

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870091

研究課題名(和文)新規関節炎抑制分子の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of a new arthritis inhibitory molecule

## 研究代表者

井上 明日香(INOUE, ASUKA)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80636522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TIARPの関節炎抑制機序を明らかにし、関節リウマチの新規治療法の開発に有用な機能部位を明らかにすることを目的としている。TIARP欠損マウスを用いた解析から、TIARPはN末端およびexon3部分を介してIL-6に依存した関節局所への好中球遊走を阻害する働きがある可能性がある。またTIARPはRA患者のCD14+CD16- 単球に発現が強いことを見出した。今後の関節リウマチをはじめとする炎症性疾患の新規治療ターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recently, We found that TIARP functions as a negative regulator in autoimmune arthritis, although the molecular mechanism of TIARP-expressing cells in arthritis remains uncertain. The purpose of this study is to elucidate the functional role of TIARP in the pathogenesis of arthritis. The severity of arthritis in TIARP<sup>-/-</sup> mice was markedly exacerbated, and the recruitment of neutrophil into the joint was significantly enhanced. CXCR1/2 expression was significantly higher in TIARP<sup>-/-</sup> neutrophil, and the recruitment capacity was enhanced to the ligand of CXCL2. Serum-transferred arthritis in TIARP<sup>-/-</sup> mice was attenuated by the blockade of IL-6R signaling, and recruitment of neutrophil into the joint of TIARP<sup>-/-</sup> mice was suppressed. These results suggested that TIARP might down-regulate the production of CXCL2 and the expression of CXCR1/2, resulting in the protective ability of neutrophil migration in arthritic joints, probably via the inhibition of IL-6 signaling.

研究分野：膠原病

キーワード：関節リウマチ 炎症性サイトカイン ケモカイン 好中球 細胞遊走

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の発症にはT細胞、B細胞、炎症性サイトカインなど様々な因子が挙げられるが、原因は未だ明らかではない。近年、RAの治療法として炎症性サイトカイン制御が有効であることは臨床で明らかとされた。しかし、リウマチ診療を激変させた生物学的製剤も高価で、免疫抑制が強く、寛解導入率は4割に満たない欠点がある。関節炎モデルの一つである glucose-6-phosphate isomerase (GPI)誘導関節炎はCD4+T細胞、B細胞および炎症性サイトカイン依存性の関節炎であり、RAと非常に類似しておりRA病態の制御機構を見極めるうえで、興味深いモデルである。そこで我々は、RAおよびGPI誘導関節炎の病態・病因に強く関与しているTNFに焦点をおいた。GPI誘導関節炎マウスの脾臓を用いてDNAマイクロアレイを行い変動する遺伝子について解析したところTNF関連遺伝子の一つであるTNF $\alpha$ -induced adipose-related protein (TIARP)分子が高発現していることを明らかとした。TIARPは脂肪細胞ではじめて同定され、TNF $\alpha$ やIL-6によって誘導される蛋白である。我々はGPI誘導関節炎においてTIARP分子が、関節炎発症初期のマクロファージ、好中球に強発現していること、関節局所では関節腫脹に伴って滑膜細胞に発現が誘導されること、マクロファージにおいてもTNF $\alpha$ 、IL-6依存的にTIARP発現が誘導されることを明らかとした。このことからTIARPはマクロファージ、好中球や滑膜細胞に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。またTIARPのヒトorthologはSTEAP4と呼ばれる。STEAP4もマウス同様に、RA患者由来末梢血単核球(PBMC)中の単球、好中球に発現し、さらにCD68陽性滑膜細胞(マクロファージ様滑膜細胞)に強発現することを見出した。このようにTIARP/STEAP4はマウスおよびヒトに共通に発現し、マクロファージ、好中球、滑膜細胞内で機能していることが考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

これまで我々はRA患者および関節炎マウスのマクロファージ、好中球、滑膜細胞にTIARP/STEAP4という分子が強発現すること示した。さらにTIARP欠損マウスは、加齢とともに滑膜炎を自然発症すること、TNF $\alpha$ 、IL-6下流シグナルが野生型と比較して増強しており炎症性サイトカイン産生能、細胞増殖能が亢進していることを明らかとした。このことからTIARPは、関節炎の炎症抑制分子である可能性が示唆された。本研究では、TIARP/STEAP4の詳細な関節炎抑制メカニズムを明らかとし、RAを含む炎症性自己免疫疾患の制御を目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) TIARPによる炎症抑制に寄与する分子の同定

マクロファージ、好中球依存性の高いK/BxN血清移入関節炎を用いて関節炎を誘導した。さらに好中球除去抗体を投与し関節炎病態を観察した。

野生型、TIARP欠損好中球を用いて変動する遺伝子をDNAマイクロアレイで解析した。

滑膜細胞からのサイトカイン、ケモカイン産生能の検討を行った。

in vivoにおけるTIARP欠損好中球の遊走能を調べた。

(2) TIARPの機能部位の同定

TIARPのN末端からC末端までの全長PCRを行ったところ、exon3欠損型TIARPが存在することが判明した。

関節炎マウスにおけるexon3欠損型TIARPの発現機構を明らかにした。

LPS刺激時のマクロファージにおけるexon3欠損型TIARPの発現解析。

レンチウイルスベクターを用いてTIARPおよび2種類(N末端欠損型、exon3欠損型)の変異体TIARP導入細胞を樹立する。その後、LPS刺激などによるサイトカイン産生量などを検討した。

(3) RAにおけるSTEAP4発現細胞の同定ならびにその機能解析

健常人(HC)、RAおよびシェーグレン症候群(SS)患者よりPBMCを採取し、STEAP4の発現レベルを検討した。

PBMC中の発現細胞を同定するために、CD3、CD19、CD14陽性細胞を選り分け定量PCRおよびFACSを用いてSTEAP4発現を検討した。

トシリズマブ、アバタセプトなどの生物学的製剤治療前後の同一患者におけるSTEAP4発現変動を検討した。

## 4. 研究成果

6回膜貫通型タンパクとして同定されたTIARPは、ヒト関節リウマチ(RA)患者および関節炎マウスのマクロファージ、好中球、滑膜細胞に共通に発現している。TIARP遺伝子欠損マウスは加齢に伴い関節炎を自然発症する。この病態の発症機序と進行過程を明らかにし、RAの病態解明および新規治療法の開発に有用な機能部位等を明らかにすることを目的としている。

(1) TIARPの炎症抑制に寄与する分子の同定

好中球、マクロファージの依存性の高いK/BxN血清移入関節炎を誘導したTIARP欠損マウスは野生型と比し関節炎が著明に増悪し、炎症部位である関節では好中球、マクロファージの浸潤が増加していた。また抗Gr1抗体を用いて好中球を欠損させたTIARP欠損マウスでは有意に関節炎の発症が抑えられた。

TIARPの好中球における役割を明らかにするため、野生型およびTIARP欠損マウス好

中球を用いて DNA マイクロアレイを施行した。TIARP 欠損好中球はケモカイン受容体(CXCR1, CXCR2)の過剰な発現をみると、さらにそのリガンドである CXCL2 への細胞遊走能が亢進していた。

CXCL2 は RA 病態において滑膜細胞から産生されることから、滑膜細胞を用いて TNF 刺激を行った野生型および TIARP 欠損滑膜細胞からのサイトカイン/ケモカイン産生を検討した。TIARP 欠損滑膜細胞では、IL-6 および CXCL2 の発現亢進を認めた。

in vivo において TIARP 欠損好中球は炎症の場へ遊走しやすいのか否かを検討するため、野生型および TIARP 欠損マウス由来好中球を 1:1 の割合で関節炎を誘導した野生型マウスに移入した。TIARP 欠損マウス好中球は野生型の好中球と比較して、有意に炎症の起こっている関節に流入することを明らかにした。更に、IL-6 の依存性を確かめるために関節炎を誘導したマウスに IL-6R 中和抗体を投与すると、好中球の遊走が著明に抑制され、関節炎病態も軽減することがわかった。このことから TIARP は IL-6 依存的に好中球、滑膜細胞の CXCR1/2-CXCL2 の抑制を介して関節局所への好中球遊走を阻害する働きがあることが明らかとなった。

#### (2) TIARP の機能部位の同定

exon3 欠損型 TIARP は、GPI 誘導関節炎を誘導したマウスの脾臓において、関節炎発症早期の day7 で最も発現が高かった。一方、関節では、関節の腫脹に伴って増加していた。また発現細胞は、全長 TIARP と同様に CD11b 陽性細胞であった。

LPS 刺激を行ったマクロファージにおいて、exon3 欠損型 TIARP は全長の TIARP と同様に刺激誘導 6 時間から発現が誘導されていた。

TIARP の抑制機構ならびにその機能部位を明らかにするため、レンチウイルスベクターを用いて TIARP 過剰発現細胞ならびに 2 種類 (N 末端欠損型、exon3 欠損型) の変異体 TIARP 導入細胞を樹立した。

全長 TIARP 過剰発現細胞は、LPS 刺激時の IL-6 産生がコントロールと比較して低下していた。一方、N 末端欠損型および exon3 欠損型 TIARP 導入細胞ではコントロールと同等であった。このことから TIARP の機能部位は、N 末端ならびに exon3 部位に存在することが考えられる。

#### (3) RA における STEAP4 発現細胞の同定ならびにその機能解析

ヒトの解析においては、健康人、RA 患者、疾患コントロール群としてシェーグレン症候群 (SS) 患者の末梢血単核球中 (PBMC) の TIARP 発現量を検討したところ、RA 患者群で、HC/SS 群と比較して有意に増加していることを明らかにした。

STEAP4 発現細胞は CD14+CD16- 単球であった。一方、CD3, CD19 陽性細胞には発現していなかった。

トシリズマブ治療により STEAP4 発現は CD14 陽性細胞において有意に低下した。一方、アバタセプト治療前後での STEAP4 発現には著明な変化は認めなかった。

このことから STEAP4 は、RA 患者の末梢血 CD14+CD16- 細胞で機能し、IL-6 によって制御されている可能性が示唆された。

このように TIARP/STEAP4 はマウス、ヒトに共通に発現し、好中球遊走ならびに炎症性サイトカイン産生を負に制御する分子であることが明らかとなった。今後の関節リウマチをはじめ他の炎症性疾患の新規治療ターゲットとなりうる可能性がある。

#### 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 2 件)

Takai C, Matsumoto I, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Kurashima Y, Wada Y, Narita I, Sumida T.: Specific overexpression of TNFAIP9 in CD14+CD16- monocytes in patients with rheumatoid arthritis- Comparative analysis with TNFAIP3-. Clin Exp Immunol. 180: 458-466, 2015

Matsumoto I, Inoue A, Takai C, Umeda N, Tanaka Y, Kurashima Y, Sumida T.: Regulatory roles of tumor necrosis factor alpha-induced proteins (TNFAIPs) 3 and 9 in arthritis. Clin Immunol. 153: 73-38, 2014

[学会発表](計 6 件)

Inoue A, Matsumoto I, Umeda N, Tanaka Y, Takai C, Kurashima Y, Takahashi S, Sumida T.: TIARP suppresses migration of neutrophils into joints via down-regulation of CXCL2/CXCR2 pathway in autoimmune arthritis. The European League Against Rheumatism 2014、フランス(パリ)、査読有、2014 年 6 月 11~14 日

Inoue A, Matsumoto I, Umeda N, Tanaka Y, Takai C, Takahashi S, Sumida T.: TNF $\alpha$ -induced adipose-related protein (TIARP) functions as a negative regulator of inflammatory process in arthritis. 15<sup>th</sup> international congress of immunology、イタリア(ミラノ)、査読有、2013 年 8 月 22~27 日

井上明日香, 松本功, 梅田直人, 田中勇希, 倉島悠子, 川口星美, 高橋智, 住田孝之: TIARP suppresses the migration of neutrophils via CXCR1/2-CXCL2 pathway in autoimmune arthritis, 第 43 回日本免疫学会総会 (京都)、査読有、2014 年 12 月 10~12 日

井上明日香, 松本功, 梅田直人, 田中勇希,

高井千夏、倉島悠子、高橋智、住田孝之：  
TIARP suppresses the migration of  
neutrophils in arthritis via the reduced  
CXCL2/CXCR2 expression、第 58 回日本  
リウマチ学会総会・学術集会（東京）、査  
読有、2014 年 4 月 24~26 日

**井上明日香**、松本功、梅田直人、田中勇希、  
高井千夏、倉島悠子、高橋智、住田孝之：  
TIARP suppresses the migration of  
neutrophils and the proliferation of  
fibroblast-like synoviocytes via regulation  
of CXCL2/CXCR2 pathway、第 42 回日本  
免疫学会総会（千葉）、査読有、2013 年 12  
月 11~13 日

**井上明日香**、松本功、梅田直人、田中勇希、  
高井千夏、高橋智、住田孝之：  
NF- $\kappa$ B/STAT3 シグナル抑制を介した  
TIARP による関節炎制御、第 57 回日本リ  
ウマチ学会総会・学術集会（京都）、査読  
有、2013 年 4 月 18~20 日

〔図書〕（計 1 件）

**井上明日香**、松本功、住田孝之：マウス  
関節炎発症における TNF $\alpha$ -induced  
adipose-related protein (TIARP)の役割、リ  
ウマチ科、査読無、第 50 号、pp. 132-137、  
2013

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 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 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 明日香 （INOUE, Asuka）

筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：8063522

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：