

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790945

研究課題名（和文）ケモカイン CCL19 と CCL21 を標的とした関節リウマチ抑制治療の挑戦

研究課題名（英文）Molecular analysis of pathogenesis on rheumatoid arthritis caused by chemokines CCL19 and CCL21.

研究代表者

桑原 卓 (KUWABARA TAKU)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：40385563

研究成果の概要（和文）：コラーゲン誘導性関節炎（CIA）はヒト関節リウマチ（RA）のマウスモデルである。今回、ケモカイン CCL19 と CCL21 の制御する CIA 発症分子機構を解析した。これらのケモカインを突然変異で欠損する plt マウスは CIA を発症しにくいことが判明した。CIA への関与が示唆されている Th17 細胞に焦点をあてて解析したところ、これらのケモカインは樹状細胞に作用し IL-23 の産生を制御していることが判明した。CCL21 による IL-23 産生は PI3K/Akt 経路をへて転写因子 NF- κ B を介していることがわかった。以上は CIA 発症機構に新知見を加えるものである。

研究成果の概要（英文）：The roles for chemokines CCL19 and CCL21 in induction of collagen-induced arthritis (CIA) were investigated plt mutant mice, that lacking expression of CCL19 and CCL21. We found that these mutant mice failed to express inflammatory cytokines and showed resistant to the induction of CIA. Collagen-immunized plt mice decreased IL-23 production in dendritic cells and a concomitant defect in Th17 cells. CCL19- and CCL21-mediated activation of the PI3K/Akt pathway and NF- κ B is essential for IL-23 production in dendritic cells. These mechanisms would contribute to the development of strategies to control rheumatoid arthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：臨床免疫学

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は全身の関節滑膜における慢性炎症を主徴とする疾患で、いまだ原因不明である。サイトカインを標的にした抗

体制剤が臨床的寛解に高い成果を示すことや、実験動物モデルであるコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) で自己反応性 T 細胞の誘導が認められることから、病態に免疫系が深く関与すると考えられている。近年の研究から、

腫瘍壊死因子 (TNF α) やインターロイキン-17 (IL-17) 産生性のヘルパーT 細胞が関節骨破壊に重要な役割を負う可能性が浮かび上がっている。

当研究室は、ケモカイン CCL19 と CCL21 の突然変異マウス (plt マウス) を発見し、これらのケモカインの機能を解析するツールとして使用してきた。CCL19 と CCL21 はリンパ系ケモカインの一つで、T 細胞が血管外遊走し二次リンパ組織へホーミングする過程を調節することを明らかにした。さらに、傍皮質で発現し、T 細胞と樹状細胞をよびよせるといった二次リンパ組織内での機能も報告してきた。加えて最近の研究で、このケモカイン欠損マウスは、免疫原のタンパク質抗原に応答するが、野生型マウスの場合とは異なるサイトカイン産生能を示すことがわかってきた。CD4 陽性 T 細胞による IL-17 などの産生低下も認められた。このことから、関節リウマチのマウスモデルであるコラーゲン誘導性関節炎 (collagen induced arthritis : CIA) を誘導したところ、野生型マウスに比べ plt マウスの症状は減弱していた。

2. 研究の目的

予備検討の結果から、ケモカインの欠損が CIA 発症に重要な役割を担う可能性が示唆された。ここでの目的は CIA 発症に至るどの段階に CCL19 と CCL21 が関与するかを明らかにすることである。特に病原性に重要とされる IL-17 や TNF α を産生する細胞とケモカインの関与についてフォーカスをあてる。これによって難治性の RA の治療法開発に、新たな視点の導入を目指す。

3. 研究の方法

CCL19 と CCL21 を欠損する plt マウスを C57BL/6 にバッククロスしたものを使用する。これらのケモカインに共通する受容体 CCR7 のノックアウトマウスを Martin Lipp 博士より譲渡いただいた。

フロイント完全アジュバントと混和したコラーゲンをマウス後背部に免疫した。21 日後、尾基部に再度免疫し CIA を誘導した。四肢の変化をもとに症状スコアをつけるとともに、一部のマウスの脚関節の組織像を観察した。

コラーゲンに対する応答を調べるため、免疫してから経時的に、所属リンパ節細胞の Recall Response、細胞集団、および産生サイトカイン等について解析した。

4. 研究成果

(1) CCL19-, CCL21-CCR7 系は CIA 発症に必須である。

野生型 C57BL/6 にコラーゲンを免疫すると 28 日後過ぎから四肢の腫れが認められ、35 日後までに全てのマウスで発症した。関節組織を観察すると、パンス形成が認められた。一方、誘導後 70 日後まで観察を続けたが、plt マウスや CCR7 ノックアウトマウスでは、症状を認めることはなかった。コラーゲンの免疫部位や回数などの誘導条件を検討したが、plt マウスでの発症は認められなかった。

コラーゲンに対する免疫応答の成立から発症までの過程のいずれかの段階に、CCL19 と CCL21 がその病原性に必須の役割を担っていることが示唆された。最初の段階である所属リンパ節細胞のコラーゲンに対する応答性を調べたところ、野生型マウスと同程度の増殖能を plt マウスも示した。以上のことからケモカイン欠損マウスは細胞遊走に障害はあるが、免疫後の所属リンパ節では、コラーゲンを異物として認識して免疫応答を示すらしいことが判明した。

(2) CCL19 と CCL21 は炎症性サイトカインの産生に関与している。

CIA の免疫学的病原性の一つにヘルパーT 細胞の制御不全が知られている。コラーゲン免疫後のリンパ組織におけるサイトカイン産生能を調べたところ、野生型マウスで多く検出できたインターフェロングamma、TNF α 、IL-17 等の炎症性サイトカインが、plt マウスで産生低下していることがわかった。Th2 サイトカインとして知られている IL-4 の産生レベルは有意差を示さなかった。免疫調節性の機能に関与するとされる IL-10 や形質転換増殖因子 (TGF β) の発現も両マウス間で差を認めることはなかった。

関節を破壊する破骨細胞の誘導に IL-17 の関与が報告されている。IL-17 の産生を特徴とするヘルパーT 細胞である Th17 細胞に着目した。plt マウスで産生低下が認められた IL-17 であるが、CD4 陽性 T 細胞を CCL21 で刺激しても発現の増大することはなかった。plt マウスでのケモカイン欠損が直接に Th17 細胞の減少につながるわけではないと考えられる。そこで、Th17 細胞の誘導を制御するサイトカインに着目

した。所属リンパ節細胞を CCL19 や CCL21 で刺激したところ、TGF β や IL-6 の産生は変化しないが、IL-23 の発現レベルの回復が認められた。この現象が所属リンパ節中のどの細胞に依るものかを調べたところ、これらのケモカインは樹状細胞を刺激して IL-23 のサブユニットである p19 の発現を誘導していることが明らかとなった。これは CCR7 ノックアウトマウス由来の樹状細胞では再現できないことから、CCL19-、CCL21-CCR7 の系が樹状細胞における IL-23 p19 発現に必須である事を物語る。この p19 サブユニットが IL-23 産生の律速になっているらしいことも示唆する結果である。

- (3) CCR7 の下流では PI3K 経路と NF- κ B が活性化し、IL-23 p19 発現を誘導する。

ケモカインを受容した CCR7 の下流で具体的にどのような経路をたどって IL-23 産生に至るかについて検討した。所属リンパ節から CD11c をマーカーにして調製した樹状細胞を CCL21 で刺激した後、細胞内のリン酸化状態をイムノブロット法で解析した。Erk をはじめとする MAP キナーゼやプロテインキナーゼ C など複数のキナーゼの活性化が認められた。阻害剤を用い、抑制が IL-23 産生に負の影響を示すキナーゼを探索したところ、PI3 キナーゼ (wortmannin、および LY294002) の阻害が IL-23 産生の顕著な低下を示した。RNAi により PI3 キナーゼの触媒サブユニットをノックダウンしたところ、IL-23p19 の mRNA レベルの低下と IL-23 産生の抑制が認められた。

一方、プロテアソーム阻害剤 (MG-132) でも樹状細胞からの IL-23 産生が低下した。このことから転写因子 NF- κ B の関与が示唆された。そこで、この転写因子の阻害タンパク質である I κ B のプロテオリシスについて調べたところ、CCL21 や CCL19 の刺激に依存して分解されることがわかった。I κ B はその分解に先立ちリン酸化される。BAY11-7085 はこのリン酸化を抑制するが、阻害条件下での CCL21 刺激では IL-23 産生と IL-23p19 の mRNA 転写はそれぞれ強く抑制された。脾臓由来や骨髄細胞から誘導した樹状細胞を使用した場合でも、ここで示したような PI3 キナーゼや NF- κ B の阻害条件における IL-23 産生のブロックが再現された。

以上のことから、樹状細胞の CCL19 や CCL21 による IL-23 産生は PI3 キナーゼや NF- κ B の経路をたどると考えら

れる。

- (4) CCR7 リガンドで刺激した樹状細胞は Th17 細胞を誘導する。

CIA 誘導時に観察された IL-23 産生低下とそれに続く Th17 細胞誘導不全を疾患抵抗性の原因とするならば、ケモカインによって IL-23 産生を復帰させれば Th17 細胞の誘導が認められるはずである。こうした作業仮説に基づき、次のような解析を行った。plt マウスから脾臓樹状細胞を調製し、この樹状細胞に抗原として卵白アルブミン (OVA) を取り込ませた。このとき CCL21 で刺激する群も同時に行った。24 時間後、これらの樹状細胞と OVA 特異的 CD4T 細胞を 72 時間共培養した。フローサイトメトリーを使用し、サイトカイン産生 CD4 陽性 T 細胞の誘導レベルと解析した。OVA の抗原提示により抗原特異的 CD4T 細胞は増殖するが、ケモカイン非存在下では IL-17 産生の誘導は認められなかった。このとき IL-10 産生細胞は検出できた。一方、CCL21 存在下の場合、有意な IL-17 産生細胞が誘導された。Th17 細胞は IL-21 のオートクリンにより分化状態を維持するとともに、抗原特異性によっては高い自己病原性を獲得する。IL-17 産生細胞の 7 割以上が IL-21 も産生するダブルプロデューサーであることが判った。これは IL-23 中和抗体存在下で消失した。これらの結果は、CCL21 で刺激された樹状細胞は Th17 細胞の誘導効果が高まり、さらにこの場合の Th17 細胞は高病原性と成り得ることを示唆する。

今回の検討で、CCL19 と CCL21 を欠損する plt マウスでは炎症性サイトカインに起因する免疫疾患 CIA の発症が抑制されることを示した。plt マウスでは CIA の病原性の一つである骨破壊に関与する Th17 細胞の誘導不全が認められた。病原性細胞の誘導機構に関与するならば、治療標的に成り得ると期待し、これらのケモカインがどのようにして Th17 細胞を誘導するかについて解析した。CCL19 と CCL21 が CCR7 を介して樹状細胞を刺激し、PI3 キナーゼや NF- κ B を経て IL-23 産生を誘導していることを明らかにした。また、CCR7 リガンドで刺激された樹状細胞は IL-17 産生性の CD4 陽性 T 細胞の分化を支持することも併せて示した。さらに IL-21 の産生が同時に検出されたことから、この条件で誘導された Th17 細胞は高い病原性を示す可能性がある。今回の検討で

は十分な治療的検討ができなかったが、ここでの結果がCIAやRAの新しい側面を提供し、これまでになかった治療戦略を計画する新知見となることを期待する。

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 3 件)

- (1) Taku Kuwabara, Yuriko Tanaka, Fumio Ishikawa, Motonari Kondo, Hideki Sekiya, and Terutaka Kakiuchi., CCR7 ligands up-regulate IL-23 through PI3-kinase and NF- κ B pathway in dendritic cells. *J. Leuko., Biol.*, 査読あり, 2012, 92:309-318.
DOI:10.1189/jlib.0811415
- (2) Kazuko Fujita, Yoshikiyo Akasaka, Taku Kuwabara, Bing Wang, Kaoru Tanaka, Itaru Kamata, Tomoko Yokoo, Toshio Kinoshita, Ami Iuchi, Yuri Akishima-Fukasawa, Yukio Ishikawa, Motonari Kondo, and Toshiharu Ishii, Pathogenesis of lupus-like nephritis through autoimmune antibody produced by CD180-negative B lymphocytes in NZBWF1 mouse. *Immunology Letters*, 査読あり, 2012, 144:1-6.
DOI:10.1016/j.imlet.2012.02.012
- (3) Kentaro Aritomi, Taku Kuwabara, Yuriko Tanaka, Hideki Nakano, Takuwa Yasuda, Fumio Ishikawa, Hisashi Kurosawa, and Terutaka Kakiuchi, Altered antibody production and helper T cell function in mice lacking chemokines CCL19 and CCL21-ser. *Microbiology and Immunology*, 査読あり, 2010, 54:691-701
DOI:10.1111/j.1348-0421.2010.00266.x

[学会発表] (計 10 件)

- (1) Taku Kuwabara, and Motonari Kondo, Acetylation modulates interleukin-2 receptor signaling. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月12日, 福岡国際会議場・福岡マリンメッセ
- (2) Kazuko Fujita, Taku Kuwabara, Bing Wang, Kaoru Tanaka, Yoshikiyo Akasaka, and Toshiharu Ishii, Analysis in expression of CD180 molecules on spleen cells after radiation-induced apoptosis in vivo. 第41回日本免疫学

会学術集会 2012年12月6日、神戸国際会議場

- (3) Yuriko Tanaka, Xianghua Guo, Taku Kuwabara, Takanori Mukozu, Fumio Ishikawa, and Motonari Kondo, SATB1 is necessary for establishment of immune tolerance. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5日、神戸国際会議場
- (4) Akiko Takashima, Fumio Ishikawa, Taku Kuwabara, Toshihiko Kinoshita, Terutaka Kakiuchi, and Motonari Kondo, 妊娠マウスにおける子宮NK細胞の変化について, 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月29日、幕張メッセ
- (5) 桑原卓、石川文雄、田中ゆり子、岡田弥生、近藤元就、垣内史堂 ケモカイン CCL19 と CCL21 は樹状細胞からの IL-23 産生とそれに続く Th17 細胞分化を調節する。第22回日本生体防御学会学術集会 2011年7月1日 那覇文化テンプス
- (6) 田中ゆり子、桑原卓、石川文雄、岡田弥生、近藤元就、垣内史堂 CCL19、CCL21-ser 欠損マウス (plt マウス) では soluble 抗原に対する免疫応答が誘導される。第22回日本生体防御学会学術集会 2011年6月30日 那覇文化テンプス
- (7) Taku Kuwabara, Fumio Ishikawa, Yuriko Tanaka, and Terutaka Kakiuchi, CCR7 ligands up-regulate IL-23 through PI3kinase and NF- κ B pathways in dendritic cells. 14th International congress of Immunology, 2010年8月24日 神戸国際会議場
- (8) Yuriko Tanaka, Taku Kuwabara, Fumio Ishikawa, and Terutaka Kakiuchi, Soluble protein antigen efficiently elicits T cell response without any adjuvant in mutant mice lacking expression of CCL19 and CCL21 (plt mice). 14th International congress of Immunology, 2010年8月24日 神戸国際会議場
- (9) Akiko Takashima, Fumio Ishikawa, Taku Kuwabara, Yuriko Tanaka, Toshihiko Kinoshita, and Terutaka Kakiuchi, Disappearance of natural killer cells in mouse uterus during early pregnancy. 14th International congress of Immunology, 2010年8月23日 神戸国際会議場

- (10) Kazuko Fujita, Wang Bing, Taku Kuwabara, Kaoru Tanaka, Itaru Kamata, Yoshikiyo Akasaka, and Toshihiro Ishii, Effects of X-ray irradiation on CD180-negative B cells in SLE-model NZBWF1 mice. 14th International congress of Immunology, 2010年8月23日 神戸国際会議場

[図書] (計 1 件)

- (1) Taku Kuwabara, Yuriko Tanaka, Fumio Ishikawa, Hideki Nakano, and Terutaka Kakicuhi. InTech, The role of CCR7-ligan in developing experimental autoimmune encephalomyelitis. 2011, 65-80
DOI:10.5772/31773

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 卓 (KUWABARA TAKU)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：40385563

(2) 研究分担者

な し

(3) 連携研究者

な し