

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790704
 研究課題名 (和文) 樹状細胞－T細胞相互作用における神経伝達物質の役割の解明と RA 治療の新戦略
 研究課題名 (英文) The role of neurotransmitter in DC-T cell interaction and new strategy for treatment of RA
 研究代表者 中野和久 (NAKANO KAZUHISA)
 産業医科大学・医学部・助教
 研究者番号：50406500

研究成果の概要 (和文)：ヒト樹状細胞が神経伝達物質であるドパミンを合成・貯蔵し、抗原特異的な相互作用下でナイーブ T 細胞にドパミンを放出し、IL-6、IL-17 産生を促すことを明らかにした。またヒト化 RA モデルマウスにおいて、ドパミン D1 様受容体阻害薬は滑膜炎を制御し、軟骨破壊も抑制することを明らかにし、ヒトの代表的な自己免疫疾患である RA の病態形成においてもドパミン受容体シグナルが強く関与すること、またドパミン D1 様受容体阻害は RA の治療にも応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)： We revealed that dendritic cells (DCs) were one of sources of dopamine in the synovial tissue of RA. During antigen-specific interaction with naive T-cells, dopamine released by DCs bound to D1-like dopamine receptors, induced differentiation to Th17 cells via IL-6 production. D2-like receptor-antagonists significantly induced accumulation of IL-6- and IL-17-positive T cells with remarkable angiogenesis, increased multiple layers of synovial fibroblast and exacerbated cartilage destruction in SCID-HuRAg mice, whereas antagonizing D1-like-receptor suppressed these responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：関節リウマチ、ドパミン、T細胞分化、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、リンパ球の細胞表面にも神経伝達物質の受容体が発現していることが明らかとなり、「病は気から」に科学的な視点が注が

れるようになった。さらに白血球は神経伝達物質を自ら合成・放出しうることが判明し、神経伝達物質はパラクライン、オートクライ

ンにリンパ球に作用し、免疫修飾作用を有することが明らかとなってきた。

我々はこれまでの研究により、(1) 最も強力な抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC)である樹状細胞 (Dendritic cell; DC)も重要な神経伝達物質であるドパミンを合成・放出しうること、(2)その合成は cAMP 刺激により増幅されること、(3) 抗原特異的な T 細胞との相互作用により、DC から T 細胞に向けてドパミンが放出されること、(4) ナイーブ T 細胞は 5 種類存在するドパミン受容体サブタイプのうち、D1, D5 などの D1 様受容体のみを発現し、ドパミン濃度依存性に Th2 サブタイプに分化することを発見し、ドパミンは「免疫伝達物質」として作用することを明らかにした。

また、この *in vitro* での発見をもとに、多発性硬化症のモデルマウスとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスに対して各種ドパミン受容体サブタイプの阻害薬の効果を検証したところ、D2 様受容体 (D2-D4) 阻害薬が疾患を増悪させたのに対し、D1 様受容体阻害薬が EAE の発症予防効果のみならず、発症後の治療効果も有することが明らかとなった。このマウスへの効果の背景を検討したところ、D1 様受容体阻害薬は IFN- γ 産生 T 細胞サブセットを増加させ、IL-17 産生 T 細胞サブセットを減少させることが判明した。

近年、関節リウマチ (RA) においても、病態形成において IL-17 産生 T 細胞サブセットの増加が大きな役割を果たすことが判ってきた。また一方で、従来の Th1/Th2 パラダイムにおいては RA の発症を誘導すると考えられてきた IFN- γ は、破骨細胞の分化抑制作用や IL-17 産生抑制作用なども有し、病態には保護的に作用することが明らかとなってきた。

2. 研究の目的

RA の滑膜炎部位におけるドパミンをはじめとする神経伝達物質の存在と産生細胞をまずは組織学的に明らかにし、細胞間相互作用におけるその免疫修飾作用を解明する。

また、EAE において、IFN- γ 産生 T 細胞サブセットを増加させ、IL-17 産生 T 細胞サブセットを減少させることで、発症抑制効果にとどまらず発症後の治療効果をも発揮した D1 様受容体阻害薬の RA に対する治療効果を、SCID-hu-RA マウスを用いて明らかにし、疾患制御への展開を目的とする。

3. 研究の方法 (*in vitro*)

(1) 関節手術で得られた RA 患者由来の滑膜組織を固定し、連続切片を作成し、ドパミン抗体を用いて免疫組織染色を行い、ドパミン貯留 DC サブセット、および、その周囲の T 細胞サブセットを同定する。

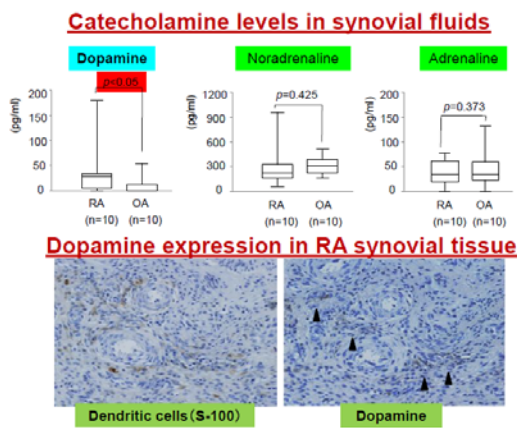
(2) 健常人より CD4 陽性 T 細胞を分離し、ドパミン受容体阻害薬の存在下、非存在下で、PMA + イオノマイシンでの活性化刺激と同時にドパミンを添加して、72 時間後に培養上清を回収し、IL-17、IFN- γ の産生状況を ELISA で検討する。

(*in vivo*)

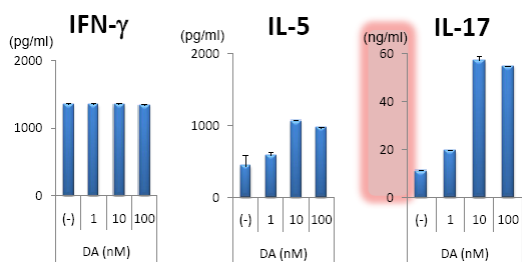
SCID マウスの背部に、関節手術で得られた RA 患者由来の滑膜組織と軟骨組織を埋め込むことで作成する SCID-hu-RA モデルマウスに対し、D1 様受容体阻害薬 (SCH-23390) を 0.01-0.5 mg/kg の量で経口投与を行う。最終的に組織を取り出して切片を作成し、炎症細胞浸潤、骨・軟骨破壊の程度や、IL-17 産生 T 細胞サブセット、IFN- γ 産生 T 細胞サブセットの浸潤状況を評価し、関節炎と骨軟骨破壊の抑制効果の有無を、コントロール群とで比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) RA の滑膜炎症においても、ドパミン・シグナルが重要な役割を担うかどうかを評価するために、まず、RA と変形性関節症 (OA) それぞれの関節炎患者の関節液中のカテコラミンの濃度を測定し比較検討した。ノルアドレナリン、アドレナリンの濃度は RA と OA で全く差を認めなかったが、ドパミンだけは RA 患者で有意に上昇していた。この結果は、RA の滑膜炎症部位にドパミンを産生する細胞が増加していることを示唆した。実際に RA 患者由来の滑膜組織の免疫組織染色により、s100 陽性で DC と考えられる細胞にドパミンが染色されており、その周囲には炎症細胞の集積が強く認められた。(下図)

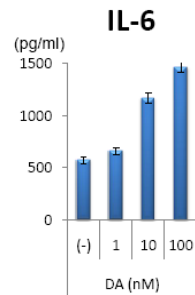


(2) 分離したヒト CD4 陽性ナイーブ T 細胞に抗 CD3+CD28 抗体刺激を加える際にドパミンを添加して培養上清中の各種サイトカインの産生を調べたところ、ドパミンも同様に濃度依存性に IL-4, IL-5 産生を増強したが、IL-17 の産生誘導は桁違いに強く、Th2 というよりはむしろ Th17 反応を強く惹起することが示唆された。

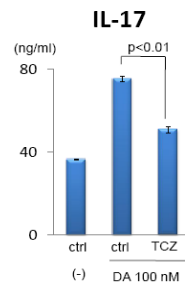


しかし、IL-17 の遺伝子発現制御に直接的に

cAMP が関与するといった報告はないため、ヒトにおいて Th17 誘導性サイトカインとして報告される TGF- β や IL-6, IL-1 β などの産生についても同様の方法で評価したところ、顕著な IL-6 の産生誘導がドパミン濃度依存性に認められた。TGF- β 産生は全く認められず、IL-1 β 産生はごく微量であった。



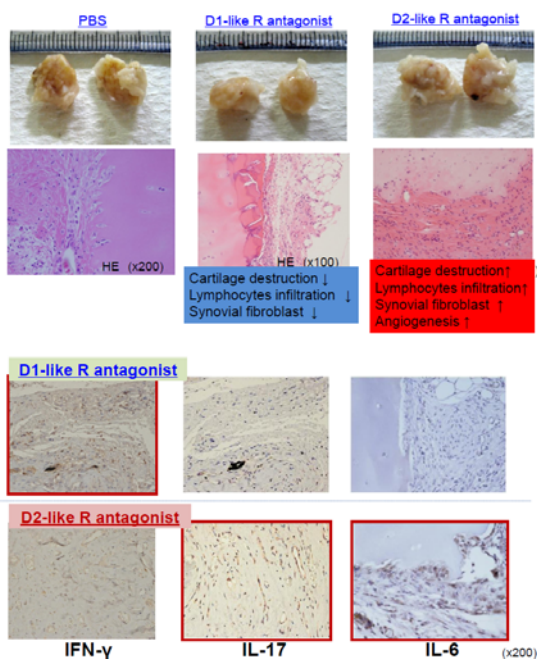
このドパミン依存性の IL-17 の産生誘導は IL-6 を介したものと仮定し、ヒト IL-6 受容体阻害抗体であるトシリズマブでヒト CD4 陽性ナイーブ T 細胞を前処理し、刺激を加えたところ、ドパミン依存性の IL-17 の産生誘導はほぼ完全に阻害された。



DC-ナイーブ T 細胞の相互作用で DC から放出されるドパミンは T 細胞自身の IL-6 の産生を促進し、オートクライン・パラクラインに作用して IL-17 産生を促進することが推察された。

(3) SCID マウスに活動性の RA 滑膜組織と軟骨を同時に移植し、擬似的にヒトの RA 滑膜炎を発症させる SCID-huRAg モデルマウスを用いてドパミン受容体阻害薬の効果を検証した。移植して一週間後より D1 様、D2 様受容体阻害薬をそれぞれ投与し、移植 30 日後に移植片を摘出

し、病理学的評価を行ったが、肉眼的に明らかに D1 様受容体阻害薬 (SCH-23390) 投与群では組織が退縮していたのに対して、D2 様受容体阻害薬 (L-750667) 投与群では周囲からの血管の走行が目立ち、組織の肥大が認められた。病理学的には、D1 様受容体阻害薬投与群では軟骨破壊はごく軽度で、滑膜線維芽細胞の退縮、IFN- γ 産生細胞が目立ったのに対して、D2 様受容体阻害薬投与群においては、顕著な軟骨破壊、血管新生を伴った滑膜の増生に加えて、IL-6 と IL-17 陽性細胞が目立った。



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)

① 中野和久、松下祥、齋藤和義、山岡邦宏、田中良哉、樹状細胞-T細胞間における免疫修飾物質としてのドパミンの機能と関節リウマチの病態形成における役割、日本臨床免疫学会会誌、査読無、32 巻、2009、1-6

② Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S., Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation., International Immunology, 査読有、21 巻、2009、645-654

[学会発表] (計 7 件)

① 中野和久、齋藤和義、山岡邦宏、田中良哉、樹状細胞-T細胞相互作用におけるドパミンの役

割とD1 様受容体阻害による滑膜炎制御、第53回 日本リウマチ学会、平成21年4月24日、東京

② Kazuhisa Nakano, Kazuyoshi Saito, Kunihiro Yamaoka, Sho Matsushita, Yoshiya Tanaka, Dendritic-cell-derived dopamine plays a pivotal role by inducing Th17-polarization in rheumatoid arthritis, 欧州リウマチ会議 (EULAR)、平成21年6月11日、コペンハーゲン

③ Kazuhisa Nakano, Kunihiro Yamaoka, Kazuyoshi Saito, Sho Matsushita, Yoshiya Tanaka, Dendritic cell-derived dopamine induces IL-6-Th17 axis in rheumatoid arthritis, 第74回インターフェロン・サイトカイン学会、平成21年6月26日、京都

④ Kazuhisa Nakano, Kazuyoshi Saito, Kunihiro Yamaoka, Sho Matsushita, Yoshiya Tanaka, Dopamine functions as a dendritic cells-mediated Th17-polarizing factor and plays a role for the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, 第 9 回国際炎症学会、平成 21 年 7 月 8 日、東京

⑤ Kazuhisa Nakano, Kunihiro Yamaoka, Kazuyoshi Saito, Yoshiya Tanaka, Dendritic cell-derived dopamine induces IL-6-Th17 axis in rheumatoid arthritis, 第73回 アメリカリウマチ学会、平成 21 年 10 月 19 日、フィラデルフィア

⑥ Kazuhisa Nakano, Kunihiro Yamaoka, Kazuyoshi Saito, Sho Matsushita, Yoshiya Tanaka, Dendritic cell-derived dopamine induces IL-6-Th17 axis and plays a pivotal role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, 第 37 回日本臨床免疫学会、平成21年11月14日、東京

⑦ Kazuhisa Nakano, Kunihiro Yamaoka, Kazuyoshi Saito, Sho Matsushita, Yoshiya Tanaka, Dendritic cell-derived dopamine induces IL-6-Th17 axis, 第39回日本免疫学会、平成21年12月4日、大阪

[図書] (計 0 件)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野和久 (NAKANO KAZUHISA)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：50406500

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：