR1 および CCR5 遺伝子欠損マウスに関節炎を誘導し、重症度を測定した。

2) 破骨細胞分化におけるケモカインレセプター CCR1, CCR5 の役割を調べるため、RAW マクロファージ細胞株を RANKL で刺激したところ、CCR5 の mRNA 発現に有意な変化は認められなかったが、CCR1 の発現は有意に亢進することが観察された (図 2)。

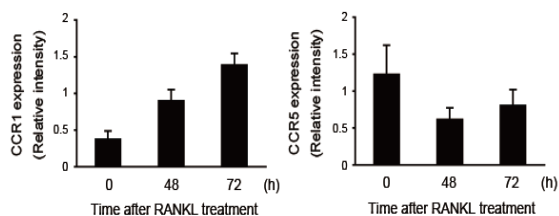


図 2. RAW264.7 マクロファージにおけるケモカイン遺伝子発現

RAW 細胞を RANKL で刺激後、ケモカインレセプター CCR1 と CCR5 の遺伝子発現変化を real-time PCR 法により検討した。

さらに、MIP-1 α の破骨細胞分化に与える影響を調べるため、*in vitro* 破骨細胞誘導系にリコンビナント MIP-1 α を添加したところ、濃度依存的に破骨細胞分化が亢進することを見出した。一方、抗 MIP-1 α 中和抗体の添加は顕著な破骨細胞分化の阻害効果を示した (図 3)。

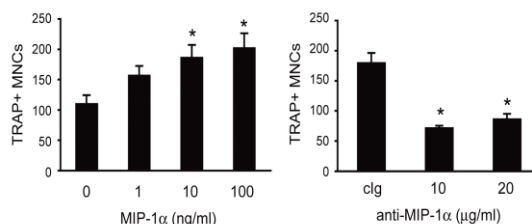


図 3. 破骨細胞分化に与える MIP-1 α の影響

リコンビナント MIP-1 α もしくは anti-MIP-1 α 抗体の存在下、骨髄細胞を RANKL/M-CSF で培養し、破骨細胞を誘導した。TRAP 染色を行い、TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞として計測した。

3) MIP-1 α , CCR1, CCR5 の破骨細胞分化における生理的役割を明らかにするため、これら遺伝子欠損マウスの *in vitro* における破骨

細胞分化能を検討した。CCR5 遺伝子欠損マウスの骨髄細胞より誘導される破骨細胞分化能は野生型マウスと比べて有意な差は見い出されなかった。しかし、MIP-1 α およびCCR1 遺伝子欠損マウスの破骨細胞分化能は有意に減少していた (図4)。さらに、MIP-1 α 添加により観察される破骨細胞分化の亢進はCCR1 欠損マウスでは認められなかった (図5)。

これらの結果より、MIP-1 α -CCR1 を介するシグナルは破骨細胞分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

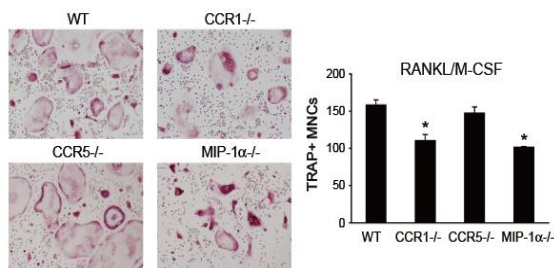


図4. MIP-1 α , CCR1 および CCR5 遺伝子欠損マウスの in vitro 破骨細胞誘導能

MIP-1 α , CCR1 および CCR5 遺伝子欠損マウスより単離した骨髄細胞を RANKL/M-CSF で培養し、破骨細胞を誘導した。TRAP 染色を行い、TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞として計測した。

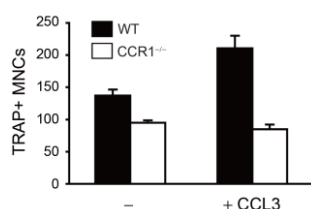


図5. CCR1 遺伝子欠損マウスの破骨細胞分化に与える MIP-1 α の影響

リコンビナント MIP-1 α の存在下、野生型および CCR1 遺伝子欠損マウスより単離した骨髄細胞を RANKL/M-CSF で培養し、破骨細胞を誘導した。TRAP 染色を行い、TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞として計測した。

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 3 件)

1. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T: Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J. Clin. Invest.* 122, 711-21, (2012) 査読有り
2. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N,

Kondo T: Absence of IFN-g accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 2911-20 (2011) 査読有り

3. Inui M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T: Protective roles of CX3CR1-mediated signals in toxin A-induced enteritis through the induction of heme oxygenase-1 expression. *J. Immunol.* 186, 423-31 (2011) 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. Natsuko Shinozaki, Masanori Inui, Shota Endo, Yuzuru Sakamoto, Kohji Kitaguchi, Kimiko Kuroki, Katsumi Maenaka, Toshiyuki Takai: Differential but competitive binding of Nogo and MHC class I to PIR-B regulates LPS-activated mast cells. 日本免疫学会学術集会, 千葉, 2011 年 11 月 29 日
2. 乾 匡範, 篠崎夏子, 遠藤章太, 高井俊行: Nogo および MHC class I による PIR-B を介した新たなマスト細胞の制御機構. 日本アレルギー学会秋期学術大会, 東京, 2011 年 11 月 11 日
3. 篠崎夏子, 乾 匡範, 遠藤章太, 坂本 譲, 北口公司, 高井俊行: Nogo および MHC クラス I による PIR-B への競合的結合によるマスト細胞の制御について. 日本アレルギー学会秋期学術大会, 東京, 2011 年 11 月 11 日
4. 近藤俊和, 石田裕子, 乾 匡範, 木村章彦, 野坂みずほ, 國中由美, 向田直史: Essential roles of CCL3-CCR1 axis in the pathogenesis of antigen-induced arthritis. 日本炎症・再生医学会, 京都, 2011 年 6 月 3 日
5. 乾 匡範: 関節強直症自然発症モデルマウスにおける発症機序の解明. 日本リウマチ学会 北海道・東北支部学術集会, 札幌, 2010 年 9 月 19 日
6. Masanori Inui, Yuko Ishida, Akihiko Kimura, Naofumi Mukaida, Toshikazu Kondo. Essential roles of CCL3-CCR1 signal pathways in the pathogenesis of antigen-induced arthritis. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 2010 年 8 月 24 日

[図書] (計 2 件)

1. 北口公司, 遠藤章太, 乾 匡範, 高井俊行: 骨髄球系細胞における MDL-1/DAP12 の機能. リウマチ科, 科学評論社, 45, 531-535, (2011)

2. 中村 晃, 乾 匡範, 高井俊行: 炎症と
DAP12/DAP10/FcR γ . 感染・炎症・免疫,
医薬の門社, 40, 120-129, (2010)

[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://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/expimu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 匡範 (INUI MASANORI)
東北大学・加齢医学研究所・講師
研究者番号: 80443985

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: