

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19689021

研究課題名(和文) Th17 サブセットが炎症性疾患特に膠原病において果たす役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the roles Th17 subset plays in inflammatory diseases, especially collagen diseases

研究代表者

佐藤 浩二郎 (SATO KOJIRO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10372434

研究成果の概要(和文): 最近同定された新規ヘルパーT(Th)細胞サブセットである Th17 細胞の分化メカニズムを理解するために Th1, Th2, Th17 各細胞を試験管内で分化させ、経時的トランスクリプトーム解析を行った。Th17 分化の過程で転写因子 c-Maf の発現が著増していることが分かり、次いで c-Maf トランスジェニックマウスを解析したところほとんどの Th 細胞がメモリー細胞の表現型を示し、c-Maf がメモリーTh 分化にも重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文): We performed a transcriptome analysis of Th1, Th2 and Th17 cells differentiated in vitro and discovered that transcription factor c-Maf is strongly induced in the course of Th17 differentiation. We also analyzed c-Maf transgenic mice and unexpectedly found that most Th cells had memory phenotype. It is suggested that c-Maf plays an important role not only in Th17 but also in memory Th differentiation.

交付決定額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 8,400,000 | 2,520,000 | 10,920,000 |
| 2008年度 | 7,300,000 | 2,190,000 | 9,490,000 |
| 2009年度 | 5,000,000 | 1,500,000 | 6,500,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 20,700,000 | 6,210,000 | 26,910,000 |

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：Th17, c-Maf, トランスクリプトーム, メモリー, IL-17, IL-23 受容体

1. 研究開始当初の背景

2006年に研究代表者は破骨細胞の分化を促進する唯一のThサブセットとしてTh17細胞を報告した。Th17細胞は2005年に命名された、Th1, Th2細胞に続く第3のエフェクターThサブセットであり、主としてIL-17を産生する。Th17は好中球の増多および遊走を促進するサブセットと考えられており、

関節リウマチ(RA)患者の関節液中にIL-17が検出されることなどから、各種炎症性疾患との関連が注目されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は大別して2つあり、1つは(A)Th17細胞分化の過程で重要な役割を果たす転写因子を同定すること、もう1つは(B)各種

膠原病を免疫応答の面から Th1/Th2/Th17 の 3 種類に分類できるかどうかを評価することであった。

3. 研究の方法

(1) マウス脾臓由来のナイーブ Th 細胞を調整し、Th1, Th2, Th17 の各分化条件で培養、1 日後および 3 日後に回収して total RNA を抽出、GeneChip によるトランスクリプトーム解析を行った。

(2) T 細胞特異的 c-Maf トランスジェニック (Tg) マウス脾臓由来の Th 細胞を解析した

(3) 野生型マウスの Th 細胞を T, B 細胞を持たない Rag-2 欠損マウスに移入し、強制的にメモリー Th 細胞の表面マーカーを持つ細胞 (メモリー様 Th 細胞) を分化させ、解析した。

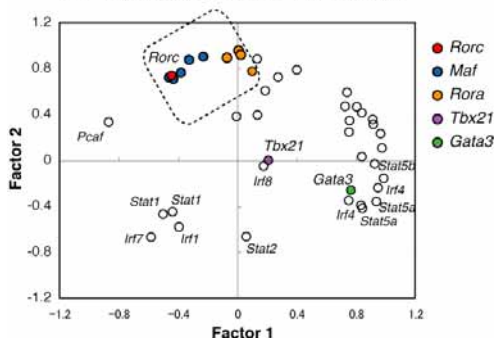
(4) ホモ欠損では胎性致死となる c-Maf ヘテロ欠損マウスを交配し、胎仔から肝細胞を調整した。この細胞を造血幹細胞として、X 線照射後の Rag-2 欠損マウスに移入しキメラマウスを作出した。このマウスの T 細胞はドナー由来の細胞である。このようにして c-Maf 欠損 Th 細胞を得ることが出来る。この Th 細胞を (3) と同様に Rag-2 欠損マウスに移入しメモリー様 Th 細胞として解析した。

(5) 血清中の IFN- γ , IL-4, IL-17 の濃度を測定すれば上記の目的 (B) に対する答は出ると考えられる。しかし IFN- γ は血清レベルで測定できることもあるが、IL-4, IL-17 についてはほとんどの場合で測定感度以下である。そこで、代替案として末梢血中の単核球を試験管内で刺激し、産生されるサイトカイン量を測定することを試みた。

4. 研究成果

(1) Th17 分化の過程で最も強く誘導される転写因子は c-Maf であった。c-Maf は Th2 型の転写因子と考えられていたためこれはやや意外な結果であった (図 1)。Th17 細胞における c-Maf の転写標的としては IL-23 受容体 (IL-23R) があることをプロモーター解析により明らかにした。

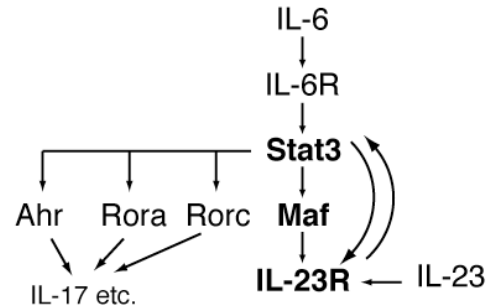
図1 トランスクリプトームデータの因子分析



(2) c-Maf Tg マウス由来の Th 細胞では確かに IL-17, IL-23R の発現が野生型よりも高かった。しかし意外なことに、この Tg マウス由来の Th 細胞はそのほとんどがメモリー細胞の表現型 (CD62L^{lo} CD44^{hi}) を示した。

(3) 野生型 Th 細胞由来のメモリー様 Th 細胞においても c-Maf, IL-17, IL-23R の発現が高いことが確認された。

図2 Th17 分化における Maf の役割



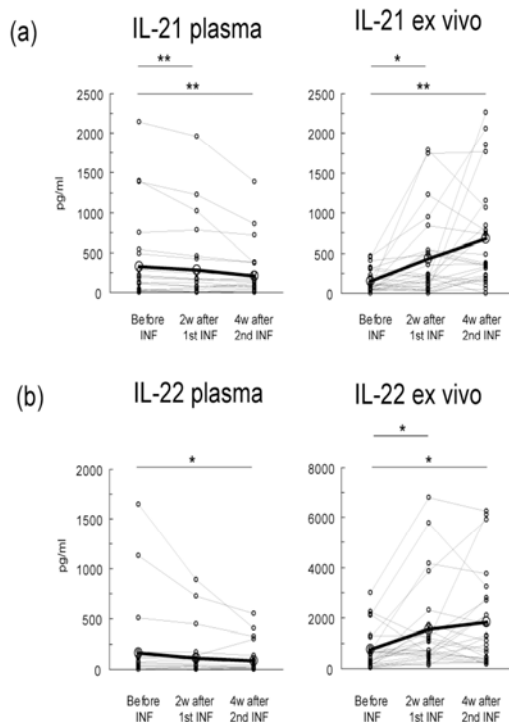
(4) c-Maf 欠損メモリー様 Th 細胞でも表面マーカーは野生型と同様 CD62L^{lo} CD44^{hi} であったが、予想通り IL-17, IL-23R の発現は低いことが確認された。転写因子 c-Maf は Th17 分化に重要であるのみならず (図 2)、メモリー Th 細胞の分化にも重要であることが示唆された。

(5) 関節リウマチ (RA) 患者、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者、ベーチェット病 (BD) 患者由来の単核球を用いて刺激後の 3 種類のサイトカイン濃度のバランスを測定したところ、SLE は IL-17 優位、BD は IFN- γ および IL-17 優位であった。Th1 型の疾患、あるいは最近では Th17 型の疾患ではないかとされている RA は意外なことに有意な偏りを示さなかった。

近年 RA の臨床は、インフリキシマブを嚆矢とする生物学的製剤の実用化によって非常に治療成績が良くなっている。このインフリキシマブによる治療前後のサイトカイン産生を調べたところ、興味深いことに治療後にサイトカイン産生が 3 種類とも増加していることが分かった。これは治療が奏功していないということではなく、CRP 濃度や RA 活動性の示標である DAS28 はいずれも治療後に低下していた。CRP は IL-6 刺激で肝細胞から産生される。すなわち CRP が低下することは生体内での IL-6 が低下していることを示唆する。ただし血清 IL-6 もまた測定困難である。単核球刺激後に産生される IL-6 を測定すると、これも治療後に増加していた。すなわち、治療後に生体内 (in vivo) の IL-6 は低下し、単核球刺激後に産生される (ex

vivo)IL-6 は増加するという鏡像関係が成立することが示唆された。この仮説を検証するためには血清中で測定できるサイトカインを探索する必要がある。スクリーニングの結果、IL-21 および IL-22 が（全検体ではないが）測定感度を超えていることが分かった。in vivo（血清）および ex vivo のこれらのサイトカイン濃度を測定すると予想通り逆相関の関係が確認された。ではどうして in vivo と ex vivo のサイトカイン濃度が逆相関するのだろうか。以前から炎症性疾患では T 細胞の反応の低下(anergy)が報告されている。炎症を抑制しようとするネガティブフィードバックシステムと考えられるが、そのメカニズムの候補としては制御性 T 細胞が挙げられる。これらの結果については現在投稿中である（図 3）。

図3 インフリキシマブ(INF)治療前後のIn vivoおよびex vivoのIL-21, 22産生



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 8 件)

Marked Induction of c-Maf Protein during Th17 Cell Differentiation and Its Implication in Memory Th Cell Development. Sato K, Miyoshi F, Yokota K, Araki Y, Asanuma Y, Akiyama Y, Yoh K, Takahashi S, Aburatani H, Mimura T. J Biol Chem. 2011;286(17):14963-71. 査読有

Geranylgeranyl-pyrophosphate regulates secretion of pentraxin 3 and monocyte chemoattractant protein-1 from rheumatoid fibroblast-like synoviocytes in distinct manners. Yokota K, Miyoshi F, Sato K, Asanuma Y, Akiyama Y, Mimura T. Clin Exp Rheumatol. 2011;29(1):43-9. 査読有

Analysis of cytokine production patterns of peripheral blood mononuclear cells from a rheumatoid arthritis patient successfully treated with rituximab. Yamamoto A, Sato K, Miyoshi F, Shindo Y, Yoshida Y, Yokota K, Nakajima K, Akiba H, Asanuma Y, Akiyama Y, Mimura T. Mod Rheumatol. 2010;20(2):183-7. 査読有

Th17 cells and rheumatoid arthritis--from the standpoint of osteoclast differentiation--. Sato K. Allergol Int. 2008;57(2):109-14. Review. 査読無

High concentration simvastatin induces apoptosis in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Yokota K, Miyoshi F, Miyazaki T, Sato K, Yoshida Y, Asanuma Y, Akiyama Y, Mimura T. J Rheumatol. 2008;35(2):193-200. 査読有

The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. Kano S, Sato K, Morishita Y, Vollstedt S, Kim S, Bishop K, Honda K, Kubo M, Taniguchi T. Nat Immunol. 2008;9(1):34-41. 査読有

Effects of low-dosage simvastatin on rheumatoid arthritis through reduction of Th1/Th2 and CD4/CD8 ratios. Kanda H, Yokota K, Kohno C, Sawada T, Sato K, Yamaguchi M, Komagata Y, Shimada K, Yamamoto K, Mimura T. Mod Rheumatol. 2007;17(5):364-8. 査読有

Pathological role of osteoclast costimulation in arthritis-induced bone loss. Ochi S, Shinohara M, Sato K, Gober HJ, Koga T, Kodama T, Takai T, Miyasaka N, Takayanagi H. Proc Natl Acad Sci U S

A. 2007;104(27):11394-9. 査読有

[学会発表](計7件)

Sato Kojiro THE TRANSCRIPTION FACTOR C-MAF PLAYS CRITICAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION OF T HELPER CELLS
Eular 2010 2010年6月18日(Rome)

佐藤浩二郎 転写因子 c-Maf が Th 細胞分化において果たす役割の解析 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月23日(神戸)

佐藤浩二郎 メモリー-Th17細胞において転写因子 c-Maf が果たす役割の解析 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009年12月2日(大阪)

Sato Kojiro Proto-oncogene Maf plays an important role in Th17-cell differentiation Keystone Symposium: TH17 Cells in Health and Disease 2009年2月7日(Vancouver)

佐藤浩二郎 転写因子 c-Maf は Th17 分化において重要な役割を果たす 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008年12月1日(京都)

Sato Kojiro TRANSCRIPTOME ANALYSIS DURING TH1/2/17 DIFFERENTIATION WITH AN 3 解析及びマウス Th17 細胞のトランスクリプトーム解析 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007年11月22日(東京)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：膠原病診断方法
発明者：佐藤浩二郎、三由文彦、三村俊英
権利者：学校法人 埼玉医科大学
種類：特許
番号：出願 2007-222082, 公開 2009-50232
出願年月日：2007年8月29日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumachi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 浩二郎 (SATO KOJIRO)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：10372434