

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09518

研究課題名(和文) 関節炎における炎症性サイトカインと自己免疫応答相互の制御

研究課題名(英文) Pathogenetic relevance of inflammatory cytokines and autoimmunity in arthritis

研究代表者

松本 功 (Matsumoto, Isao)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30343081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：STEAP4及びExon3欠損バリエーションの発現及び機能を関節リウマチ患者(RA)単球で解析した。両者ともRA単球で特異的に発現が上昇し、CRPと発現形態がリンクしていた。また、STEAP4及びバリエーションをTHP-1に遺伝子導入し機能解析を行い、バリエーション移入細胞ではLPS刺激によるIL-6が著減した。これらより、バリエーションもRAにおいて炎症性サイトカインのコントロールに重要な役割を果たすことが明らかにされた。また、RA患者において、抗CCG7抗体のみが3種類の有効な生物学的製剤加療後に低下することを明らかにし、疾患活動性を評価できる自己抗体である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression and the function of six-transmembrane epithelial antigen 4 (STEAP4) and its exon3 spliced variant in human monocytes, and identified specific expression and relation to CRP in patients with rheumatoid arthritis (RA). To reveal the function of STEAP4 and its variant, we established overexpressed THP-1 cell line, and proved that IL-6 was significantly downregulated by LPS stimulation in exon3 variant-overexpressed lines, with the change of NF- κ B and STAT3 pathways. These findings suggest that STEAP4 variants also have pivotal role controlling inflammatory cytokines in RA. In addition, anti-citrullinated GPI-peptide 7 antibodies were specifically decreased by 3 kinds of effective biological treatment in patients with RA, suggesting one of the new biomarkers reflecting disease activity in RA.

研究分野：膠原病・リウマチ・アレルギー

キーワード：関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

A) 関節リウマチ(RA)において、TNF、IL-6 アンタゴニストは有効性が顕著で、治療体系を大きく変革させた。しかしながら病因に関して、どちらの製剤が有効であるか、またそのリンクなど、病因に関しては未だ不明点が多い。研究代表者らは、TNFa, IL-6 両者に依存性と考えられる GPI 誘導関節炎を用いて、TNFa-induced adipose related protein (TIARP) を同定し、TIARP-欠損マウス(C57BL/6 背景)を独自に作成し、関節炎を自然発症することを報告した。

また、ヒトホモログである Six-transmembrane of epithelial antigen of prostate4 (STEAP4)にも着目し、末梢血において、STEAP4 の強発現細胞は単球であり、STEAP4 の発現挙動は TNF 阻害剤、IL-6 阻害剤によって減弱し、特に有効性が高い群でその低下が顕著であった。

本研究申請では関節炎炎症の病態中心である単球により着目し、治療応用を検討する。

B)抗環状シトルリン化蛋白抗体(ACPA)はRA診断に重要な検査であり、関節破壊の予後を規定すると考えられているが、病勢とのリンクや病因的意義は未だ明らかでない。また ACPA は、その産生メカニズムや対応抗原に関しても不明点が多い。我々は環状シトルリン化 GPI (CCG) 抗体が、RA 患者で特異的に見出され、TNF 阻害剤などのバイオ治療有効患者でより抗体価が低下する傾向が認められ、抗 CCG 抗体は新たな自己抗体として特異的診断及び疾患活動性のマーカーになりうる可能性を明らかにしてきた。しかしながら、RA 患者では診断時点ですでに ACPA は発現上昇があり、その産生・制御機構の解明には動物モデルが必要である。我々は上記 GPI 誘導関節炎でも ACPA が上昇することを見出し、その産生制御メカニズムを探索する。

2. 研究の目的

A)関節炎における TIARP/STEAP4 蛋白及びバリエーションの病因的意義

TIARP/STEAP4 にはバリエーションが存在する。全長、Exon3 欠損の2種類のSTEAP4をレンチウイルスベクターで単球細胞系ラインである THP-1 に過剰発現させ、シグナル伝達における機能的な解析やバリエーションの発現意義について探索する。

また、RA 患者 CD14 陽性細胞に STEAP4 の発現が強いことが判明している。STEAP4 及びバリエーションの末梢血での発現変動や臨床的パラメーターとの比較統合を行い、RA 病態とのリンクを検討していく。

B)抗シトルリン化蛋白抗体(抗環状シトルリン化 GPI 抗体を含む)の産生制御メカニズム

RA の自己抗体で ACPA の重要性は明らかであ

るが、産生制御を考える適切なモデルが存在しない。我々は GPI ペプチド誘導関節炎(pGIA)において、ACPA 及びシトルリン化蛋白上昇を認め、その病因的意義と制御機構の探索を行う。pGIA では抗 CCP 抗体が早期から上昇することが我々の検討で判明している。経時的に皮膚・関節・肺・腸管・末梢血などでのシトルリン化蛋白を解析し、発現局所の PAD2,4 遺伝子・蛋白の発現についても経時的に観察し、どのように ACPA 産生が誘導されるかを検索する。

3. 研究の方法

A) STEAP4 には Exon3 欠損バリエーションが存在する。RA 患者、健常人の末梢血単球における STEAP4 及び Exon3 欠損バリエーションを定量 PCR で比較検討し、臨床的パラメーターとのリンクを検索する。

また、機能解析のため全長、Exon3 欠損2種類のSTEAP4のクローニング、シークエンスを行う。その2種類をレンチウイルスベクターを用いて THP-1 細胞に過剰発現させる。LPS 刺激時のサイトカイン産生や、シグナル伝達における機能的な解析を模索し、バリエーションの発現意義について探索する。

B)抗 CCG 抗体の変動を生物学的製剤である TNF 阻害薬、IL-6 阻害薬、CTLA-4lg 治療前後で比較し、変動を確認する。対象として、代表的な ACPA である CEP-1 抗体を用いる。また、ACPA を抗原で affinity purify し、関節滑膜での発現細胞を免疫染色で同定を試みる。また、皮膚・関節・肺・腸管などでのシトルリン化蛋白の発現を経時的に観察し、シトルリン化蛋白産生の中心細胞を免疫染色で同定する。局所の PAD2,4 遺伝子や蛋白の発現についても検討し、シトルリン化蛋白と比較解析することによりどのように ACPA 産生が起きるかを模索する。

4. 研究成果

A) STEAP4 及び Exon3 欠損バリエーションの発現をヒト単球で解析し、両者とも関節リウマチ患者で特異的に発現が上昇し、CRP と発現形態がリンクしていた。機能解析のため、STEAP4 及びバリエーションを THP-1 に遺伝子導入し、バリエーション移入細胞では LPS 刺激による IL-6 が著減し、TNFa は著増した。これらは NF-kB や STAT3 経路の変調による発現変動と考えられ、バリエーションも炎症性サイトカインのコントロールに重要な役割を果たすことが明らかにされた (Ebe H, et al. Clin Exp Immunol .2018)。

B) ヒト ACPA をアフィニティー生成し、関節局所でのシトルリン化タンパク産生細胞は CD68 陽性細胞であることを明らかにした。また、3種類のバイオ製剤すべて(infliximab, tocilizumab, abatacept)で治療により抗 CCG7 抗体のみが低下することを明らかにし、

疾患活動性を評価できる自己抗体である可能性が示唆された (Umeda N, et al. Modern Rheumatol. 2017)。

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Ebe H, *Matsumoto I, Kawaguchi H, Kurata I, Tanaka Y, Inoue A, Kondo Y, Tsuboi H, Sumida T. Clinical and functional significance of STEAP4-splice variant in CD14⁺ monocytes in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 191:338-348, 2018 (査読有)
2. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Takahashi H, Hirota T, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T. Comparison of the performance of new ACR-EULAR classification criteria for primary Sjogren's syndrome with former sets of criteria in Japanese patients. Ann Rheum Dis 76:1980-1985,2017(査読有)
3. Umeda N, *Matsumoto I, Tanaka Y, Kawaguchi H, Ebe H, Kagami Y, Ishigami A, Sumida T. Anti-cyclic citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide -7 (CCG-7) antibodies were suppressed by biologics treatment and deposited to citrullinated proteins in CD68-positive cells in the RA synovium. Mod Rheumatol. 27:914-916,2017(査読有)
4. Iizuka-Koga M, Asashima H, Ando M, Lai C-Y, Mochizuki S, Nakanishi M, Nishimura T, Tsuboi H, Hirota T, Takahashi H, Masumoto I, Otsu M, Sumida T.: Functional analysis of dendritic cells generated from T-iPS cells from CD4⁺ T cell clones of Sjogren's syndrome. Stem Cell Reports 8:1155-63,2017 (査読有)
5. Inoue A, *Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Takai C, Kawaguchi H, Ebe H, Yoshida H, Matsumoto Y, Segawa S, Takahashi S, Sumida T. TIARP attenuates autoantibody-mediated arthritis via the suppression of neutrophil migration by reducing CXCL2/CXCR2 and IL-6 expression. Sci Rep 6:38684, 2016 (査読有)
6. Umeda N, *Matsumoto I, Kawaguchi H, Kurashima Y, Kondo Y, Tsuboi H, Ogishima H, Suzuki T, Kagami Y, Sakyu T, Ishigami A, Maruyama N, Sumida T. Prevalence of soluble peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) and anti-PAD4 antibodies in autoimmune diseases. Clin Rheumatol 35:1181-1188, 2016 (査読有)
7. Yoon JH, Sudo K, Kuroda M, Kato M, Lee I, Nakae S, Imamura T, Kim J, Ju JH, Matsuzaki K, Matsumoto I, Sumida T, Mamura M. Phosphorylation status determines the divergent roles of TGF- β receptor-regulated Smad in STAT3-induced TH17 differentiation. Nat Commun. 6:7600, 2015 (査読有)
8. Seri Y, Shoda H, Suzuki A, Matsumoto I, Sumida T, Fujio K, Yamamoto K. Peptidylarginine deiminase type 4 deficiency reduced arthritis severity in a glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis model. Sci Rep 21;5:13041, 2015 (査読有)
9. 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(査読有)
10. 松本功 関節リウマチ滑膜における TIARP の意義 Keynote R・A,

5:17-21, 2017

11. 松本功、井上明日香、高井千夏、住田孝之 TNF- α 誘導蛋白 TIARP の関節炎制御メカニズム 炎症と免疫 炎症と免疫 23: 351-355, 2015

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 松本功: Pathogenic autoimmune reaction and new therapeutic avenue of rheumatoid arthritis 第46回日本免疫学会学術集会クリニカルセミナー(仙台) 2017
2. 松本功: TNF誘導蛋白(TIARP)による関節炎制御メカニズム 第2回日本骨免疫学会シンポジウム(沖縄) 2016
3. 松本功: 関節リウマチにおけるTNF α の病因論とその阻害メカニズム 第37回日本炎症・再生医学会教育講演11(京都) 2016
4. 松本功: 関節リウマチ研究の臨床応用～炎症細胞の制御に向けて～ 第26回JCR関東支部学術集会(宇都宮) 2015

〔図書〕(計 1 件)

1. 松本功 関節リウマチにおける単球・マクロファージと TNF- α -induced adipose related protein (TIARP) 日本臨床免疫学会雑誌 39: 455-458, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 関節リウマチ診断薬
発明者: 松本功、川口星美、住田孝之
権利者: 筑波大学
種類:
番号: 特願 2018-005038
出願年月日: 2018.1.6
国内外の別: 国内

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
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-medicine/rheumatology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者 松本 功
(MATSUMOTO Isao)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 30343081

(2)研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

〔その他の研究協力者〕
()