

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08895

研究課題名(和文) Pathogenic Role of Atypical Chemoattractant Receptors in Immune Complex-induced Arthritis

研究課題名(英文) Pathogenic Role of Atypical Chemoattractant Receptors in Immune Complex-induced Arthritis

研究代表者

宮部 斉重 (Miyabe, Yoshishige)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：70632313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が開発した組織内でChemoattractant分子を可視化する技術と関節内インビロイメージング技術を駆使し、血管内皮細胞に発現しているシグナル伝達に関与していない"Atypical"な補体受容体 C5aR2が関節組織における補体成分C5aを血管内腔へ輸送している事を見出した。以上から、関節におけるIII型アレルギー反応機序では組織で産生されたC5aは血管内皮細胞に発現しているAtypical補体受容体C5aR2によって血管内腔へ輸送され、循環している好中球に発現しているClassical受容体C5aR1に結合し炎症の起点となる血管内接着を促進し、炎症を惹起している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、補体は血管炎の重要な治療標的であるが、生体内における機能は不明な点が多い。本研究成果は、炎症病態における生体内での補体受容体C5aR2が補体成分C5a輸送に関与し炎症惹起に関与しているという新しい機能を発見し、関節リウマチにおける新しい治療標的となりうる事を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Chemoattractant-induced arrest of circulating leukocytes and their subsequent diapedesis is a fundamental component of inflammation. However, how tissue-derived chemoattractants are transported into the blood vessel lumen to induce leukocyte entry into tissue is not well understood. Our in vivo imaging joints has demonstrated that the atypical complement C5a receptor 2 (C5aR2) expressed on endothelial cells were required for the transport of C5a into the vessel lumen in a murine model of immune complex induced arthritis. Transported C5a was required to initiate C5aR1-mediated neutrophil arrest, igniting joint inflammation. Our findings provide new insights into how atypical chemoattractant receptors collaborate with classical signaling chemoattractant receptors to control distinct steps in the recruitment of neutrophils into tissue sites of inflammation.

研究分野：膠原病内科学

キーワード：細胞遊走 補体 関節炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器・細胞腫毎に免疫細胞の動態は補体成分、ケモカインや脂質メディエーター等の Chemoattractant (CA) 分子によって厳密に制御されている。免疫細胞の遊走制御機構を解明することで、臓器特異的に免疫細胞遊走が制御可能な次世代免疫抑制療法開発に繋がると期待されている。しかし、従来の形態学的解析手法では生体内における免疫細胞の動態を理解するには技術的に限界があった。

そこで、我々は生きたマウスの関節組織における免疫細胞の動態をリアルタイムに解析可能な関節内インビボイメージングシステム (JIVM) を新たに構築した。我々が構築した JIVM を用いた結果、関節炎発症に補体成分 C5a が起点となる新しい III 型アレルギー機序が関与することを発見し、その過程における個々の CA 受容体の役割を明らかにする事に成功した。

一方、循環している免疫細胞を組織へ遊走させるには組織で産生された CA 分子が血管内腔へ輸送される必要がある。しかし、組織で産生された CA 分子がどのように血管内腔へ輸送され、血液中を循環する免疫細胞を炎症局所へ遊走させるか、その機序は未だ不明である。

2. 研究の目的

近年、我々は生体内で CA 分子の動態をリアルタイムに可視化する事にも成功した。本研究は、我々が構築した CA 分子の可視化技と JIVM 駆使して、組織で産生された CA 分子と循環している免疫細胞の動態並びに相互間作用を明らかにすることを目的としている。最終的に炎症病態において免疫細胞の遊走を効果的に抑制する標的を同定し、新たな免疫治療法の基礎を確立する事を目的としている。

3. 研究の方法

- (1) 免疫複合体誘導関節炎、健常マウスの滑膜組織を採取し補体受容体 C5aR2 の発現を qPCR 及びフローサイトメトリーにて解析した。
- (2) 関節炎病態における造血幹細胞及び非造血幹細胞の C5aR2 機能を解析するため、骨髄キメラマウスを作成し、それら骨髄キメラマウスへ関節炎を誘導し、臨床スコア、関節組織の病理学的評価、並びに関節液中の好中球数をフローサイトメトリーにて解析した。
- (3) 好中球が GFP 標識されているマウス (WT-LysM-eGFP マウス) 由来骨髄を X 線照射した C5aR2 遺伝子欠損マウスへ移植し、骨髄キメラマウスを作成した。この骨髄キメラマウスへ関節炎を誘導し、JIVM にて関節組織における好中球の細胞動態をリアルタイムに解析した。
- (4) マウスの関節組織に補体成分 C5a を添加し、好中球の動態を解析する In vivo superfusion アッセイを、上記の骨髄キメラマウスへ実施し、組織中に滴下した C5a を介した好中球遊走に C5aR2 が関与しているのか、解析した。
- (5) 蛍光標識した C5a を作成し、in vivo superfusion assay にて組織中の C5a 運搬に C5aR2 が関与しているか、解析した。

4. 研究成果

- (1) 関節炎マウス及び健常マウス由来の滑膜組織を採取し、qPCR で解析すると関節炎由来滑膜組織では C5aR2 mRNA の発現が上昇していた (図 1A)。滑膜組織から細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて解析すると関節炎由来滑膜組織では CD45⁺CD31⁺血管内皮細胞の表面上に C5aR2 発現が亢進している事を見出した (図 1B, C)。

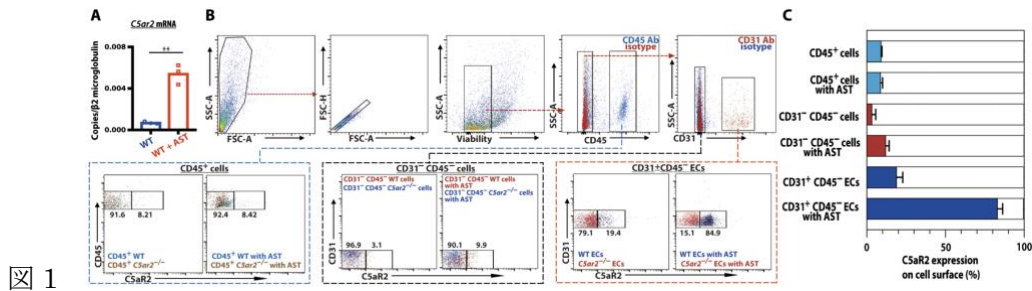


図 1

- (2) さまざまな骨髄キメラを作成した(図 2A)。骨髄キメラマウスでは循環している好中球数に影響は見られず(図 2B)、関節炎を誘導すると非造血幹細胞における C5aR2 遺伝子を欠損させると関節炎が抑制され、さらに関節液中の好中球数も抑制された(図 2C, D, E)。病理学的評価においても同様に炎症性変化の抑制が観察された(図 2F, G)。以上から非造血幹細胞に発現する C5aR2 が関節炎の発症に重要であることが示唆された。

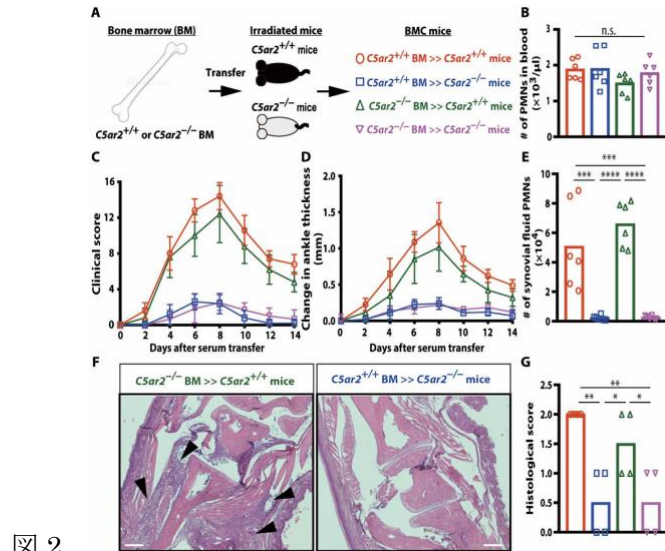
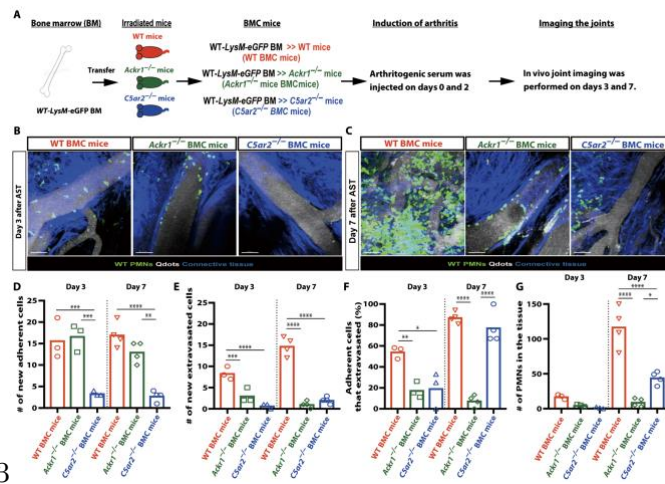


図 2

- (3) ケモカイン受容体 ACKR1 は in vitro で血管内皮細胞上に発現し、ケモカイン CXCL1、CXCL2 などの運搬に関与していることが知られている。非造血幹細胞上の C5aR2 又は ACKR1 遺伝子を欠損させた骨髄キメラマウスを作成した(図 3A)。

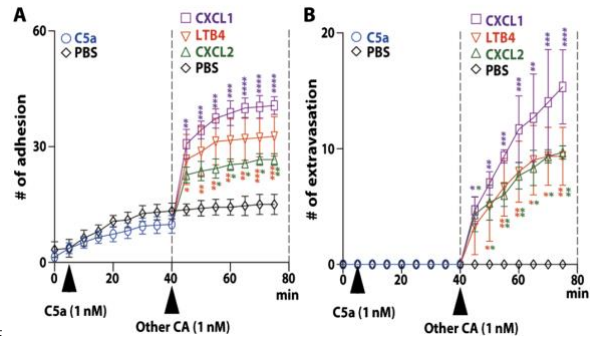
図 3



それら骨髄キメラマウスへ関節炎を誘導し、JIVM にて関節組織における好中球の動態をリアルタイムに解析すると ACKR1 遺伝子欠損骨髄キメラマウスでは好中球は血管壁に接着できるが、組織へ漏出できないのに対して C5aR2 遺伝子欠損キメラマウスでは血管壁に接着すらできなかった(図 3B, C, D, E, F, G)。以上から ACKR1 はケモカインを組織から血管内腔へ運搬し、好中球が組織へ漏出する部分に関与し、C5aR2 は C5a を血管内腔へ運搬し、好中球が血管接着する機序に関与していることが示唆された。

(4) In vivo superfusion アッセイを用いて関節における好中球の動態を解析した。非造血幹細胞の C5aR2 遺伝子を欠損させた骨髄キメラマウスでは補体成分 C5a を添加したときは、細胞接着及び遊走を誘導できなかったが、他の CA 分子に切り

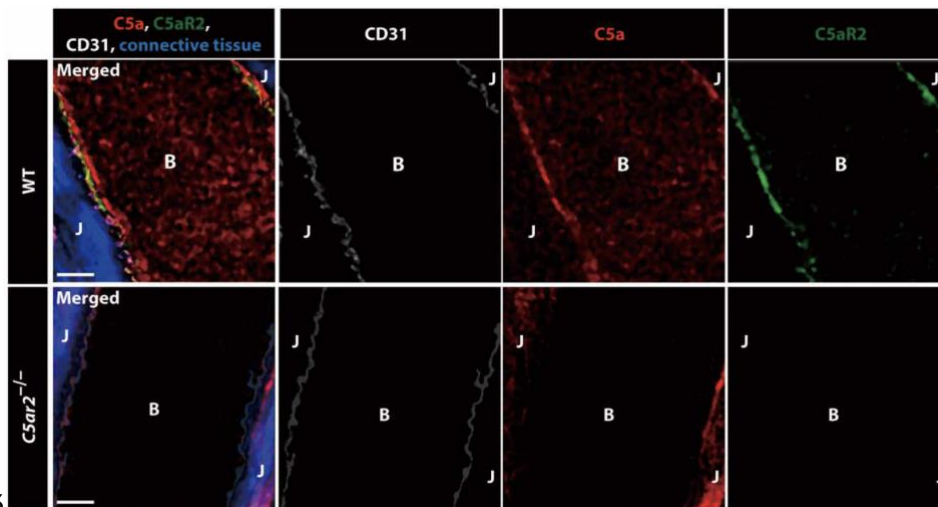
図 4



替えると好中球の接着及び遊走を誘導することができた (図 4 A, B)。以上から、C5aR2 は C5a 特異的な輸送に関与している事が示唆された。

(5) In vivo superfusion アッセイを用いて非造血幹細胞の C5aR2 が C5a 輸送に関与しているか、解析した。C5a を可視化するために蛍光標識した C5a を作成し、組織へ添加した。健康マウスの関節組織では C5a 添加後、血管内腔へ輸送されたが、C5aR2 遺伝子欠損マウスでは組織から血管内腔へ C5a が輸送されなかった (図 5)。

図 5



以上から、血管内皮細胞に発現する補体受容体 C5aR2 は組織で産生された C5a を血管内腔へ輸送し循環している好中球の血管内接着を促進し、炎症を惹起していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyabe Yoshishige, Miyabe Chie, Iwai Yoshiko, Luster Andrew D.	4. 巻 3 (3)
2. 論文標題 Targeting the Chemokine System in Rheumatoid Arthritis and Vasculitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JMA Journal	6. 最初と最後の頁 182 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31662/jmaj.2020-0019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyabe Yoshishige, Lian Jeffrey, Miyabe Chie, Luster Andrew D.	4. 巻 15 (12)
2. 論文標題 Chemokines in rheumatic diseases: pathogenic role and therapeutic implications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Reviews Rheumatology	6. 最初と最後の頁 731 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41584-019-0323-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyabe Yoshishige, Miyabe Chie, Mani Vinidhra, Mempel Thorsten R., Luster Andrew D.	4. 巻 4 (35)
2. 論文標題 Atypical complement receptor C5aR2 transports C5a to initiate neutrophil adhesion and inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 eaav5951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.aav5951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshishige Miyabe
2. 発表標題 Atypical complement receptor C5aR2 transports C5a to initiate neutrophil adhesion and inflammation
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮部 斉重
2. 発表標題 関節でのIII型アレルギー反応機序における補体の新規機能の解析
3. 学会等名 第58回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Liverpool			
米国	Massachusetts General Hospital	Harvard Medical School		