

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591261

研究課題名（和文） 自己免疫誘導関節炎における新規制御分子の病因的意義

研究課題名（英文） Pathogenic role of newly identified regulatory molecule in autoimmune 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

研究成果の概要（和文）：

1) TIARP 欠損マウスは約 1 年で関節炎を自然発症し、脾臓にてマクロファージの増加が認められ、サイトカインプロファイルでは IL-6 の過剰産生が認められた。腹腔内マクロファージを取りだし、欠損マウスの細胞では NFkB、及び STAT3 の過剰なシグナル伝達、また TNF 誘導性の apoptosis の制御ができず、関節炎を増悪させていることが示唆された。（論文 review 中）。

2) 環状化シトルリン化 GPI peptide (CCG) を 9 種作成し、RA 患者 208 名、自己免疫疾患患者 202 名、健常人 174 名の血清中の抗 CCG 抗体の有無を検討した。CCG-2, 4, 7 に対する抗体の陽性率各々 30% で、特異度は 99% を超えていた。これらは HLE-DR-SE、抗 CCP 抗体とリンクし、治療 6 ヶ月後の抗体価は疾患活動性ととともに低下し、診断マーカー、疾患活動性マーカーとしての可能性が示唆された（論文投稿中）。

研究成果の概要（英文）：

1) TIARP<sup>-/-</sup> mice developed spontaneous arthritis, had high serum levels of IL-6, increased CD11b<sup>+</sup> cell count in the spleen, and showed enhanced TNF-induced IL-6 expression in macrophages. Sustained degradation of IκBα with dysregulated apoptosis was also noted in TIARP<sup>-/-</sup> macrophages, and they showed increased IL-6-induced STAT3 phosphorylation. These findings suggested that TIARP is a negative regulator in arthritis by suppressing IL-6 production, its signaling and TNFα-induced NF-κB signaling result in enhanced apoptosis in macrophages.

2) Nine cyclic citrullinated GPI peptides (CCG-1-9) were constructed. Samples were obtained from patients with RA (n=208), healthy subjects (n=174) and other autoimmune diseases (n=202). Anti-CCG-2, 4, 7 Abs were detected in about 30.0% patients with RA, and these Abs were very specific of RA (specificity 99%). Anti-CCG-2, 4, 7 Abs were correlated with anti-CCP, CEP-1 and the presence of *HLA-DRB1* SE allele. Treatment with TNF antagonists significantly reduced the levels of anti-CCG-2, 7, suggesting possible diagnostic and activity marker of RA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：膠原病・リウマチ学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・内科学

キーワード：リウマチ学

#### 1. 研究開始当初の背景

ヒトRAに近似したモデルと考えられるGPI誘導性関節炎モデルマウスを中心に検討し、ヒトRAへのtranslational researchを進めていく。現在までに得られた抗GPI抗体陽性者を含むRA患者データと比較検討していきながら、抗GPI抗体の関節炎への関与のメカニズムや、自己抗原特異的なその他細胞群との係わり合いを検討し、研究を進めていく。特に、TNF・とIL-6依存性という共通点に着目し、更にヒトでの抗GPI抗体にも再検討を加え、以下の3つのテーマに関して進めていく。

#### 2. 研究の目的

(1) 関節炎特異的TNF誘導分子TNF-induced adipose related protein (TIARP)の解析、関節炎制御機構との関連

(2) ヒトSTEAP4 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate-4)のRA患者での病因的意義

(3) RA患者におけるシトルリン化GPIに対する自己抗体の同定、他疾患への応用

#### 3. 研究の方法

(1) TIARP欠損マウス(C57B1/6)を作成し、in vivoでのTIARPの意義を検討し、欠損マウスマクロファージにも着目して検討を進める。

(2) STEAP4の関節組織での局在や、培養滑膜での発現を免疫染色で確認していく。また、滑膜培養細胞でのsiRNAを用いたのKnock downを行い、炎症性サイトカインと共培養することでの滑膜増殖や炎症性蛋白(サイトカイン)の合成について検討していく。

(3) アルギニンを保持する25merのペプチドを10程度作成し、環状化、シトルリン化を行う。この環状シトルリン化GPIペプチドに対する自己抗体をELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)で検討し、RA群、コントロール群で臨床的な経過や変動も含めて比較検討する。

#### 4. 研究成果

(1) に関しては現在論文revise中である。

(2) に関しては2報の論文を発表。

(3) に関しても現在論文投稿中である。

#### 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24件)

全て査読有

1. Hashizume M, Yoshida H, Tanaka K, Suzuki M, Matsumoto I, Sumida T, Mihara M. Interleukine-6 regulates anti-arthritic effect of methotrexate via the reduction of SLC19A1 expression in mouse arthritis model Arthritis Research & Therapy (in press)2012
2. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N.: Association of *PHRF1-IRF7* region polymorphism with clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Lupus(in press) 2012
3. Tanaka Y, \*Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Sugihara M, Hayashi T, Ito S, Sumida T: Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4(STEAP4) is expressed on monocytes/neutrophils, and is regulated by TNF antagonist in patients with rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Rheumatol. 30:99-102, 2012
4. Tsuboi H, Nakamura Y, Iizuka M, Matsuo N, Matsumoto I, Sumida T.: Generation and functional analysis of monoclonal antibodies against the second extracellular loop of human M3 muscarinic acetylcholine receptor. Mod. Rheumatol. 22, 264-271, 2012.
5. Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahashi S, Matsumoto I, and Sumida T.:Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. Arthritis Rheum. 64:162-72, 2012
6. Tanaka Y, \*Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Minami R, Umeda N, Kanamori A, Ochiai N, Miyazawa K, Sugihara M, Hayashi T, Goto D, Ito S and Sumida T : Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4(STEAP4) is TNFalpha-induced protein that regulates IL-6, IL-8, and cell proliferation in synovium from patients with rheumatoid arthritis. Mod. Rheumatol 22:128-36,2012
7. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Horikoshi M, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Ito S and Sumida T: NK1.1+ gdT cells attenuates IL-18 plus IL-2-induced murine interstitial lung disease. Am. J. Res. Cell. Mol.

- Biol. 45,659-66, 2011
8. Koga M, Kawasaki A, Ito I, Furuya T, Ohashi J, Kyogoku C, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T and Tsuchiya N: Cumulative Association of Eight Susceptibility Genes with Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Female Population. *J Hum Genet* 56, 503-507, 2011
  9. Tsuboi H, Wakamatsu E, Iizuka M, Nakamura Y, Sugihara M, Suzuki T, Ogishima H, Hayashi T, Goto D, Ito S, Matsumoto I, Sumida T: Importance of serine727 phosphorylated STAT1 in IFN $\gamma$ -induced signaling and apoptosis of human salivary gland cells. *Int J Rheum Dis*. 14, 86-91, 2011
  10. Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Horikoshi M, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Taniguchi S and Sumida T: Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -carba-GalCer (RCAI-56), a novel synthetic glycolipid ligand, suppresses murine collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol*. 164, 236-247, 2011.
  11. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T and Tsuchiya N: Toll-like receptor 7(TLR7) SNPs in the 3' untranslated region and intron additively contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Japanese female population. *Arthritis Res. Ther*. 13, R41, 2011
  12. Hikami K, Kawasaki A, Ito I, Koga M, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Tsutsumi A, Kusaoi M, Takasaki Y, Hashimoto H, Arinami T, Sumida T and Tsuchiya N: Association of a functional polymorphism in the 3' untranslated region of SPI1 with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 63, 755-763, 2011
  13. Akashi N, \*Matsumoto I, Tanaka Y, Inoue A, Yamamoto K, Tanaka Y, Umeda N, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sekiguchi K and Sumida T : Comparative suppressive effect in models of autoimmune arthritis by tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib. *Mod. Rheumatol* 21, 267-275, 2011
  14. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, Tsutsumi A, Hayashi T, Uchida K, Usui J, Yamagata K and Sumida T. Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clin. Exp. Immunol*. 159, 1-10, 2010
  15. Chen Q, Muramoto K, Masaaki N, Ding Y, Yang H, Mackey M, Li W, Inoue Y, Ackermann K, Shirota H, Matsumoto I, Spyvee M, Schiller S, Sumida T, Gusovsky F and Lamphier M. A novel antagonist of the prostaglandin E(2) EP(4) receptor inhibits Th1 differentiation and Th17 expansion and is orally active in arthritis models. *Br J Pharmacol*. 160, 292-310, 2010
  16. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Kondo Y, Sugihara M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Takasaki Y, Hashimoto H, Matsuta K, Sumida T and Tsuchiya N : Replication of association between *FAM167A(C8orf13)-BLK* region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis*. 69, 936-937, 2010
  17. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Ito S and Sumida T. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$  signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease in mice. *Clin. Exp. Immunol*. 160, 394-402, 2010
  18. Suzuki T, Ito S, Handa S, Kose K, Okamoto Y, Minami M, Sugihara M, Horikoshi M, Tsuboi H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I and Sumida T : New low-field extremity MRI, compactScan: comparison with whole body 1.5 tesla conventional MRI. *Mod. Rheumatol*. 20, 331-336, 2010
  19. Kawasaki A, Ito I, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T and Tsuchiya N : Association of TNFAIP3 polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *J Biomed Biotechnol*. 2010, 207578, 2010
  20. Tsuboi H, Matsumoto I, Wakamatsu E, Nakamura Y, Iizuka M, Hayashi T, Goto D, Ito S and Sumida T : New epitopes and function of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol*. 162, 53-61, 2010
  21. Hayashi T, Ito S, Goto D, Matsumoto I and Sumida T : Elevated level of serum cystatin-C concentration is a useful predictor for myelosuppression induced by methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 20, 548-55, 2010
  22. Horikoshi M, Suzuki T, Sugihara M, Kondo Y, Tsuboi H, Uehara T, Hama M, Takase K, Ohno S, Ishigatsubo Y, Yoshida Y, Sagawa A, Ikeda K, Ota T, Matsumoto I, Ito S and Sumida T : Comparison of low-field dedicated extremity magnetic resonance imaging with articular ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol*. 20, 556-560, 2010
  23. Iizuka M, Wakamatsu E, Tsuboi H, Nakamura Y, Hayashi T, Matsui M, Goto D, Ito S, Matsumoto I and Sumida T : M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive immune response induces Sjogren's syndrome-like sialoadenitis. *J. Autoimmunity* 35, 383-389, 2010
  24. Kawasaki A, Ito S, Furukawa H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Kusaoi M, Ohashi J, Graham R R, Matsuta K, Behrens T W, Tohma

S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T and Tsuchiya N : Association of TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population : a case-control association study: Arthritis Res. Ther. 12, R174, 2010

[学会発表] (計 7 件)

1. 松本功、梅田直人、土屋尚之、住田孝之 関節リウマチにおける抗シトルリン化GPI抗体 第56回日本リウマチ学会総会(東京)シンポジウム、4月26日~28日、2012
2. 松本功、井上明日香、住田孝之 TIARP欠損による炎症性サイトカイン異常と関節炎発症機構第56回日本リウマチ学会総会(東京)シンポジウム、4月26日~28日、2012
3. Matsumoto I, Sumida T. Immunological mechanisms in autoimmune arthritis via ubiquitous autoantigens. International Rheumatology symposium 第56回日本リウマチ学会総会(東京)国際シンポジウム、4月26日~28日、2012
4. Matsumoto I Pathophysiology of autoimmune arthritis - From clinic to bench and vice versa-. China-Japan Rheumatology symposium、第56回日本リウマチ学会総会(東京)国際シンポジウム、4月26日~28日、2012
5. 松本功、井上明日香、田中陽子、住田孝之: 自己免疫性関節炎における TNF alpha induced adipose related protein (TIARP)の機能解析 日本アレルギー学会(東京)11月26-28日、2010
6. Matsumoto I: IL-6 receptor inhibition in autoimmune arthritis - from clinical and basic point of view- 7<sup>th</sup> Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies(CORS) (Kyoto)、10月19日、2010
7. 松本功: 生物学的製剤導入による外科手術適応例の変動—内科的見地より— 第39回リウマチの外科研究会シンポジウム(東京)、8月28日、2010

[図書] (計 27 件)

1. 松本功 特集: 関節リウマチ(RA): 診断と治療の進歩 病態 関節炎モデル 日本内科学会雑誌 (in press) 2012
2. 松本功 サイトカインのすべて TGF-b 臨床免疫・アレルギー科 (in press)2012
3. 松本功 特集: 膠原病・リウマチ疾患の治療の現状と展望 免疫抑制薬・抗リウマチ薬 アザチオプリン 日本内科学会

雑誌、100: 2924-2928, 2011

4. 松本功: 再発性多発軟骨炎 GUIDELINE 膠原病・リウマチ 改訂第2版、小池隆夫、住田孝之編集、診断と治療社、123-126、2010
5. 松本功: 多発性筋炎/皮膚筋炎 COLOR ATLAS 膠原病・リウマチ 改訂第2版 住田孝之編集 診断と治療社 100-105、2010
6. 松本功: 免疫グロブリン・補体・免疫複合体 リウマチ・膠原病内科 クリニカルスタンダード 文光堂 30-34、2010
7. 松本功 関節リウマチ診療 update IL-17 阻害は有効か? 内科 南江堂 109:659-663、2012
8. 松本功 関節リウマチにおける Th17細胞と抗 IL-17, 23 抗体療法 最新医学 67: 275-280、2012
9. 松本功 トップランナーに聞く 関節リウマチの発症メカニズム解明とその制御機構を追い求めて 最新医学 131: 2575-2579、2011
10. 松本功、岩波慶一、田中陽子、井上明日香、田中勇希、梅田直人、住田孝之: 解糖系酵素に対する自己免疫応答と関節リウマチ 日本臨床免疫学会雑誌 34: 456-463、2011
11. 松本功: 関節リウマチにおける Th17細胞の意義 リウマチ科 46: 102-108、2011
12. 松本功: 生物学的製剤の副作用: Cochrane データベースより RA trends 3:8-9、2011
13. 松本功: 関節リウマチを疑ったら 診断治療の update と鑑別すべき膠原病—シェーグレン症候群— medicina 48:199-202、2011
14. 松本功: K/BxN マウス-血清移入関節炎 - Clinical Calcium 21: 261-266、2011
15. 井上明日香、松本功、住田孝之: TIARP による炎症性サイトカインの産生抑制 臨床免疫・アレルギー科 55: ,2011
16. 松本功: 関節リウマチにおける自己抗体の病態への関与 リウマチ科 45: 215-218、2011
17. 松本功: 薫風吹く膠原病診療—臨床を駆ける進歩の風—シェーグレン症候群 内科 107:595-598、2011
18. 井上明日香、松本功、住田孝之: 自己免疫関節炎における TNFa-induced adipose related protein(TIARP)の役割 医学のあゆみ 232:818-819、2010

19. 飯塚麻菜、若松英、松本功、坪井洋人、中村友美、松井稔、住田孝之： シェーグレン症候群の病態形成における M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体に対する自己免疫応答の解明 日本臨床免疫学会雑誌 33:87-91, 2010
20. 松本功： 実験的関節炎に対するリボゾームを用いた抗原特異的治療戦略 リウマチ科 43:385-393, 2010
21. 松本功： 膠原病—病態への新たなアプローチと治療展開— 関節リウマチの分子標的と制御 最新医学 65:960-964, 2010
22. 住田孝之、坪井洋人、飯塚麻菜、中村友美、松本功： M3R 反応性 T 細胞とシェーグレン症候群 Mebio 27:84-93, 2010
23. 松本功、井上明日香、田中陽子、明石直嗣、岩波慶一、住田孝之： TNF・誘導分子 TIARP と自己免疫疾患 Mebio 27:68-75, 2010
24. 明石直嗣、松本功、住田孝之： RA の治療標的としての immunoproteasome Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 4:181-184, 2010
25. 坪井洋人、松尾直美、飯塚麻菜、中村友美、松本功、住田孝之： シェーグレン症候群における M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体抗体のエピトープと機能解析 日本臨床免疫学会雑誌 33:222-228, 2010
26. 松本功、井上明日香、田中陽子： 関節炎における TNF $\alpha$ -induced adipose related protein (TIARP) リウマチ科 44:354-360, 2010
27. 明石直嗣、松本功、住田孝之： 関節リウマチ治療におけるイマチニブの可能性 分子リウマチ治療 3: 179-182, 2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/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) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：