

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 5 月 30 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011 年度～2012 年度
 課題番号：23791113
 研究課題名（和文）
 関節リウマチおよびその動物モデルにおける GM-CSF 産生 CD4T 細胞の役割
 研究課題名（英文）
 Role of GM-CSF secreting CD4 T cells in rheumatoid arthritis and its animal model
 研究代表者 橋本 求 (HASHIMOTO MOTOMU)
 京都大学 医学研究科 助教
 研究者番号：60512845

研究成果の概要（和文）：

関節リウマチの病態において、GM-CSF を産生する CD4T 細胞の役割を明らかにするために、ヒトリンパ球および動物モデルを用いて実験を行った。末梢血ナイーブ CD4T 細胞を滑膜線維芽細胞と共培養する実験により、線維芽細胞表面上に発現し CD4T 細胞の GM-CSF 産生を誘導する分子を同定した。また、自然発症の関節炎モデルマウスにおいて、CD4T 細胞の産生する GM-CSF が、IL-6, IL-1, TNF α などの炎症性サイトカイン産生を亢進させる役割をはたしていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

To study the role of GM-CSF secreting CD4 T cells in rheumatoid arthritis, we conducted co-culture experiments of human lymphocytes and animal experiments. By co-culture experiments, we identified a molecule expressed on fibroblast-like synoviocyte (FLS) which drives the production of GM-CSF from naïve CD4 T cells. By animal experiments, we found that GM-CSF produced by CD4 T cells at the site of inflammation promoted inflammation by enhancing the production of IL-6, IL-1 and TNF from macrophages.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：関節リウマチ、CD4T 細胞、GM-CSF、fibroblast-like synoviocyte

1. 研究開始当初の背景

近年、主に動物モデルを用いた研究により、関節リウマチ (RA) などの自己免疫疾患の発症において CD4T 細胞の産生する IL-17 が重要な役割を果たす可能性が注目されてきた。しかし、ヒト RA の滑膜中に存在する CD4T 細胞の産生する IL-17 は 1~2% で、たとえば、CD4T 細胞のうち 10~40% が賛成する INF γ などと比べて極めてわずかであり、IL-17 以外の CD4T 細胞由来のサイトカインが役割を果たす可能性が考えられた。

我々は RA のモデルマウスである SKG マウスを用いて実験を行ってきたが、このマウスの CD4T 細胞においては、IL-17 のみならず GM-CSF 産生が亢進しており、GM-CSF が TNF α や IL-6, IL-1 などのマクロファージからの産生を亢進させる作用をもっていることを見出したため、RA およびその動物モデルにおける GM-CSF 産生 CD4T 細胞の役割を解明することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RA およびその動物モデルにおいて、CD4T 細胞からの GM-CSF 産生が、どのような分子メカニズムで誘導され、炎症病態においてどのような役割を果たすかを明らかにすることである。

上記研究目的を遂行するために、i) RA 患者や健常者のヒトリンパ球や RA 患者の培養滑膜細胞を用いた実験と、ii) 関節炎モデルマウスである SKG マウスを用いて、in vivo の関節炎モデルにおけるその役割を解明する実験を行った。

3. 研究の方法

i) RA 患者らの末梢血リンパ球や培養滑膜細胞を用いた実験

- a. RA 患者や健常者の末梢血や滑液細胞中の CD4T 細胞の産生するサイトカインを、FACS を用いた細胞内サイトカイン染色により評価した。
- b. 健常者の末梢血中の naïve CD4 T 細胞を、RA 患者の滑膜組織からとった培養滑膜細胞とともに共培養し、CD3 刺激や CD28 刺激などの T 細胞レセプターシグナルや補助刺激因子を加えて、健常者の naïve CD4T 細胞から GM-CSF が誘導されるようになるメカニズムを検討した。

ii) 関節炎モデルマウス SKG マウスを用いた動物実験

- a. In vivo における GM-CSF 産生 CD4T 細胞の役割を解明するために、SKG マウスの CD4T 細胞を、T 細胞を欠損する RAG2 ノックアウトマウスなどのレシピエントマウスに移入する実験において、ドナーおよびレシピエントの GM-CSF を欠損させて移入したときに、関節炎の発症率や重症度がどのように変化するか評価した。また、GM-CSF ノックアウト SKG マウスに、様々な自然免疫系を刺激する物質を投与して、関節炎やそのほかの病態の惹起が抑制されるか検討した。
- b. SKG マウスから取り出したマクロファージや CD4T 細胞に、様々な自然免疫系を刺激する物質を加えて、in vitro で GM-CSF の産生が誘導されるメカニズムを検討した。

4. 研究成果

i) RA 患者らの末梢血リンパ球や培養滑膜細胞を用いた実験

- a. 健常人と、RA 患者の末梢血中では、CD4T 細胞中の GM-CSF 産生分画の割合に明らかかな差は認めなかった。しかし、RA 患者の滑液中では、末梢血に比べて GM-CSF 産生分画の割合は増大しており、滑膜局所において、GM-CSF が RA の病態に寄与している可能性が考えられた。

- b. そこで、関節局所で CD4T 細胞の GM-CSF 産生が亢進するメカニズムを明らかにするために、健常人のナイーブ CD4T 細胞を RA 患者の滑膜細胞 (線維芽細胞; fibroblast like-synoviocyte: FLS) と共に培養し、抗 CD3/28 抗体などの TCR 刺激 + 補助刺激因子を加えると、CD4T 細胞が GM-CSF を著明に産生するようになることを見出した。そして、この産生誘導は、CD4T 細胞と FLS との細胞接触を transwell を使用して妨げると、産生がみられなくなることから、CD4T 細胞からの GM-CSF 産生誘導は、FLS の産生するサイトカインではなく、CD4T 細胞と FLS の細胞接触に依存していることがみいだされた。そこで、RA の FLS 細胞表面上に高発現している分子を、過去の論文からピックアップし、それらを網羅的に抗体で

ブロックすることで、transwell と同等の効果がみられるか検討した。その結果、RA の FLS に高発現している細胞表面上のある特定の分子をブロックすると、GM-CSF 産生が誘導されることを見出した。逆にこの分子を、プラスチックプレート上に固層化し、CD4T 細胞を刺激しても、GM-CSF 産生が誘導されることから、この分子は、特に CD4T 細胞からの GM-CSF 産生に役割を果たしていることを見出された。

ii) 関節炎モデルマウス SKG マウスを用いた動物実験

a. モデルマウスの関節炎惹起性 CD4T 細胞をレシピエントマウスに移入する実験において、ドナー CD4T 細胞およびレシピエントのどちらの GM-CSF 産生が欠損しても、関節炎重症度が低下したため、CD4T 細胞とそれ以外の細胞の産生する GM-CSF のどちらも関節炎の病態形成に重要であることを見出した。

b. In vitro でマウスのマクロファージに LPS や zymosan などの自然免疫系の活性化物質を加えるときに、recombinant GM-CSF を加えると、マクロファージからの IL-6, IL-1, TNF など炎症性サイトカインの産生が著明に亢進することを見出した。また、CD4T 細胞とマクロファージを共培養する際にも、CD4T 細胞がマクロファージからの刺激をうけて、GM-CSF を産生していることを FACS ににより確認した。

(考察)

以上をまとめると、GM-CSF 産生 CD4T 細胞は、関節リウマチ患者の滑膜局所で増大しており、CD4T 細胞からの GM-CSF 産生誘導は、RA 滑膜組織の FLS との細胞接触に強く依存することを見出された。また、CD4T 細胞の産生する GM-CSF は、マクロファージからの IL-6 や IL-1, TNF などの炎症性サイトカインの産生を亢進させることで、サイトカインによる vicious cycle を形成しており、関節リウマチの滑膜局所における炎症を遷延・悪化させる働きがあることが分かった。

近年、GM-CSF は RA において、TNFa や IL-6 につぐあらたな治療ターゲットとされ、治療が開始され、RA 治療に有意な効果があることが証明されつつある。本研究は、RA の病態における GM-CSF の重要性を改めて示すとともに、CD4T 細胞由来の GM-CSF の産生誘導とそ

の役割に焦点をしばってそのメカニズムの一端を解明した。特に、本研究においては、i) のヒト末梢血リンパ球や FLS を用いた実験において、CD4T 細胞と FLS との細胞接触が、CD4T 細胞からの GM-CSF 産生誘導に重要であることを示し、さらにそのかかわる分子を同定できたことは大きな進歩であり、今後、この分子の機能解析をすすめ、英文論文として報告したいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, Kawabata D, Fujii T, Iwakura Y, Mimori T. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. PLoS One. 2013; 6:8(5):e6223. 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0062231.
- ② Hashimoto M, Mimori T. Role of Th17 cells and innate immunity for the induction of autoimmune arthritis. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Zasshi 2012;35(6):463-9. 査読無
<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsci>
- ③ Sakaguchi S, Tanaka S, Tanaka A, Ito Y, Maeda S, Sakaguchi N, Hashimoto M. Thymus, innate immunity and autoimmune arthritis: interplay of gene and environment. FEBS Lett. 2011 Dec 1;585(23):3633-9. 査読無
doi:10.1016/j.febslet.2011.10.026.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 橋本求、関節リウマチの発症における自然免疫系の寄与、第 57 回日本リウマチ学会シンポジウム、2013 年 4 月 19 日、京都

[図書] (計 件) なし

[産業財産権] なし

○出願状況 (計 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 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 橋本求
（京都大学 医学研究科 助教）
研究者番号：60512845

(2) 研究分担者
（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者
（ ）

研究者番号：