

平成22年 5月21日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791032
 研究課題名（和文） ヒト関節リウマチにおける Th17 関連経路の解析および治療への応用
 研究課題名（英文） Analysis of Th17 axis in the pathogenesis of human rheumatoid arthritis.
 研究代表者
 吉富 啓之 (YOSHITOMI HIROYUKI)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：50402920

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)からの CCL20 の産生には TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 が autocrine/paracrine 的に関与していた。次に、炎症性サイトカインが FLS を刺激することにより誘導されるリンパ球遊走にはケモカインである CCL20 とその受容体である CCR6 が重要な役割を果たしていた。さらに、炎症性サイトカインは CCL20 を介した CCR6 陽性細胞の遊走を促し、この細胞群により産生される IL-17 は CCL20 と協調的に IL-6 の産生を生じることで炎症の継続が生じるという関節リウマチの病態が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：IL-1 β vigorously induced the production of CCL20 from FLSs of human RA and the production of CCL20 induced by TNF- α was partially attributed to a trace amount of IL-1 β induced by TNF- α . The conditioned medium of IL-1 β -stimulated FLSs significantly recruited CCR6+ MNCs in a CCL20 dependent manner. Interestingly, CCL20 enhanced the production of IL-6 coordinately with the stimulation of IL-17 but not with that of IFN- γ . These findings imply FLSs stimulated by proinflammatory cytokines recruit CCR6+ MNCs including IL-17-producing-helper T cells into the inflamed joint, leading to the enhancement of the production of CCL20, which chemokine and IL-17 coordinately induce proinflammatory cytokines.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：アレルギー・喘息、免疫学、ケモカイン、TH17、関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

CD4 陽性 T 細胞は TH1 および TH2 に分化

することが知られていたが、IL-17 を産生する TH17 という別の分画に分化することが近年明らかとなった。動物モデルの知見より、

Th17 は関節リウマチをはじめとする様々な自己免疫性疾患に関与すると考えられている。一方で、リンパ球の分化や性質がヒトとマウスで異なっていることが明らかになってきている。例えば、マウス Th17 の分化には IL-6 と TGF- β が重要だが (Nature, 441:235-238)、ヒトでは IL-1 が重要である (J Exp Med, 205:1903-16)。別の問題点として Th17 は不安定で、容易に IL-17 と IFN- γ を同時に産生する Th17/Th1 細胞を経て Th1 に再分化する (J Clin Invest. 119:565-72)。このように、ヒトの関節リウマチの病態において Th17 がどのような役割を果たすのかを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

Th17 細胞が関節リウマチ等のヒト自己免疫疾患に関与する機序には明らかにすべき点が残っている。特に、炎症性サイトカインが自己反応性のリンパ球を遊走させる機序については不明な点が多い。従来の治療抵抗性の患者に新たな治療の選択肢を提供するために、関節リウマチの病態における Th17 細胞の関与を解析し、解明された機序を治療へ応用することを目的とする。

3. 研究の方法

関節リウマチ患者および非関節リウマチ患者の整形外科手術時に廃棄される関節液、滑膜組織、骨軟骨組織および血液を患者の同意のもと研究に用いた。

S 関節リウマチ患者における CCR6/CCL20 の発現解析関節リウマチ患者および非関節リウマチ患者の関節液、血清、滑膜組織を用いて、CCR6 および CCL20 をはじめとする Th17 関連分子の発現強度を ELISA、RT-PCR、FACS 等にて解析した。

% 線維芽細胞様滑膜細胞を様々な炎症性サイトカインにて刺激し、どのような刺激により CCL20 の産生が誘導されるかを解析した。

& 線維芽細胞様滑膜細胞を炎症性サイトカインにて刺激し得られる培養上清に対して誘導されるリンパ球遊走を解析した。

4. 研究成果

関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) を各サイトカインにて刺激すると、IL-1 β 、TNF- α にてケモカインである CCL20 の産生が誘導されたが IL-6 単独では誘導されなかった。(図 1)

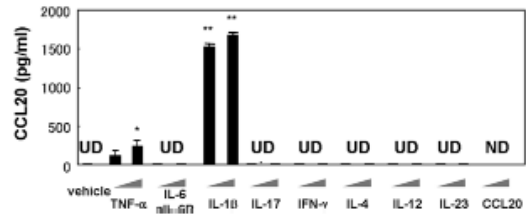


図 1 各サイトカイン刺激による FLS からのサイトカイン産生

TNF- α にて誘導される CCL20 の産生は抗 IL-1 β 抗体にて抑制された (図 2)。また、TNF- α と同時に可溶性 IL-6 受容体を加えると産生が増強した (図 3)。これらより、CCL20 の産生には TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 が autocrine/paracrine 的に関与していることが明らかとなった。

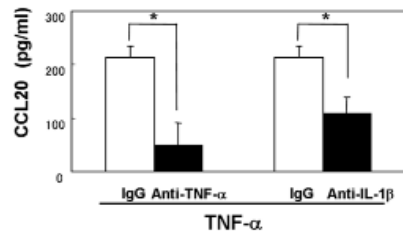


図 2 TNF α 刺激による FLS からの CCL20 産生には IL-1 β が関与している

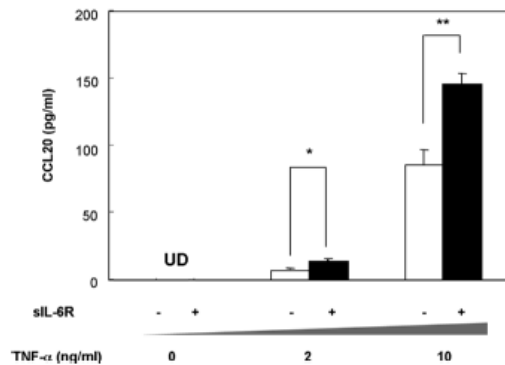


図 3 TNF α 刺激による FLS からの CCL20 産生は IL-6 が関与する

次に、炎症性サイトカイン刺激により細胞遊走が生じる機序を明らかにするために、滑膜細胞を IL-1 β にて刺激して得られた conditioned medium に対するヒト単核球の遊走を解析した。細胞遊走は CCL20 の受容体である CCR6 特異的に生じ、CCL20 の中和抗体を投与したところ、CCR6 特異的な細胞遊走は抑制された (図 4)。このことにより、炎症性サイトカインにより誘導されるリンパ球遊走にはケモカインである CCL20 とその受容体である CCR6 が重要な役割を果たしているこ

とが明らかとなった。

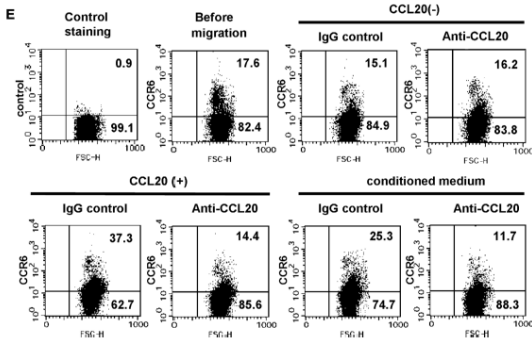


図4 IL-1刺激FLSはCCL20を介してCCR6陽性リンパ球を遊走させる

CCR6はIL-17産生性ヘルパーT細胞に特異的に発現している。そこで、IL-17とCCL20がサイトカイン産生に及ぼす影響を解析したところ、CCL20はIL-6の産生を誘導し、この産生はIL-17により増強しIFN- γ にて影響を受けなかった(図5)。

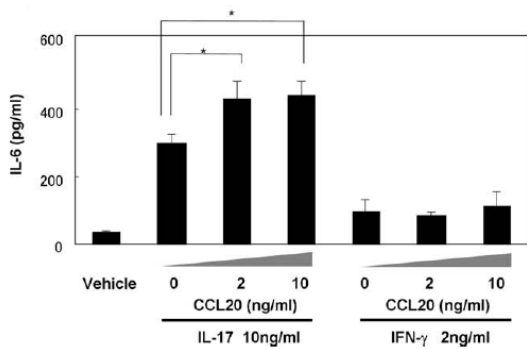


図5 CCL20はIL-17と協調的にFLSよりIL-6産生を誘導する

これらのことから、炎症性サイトカインはCCL20を介したCCR6陽性細胞の遊走を促し、この細胞群により産生されるIL-17はCCL20と協調的にIL-6の産生を生じることで炎症の継続が生じるという関節リウマチの病態が明らかとなった。

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5件)

Nishitani K, Ito H, Hiramitsu T, Tsutsumi R, Tanida S, Kitaori T, Yoshitomi H, Kobayashi M, Nakamura T. PGE2 inhibits MMP expression by suppressing MKK4-JNK MAP kinase c-JUN pathway via EP4 in human articular chondrocytes. *J Cell Biochem*. 2010 ;109(2):425-33. 査読有

Tanida S, Yoshitomi H, Nishitani K, Ishikawa M, Kitaori T, Ito H, Nakamura T. CCL20 produced in the cytokine network of rheumatoid arthritis recruits CCR6(+)

mononuclear cells and enhances the production of IL-6. *Cytokine*. 2009;47(2):112-118. 査読有

③ 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 interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(8):2294-303. 査読有

④ Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, Nakano M, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum*. 2009 Mar;60(3):813-23. 査読有

⑤ Wakasa-Morimoto C, Toyosaki-Maeda T, Matsutani T, Yoshida R, Nakamura-Kikuoka S, Maeda-Tanimura M, Yoshitomi H, Hirota K, Hashimoto M, Masaki H, Fujii Y, Sakata T, Tsuruta Y, Suzuki R, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Arthritis and pneumonitis produced by the same T cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis. *Int Immunol*. 2008;20(10):1331-42. 査読有

[学会発表] (計3件)

① CCL20 produced in the cytokine network of rheumatoid arthritis recruits CCR6+ mononuclear cells and enhances the production of IL-6. Shimei Tanida, Hiroyuki Yoshitomi, Kohei

Nishitani, Masahiro Ishikawa,
Toshiyuki Kitaori, Hiromu Ito, and
Takashi Nakamura. 56th Annual Meeting
of the Orthopaedic Research Society.
March 6 - 9, 2010. New Orleans.

- ② RA診療の基本と薬物療法の初歩の初歩
吉富啓之 京都大学整形外科
第5回京整会若手研修会
%##.9.6 京都
- ③ 関節リウマチの病態におけるリンパ球
の役割 吉富啓之 京都大学整形外科
19回リウマチ学会近畿支部
学術集会 %##.9.5 大阪

〔図書〕(計 1件)

- ① 臨床医学の展望 2009 関節リウマチ
吉富啓之 J 日本医事新報
No4426 p72-84 2009/2/21

~
[ggc-"jjj!^h[c!^lbgbzh!TM]c"q
fX^XZX^T^YhaW XagT_ aTa^bgfhl [g`_`~`~`

5. 研究組織

(1) 研究代表者

吉富 啓之 (YOSHITOMI HIROYUKI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：50402920