

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591167
 研究課題名(和文) マイクロRNA プロファイリングによるヒトループス腎炎及びマウスモデルの研究
 研究課題名(英文) MicroRNA profiling of human lupus nephritis and murine lupus-like nephritis.
 研究代表者 河野 誠司 (KAWANO SEIJI)
 神戸大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：20351512

研究成果の概要：

NZB/W F1 マウスに抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体の投与実験を行い、前者は CD4+PD-1+T 細胞を減らして腎炎を改善し、後者は逆に CD4+PD-1+T 細胞が蓄積し腎炎を悪化させた。CD4+PD-1+T 細胞は IFN- γ 高産生細胞であり、腎炎病態への積極的関与が強く示唆された。また同マウスの抗 PD-L1 抗体投与後に、脾臓から単離した CD4+PD-1+T 細胞と CD4+PD-1-T 細胞より miRNA および mRNA を抽出し、比較プロファイリングを行って CD4+PD-1+T 細胞に特異的な miRNA および mRNA の同定を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・感染症内科学

キーワード：膠原病学、ループス腎炎、PD-1、トレランス、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 抑制性共刺激分子のひとつである PD-1 は、関節リウマチ (RA) や全身性エリテマトーデス (SLE) の感受性遺伝子であると報告されている。

また、PD-1 欠損マウスは亜系の違いにより糸球体腎炎や増殖性関節炎、あるいは心筋炎などの自己免疫性疾患を発症する。これらの事実から我々は PD-1/PD-L システムの異常が、自己反応性 T リンパ

球に対する末梢トレランスの破綻を招き自己免疫疾患が形成されるという仮説のもと、ヒト・マウス PD-1 の研究を行ってきた。ヒト研究では、RA 関節液中に① CD4+PD-1+T 細胞が集積し、② CD4+PD-1+T 細胞は IL2 産生が少ない一方で IL10 を産生していること、③ RA 由来滑膜細胞は IFN γ 刺激で PD-L1 発現が誘導されることを見出した。また、ヒトのシェーグレン症候群研究にて④患者唾液中の CD4+あるいは CD8+T 細胞に PD-1 が発現すること、⑥患者の口唇生検組織で PD-L1 が唾液腺の腺房上皮細胞に強く染まること、(3)唾液腺へのリンパ球浸潤の程度と浸潤リンパ球の PD-1 陽性比率が正の相関をとることを見出した。また、ループス様腎炎モデルの NZB/W F1 マウスへの抗 PD-L1 抗体の腹腔内投与によりループス様腎炎が悪化し、ネフローゼ死にいたることを見出した。組織学的検討では NZB/W F1 マウスにおいて、腎炎発症後のメザンギウム領域に PD-L1 が強く発現することを見出し、NZB/W F1 マウスの腎炎発症への関与について現在解析を進めていた。以上のように、我々は PD-1/PD-L1 システムの自己免疫疾患への関与についてヒト・マウスで解析を進めていた。

(2) 従来マイクロ RNA (miRNA) のプロファイリングによる疾患研究は、癌研究など世界的にごく一部の限られた疾患でしか成果が報告されておらず、ヒト・マウス自己免疫疾患において miRNA 発現プロファイルについて解析した研究報告はなかった。これまでの DNA チップを用いたメッセンジャー RNA (mRNA) 発現プロファイリング解析は、mRNA 発現量が必ずしも転写後のタンパク発現量を反映しないという問題点があり、miRNA のプロファイリングは転写後調節という mRNA 発現と実際のタンパク発現をつなぐミッシングリンクをつなぐ分子基盤を与えるものとして重要性は高まるばかりであると考えられた。

(3) 我々は、先行して RA 患者と変形性関節症 (OA) 患者由来の短期培養関節滑膜細胞の miRNA プロファイリングに着手し、RA と OA で大きく発

現の異なる miRNA を見出した。その 1 つである miR-124a について、miR-124a の発現が滑膜増殖とサイトカイン産生に深く関与していることが明らかになり、解析を進めていた。また miR155 が RA や SLE の病態に関与する可能性のある miRNA として、ここ数年にわかに注目を集めてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) PD-1/PD-L1 経路が NZB/WF1 マウスの腎炎の発症にかかわっているかを明らかにすること、(2) NZB/W F1 マウスの腎炎発症前後・抗 PD-L1 抗体投与前後の miRNA プロファイリングにより、腎炎増悪に関連して変化する miRNA を特定し、ループス腎炎発症における miRNA の役割、PD-1 シグナルと miRNA との関連を明らかに miRNA することである。

3. 研究の方法

(1) NZB/W F1 マウスの腎炎発症を観察し、腎臓組織における PD-1 や PD-L の発現分布を蛍光抗体法を用いて詳細に検討した。

(2) NZB/W F1 マウスに 16 週齢から 24 週齢にかけて抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-L1 抗体を腹腔内投与し、ループス様腎炎の発症への影響を、尿タンパク、血清中サイトカイン濃度、dsDNAIgG サブクラス解析、生存率などを指標に検討した。

(3) NZB/W F1 マウスにおいて腎炎発症前後・抗 PD-L1 抗体投与前後の時点で、脾臓より CD4+T 細胞を採取し、CD4+PD-1+T 細胞と CD4+PD-1-T 細胞をセルソーターにより分離し、それぞれ mRNA と miRNA を抽出し、プロファイリングを行ない、腎炎増悪に関連して変化する miRNA を特定する。両プロファイリングには、TORAY 社のマウス用 3D-GeneDNA チップを用いた。このシステムは定量的に miRNA あるいは mRNA を測定できる。

4. 研究成果

(1) NZB/WF1 マウスの腎炎発症後の腎臓の蛍光抗

体染色により、腎臓への浸潤 CD4+T リンパ球には PD-1 が発現し、糸球体血管内皮細胞や尿細管内皮細胞には PD-L1 が発現していたが、メザンギウム細胞には PD-1 も PD-L1 も発現していなかった。フローサイトメーター解析で、腎臓や脾臓の CD4+PD-1+T 細胞には、細胞内染色にて IFN- γ が高発現しており、(増殖能は低下しているが) エフェクター T 細胞の形質をもっていることがわかった。

(2) 腎炎発症前から抗マウス PD-1 抗体 (J43) を腹腔内投与すると、CD4+PD-1+T 細胞数が減少し、尿たんぱくの増悪が遅延し、腎炎は発症するものの生後 1 年たっても半数のマウスが生存した。また腎組織から PD-1+T 細胞が消失した。さらに、J43 抗体の PD-1+細胞への効果をみるために補体依存性細胞障害活性試験を行ったところ、J43 の投与により、PD-1 強制発現細胞株の傷害死が誘導された。一方、抗マウス PD-L1 抗体 (111A) を投与すると、CD4+PD-1+T 細胞数が週齢とともに増加し、血清中 IFN- γ が著増、それと並行して尿タンパクが早期に増悪し、dsDNA 抗体の IgG 2 へのクラススイッチが促進され、腎死の時期が早まった。

(3) NZB/W F1 マウスにおいて、抗 PD-L1 抗体投与後に腎炎が発症し CD4+PD-1+T 細胞が著明に増加した時点で、CD4+PD-1+T 細胞と CD4+PD-1-T 細胞をセルソーターにより集め、miRNA と mRNA を抽出し、プロファイリングを行った。この結果をもとに、CD4+PD-1+T 細胞に CD4+PD-1-T 細胞より有意に高発現あるいは低発現している mRNA あるいは miRNA を同定し解析中である。

(得られた結果のインパクトと今後の展望)

(1) 本研究から、CD4+PD-1+T 細胞が NZB/W F1 マウスの腎炎の増悪に密接に関与していることが明らかになり、ループス腎炎の発症機序にこの細胞がどう関与しているか、大きな関心がもたれる。従来、PD-1 分子は T リンパ球に末梢トレランスを誘導する抑制性の共刺激分子ととらえられてきたが、本研究により、PD-1 を発現しながらもエフェ

クターとしての機能を保持した細胞が存在し、ループス様腎炎の発症に密接にかかわっていることが明らかになった。これは、内外の PD-1 研究の枠組みに大きな修正を迫る結果であり、大きなインパクトがあると考えられる。またループス腎炎の病態研究に新しい細胞群を加味して考える必要があることを示唆している。さらに、もう一つの意義は、J43 抗体がマウスの CD4+PD-1+T 細胞を減少させることにより腎炎の発症遅延をもたらす効果があり、将来ヒトループス腎炎の治療に、PD-1 発現細胞を減らすような抗 PD-1 抗体が有用である可能性を示唆した研究であることである。

(2) 今後の病態解析の方向としては、① mRNA あるいは miRNA プロファイリングに基づく、標的 mRNA・タンパク質の推定と定量、その結果を元に② RNAi 法による miRNA の抑制とそれによる標的 mRNA・タンパク質の量的変化の解析、あるいは逆に pre-miRNA 分子の導入を用いた標的 mRNA・たんぱく質の量的変化の解析をおこなう。それらの解析を通じて、NZB/W F1 マウスにおける PD-1 経路/PD-1+T 細胞の分子基盤を miRNA 解析を通して明らかにすることをめざす。

さらに、治療応用の前段階として、ヒト PD-1 発現細胞株を用いて、CDC 活性あるいは ADCC 活性のある抗ヒト PD-1 抗体をスクリーニングして見出し、難治性ループス腎炎の治療の新しいオプションとして成り立ちうるか検討してゆきたい。あるいは、miRNA 解析による結果をもとに、将来 miRNA の生体内ドラッグ・デリバリーシステムが確立されれば、miRNA を用いたループスの遺伝子治療も展望できる。

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 9 件)

1. Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, Saura R, Kurosaka M, and Kumagai S. miR-124a is a key regulator of proliferation and MCP1 secretion in fibroblast

like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2009 ; 60(5): 1294-1304. (査読あり)

2. Takenokuchi M, Kawano S, Nakamachi Y, Yoneda K, Joho K, Saigo K, Tatsumi E, Kumagai S. Quantitative Detection of PML-RAR α Fusion Transcript by Real-time PCR with A Single Primer Pair. *J Clin Lab Anal*. In press. (査読あり)

3. Syampurnawati M, Tatsumi E, Ardianto B, Takenokuchi M, Nakamachi Y, Kawano S, Kumagai S, Saigo K, Matsui T, Takahashi T, Nagai K, Gunadi h, Nishio H, Yabe H, Kondo S, Hayashi Y. DR negativity is a distinctive feature of M1/M2 AML cases with NPM1 mutation. *Leukemia Res*. 2008;32(7):1141-3. (査読あり)

4. Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, Sugiyama D, Nakamura T, Morinobu S, Kawano S, and Kumagai S. Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: Estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a five-year period. *Modern Rheumatol*. 2008;18(2):153-60. (査読あり)

5. Hayashi N, Kawano S, Sugiyama D, Nishimura K, Nakazawa T, Morinobu A, and Kumagai S. Dissociation of rheumatoid factor level from that of international reference material due to wrong calibrator in Dade Behring kit. *Modern Rheumatol*. 2007 ; 17:447-49. (査読あり)

6. Kurimoto C, Kawano S, Tsuji G, Hatachi S, Jikimoto T, Sugiyama D, Kasagi S, Komori T, Nakamura H, Yodoi J, and Kumagai S. Thioredoxin may exert a protective effect against tissue damage caused by oxidative stress in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2007;34:2035-43. (査読あり)

7. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshiba M, Kuntz KM, Kamae I, and Kumagai S. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2007;146: 797-808. (査読あり)

8. Nobuhara Y, Kawano S, Kageyama G, Sugiyama D, Saegusa J, and Kumagai S. Is SS-A/Ro52 a hydrogen peroxide-sensitive signaling molecule? *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007;9: 385-91. (査読あり)

9. Syampurnawati M, Tatsumi E, Furuta K, Takenokuchi M, Nakamachi Y, Kawano S, Kumagai S, Saigo K, Matsui T, Takahashi T, Nagai KI, Yabe H, Kondo S, and Hayashi Y. HLA-DR-negative AML (M1 and M2): FLT3 mutations (ITD and D835) and cell-surface antigen expression. *Leuk Res*. 2007;31: 921-9. (査読あり)

[学会発表] (計5件)

1. Kasagi S, Kawano S, Morinobu A, Hatachi S, Okazaki T, Tanaka Y, Minato N, Honjo T, and Kumagai S. 第38回日本免疫学会総会・学術集会。2008年12月3日。京都。

2. Kasagi S, Kawano S, Morinobu A, Hatachi S, Simatani K, Tanaka Y, Minato N, Okazaki T, Honjo T, and Kumagai S. Involvement of IFN-g producing CD4+PD-1+ T cells in lupus-prone NZB/W F1 mice. American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting. at San Francisco. Oct 28, 2008.

3. 笠木伸平, 河野誠司, 森信暁雄, 簗智さおり, 熊谷俊一。ループス腎炎モデルマウスにおけるPD-1およびPD-L1の機能解析。第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008年4月21日。札幌。

4. Kasagi S, Kawano S, Morinobu A, Tanaka Y, Okazaki T, Minato N, Honjo T, and Kumagai S. The

role of PD-1/PD-L in the pathogenesis of nephritis of NZB/W F1 mice. 第11回京都免疫ワークショップ。2008年3月22日。京都。

5. Kasagi S, Kawano S, Morinobu A, Hatachi S, Tanaka Y, Okazaki T, Minato N, Honjo T, and Kumagai S. Expression of PD-1/PD-L1 in the development of lupus-like nephritis in NZB/W F1 mice. 第37回日本免疫学会総会・学術集会。2007年11月20日。東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 誠司 (KAWANO SEIJI)

神戸大学医学部附属病院・講師

研究者番号：20351512

(2) 研究分担者

熊谷 俊一 (KUMAGAI SHUNICHI)

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究者番号：00153346

中町祐司 (NAKAMACHI YUJI)

神戸大学医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：80379429

(3) 連携研究者

本庶 佑 (HONJO TASUKU)

京都大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：80090504

湊 長博 (MINATO NAGAIHIRO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40137716

田中 義正 (TANAKA YOSHIMASA)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：90280700

岡崎 拓 (OKAZAKI TAKU)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授

研究者番号：00362468

森信 暁雄 (MORINOBU AKIO)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10294216

籾智 さおり (HATACHI SAORI)

(財) 田附興風会医学研究所・第4研究部・研究員

研究者番号：70414117