

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860317

研究課題名(和文)新規ケモカイン受容体会合分子フロントによる慢性炎症性疾患の分子制御

研究課題名(英文)Molecular regulation of chronic inflammatory disease by a novel chemokine-receptor associating protein FROUNT

研究代表者

遠田 悦子(TODA, Etsuko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：00589327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチなどの慢性炎症性疾患においては、ケモカインを介した白血球の過剰な集積・浸潤が病態形成に密接に関与している。本研究ではケモカインシグナル促進分子FROUNT(フロント)の関節リウマチにおける役割について解析を行った。FROUNTを欠損したマウスでは関節リウマチの発症および重症化が改善され、免疫誘導期および炎症期の双方への関与が示唆された。またマクロファージの減少と、T細胞サブセットにおけるTregの増加およびTh17の減少が認められ、関節炎に関連する免疫応答が減弱することが明らかになった。以上より、FROUNTは関節炎発症および重症化に重要な役割を担っていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Chemokines and chemokine receptors play important roles in the recruitment of leukocytes to inflammation sites in inflammatory diseases including rheumatoid arthritis. In this study, we investigated the role of FROUNT, an up-regulator of chemokine signaling, in the onset and progression of rheumatoid arthritis. FROUNT deficient mice exhibited decreases in the rate of onset and severity of collagen-induced arthritis. Our data suggest that FROUNT is involved in both immune response to collagen and inflammatory phase in the disease course of arthritis. FROUNT-deficient mice exhibited decreases in a subset of macrophages and Th17 subset and increases in Treg subset in CD4 T cell population. Thus, a chemokine signal up-regulator FROUNT has turned out to be a promising target for rheumatoid arthritis to lessen arthritis-related immune response and inflammation.

研究分野：免疫生物学

キーワード：ケモカイン ケモカイン受容体 慢性炎症性疾患 関節リウマチ FROUNT

1. 研究開始当初の背景

炎症性疾患においては白血球の過剰な集積・浸潤が病態形成に密接に関与している。白血球の移動に中心的な働きを担うのが遊走因子ケモカインとケモカイン受容体である。炎症時の白血球の移動を適切に制御することにより、炎症反応の場の形成を調節し、疾患の根本治療につながることを期待されるが、未だこのようなコンセプトに基づく治療法は実現していない。

FROUNT は炎症性ケモカインの受容体である CCR2 および CCR5 に結合し、細胞遊走シグナルを正に制御する (Toda et al. *J. Immunol.* (2009) 183:6387-94, Toda et al. *Biochem J.* (2014) 457(2):313-22, Terashima et al. *Nat. Immunol.* (2005) 6:827-35)。FROUNT が作用する CCR2 と CCR5 はマクロファージや一部の T 細胞などに発現しており、FROUNT はこれらの細胞の細胞遊走への促進的作用を介して炎症・免疫応答の促進に関与している可能性が考えられる。関節リウマチは関節滑膜に生じた炎症・免疫反応により関節の痛みや腫脹、重症化すると関節破壊に至る自己免疫疾患である。未だ発症の原因は解明されておらず、関節炎発症・悪化の機序にもとづく安全で安価な治療法が求められている。これまでに CCR2 および CCR5 の欠損マウスを用いた解析では関節炎の悪化と改善のいずれの報告もあり (*J. Clin. Invest.* (2004) 113:856-866, *Cytokine* 31 (2005) 64e71, *J Immunol* (2004) 172:890-898)、これら受容体に関連し、より根本原因を担う調節分子の存在が示唆される。本研究ではこれら両方の受容体に作用する FROUNT に着目した解析を実施する。

2. 研究の目的

本研究ではフロント欠損が関節リウマチの病態に与える影響を解明することを目的として、コラーゲン誘発性関節リウマチにおけるフロント欠損がもたらす病態変化を明

らかにする。さらにフロント欠損によって病態変化を引き起こす責任細胞の特定、フロントが関与する病態形成時期の特定および免疫学的、組織学的解析から、関節リウマチの発症機構に関する新たな知見を得ると共に、フロントの関節リウマチ治療標的としての可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) FROUNT 遺伝子欠損条件および CIA 発症条件の検討

FROUNT 欠損がコラーゲン誘発性関節リウマチ (CIA) の病態に与える影響を解析するにあたり、FROUNT 完全欠損マウスは胎生致死を示すことから、タモキシフェン投与により FROUNT 遺伝子を全身性に欠損させる FROUNT コンディショナル欠損マウス (C57BL/6 系統) を作製した。CIA はタイプ II コラーゲンをアジュバントとともに尾底部に皮下投与することにより初回免疫を行ったのち、3 週間後に同様に 2 回目の免疫を行うことで発症させた。コラーゲン抗体誘導関節炎モデル (CAIA) ではコラーゲン抗体カクテルを尾静注し、3 日後に LPS を腹腔内投与することにより関節炎を発症させた。

(2) フロント欠損による関節炎病態変化

関節炎のスコアリングおよび四肢の厚みの測定を行い、病態の経時変化を解析した。エンドポイントは 2 回目免疫より 3 週間とし、関節組織、末梢血、脾臓および所属リンパ節組織を採取し、組織学的解析、細胞機能解析に用いた。

(3) 免疫学的、組織学的解析からの関与細胞の特定

脾臓、所属リンパ節および末梢血の免疫細胞の構成をフローサイトメトリーにより解析した。また脾臓細胞およびリンパ節の細胞を TCR 刺激 (CD3+CD28) または II 型コラー

ゲン刺激存在下にて培養し、48時間～72時間後の細胞の増殖およびサイトカイン産生を解析した。関節組織についてはマイクロCT画像を取得し、骨の形状の画像解析より骨破壊の状態を定量した。

(4) フロントが関与する関節炎病態ステージの特定

免疫したコラーゲンに対する抗コラーゲン抗体を含む免疫応答の誘導期と再免疫に対する炎症応答からなるCIAモデルに加えて、抗コラーゲン抗体を投与することで関節炎を惹起する炎症期モデルについても FROUNT の欠損による影響を解析することによって、FROUNT の関与する関節炎病態ステージを特定する。

4. 研究成果

(1) FROUNT 遺伝子欠損条件および CIA 発症条件の検討

FROUNT 遺伝子のコンディショナル欠損マウスを準備し、タモキシフェンを5日連続腹腔内投与することにより欠損を誘導した。欠損を誘導した FROUNT 欠損マウスおよびコントロールマウスに CIA を誘導した。一般に C57BL/6 系統では CIA 誘導効率が低いいため、誘導条件の検討を行った。欠損誘導条件およびコラーゲン免疫誘導条件を検討し、関節炎を確実に発症し、安定して欠損誘導の表現型が観察される条件を最適化した。タモキシフェン用量、使用するマウスの週齢、コラーゲン量および免疫部位の条件を検討し、7割のマウスにおいて関節炎の発症を認めた。

(2) フロント欠損による関節炎病態変化

上記最適化した条件にてフロント誘導型欠損マウスにおいて関節炎を誘導し、病態の経時変化を観察した。その結果、フロント誘導型欠損マウスにおいて、コントロール群に対して発症率の有意な低下が認められた。関

節炎スコアの比較においては、フロント欠損により関節炎の重症度が顕著に改善された。関節炎による関節の腫脹を定量した結果では、フロント欠損マウスにおいて有意に関節の腫脹が抑えられていた。以上より、フロント欠損によりコラーゲンにより誘発される関節炎の発症および進行が著しく抑制されることが判明した。

(3) 免疫学的、組織学的解析からの関与細胞の特定

細胞ポピュレーション解析

関節炎を誘導したフロント欠損マウスにおいて、リンパ節および脾臓・末梢血における制御性T細胞サブセットやマクロファージサブセットなど種々の白血球サブセットをフローサイトメトリーにより解析した結果、脾臓においてマクロファージサブセットの構成に変化が認められ、また Foxp3+ 制御性T細胞が増加していた。

コラーゲン刺激に対する応答解析

関節炎発症マウス由来の脾臓細胞をコラーゲン存在下で培養したのちに細胞を回収し、増殖応答および細胞内染色により細胞内サイトカインの発現量を解析した。増殖応答については、コントロールマウス、FROUNT 欠損マウス由来細胞ともにコラーゲン未免疫マウス由来細胞に対してコラーゲン免疫マウス由来細胞で増殖応答が亢進しており、FROUNT 欠損条件においてもコラーゲンに対する免疫応答が誘導されていることが示された。一方、FROUNT 欠損マウス由来のT細胞では IL-17 産生細胞の割合が低下していた。また TCR 刺激を行った場合にはコントロールと同等の応答を示したため、FROUNT 欠損によりT細胞の応答性は保持されているもののコラーゲン特異的な免疫応答が減弱していることが示された。

組織学的解析

関節部位の骨組織解析用のサンプルを作

製し、関節炎誘導時の骨表面の性状変化の定量解析を行った結果では、フロント欠損マウスにおいて特徴的な変化を認め、骨破壊が軽減されることを見出した。

(4)フロントが関与する関節炎病態ステージの特定

コラーゲン抗原に対する免疫応答誘導を介さない抗コラーゲン抗体投与による関節炎モデル(CAIA)を用いて FROUNT 欠損の影響を評価した。CIA モデルと同様に、FROUNT 欠損マウスで著明な関節炎発症の低下が認められた。このことから、FROUNT は炎症期においても重要な働きを担っていることが示された。In vitro の細胞応答解析においてはコラーゲン特異的免疫応答にも FROUNT が関与する結果を得ていることから、FROUNT は関節炎において免疫応答誘導および炎症期のいずれにも関与していることが示唆された。

以上より、FROUNT は関節炎発症および重症化に重要な役割を担っていることが示された。今後、FROUNT 欠損により変化する免疫細胞サブセット間の関連について解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

遠田悦子、寺島裕也、松島綱治 「ケモカインシグナル」生体の科学：特集：細胞シグナル操作法 Vol 66 (5):412-413, 2015 2015 年 10 月 15 日発行 (査読無)

〔学会発表〕(計 5 件)

遠田悦子、細胞動態の分子メカニズムに着目した疾患の診断/治療/予防法の研究開発、ケモカイン受容体会合分子の機能解析と阻害化合物の開発研究(口頭・招待講演)、第 87 回日本衛生学会学術総会若手シンポジウム、2017 年 3 月 26-28 日、シーガイア・コンベンションセンター(宮城県・宮崎市)

Etsuko Toda, Yuya Terashima, Kaori Esaki, Sosuke Yoshinaga, Hiroaki Terasawa and Kouji Matsushima, A therapeutic target site in inflammatory chemokine receptors which is essential for FROUNT-mediated chemotactic signaling, Keystone Symposia Conference –PI3K Pathways in Immunology, Growth Disorders and Cancer, (Santa Fe, USA) January 19-23, 2017

Etsuko Toda, Yuya Terashima and Kouji Matsushima, A chemokine-signaling modulator FROUNT as a novel molecular target for cancer therapy. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6-8 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

遠田悦子、寺島裕也、松島綱治、生体における細胞遊走促進因子 FROUNT の発現量変化と白血球遊走活性の解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25-27 日、仙台国際センター・東北大学(宮城県・仙台市)

Etsuko Toda, Yuya Terashima, Kaori Esaki, Sosuke Yoshinaga, Hiroaki Terasawa and Kouji Matsushima, A binding element for a chemotaxis regulatory molecule FROUNT in macrophage chemokine receptors. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages (ICCIM) 2015 2015 年 7 月 9- 11 日 伊藤謝恩ホール(東京都・文京区)

〔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〕

所属研究室ホームページ

<http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

遠田 悦子 (TODA, Etsuko)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00589327

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

寺島 裕也 (TERASHIMA, Yuya)

南木 敏宏 (NANKI, Toshihiro)