

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591091
 研究課題名（和文）
 抗核抗体の産生制御におけるタイプ I インターフェロンの変動と制御性 T 細胞の誘導
 研究課題名（英文）
 Type I interferon and regulatory T cells associated with autoantibody production
 研究代表者
 藤井 隆夫（TAKAO FUJII）
 京都大学・医学研究科・特定准教授
 研究者番号：70255462

研究成果の概要（和文）：
 全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus: SLE）の難治性病態のうち、タイプ I インターフェロン（IFN）の誘導に重要な抗 U1RNP 抗体が関与する肺動脈性肺高血圧症（PAH）と Neuropsychiatric SLE（NPSLE）に注目した。IFN- α/β は、肺動脈血管内皮細胞からの fractalkine と RANTES の発現を亢進させ、JAK 阻害薬でその発現が抑制された。NPSLE では脳脊髄液（cerebrospinal fluid: CSF）-抗 U1RNP 抗体は CSF-IFN- α や MCP-1 高値と相関した。

研究成果の概要（英文）：
 In the present study, I focused on neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE) and pulmonary arterial hypertension (PAH), which are associated with anti-U1 ribonucleoprotein antibodies (anti-U1RNP Abs). Type I IFN (IFN- α/β) could stimulate pulmonary arterial endothelial cells to secrete fractalkine and RANTES, that was suppressed by JAK inhibitors. In NPSLE, the presence of anti-U1RNP Abs in cerebrospinal fluid (CSF) was associated with high levels of IFN- α and MCP-1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	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・感染症内科学

キーワード：タイプ I インターフェロン、抗核抗体、全身性エリテマトーデス

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus: SLE）をはじめとした膠原病において Type I インターフェロン（IFN）は病因的意義を有するサイトカインと考えられている。特に混合性結合組織病（mixed connective tissue disease: MCTD）で高力価陽性となる抗 U1-ribonucleoprotein (RNP) 抗体の免疫複合体が Type I IFN (IFN- α/β)

を誘導することが知られ、自己抗原に対するトレランスの破綻や持続的な自己抗体産生に関与している可能性が数多く報告されている。一方、Type I IFN は様々な疾患で治療薬として使用されてきた。まれではあるが、この IFN 治療による肺動脈性肺高血圧症（pulmonary arterial hypertension: PAH）の発症が報告されている。IFN 治療の基礎疾患は C 型肝炎、多発性硬化症、メラノーマな

ど多岐にわたるため、その基礎疾患に依存せず、むしろ過剰な Type I IFN と PAH とが関連する可能性が高い。PAH は SLE や MCTD、強皮症で高頻度に認められる難治性病態であるが、その発症機序は不明である。

また古くから血清中抗 U1RNP 抗体陽性 SLE あるいは MCTD 患者では中枢神経症状が多いことが報告されていたが、その理由は明確でない。われわれは病態局所で抗 U1RNP 抗体が何らかの病原性を有する可能性を考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、3 年間で以下の 2 つの研究を行った。

(1) IFN- α/β が PAH の治療ターゲットになるかどうかを将来的に明確にするため、肺血管培養細胞を用いて、IFN- α/β による刺激実験を行った。

(2) CSF-抗 U1RNP 抗体陽性と液性因子(NPSLE と関連するサイトカイン・ケモカイン) に相関がないかどうかを調べた。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞はヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC)、ヒト肺微小血管内皮細胞 (HLMVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC)、およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。これらをリコンビナント IFN- $\alpha 2b$ および IFN- β と共培養 (0.1-10 ng/mL) し、培養上清中の CCL2 (MCP-1)、CX3CL1 (fractalkine)、CCL5 (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted [RANTES]) 濃度および発現する蛋白の mRNA を reverse transcription-PCR で調べた。また細胞表面にそれらが発現しているかどうかを、HPAEC を用いた蛍光染色で明らかにした。さらにそれらの分泌が JAK 阻害薬により抑制されるかどうかを調べた。

(2) 文書同意をとったうえで NPSLE 患者の CSF を保存し、82 例においてサイトカイン・ケモカインを測定した。CSF-抗 U1RNP 抗体を RNA-免疫沈降法 (RNA-IPP) で、抗 NR2 抗体を ELISA で測定した。CSF 中の液性因子の測定は Filgen 社に依頼し、Procarta® Cytokine Assay kit を用いて IFN- α 、IL-8、IP (interferon-inducible protein) -10、MCP (monocyte chemoattractant protein) -1、MIG (monokine induced by IFN- γ)、RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)、fractalkine の 7 種類を Bio-Plex™ により測定した。

4. 研究成果 (考察を含む)

(1) HPAEC 培養上清中に IFN- α/β を加えることで MCP-1、fractalkine、RANTES のいずれが有意に分泌されるかを調べた。Fractalkine は IFN- β で最高 5.9 ± 0.5 ng/mL、また RANTES は IFN- α/β で最高 $77.4 \pm 2.7 / 230.9 \pm 9.4$ pg/mL まで分泌が刺激された (72 時間後) が、MCP-1 の分泌はいずれの IFN でも刺激されることはなかった (発表論文参照)。また同様に、IFN- α/β (50ng/mL) を加えることで、fractalkine と RANTES が HPAEC の細胞質に発現することを確認した。そこで以下の検討では、MCP-1 は除外し fractalkine と RANTES のみを測定した。

IFN- α/β は、HUVEC、HAEC、HPAEC、および HLMVEC で fractalkine の発現を亢進させたが、その mRNA のピークは刺激後 8 時間であった。しかしそのピーク時にコントロール培養細胞と比較して有意に発現が亢進したのは mRNA レベルでは HPAEC であり、蛋白レベルでは HPAEC と HLMVEC であった (図 1a-D)。一方、IFN- α/β による RANTES の mRNA 発現は 24 時間がピークであり、そのピーク時に mRNA 発現は HUVEC と有意な差は認めなかったものの、培養上清中における RANTES の濃度は HPAEC や HLMVEC で有意に高かった。

さらに本研究では IFN- α/β (10 ng/mL) による fractalkine と RANTES の分泌亢進が JAK 阻害薬により影響を受けるかどうかを確認した。図 1 にしめすとおり、これらのケモカイン分泌は、JAK 阻害薬の濃度依存的 (0.1-1 μ M) に抑制された。

PAH の発症機序はいまだ明らかではない。しかし、MCTD や強皮症、SLE などの全身性自己免疫疾患に続発することが多く、特発性 PAH でも自己免疫現象がしばしば認められる。したがって PAH の成因には免疫異常が関与している可能性がある。PAH のリスク因子とされる抗 U1RNP 抗体についても直接的な関与は十分明らかにされていない。以前より血管内皮細胞に対する自己抗体の併存を示唆する報告があるが、病理組織において免疫複合体や IgG の沈着は必ずしも明らかでなく、effector 分子は異なる可能性もある。われわれは抗 U1RNP 抗体をはじめとする RNA-binding protein に対する自己抗体-免疫複合体が樹状細胞の Toll-like receptor により認識されて type I IFN を分泌すること、またきわめてまれではあるが IFN- α/β を用いた治療により PAH が誘導された症例報告があることから、抗 U1RNP 抗体が type I IFN を介して間接的に PAH の成因に関与している可能性があるとして仮説を立てた。

一方特発性 PAH 患者においては、病態の局所で MCP-1、fractalkine、RANTES などのケモカイン発現が亢進することが知られている。われわれの成績から、IFN- α/β は特に

HPAEC において、fractalkine、RANTES の産生誘導を強く示唆する。ここで fractalkine はセレクチンやインテグリン非依存性の白血球接着因子であるとともに、単球の遊走を誘導することが知られているため、これらの血球を介した肺血管傷害機序が考えられる。過去には、強皮症から得られた肺組織において発現が亢進しているという報告や fractalkine のレセプターに関する遺伝子異常が PAH を合併した強皮症で認められるとする報告がある。また RANTES の発現は PAH 患者の肺血管のみでなく、SLE 患者血漿中でも亢進している。したがって、抗 U1RNP 抗体陽性 PAH 患者で Type I IFN の発現が亢進することにより、PAH に関連するケモカインが局所的に活性化され、単球をはじめとした炎症細胞を肺血管内皮および平滑筋細胞に誘導している可能性がある。In vitro におけるデータから、Type I IFN は抗 U1RNP 抗体高力価陽性の MCTD でより強く誘導されると考えられるが、今回のデータのみではまだ抗 U1RNP 抗体と PAH とのリンクは明確でない。今後 in vivo の系を用いてより詳細な検討を加えたい。

なお本研究で興味深い点は、関節リウマチ治療薬として近日中に発売される JAK 阻害薬により、Type I IFN で誘導されるケモカインが抑制されたことである近い将来、JAK 阻害薬や抗 IFN- α 抗体 (sifalimumab、現在 SLE で治験中) が抗 U1RNP 抗体陽性膠原病における PAH を改善させた症例を見いだせば、本研究と併せて Type I IFN や fractalkine、RANTES が PAH の治療ターゲットとなるエビデンスとなり、難治性病態である PAH の治療進歩につながると思われる。

(2) RNA-IPP で測定した CSF-抗 U1RNP 抗体陽性例を示す。2010 年に論文化したようにこの方法で検出した CSF-抗 U1RNP 抗体は臨床的な意義を有していた。つまり抗 U1RNP 抗体陽性 SLE/MCTD 患者で CNS 症状を呈した場合、CSF 中の抗 U1RNP 抗体測定は CNS 症状と原疾患との関連や活動性を知る上で有用で、CSF 中の抗 U1RNP 抗体は血液脳関門透過性の亢進のみによるのではなく CNS 局所でその産生が刺激されている可能性がある (発表論文参照)。しかしその CSF-抗 U1RNP 抗体の病因的意義は明らかでなかった。そこで今回、NPSLE に関連する液性因子として報告されているサイトカインやケモカインに注目した。特に、CSF 中で測定された IFN- α (Shiozawa S, et al, Arthritis Rheum, 1992)、IL-8 (Fragoso-Loyo H, et al, Arthritis Rheum, 2007)、IP-10 (Okamoto H, et al, Arthritis Rheum, 2004)、MCP-1 (Iikuni N, et al, Ann Rheum Dis, 2006)、MIG (Fragoso-Loyo H, et al, Arthritis Rheum, 2007)、RANTES

(Fragoso-Loyo H, et al, Arthritis Rheum, 2007)、fractalkine (Sato E, et al, Ann Rheum Dis, 2006) が、NPSLE 患者では有意に高いとされている。今回は測定する液性因子としてこれらを選択した。

本研究で、CSF-抗 U1RNP 抗体陽性と IFN- α や多くのケモカインが関連する可能性が考えられた (論文投稿中)。なお NPSLE ではないが、cognitive dysfunction や早期のアルツハイマー病と CSF 中の IP-10、MCP-1、IL-8 が関連するとされているが (Galimberti D, et al, Arch Neurol, 2006)、血清-抗 U1RNP 抗体陽性 cognitive dysfunction (NPSLE) では、MCP-1 とともに fractalkine が関与する可能性がある。本研究では、CSF-抗 U1RNP 抗体の出現と IL-8 に差がみられなかった。数多くの報告で CSF IL-8 は NPSLE と関連するとされている (Trysberg E, et al, Lupus, 2000 など) ため結果の乖離があるが、IL-8 と関連がないことがむしろ抗 U1RNP 抗体陽性 NPSLE の特徴かもしれない。

in vitro において、抗 U1RNP 抗体が形成する免疫複合体は、I 型インターフェロンである IFN- α の inducer として注目されている (Savarese E, et al, Blood, 2006, Ehlers M, et al, Trend Immunol, 2006)。われわれが RNA-IPP で検出した CSF-抗 U1RNP 抗体 (およびその免疫複合体) が髄腔内でいかなる細胞に作用し、IFN- α やケモカインを誘導するかは今後の課題である。しかし最近、NPSLE 患者の CSF から精製された IgG と、ヒト細胞核成分を混合して作成した免疫複合体により、ヒト PBMC から IFN- α 、IL-8、IP-10、MCP-1 の分泌が刺激されることが示されている (Santer DM, et al, J Immunol, 2009)。この報告では CSF 中の抗核抗体の測定はされていないが、培養上清に RNase を加えることで IFN- α の産生刺激が阻害されているため、抗 U1RNP 抗体や抗 SS-A 抗体など RNA-binding protein に対する自己抗体が液性因子の産生に関与している可能性があるため、われわれの成績を裏付ける結果と考えている。

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 3 件)

1. Masayoshi Nakano, Takao Fujii, et al. Type I interferon induces CXCL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary vascular endothelial cells. Clin Exp Immunol 170:94-100, 2012. (DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04638.x)
2. Naoichiro Yukawa, Takao Fujii, et al.

Correlation of antinuclear antibody and anti-double-stranded DNA antibody with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective clinical study. Arthritis Res Ther 2011; 13: R213. (DOI: 10.1186/ar3546)

3. Takeshi Sato, Takao Fujii, et al. Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. Arthritis Rheum 2010; 62: 3730-3740, 2010. (DOI : 10.1002/art.27700)

[学会発表] (計 2 件、海外学会のみ)

1. Takao Fujii, Tomoko Yokoyama, et al. Association between autoantibodies and inflammatory mediators in cerebrospinal fluids from patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Annual European Congress of Rheumatology, June 6-9, 2012, Berlin, Germany.
2. Naoichiro Yukawa, Takao Fujii, et al. Correlation of antinuclear antibodies and anti-DNA antibodies with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. EULAR 2010, Rome, Italy.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 隆夫 (TAKAO FUJII)

研究者番号:

70255462

(2) 研究分担 (協力) 者

湯川 尚一郎 (NAOICHIRO YUKAWA)

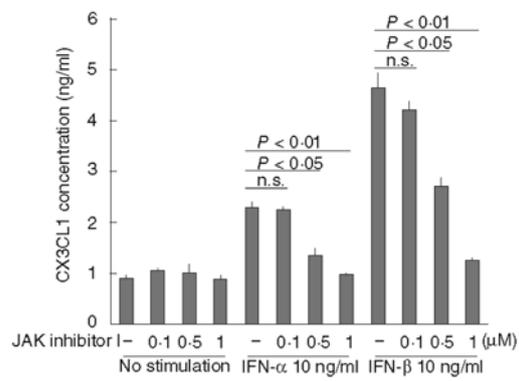
研究者番号:

湯川 尚一郎 (90422972)

(3) 連携研究者

なし

a) CX3CL1 (Fractalkine)



b) CCL5 (RANTES)

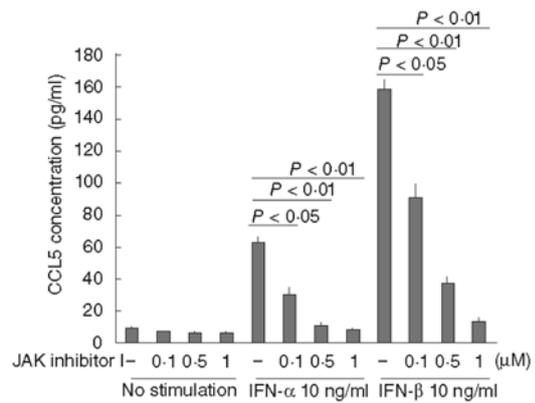


図1. JAK 阻害薬による Type I IFN 誘導性肺血管ケモカインの抑制

IFN- α / β 刺激による fractalkine および RANTES の誘導は、JAK 阻害薬により濃度依存的に抑制された。HPAEC を用いた実験結果を示している