

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461480

研究課題名(和文) 関節リウマチの病態に關与する骨髓細胞の解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The analysis of myeloid-derived suppressor cells related with the pathogenesis of rheumatoid arthritis and development of a new therapy

研究代表者

川人 豊 (KAWAHITO, YUTAKA)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50336731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脾臓中の骨髓由来抑制細胞(MDSCs)が、コラーゲン誘導関節炎モデルマウスで関節炎の発症とともに増加し、MDSCsがCD4+T細胞の増殖抑制やTh17細胞への分化抑制のほか、IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカイン産生抑制する事を明らかにした。さらに、MDSCsをCIAマウスに経静脈投与する事で、関節炎の抑制効果を示した。すなわち、CIAマウス関節炎で、MDSCsがCD4+ T細胞を介した炎症免疫反応を抑制する事を意味する。これらは、MDSCsの自己免疫性関節炎の病因への関与とMDSCsによる新たな関節リウマチ治療の可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells) accumulated in the spleens of mice with CIA (collagen induce arthritis) when arthritis severity peaked. These MDSCs inhibited the proliferation of CD4+ T cells and their differentiation into Th17 cells in vitro. Moreover, MDSCs inhibited IFN- γ , IL-2, TNF- α , and IL-6 by CD4+ T cells in vitro, which is antigen non-specific T cell response. Adoptive transfer of MDSCs reduced the severity of CIA in vivo. In conclusion, MDSCs in CIA suppress the progression of CIA by inhibiting the pro-inflammatory immune response of CD4+ T cells. These observations suggest that MDSCs play crucial roles in the regulation of autoimmune arthritis, which could be exploited in new cell-based therapies for human rheumatoid arthritis.

研究分野：膠原病・リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 骨髓由来抑制細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチの発症機序として、近年骨髄の病態への関与が示唆されている。多数の骨髄間葉系細胞が関節部のペアゾーンと呼ばれる部位にある小孔を通して関節腔内に侵入し増殖滑膜を形成すること、罹患関節部骨髄と関節の増殖滑膜の線維芽細胞様細胞（間質細胞）は、形体、表面抗原構造、産生サイトカインもほぼ同様であることが確かめられている。しかしながら、原因となる免疫異常をきたす骨髄細胞の同定は未解明で、治療につながる免疫抑制系の細胞も不明である。

MDSCs(Myeloid-derived suppressor cells)は、強力なT細胞機能障害誘導活性を持つ未成熟な骨髄性細胞の不均一な細胞集団で、悪性腫瘍の増殖に関与する細胞群で(Nat Rev Immunol. 2009;9:162-74)、近年注目を集めている。その表現抗原はCD11b+ Gr-1+として知られており、炎症性腸疾患や自己免疫性脳脊髄炎など自己免疫性疾患の動物モデルにおいてもMDSCsが増加することが報告されているが、過剰な免疫反応がその病態である自己免疫性疾患において免疫抑制機能を持つMDSCsが増加している意義については未だ明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、関節リウマチの病因に関与する骨髄細胞としてのMDSCsを同定し、関節リウマチの新たな治療法を検討していく事にある。その意義については明らかでない点が多い。本研究では、MDSCsが代表的な自己免疫性疾患である関節リウマチにおいてどのような役割を果たしているか、MDSCsの病因的意義を解明し、関節リウマチの新たな治療法となりえるかを検討する。また、関節炎発症前後におけるMDSCsを検討することで、骨髄細胞の関節炎の病因機序が明らかになり、リウマチ発症機序の解明につなげることが可能となる。

3. 研究の方法

(1) コラーゲン誘導性関節炎 (collagen induced arthritis : CIA) の作成

CIAは、DBA/1マウスにday0に初回免疫としてウシ型コラーゲンおよび完全フロイントアジュバントを、day21に追加免疫としてウシ型コラーゲンおよび不完全フロイントアジュバントを、尾部に皮下注射し関節炎を惹起させた。

(2) 骨髄由来抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells: MDSCs) の採取

CIAマウスの関節炎発症前、発症時、ピーク時における骨髄細胞からの細胞懸濁液をAnti-Gr1-Biotin抗体とAnti-Biotin MicroBeadsとともに培養し、細胞をMACS(magnetic cell sorting) Columnにかけることにより、磁気標識されたGr-1細胞をカラムに保持し、その後、ポジティブフラクションとして、CD11b⁺Gr-1⁺のMDSCsを溶出し、形態学的観察も行った。

(3) MDSCs の免疫作用の解析

CIAモデルマウスの脾臓細胞から分離したMDSCsを、正常マウス脾臓細胞から分離し抗CD3と抗CD28モノクローナル抗体により刺激したCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞と共培養し、T細胞の増殖抑制、T細胞由来の様々なサイトカイン産生に与える影響をELISA法を用いて検討した。また、CD4⁺T細胞にリコンビナントIL-6とTGF- β 1、IFN- γ 、IL-4、IL-12の中和抗体を添加培養した。Th17細胞誘導し、その後、MDSCsとの共培養し、培養上清中のIL17Aを測定し、TH17細胞の分化機能に及ぼす影響を観察した。また、関節リウマチの関節液は酸性であり、この酸性環境がMDSCsのCD4⁺T細胞の増殖抑制機能に影響があるかを、乳酸、塩酸を添加した培養系で観察した。

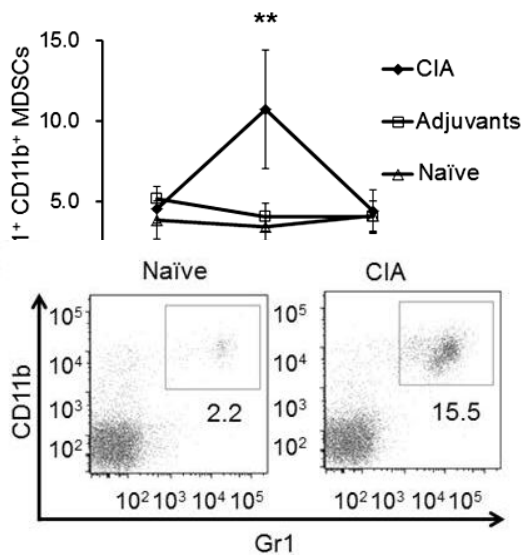
(4) MDSCs によるマウス CIA の抑制

CIA 関節炎モデルマウスに、脾臓細胞から分離した MDSCs を、免疫時 (day0) 関節炎発症後 (day21) に経静脈的に投与し、関節炎、骨破壊の抑制が可能か関節炎スコアや組織学的にも評価した。また、Gr-1 抗体投与すなわち Gr-1⁺細胞除去による、CIA 関節炎における影響も観察した。

4. 研究成果

(1) CIA マウスの脾臓由来 MDSCs

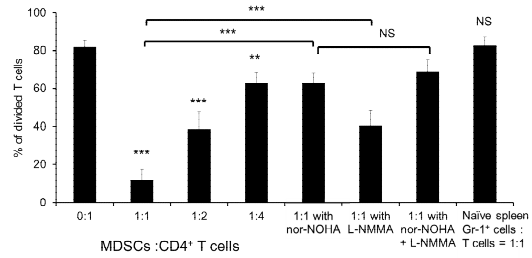
関節炎の活動性が最も高い day 35 で、脾臓由来の CD11b⁺Gr-1⁺ MDSCs が増殖していた。また、97%が CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} granulocytic MDSCs であった。



***p* < 0.01

(2) MDSCs の CD4⁺ T 細胞増殖抑制能

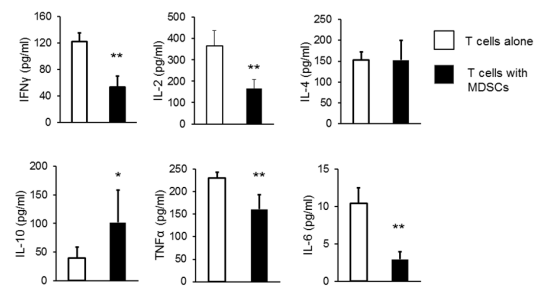
MDSCs: CD4⁺ T cell との混合培養で比を 1:1 から 1:4 まで比較したが、MDSCs の最も多い 1:1 で CD4⁺ T 細胞 CD4⁺ T 細胞抑制能が高く、この現象は、arginase inhibitor と iNOS inhibitor の添加で消失した。



p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001

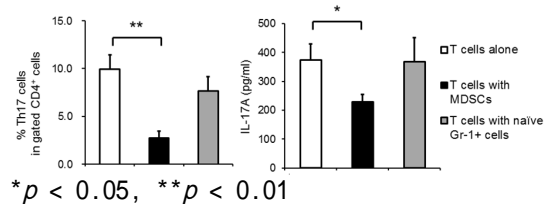
(3) MDSCs の CD4⁺ T 細胞由来サイトカインの制御能と Th17 分化抑制能

MDSCs は CD4⁺ T 細胞からの IFN γ , IL-2, TNF α , IL-6 のサイトカイン産生を抑制したが、IL-10 の産生を増強させた。



p* < 0.05, *p* < 0.01

また、MDSCs との共培養で CD4⁺ T 細胞からの Th17 分化抑制され、IL-17A の産生を抑制した。

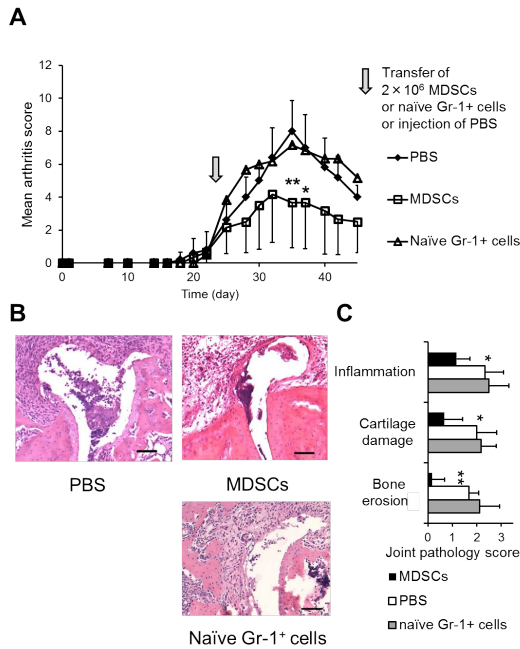


p* < 0.05, *p* < 0.01

(4) MDSCs の CIA 抑制効果 (in vitro)

CIA のコラーゲン初回免疫時 (day0) と 2 回目の免疫時時 (day21) に脾臓由来の MDSCs を静脈より移入することで、関節炎と骨軟骨破壊抑制を有意に抑制する事が判明した、また、所属リンパ節では、制御性 T 細胞に変化はなかったが、CD4⁺ T 細胞、CD4⁺ IFN γ ⁺ Th1 細胞、Th17 細胞数が減少した。MDSCs は in vivo での Th1 と Th17 細胞を減少させ、また

血清中の TNF- α 、IL-6 産生を抑制することで、CIA 関節炎抑制効果を示した。



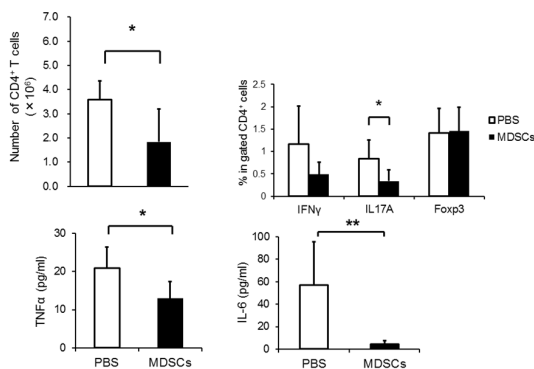
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

A: 関節炎スコア

B: 関節炎の HE 染色像

C: 病理学的炎症・骨・軟骨破壊指数の変化

MDSCs 静脈移入群での関節炎抑制効果がみられた。

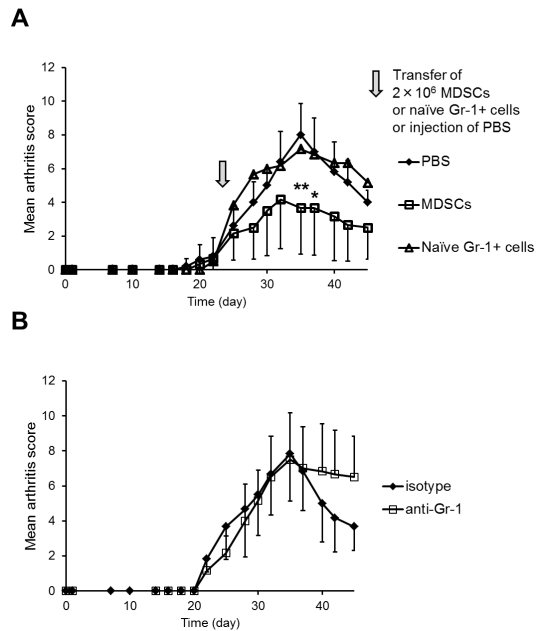


上段：関節炎所属リンパ節での CD4⁺T 細胞、CD4⁺IFN γ + Th1 細胞、Th17 細胞数は減少。

下段：CIA の血清の TNF α 、IL-6 の濃度。

MDSCs の CIA 抑制効果は、関節炎が発症した時期 (day25) に静脈移入した場合も、関節炎抑制効果があった。さらに関節炎ピーク時 (day35) より Gr-1 中和抗体を CIA マウスに投与し Gr-1⁺の MDSCs を除去することで、

コントロールに比較し関節炎が持続した。これらは、MDSCs が CIA の生体内で免疫抑制機能を持ち、関節炎を抑制すること、また、関節炎治療に応用可能である事を示している。



A: MDSCs の CIA 抑制効果

B: Gr-1 抗体の CIA への影響

また、MDSCs は pH 7.2 の酸性環境で CD4⁺ T cell の増殖抑制効果が阻害され、この効果は乳酸イオンには依存せず、水素イオン(H⁺)による事が判明し、さらに研究を進めている。

以上より、骨髄由来抑制細胞(Myeloid-derived suppressor cells: MDSCs)は、マウスのコラーゲン誘導性関節炎 (collagen induced arthritis: CIA) の脾臓中に関節炎の増強と共に増加し、CD4⁺ T cell の増殖、関節炎に関与するサイトカイン、Th17 細胞への分化を抑制している事が明らかになった。また、MDSCs の静脈への移入より関節炎が抑制でき、MDSCs が存在しないと関節炎の改善に遅延が生じる事を示した。このように、MDSCs は自己免疫性関節炎の免疫抑制系に重要な役割を持ち、また、関節炎治療への応用も期待できると結論付けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Fujii W, Ashihara E, Hirai H, Nagahara H, Kajitani N, Fujioka K, Murakami K, Seno T, Yamamoto A, Ishino H, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y. Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. J. Immunol. 191(3):1073-1081, 2013. 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

1. 藤井 渉, 芦原英司, 川人豊. 自己免疫性疾患における骨髄由来抑制細胞の機能解析シンポジウム; リウマチ・自己免疫疾患とサイトメトリー. 第24回日本サイトメトリー学会, 2014年6月29日, 関西医科大学(大阪府・枚方市).

2. Fujii W, Ashihara E, Hirai K, Fujioka K, Seno T, Ishino H, Kawahito Y. Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年12月12日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市).

3. 藤井 渉, 芦原英司, 平位秀世, 村上 憲, 妹尾高宏, 山本相造, 石野秀岳, 河野正孝, 前川 平, 川人 豊. コラーゲン誘導関節炎における Myeloid-derived suppressor cells は関節炎の制御に重要な役割を果たす. 第34回日本炎症・再生医学会. 2013年7月3日, 国立京都国際会館(京都府・京都市).

4. Fujii W, Ashihara E, Hirai H, Nagahara H, Fujioka K, Murakami K, Nakamura K, Seno T, Yamamoto A, Ishino H, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y. Myeloid-derived suppressor cells have regulatory roles in mouse collagen-induced arthritis. European League Against Rheumatism (EULAR)

Congress, 2013年6月13日, Madrid (Spain).

5. 藤井 渉, 永原秀剛, 藤岡数記, 村上 憲, 中村 薫, 妹尾高宏, 山本相造, 石野秀岳, 河野正孝, 小田 良, 徳永大作, 久保俊一, 川人 豊. 自己免疫性関節炎における Myeloid-derived suppressor cells は CD4⁺T 細胞の免疫反応を抑制し、関節炎を改善させる. 第57回日本リウマチ学会総会・学術総会, 2013年4月18日, 国立京都国際会館(京都府・京都市).

〔図書〕(計1件)

1. Fujii W, Ashihara E, Kawahito Y. Myeloid-derived suppressor cells in autoimmune diseases. Inflammation and Regeneration 34(3): 124-128, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者 川人 豊

(KAWAHITO YUTAKA)

京都府立医科大学・医学研究科 准教授
研究者番号: 50336731

(2) 研究分担者 河野 正孝

(KOHNO MASATAKA)

京都府立医科大学・医学研究科 講師
研究者番号: 60405256

(3) 研究分担者 芦原 英司

(ASHIHARA EISHI)

京都薬科大学 薬学部 教授
研究者番号: 70275197

(4) 研究分担者 山本 相浩

(YAMAMOTO AIHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科 助教
研究者番号: 60589878

(削除: 日本学術振興会承認 平成27年
8月26日)