

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18390290
 研究課題名（和文） 関節炎抑制蛋白によるリウマチ性疾患の病態解析と新規治療法開発に関する研究

研究課題名（英文） Analysis of pathophysiology and novel therapeutic approach for rheumatic diseases by arthritis-regulated proteins

研究代表者

三森 経世 (MIMORI TSUNEYO)

京都大学・大学院医学研究科・内科学講座臨床免疫学・教授

研究者番号： 10157589

研究成果の概要： 本研究は、以前に見出した関節リウマチ (RA) の新たな自己抗体である抗カルパスタチン抗体と抗 FRP 抗体の対応抗原がいずれも関節炎抑制作用を示したことから、これらの自己抗体が RA の発症と増悪に関与する病原性自己抗体ではないかと考え、これら自己抗体および自己抗体の制御によって関節炎を治療できる可能性を追求した。カルパイン (カルシウム依存性中性プロテアーゼ) の特異的インヒビターであるカルパスタチンは線維芽細胞の IL-6 産生を抑制するだけでなく、T 細胞分化にも影響することが判明した。関節炎モデルにおいてはカルパスタチンは炎症を抑制しカルパインは増強した。フォリスタチン関連蛋白 (FRP) はヒトとマウスで炎症の制御に関して異なる働きを有する可能性が示唆され、マウス関節炎に対してヒト FRP は抑制したが逆にマウス FRP は増強した。これらの炎症制御蛋白の解析により関節炎病態の理解と新たな治療法開発の可能性が示唆される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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： 関節リウマチ、自己抗体、カルパイン、カルパスタチン、FRP、コラーゲン誘発関節炎

1. 研究開始当初の背景

膠原病は原因不明の多臓器を障害する全身炎症性疾患で、多彩な自己免疫現象を伴う自己免疫疾患である。膠原病の一種である関節リウマ

チ (Rheumatoid Arthritis: RA) は骨破壊性の多発関節炎を主症状とし、全身の様々な臓器障害を伴う原因不明の全身性炎症疾患で、我が国の患者数は約70万人と推定されている。関節の痛み

とともに関節の変形・拘縮が進行して機能障害を残し、日常生活・QOLが大きく制限される。

RAはリウマトイド因子 (IgGに対する自己抗体) の存在より自己免疫疾患と考えられるにも関わらず、他の膠原病のような疾患特異的標識抗体の報告は少ないのが現状であった。我々はRA特異的自己抗体の検出をめざして、RA患者血清と反応する自己抗原をコードするcDNAを分離・解析したところ、そのうちの1つがカルシウム依存性システインプロテアーゼ (カルパイン) の特異的内在性阻害因子であるカルパスタチンと判明した。抗カルパスタチン抗体はRAでの陽性率が81%と高く、RA以外のリウマチ性疾患よりも有意に高頻度であることが確認された。カルパインは炎症に関与する様々な因子の活性化を司り (プロテインキナーゼC活性化、IL-1 活性化、I κ B分解によるNF- κ B活性化、白血球遊走因子生成など)、また軟骨基質のプロテオグリカンを分解することが報告されており、RA患者の滑膜や関節液内ではカルパインが増加していることから、カルパインがRAの病態とも関与する可能性が指摘されていた。我々はRA患者の抗カルパスタチン抗体陽性血清中のIgG分画が*in vitro*でカルパスタチンの機能を抑制してカルパイン活性を上昇させることを確認しており、かかる成績は抗カルパスタチン抗体がRAの新しい診断マーカーとして有用なばかりでなく、同抗体がRAの組織破壊や炎症の惹起に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。さらに、カルパイン阻害物質E-64-dを抗コラーゲン抗体誘発関節炎マウスに投与すると関節炎の発症が有意に抑制されることを見だし、カルパイン活性の抑制がヒトRAの治療に応用できる可能性を示唆した。

2. 研究の目的

申請者らはRAで見出された自己抗体の臨床的意義および病因的意義を追求するとともに、その自己抗原となるカルパイン・カルパスタチ

ン系のRA関節骨破壊における役割を追究し、RAの新たな治療戦略の確立を目指している。かかる背景と成績をもとに、これまでの成果をさらに発展させて膠原病・リウマチ性疾患患者のカルパイン活性を制御し、また病原性自己抗体産生を制御することによって、膠原病・リウマチ性疾患の新しい治療戦略をめざす。このためには、入念な基礎的・動物実験が必要であるため、本研究では、1)滑膜細胞のサイトカイン産生におけるカルパイン・カルパスタチン系の関与、2)T細胞分化におけるカルパイン・カルパスタチン系の関与、3)カルパスタチン遺伝子導入による遺伝子治療の試み、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) カルパスタチン遺伝子導入による線維芽細胞およびT細胞機能修飾効果の解析

①T細胞におけるカルパインとカルパスタチン発現: BALB/c 脾細胞より磁気ビーズ法でCD4+CD62+T細胞を分離し、Neutral condition (サイトカイン無添加)、Th1 condition (IL-12を5 ng/ml添加)、Th2 condition (IL-4を20 ng/ml添加)で培養し、経時的に細胞抽出物中のカルパインおよびカルパスタチン量をウェスタンブロットで検出した。

②カルパスタチン遺伝子レトロウイルスベクターの作成と感染: IRES (internal ribosome entry site) とGreen fluorescent protein (GFP) 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター

(pBMN-IRES-GFP) にヒトカルパスタチン全長cDNA、またはカルパスタチンのドメインIおよびドメインIVにおけるサブドメインA、B、CをカバーするcDNA (d1ABCおよびd4ABC)、サブドメインA、BのみをカバーするcDNA (d1ABおよびd4AB) を組み込んで、カルパスタチンとGFPを共発現するレトロウイルスDNAを作成した。これをPhoenix 293T細胞に遺伝子導入することにより、カルパスタチン発現レトロウイルスを作成した。この培養上製をBalb/cマウス

脾細胞のナイーブCD4+CD62+T細胞、およびNIH-3T3線維芽細胞に感染させた。感染細胞中のカルパスタチンの発現はマウス抗カルパスタチン抗体(Santa Cruz Biotechnology, TAKARA)を一次抗体、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を二次抗体に用いたウェスタンブロットで確認した。全長カルパスタチンおよびカルパスタチン各機能ドメインを強制発現させた3T3細胞抽出物中のカルパスタチン活性を、カゼインを基質としたカルパインの蛋白分解作用に対する阻害活性を測定することによって検討した。

③カルパスタチン過剰発現線維芽細胞におけるサイトカイン産生の解析： NIH-3T3細胞にカルパスタチンドメイン発現レトロウイルスを感染させて培養し、day7~9に 5×10^5 /wellを撒き、LPS 1 μ g/mlを添加した。これをさらに30時間培養し、上清中のIL-6、TNF α 、IL-1 β をELISAにより測定した。

④カルパスタチン過剰発現CD4+T細胞におけるサイトカイン産生の解析： Balb/c 脾細胞より磁気ビーズ法で分離したCD4+CD62+T細胞 5×10^5 /wellを撒き、Neutral condition (サイトカイン無添加)、Th1 condition (IL-12を5 ng/ml添加)、Th2 condition (IL-4を20 ng/ml添加)で培養し、翌日カルパスタチンドメイン発現レトロウイルスを感染させた。day4にPMA/Ionomycinで刺激し、IFN- γ 、IL-4、およびIL-6のサイトカイン産生能をFACSで解析した。

⑤ カルパスタチン発現T細胞移入による関節炎抑制の検討

II型コラーゲン (CII) および完全フロイントアジュバント (CFA) で免疫したDBJ/1Jマウスより免疫後9日目にドレナージリンパ節および脾臓よりCD4+T細胞を分離し、カルパインおよびカルパスタチンドメインIV cDNA組み換えレトロウイルスを感染させた。これを7日間培養し、CII+CFAで免疫したDBJ/1Jマウスに免疫後7日目に 1×10^6 個を移入し、その後の関節炎発症にお

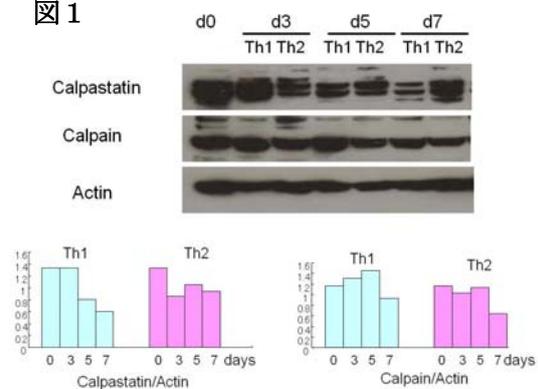
ける影響を検討した。

4. 研究成果

(1) カルパスタチン遺伝子導入による線維芽細胞およびT細胞機能修飾効果の解析

①CD4+T細胞におけるカルパスタチン発現の経時的变化： Th1条件ではカルパイン発現がほとんど変化なかったのに対して、5日目以後のカルパスタチン発現は著明に減少していた。これに対して、Th2条件では培養7日目のカルパイン発現に減少傾向が認められたが、カルパスタチンの発現にはほとんど変化がなかった(図1)。

図1



②レトロウイルス感染CD4+T細胞におけるカルパスタチン発現の確認と活性の測定：

Balb/cの脾臓から磁気ビーズを用いてCD4+CD62+T細胞をSortし、カルパスタチン発現レトロウイルスを感染させた。全長カルパスタチン感染T細胞ではカルパスタチン発現率が経時的に速やかに減少した。このため解析は困難と判断して、最小機能ドメインをクローニングすることとした。カルパスタチンの最小機能ドメインのいずれを用いても、カルパスタチン発現率は60-80%以上に保たれており、カルパスタチン高発現T細胞の維持が可能となった。

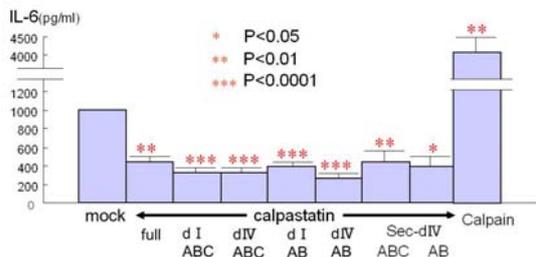
カルパスタチン発現レトロウイルスをPhoenix 293T細胞にtransfectionさせ、Day3にLysateを作成、SDS-PAGE後にウェスタンブロットを行ったところ、カルパスタチン各機能ドメ

インの発現が確認された。また全長カルパスタチン、カルパスタチンドメインを強制発現させた3T3細胞抽出物中のカルパスタチン活性を、カゼインを基質としたカルパインの蛋白分解作用に対する阻害活性を測定し、いずれもMockに比して有意のカルパスタチン活性を認めた。

(図省略)

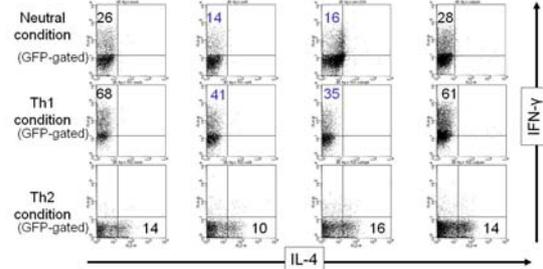
③カルパスタチン過剰発現線維芽細胞におけるサイトカイン産生の解析： NIH-3T3細胞にカルパスタチンドメイン発現レトロウイルスを感染させて培養し、LPS刺激後の上清中のサイトカイン発現を測定した。カルパスタチンおよびカルパスタチン機能ドメインいずれを感染させたNIH-3T3細胞においてもIL-6産生の有意な抑制が認められ、カルパインにより著明なIL-6再生増加が認められた(図2)。IL-1 β とTNF α の測定も同時に行ったがいずれも感度以下で検出できなかった。

図2



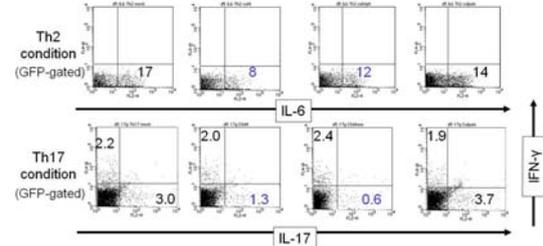
④カルパスタチン過剰発現CD4+T細胞におけるサイトカイン産生の解析： Balb/c 脾細胞より分離したCD4+CD62+T細胞をNeutral condition (サイトカイン無添加)、Th1 condition (IL-12添加)、Th2 condition (IL-4添加)で培養し、カルパスタチンドメイン発現レトロウイルスを感染後、PMA+Ionomycinで刺激し、種々のサイトカイン産生能をFACS解析した。Neutral conditionおよびTh1 conditionではカルパスタチン産生細胞においてINF- γ の有意な低下が認められたが、Th2 conditionではIL-4産生に有意の変化はなかった(図3)。

図3



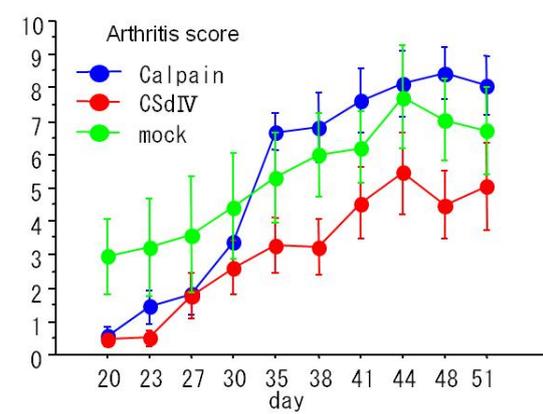
同様にIL-6産生能をFACSで解析したところ、Th1およびTh2 conditionのいずれにおいてもカルパスタチン発現によりIL-6産生の抑制がみられ、Th17条件下でのIL-17産生はカルパスタチン発現により減少が認められた(図4)。

図4



⑤カルパインおよびカルパスタチンの関節炎に及ぼす影響： カルパスタチン活性ドメイン過剰発現T細胞を移入したマウスでは関節炎の発現が有意に抑制された。これに対して、カルパイン過剰発現T細胞を移入したマウスでは関節炎発現が有意に増強された(図5)。

図5



考察

我々は以前にRA患者より新たな自己抗体である抗カルパスタチン抗体と抗FRP抗体を見出

し、それらの対応抗原がいずれも関節炎抑制作用を発揮することから、これらの自己抗体がRAの発症と増悪に關与する病原性自己抗体ではないかと考えた。そこで、これらの自己抗原および自己抗体の制御によって関節炎を制御することが可能ではないかと考え本研究を遂行した。

レトロウイルスベクターにカルパスタチンおよびその機能ドメイン遺伝子を組み込むことによって、マウスの線維芽細胞とCD4+T細胞にカルパスタチンを強制的に過剰発現させることに成功した。全長cDNAよりもむしろ低分子である機能ドメインの導入によって効率良い発現と有意のカルパインの抑制作用が確認された。

このシステムにより線維芽細胞 (NIH-3T3細胞) にカルパスタチン活性を過剰発現させることにより、IL-6産生の有意な抑制効果が認められた。これは、以前に報告した、カルパイン阻害薬であるE-64-dが滑膜細胞のIL-6産生を抑制して関節炎の発症を抑制する成績⁴⁾を、カルパインの特異的阻害蛋白であるカルパスタチンによって裏付けるものであり、カルパイン自身の阻害が直接これらの事象に關与することが証明された。さらに、マウスCD4+T細胞にカルパスタチン活性を過剰発現させることにより、IFN- γ 、IL-6、IL-17の有意な産生の減少がみられた。このように、カルパスタチンは線維芽細胞のみならず、CD4+T細胞においてもサイトカイン産生抑制効果を示し、カルパインはT細胞の分化や活性化に影響を及ぼしていることが確認された。RAにおいてカルパスタチンに対する自己抗体が存在することは、カルパインによる関節破壊や炎症惹起に直接關与するのみでなく、ナイーブT細胞からエフェクターT細胞への分化を誘導することにより、関節炎悪化に關与している可能性が考えられた。

CIAモデルにレトロウイルスを感染させたCD4+T細胞を移入する系において、カルパインの過剰発現は関節炎を有意に増悪させ、カルパスタチン (活性化ドメイン) は関節炎を抑制す

ることが確認され、カルパインの制御がヒトRAの新たな治療戦略の可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等 【雑誌論文】 (計 14 件)

- ① Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: $\gamma\delta$ T Cells are the predominant source of IL-17 in the affected joints of collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (in press). (査読有)
- ② Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R: Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjogren's syndrome: Significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach. *Auton Neurosci*. *Auton Neurosci*. 146(1-2):33-5, 2009. (査読有)
- ③ Jin ZX, Huang CR, Dong L, Goda S, Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Tong XP, Masaki Y, Fukushima T, Tanaka M, Mimori T, Tojo H, Bloom ET, Okazaki T, Umehara H: Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells. *Int Immunol*. 20(11):1427-37, 2008. (査読有)
- ④ Fujita Y, Fujii T, Nakashima R, Tanaka M, Mimori T: Aseptic meningitis in mixed connective tissue disease: cytokine and anti-U1RNP antibodies in cerebrospinal fluids from two different cases. *Mod Rheumatol*. 18(2):184-8, 2008. (査読有)
- ⑤ Nakayamada S, Saito K, Umehara H, Ogawa N, Sumida T, Ito S, Minota S, Nara H, Kondo H, Okada J, Mimori T, Yoshifuji H, Sano H, Hashimoto N, Sugai S, Tanaka Y: Efficacy and safety of mizoribine for the treatment of Sjogren's syndrome: a multicenter open-label clinical trial. *Mod Rheumatol* 17(6):464-9, 2007. (査読有)

⑥ Mimori T, Imura Y, Nakashima R, Yoshifuji H: Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathy: an update on clinical and pathophysiological significance. *Curr Opin Rheumatol* 19 (6) :523-9, 2007. (査読有)

⑦ Handa T, Nagai S, Miki S, Ueda S, Yukawa N, Fushimi Y, Ito Y, Ohta K, Mimori T, Mishima M, Izumi T: Incidence of pulmonary hypertension and its clinical relevance in patients with interstitial pneumonias: comparison between idiopathic and collagen vascular disease associated interstitial pneumonias. *Intern Med*. 46 (12) :831-7, 2007. (査読有)

⑧ Ito Y, Kawabata D, Yukawa N, Yoshifuji H, Usui T, Tanaka M, Fujii T, Mimori T: Severe subcutaneous generalized edema in a patient with dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 17 (2) :171-3, 2007. (査読有)

⑨ Murakami K, Fujii T, Yukawa N, Yoshifuji H, Kawabata D, Tanaka M, Usui T, Mimori T: Successful treatment of a patient with refractory adult Still's disease by tacrolimus. *Mod Rheumatol* 17 (2) :167-70, 2007. (査読有)

⑩ Hirakata M, Suwa A, Takada T, Sato S, Nagai S, Genth E, Song YW, Mimori T, Targoff IN: Clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase. *Arthritis Rheum* 56 (4) :1295-303, 2007. (査読有)

⑪ Fujita Y, Fujii T, Takeda N, Tanaka M, Mimori T: Successful treatment of primary Sjogren's syndrome with chronic natural killer lymphocytosis by high-dose prednisolone and indomethacin farnesil. *Intern Med*. 46 (5) :251-4, 2007. (査読有)

⑫ Tokunaga M, Saito K, Kawabata D, Imura Y, Fujii T, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Iwata S, Azuma T, Mimori T, Tanaka Y: Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system.

Ann Rheum Dis. 66 (4) :470-5, 2007. (査読有)

⑬ Yoshifuji H, Fujii T, Kobayashi S, Imura Y, Fujita Y, Kawabata D, Usui T, Tanaka M, Nagai S, Umehara H, Mimori T: Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 39 (3) :233-241, 2006. (査読有)

⑭ Miyachi K, Hosaka H, Nakamura N, Miyakawa H, Mimori T, Shibata M, Matsushima S, Chinoh H, Horigome T, Hankins RW, Zhang M, Fritzler MJ: Anti-p97/VCP antibodies: an autoantibody marker for a subset of primary biliary cirrhosis patients with milder disease? *Scand J Immunol* 63 (5) :376-382, 2006. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三森 経世 (MIMORI TSUNEYO)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 10157589

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

藤井 隆夫 (FUJII TAKAO)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号： 70255462

臼井 隆 (USUI TAKASHI)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号： 90362483

田中 真生 (TANAKA MASAO)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号： 10332719

(4) 研究協力者

伊藤 能永 (ITO YOSHINAGA)
京都大学・大学院医学研究科・大学院生

橋本美季子 (HASHIMOTO MIKIKO)
京都大学・大学院医学研究科・大学院生

村上 孝作 (MURAKLAMI KOSAKU)
京都大学・大学院医学研究科・大学院生