

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月 31日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791110

研究課題名（和文）CCR9を介する関節リウマチ病態形成の分子機構の解明とその阻害による新規治療開発

研究課題名（英文）Abrogation of CCR9 ameliorates murine collagen-induced arthritis

研究代表者

渡部 香織（WATANABE KAORI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座助教

研究者番号：30581582

研究成果の概要（和文）：関節リウマチにおける、CCL25/CCR9 相互作用の病態への関与について検討した。関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞様滑膜細胞や健常人末梢血単球を CCL25 で刺激したところ、サイトカイン等の炎症性メディエーター産生亢進がみられた。また、CCL25 による破骨細胞分化促進作用も認めた。コラーゲン誘導関節炎マウスに CCR9 阻害剤を投与したところ、関節炎が抑制され、CD11b 陽性脾細胞の滑膜組織への遊走も阻害した。

研究成果の概要（英文）： Stimulation with CCL25 enhanced production of inflammatory mediators from synoviocytes or monocytes and also enhanced osteoclastogenesis. Blocking of CCR9 inhibited murine collagen-induced arthritis. CCR9 antagonist reduced migration of macrophages into the synovial tissue of the mice with arthritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	3, 200, 000	960, 000	4, 160, 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：CCR9、CCL25、ケモカイン、関節炎

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ（RA）は、多関節の滑膜の炎症を特徴とし、不可逆的な関節破壊をもたらす原因不明の慢性炎症性疾患である。近年、TNF 阻害剤などの生物学的製剤の使用により、多くの症例において優れた臨床効果と予後改善が認められるようになったが、未だに諸治療に抵抗性を示す症例も多く、長年にわたる関節破壊がもたらす重篤な身体機能の低下は大きな社会問題となっている。また、抗体製剤は高価であることから、患者個人や国家の医療保険財政に対する負担も大きく、低分子化合物による安価で有効な治療法の開発が期待されている。

CCL25 は、1997 年に同定されたケモカインであり、樹状細胞や血管内皮細胞より産生さ

れ、その受容体 CCR9 を介してリンパ球や単球/マクロファージに対する走化因子として働く。特に、小腸粘膜免疫組織における CCL25/CCR9 の機能は広く研究されており、エフェクターメモリーT 細胞や、IgA 陽性形質細胞の粘膜固有層への遊走作用を介して粘膜免疫の維持やクローン病などの炎症性腸疾患の病態形成に関与することが報告されている。

RA の炎症滑膜組織において、T 細胞、B 細胞、マクロファージの著明な浸潤を認め、炎症性サイトカイン産生、抗体産生などにより滑膜の持続炎症に寄与していると考えられる。また、RA 滑膜組織において、CCR9 陽性マクロファージの存在が報告されており、CCL25/CCR9 相互作用は、単球/マクロファ-

ジの RA 滑膜組織への遊走にも関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、CCL25/CCR9 相互作用の RA 病態形成への関与を明らかにし、その阻害による新規治療開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 滑膜組織における免疫染色

RA および変形性膝関節症(OA)滑膜組織の凍結切片を -20°C アセトンにて10分間固定し、1.5% H_2O_2 で15分インキュベートした後、TBS (2% goat serum, 1% BSA, 0.1% triton X-100, 0.05% tween-20)にて30分ブロッキングした。1次抗体として抗 CCR9 抗体、抗 CCL25 抗体 (R&D Systems)を使用し、1時間室温で反応後、2次抗体に Alexa 546 標識抗マウス IgG2a または IgG2b 抗体を用いた。DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)にて核染色を行った。

免疫二重染色を行うため、抗 CD68 抗体 (Dako)、抗 vimentin 抗体 (Acris Antibodies)、抗 lysosome-associated membrane glycoprotein (DC-Lamp) 抗体、(Immunotech)、抗 CD4 抗体 (eBioscience)、抗 CD8 抗体 (eBioscience)を用い、その後 Alexa 488 標識抗マウス IgG1 抗体 (Invitrogen)を反応させた。

(2) RA 滑膜線維芽細胞様滑膜細胞に対する CCL25 による刺激作用

RA 滑膜線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) を RA 滑膜組織より樹立した。FLS 細胞表面の CCR9 の発現を解析するため、phycoerythrin 標識抗 CCR9 抗体 (R&D Systems)を用いてフローサイトメトリーを行った。

RA FLS を CCL25 共存下 (0, 5, 50, 500 ng/ml)で48時間培養し、培養上清中の IL-6、matrix metalloproteinase (MMP)-3 濃度を ELISA kits (R&D Systems)を用いて解析した。また、CCR9 阻害剤 (CCX8037: chemocentryx 社より供与) による刺激抑制効果についても解析を行った。

(3) 健康人末梢血単球に対する CCL25 刺激作用

健康人末梢血より CD14 陽性単球を MACS ベーズ (Miltenyi Biotec)を用いて単離した。細胞表面の CCR9 の発現は、ヒト IgG にて Fc ブロックを行った後、phycoerythrin 標識抗 CCR9 抗体 (R&D Systems)を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

CD14 陽性単球を CCL25 共存下 (0, 5, 50, 500 ng/ml)で 48 時間培養し、培養上清中の IL-6、TNF- α 濃度を ELISA kits (R&D Systems)を用いて測定した。また、CCX8037 付加によ

る刺激抑制効果についても解析を行った。

(4) CCL25 による破骨細胞分化への影響

健康人末梢血単球を、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) (Peprotech) と macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) (R&D systems) 刺激下で、CCL25 (0, 5, 50, 500 ng/ml)とともに7日間培養を行った。tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色キット (Primary Cell)を用いて、TRAP 染色陽性多核 (3核以上)細胞数を計測した。また、カルシウムコートしたプレート (BD Bioscience)上においても同様の培養を行い、Image J software (National Institutes of Health)を用いてカルシウム溶解面積を解析した。

(5) コラーゲン誘導関節炎マウス (CIA) における CCR9 阻害剤の関節炎抑制効果

DBA1/J マウスに、ウシ II 型コラーゲンをアジュバントともにて2回免疫した (day-14, day 0)に免疫を行った。CCR9 阻害剤 (CCX8037) を day -7 より1日2回皮下注射し、day 14 まで関節炎スコア、足部の厚みを記録した。また、day 14 に足関節の X 線撮影、および足関節のヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

次に、CCR9 阻害剤 (CCX8037) を関節炎発症後の day 5 より1日2回皮下注射し、day 14 まで関節炎スコア、足部の厚みを記録した。また、day 14 に解剖を行い、足関節の X 線撮影、および足関節のヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

(6) CCR9 阻害剤による CD11b 陽性細胞の遊走阻害効果

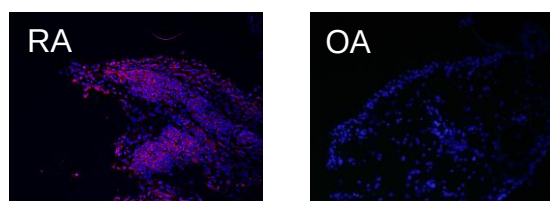
Day 9 の CIA マウス脾細胞より CD11b 陽性細胞を単離し、Cell Tracker Orange 5-(and 6)-((4-chloromethyl)benzoyl) amino) tetramethylrhodamine (CMTMR) (Molecular Probes)をラベルした。Day 9 にレシピエント CIA マウスにラベルした細胞を移入した。移入24時間前、12時間前、30分前、12時間後にそれぞれ CCX8037、vehicle を皮下注射し、移入24時間後に、足関節の非脱灰組織よりプレパラート作成を行い、蛍光顕微鏡 (KeyenceBiozero)を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 滑膜組織における CCR9, CCL25 発現

RA 滑膜組織では、CCR9 の発現が認められたが、OA 滑膜組織では CCR9 の発現はほとんどみられなかった (図1)。

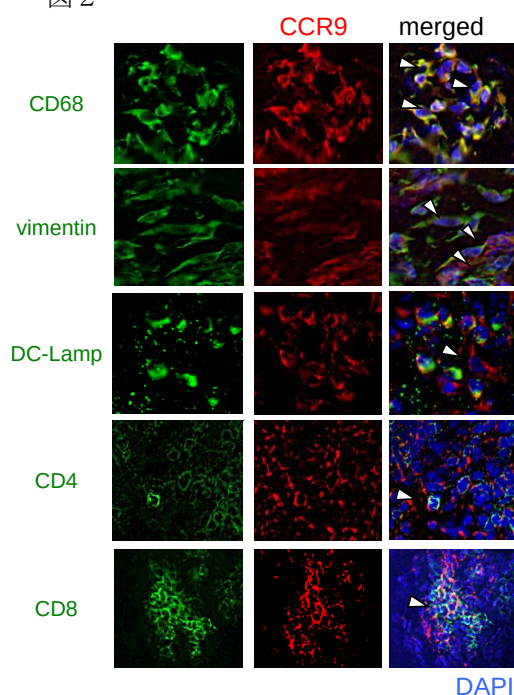
図 1



CCR9 (赤)、DAPI (青)

RA 滑膜組織を CCR9 で染色後、細胞種特異抗体で二重染色した。CD68 陽性マクロファージ、vimentin 陽性 FLS、DC-Lamp 陽性樹状細胞、一部の CD4 や CD8 陽性 T 細胞に CCR9 の発現を認めた (図 2)。

図 2



また、CCL25 も RA 滑膜組織で発現を認め、OA 滑膜では CCL25 発現は軽微であった。また、二重染色により、CCL25 は RA 滑膜 CD68 陽性マクロファージより発現を認めた。

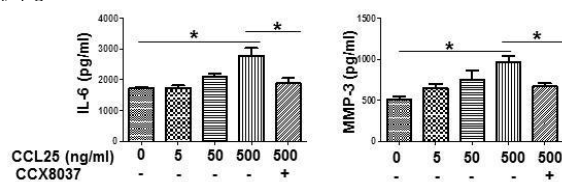
RA 滑膜組織では、CCL25、CCR9 の発現が亢進していると考えられた。

(2) RA FLS に対する CCL25 による刺激作用

RA 滑膜組織より樹立した培養 FLS は、フローサイトメーターの解析により、細胞表面の CCR9 発現を認めた。

RA FLS を CCL25 にて刺激したところ、CCL25 濃度依存性に培養上清中の IL-6、MMP-3 濃度の上昇が認められた。また、CCR9 阻害剤である CCX8037 の添加により、CCL25 刺激による効果が抑制された (図 3)。

図 3

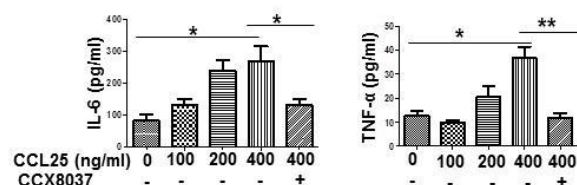


CCL25 は RA FLS の活性化作用を有し、RA 滑膜組織において炎症性メディエーターの産生を亢進させていることが示唆された。

(3) 健康人末梢血単球に対する CCL25 刺激作用

健康人末梢血より単離し CD14 陽性単球の細胞表面にも CCR9 の発現がみられた。In vitro で、CCL25 にて刺激したところ、CCL25 濃度依存性に培養上清中の IL-6、TNF- α の濃度の上昇が認められた。また、CCX8037 付加により、刺激の抑制がみられた (図 4)。

図 4



4) CCL25 による破骨細胞分化への影響

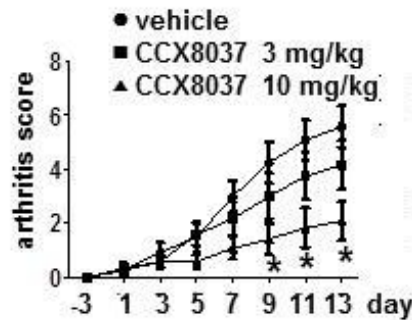
健康人末梢血 CD14 陽性単球を、RANKL + M-CSF で培養することにより、TRAP 陽性の多核細胞 (破骨細胞) が誘導されるが、そこに CCL25 を共培養したところ、CCL25 濃度依存性に TRAP 染色陽性多核細胞数が増加した。また、カルシウム溶解面積の拡大もみられた。

CCL25 は単球/マクロファージ活性化作用も有し、炎症性サイトカイン産生、破骨細胞の分化誘導促進作用も認める。CCL25/CCR9 相互作用が、FLS、単球/マクロファージの活性化により RA の病態形成に関与していると考えられた。

(5) CIA マウスにおける CCR9 阻害剤の関節炎抑制効果

CIA マウスに CCR9 阻害剤 (CCX8037) を関節炎発症前 (day -7) より投与したところ、関節炎スコアの有意な抑制効果がみられた (図 5)。また、CCR9 阻害剤の投与により、関節炎の発症率、足部の厚みも低下した。さらに、足関節 X 線では骨破壊の抑制を認め、足関節 HE 染色組織では炎症細胞浸潤の抑制効果を認めた。

図 5

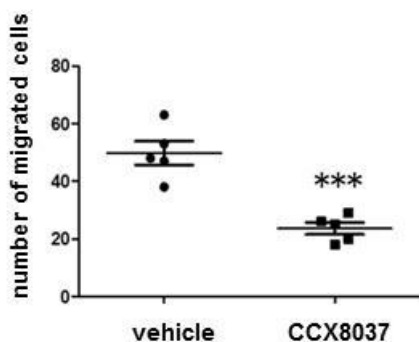


次に、CIA マウスに CCX8037 を関節炎発症後 (day 5) より投与開始したところ、関節炎スコア、関節炎発症率、足部の厚みはいずれも有意に低下した。また、足関節の X 線、HE 染色による評価で、骨破壊、炎症細胞浸潤の有意な抑制がみられた。

(6) CCR9 阻害剤による CD11b 陽性細胞の滑膜組織への遊走阻害

レシピエント CIA マウスに、CMTMR 標識した CD11b 陽性脾細胞を移入し、24 時間後に足関節に遊走した標識された細胞数を計測した。遊走した細胞数は、CCR9 阻害剤の投与により有意に減少した (図 6)。CCR9 は滑膜へのマクロファージの遊走にも関与していると考えられた。

図 6



以上の結果より、CCL25、CCR9 は RA 滑膜組織に発現し、CCL25 は滑膜細胞からの炎症性メディエーター産生、破骨細胞分化、炎症細胞浸潤に関与していると考えられる。CCL25/CCR9 相互作用の阻害は、関節炎抑制効果を認め、RA の新規治療標的となることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)
 〔図書〕 (計 0 件)
 〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 香織 (WATANABE KAORI)
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
 科・寄附講座助教
 研究者番号：30581582

()

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：