

## 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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号： 14301  
 研究種目： 基盤研究（B）  
 研究期間： 2010 ～ 2012  
 課題番号： 22390201  
 研究課題名（和文） 炎症制御蛋白による全身性自己免疫疾患の病態解析と新規治療への展開  
 研究課題名（英文） Analysis of pathogenicity and development of novel therapy by inflammation-regulating proteins in systemic autoimmune diseases  
 研究代表者  
 三森 経世（MIMORI TSUNEYO）  
 京都大学・医学研究科・教授  
 研究者番号： 10157589

**研究成果の概要（和文）：** 本研究は、以前に見出した関節リウマチ（RA）の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、これら自己抗原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、特に Th17 細胞分化・活性化を強く抑制した。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ていたが、CD14-TLR4 シグナルを介する作用により自然免疫系で炎症を惹起することが示された。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。

**研究成果の概要（英文）：** We reported previously that autoantibodies to calpastatin (inhibitor of calpain (calcium-dependent neutral proteinase)) and follistatin-related protein (FRP) are found in patients with rheumatoid arthritis. Since these target antigens appeared to show regulatory effects against inflammation, we have intended to clarify the possibility that arthritis may be treated by regulating these autoantigens and autoantibodies. Calpastatin inhibited not only the secretion of IL-6 from fibroblasts, but also affected T cell differentiation, in particular strongly suppressed the differentiation and activation of Th17 cell. Although FRP has been debated to show different action on regulating of inflammation between human and mouse, we demonstrated that FRP activates inflammation in natural immunity system via TLR4-CD14 signaling. Analyses of these inflammation-regulating proteins may clarify the pathogenic mechanisms and novel therapeutic strategies of inflammatory arthritis and autoimmune diseases.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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・アレルギー内科学

キーワード： カルパイン、カルパスタチン、FRP、Th17 細胞、IL-6、自己抗体、関節リウマチ、自己免疫疾患

## 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する原因不明の全身性炎症疾患で、我国の患者数は約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 $\kappa$ B分解によるNF- $\kappa$ 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。

一方同様のアプローチにより、RAの自己抗体の対応抗原としてフォリスタチン関連蛋白 (follistatin-related protein: FRP) を同定した。FRPはアクチビンの特異的阻害物質であるフォリスタチンと共通の構造 (フォリスタチン

ドメイン) を有し、TGF- $\beta$ によって産生が誘導されるが、その生理活性は明らかにされていない。我々はこのFRPが関節滑膜細胞からのMMP-1、3およびプロスタグランジンE1分泌を抑制し、RA患者抗FRP抗体がこれらFRPの炎症メディエーター産生抑制作用を阻害することによりRAの病態形成に関することを見出し、さらにFRPを抗コラーゲン抗体誘発関節炎マウスに投与することにより、関節炎発症を有意に抑制することを証明した。

## 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・カルパスタチン系およびFRP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、FRP産生を誘導し、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) サイトカイン産生におけるカルパイン/カルパスタチン系およびFRP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) カルパスタチンおよびFRP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) T細胞分化に及ぼすカルパイン/カルパスタチン系の影響に関する研究

① T細胞におけるカルパインとカルパスタチン発現: Th1、Th2 および Th17 細胞分化過程におけるカルパインとカルパスタチンの発現を免疫ブロット法で解析した。

② T細胞分化におけるカルパインとカルパスタチンの作用: ヒトカルパインまたはカルパスタチン cDNA を組み込んだレトロウイルスベクターをマウス脾細胞の CD4+T 細胞にトランスフェクトさせた。この遺伝子導入 T細胞を Th1、Th2 および Th17 条件下で培養し、サイトカイン産生と T細胞分化に関わる転写調節因子の発現を検討した。

(2) サイトカイン産生に及ぼすFRPの影響に関する研究

①培養細胞におけるサイトカイン産生の測定：  $3 \times 10^4$ 個のマウス3T3細胞およびヒトRA患者滑膜細胞に、マウスFRP (mFRP) またはヒトFRP (hFRP) を種々の濃度で添加し、24時間後の培養上清中のIL-6濃度をELISA (eBioscience)で測定した。

②SiRNAによるFRPのノックダウン： ヒトFRPをターゲットとするsiRNAを作成し (Invitrogenに作成依頼)、ヒトRA滑膜由来SF-1細胞にトランスフェクトさせて、IL-6産生を測定した。

③LPSトレランスの誘導： マウス腹腔細胞を採取して培養し、LPSまたはFRPで刺激した。24時間後に培養上清を交換、再びLPSで刺激して、24時間後の培養上清中のIL-6濃度を測定した。

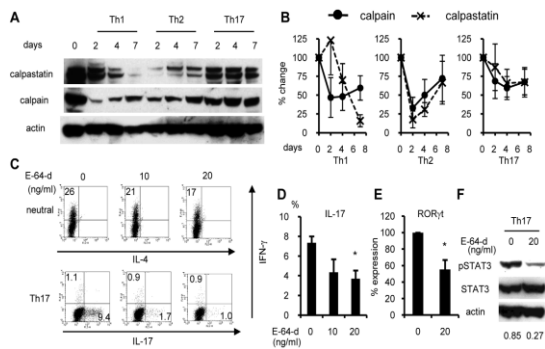
### (3) カルパスタチンおよびFRP発現T細胞移入による関節炎抑制の検討

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日目にドレーン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、カルパスタチンドメインIV、ヒトおよびマウスFRP 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  $1 \times 10^6$ 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) T細胞分化に及ぼすカルパイン/カルパスタチン系の影響に関する研究

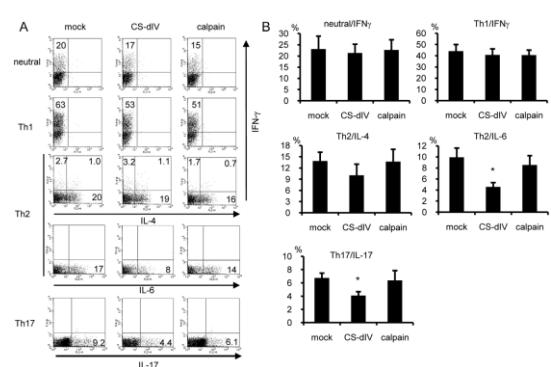
①T細胞分化におけるカルパインとカルパスタチン発現： どのTh細胞でもカルパイン発現は経時的に減少したが、カルパスタチンの発現はTh1細胞においてTh2細胞およびTh17細胞よりも減少しており、特に活性化Th1細胞での減少が著しかった (図1A&B)。(図1)



特異的カルパイン阻害剤 E-64-d は濃度依存的にTh17細胞発現を抑制し (図1C&D)、その効果はROR $\gamma$ tの発現抑制 (図1E)とSTAT3リン酸化の阻害によると考えられた (図1F)。

②T細胞分化におけるカルパインとカルパスタチンの作用： カルパスタチン過剰発現CD4+T細胞ではTh2条件下でのIL-6産生、Th-17条件下でのIL-17産生が有意に抑制された (図2)。これに対し、カルパイン過剰発現CD4+T細胞ではこれらのサイトカイン産生への影響は少なかった。カルパスタチンによるTh17細胞の分化抑制およびIL-17産生抑制作用は、I $\kappa$ B $\alpha$ の安定化によるNF- $\kappa$ Bシグナルの抑制によるものと考えられた。

(図2)



③カルパスタチンによる関節炎モデルの抑制： カルパスタチン過剰発現T細胞を移入したマウスでは関節炎の発症が有意に抑制されたのに対し、カルパイン過剰発現細胞は関節炎を増悪させた。

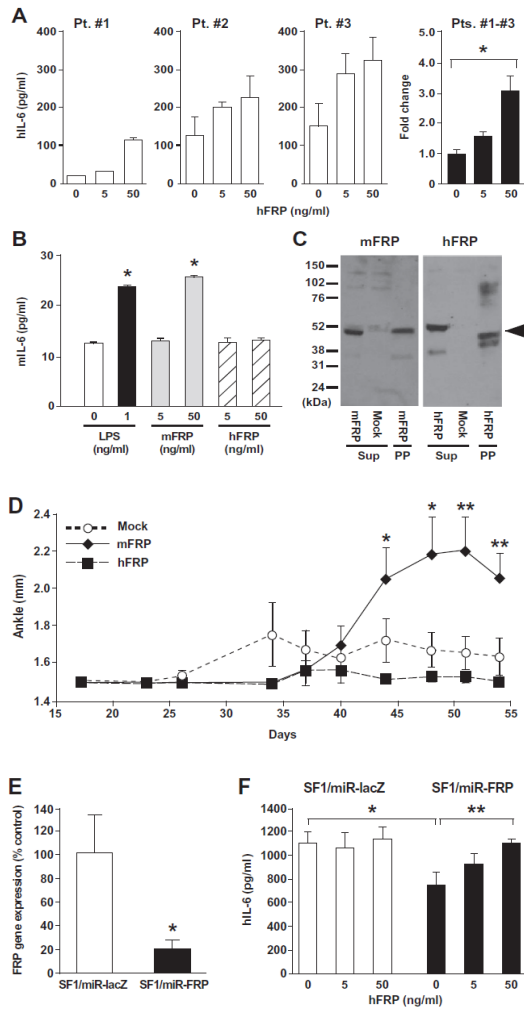
### (2) 炎症と自然免疫に及ぼすFRPの影響に関する研究

①FRPによるIL-6の産生： hFRPはRA患者由来培養滑膜細胞からのIL-6産生を誘導した (図3A)。またmFRPはマウスNIH-3T3細胞からのIL-6産生を増加させた (図3B)。このようにヒトおよびマウスFRPはともにIL-6産生を誘導することが示された。

FRPを過剰発現させたT細胞をコラーゲン誘導関節炎モデルマウスに移入すると、mFRPは関節炎を増悪したが、hFRPでは増悪は認められなかった (図3D)。

IL-6を自然産生するヒトRA由来滑膜細胞株であるSF-1細胞にFRPのsiRNAをトランスフェクトさせるとIL-6産生が抑制され (図3E)、FRPの外部からの添加によりIL-6産生が回復した (図3F)。

(図3)

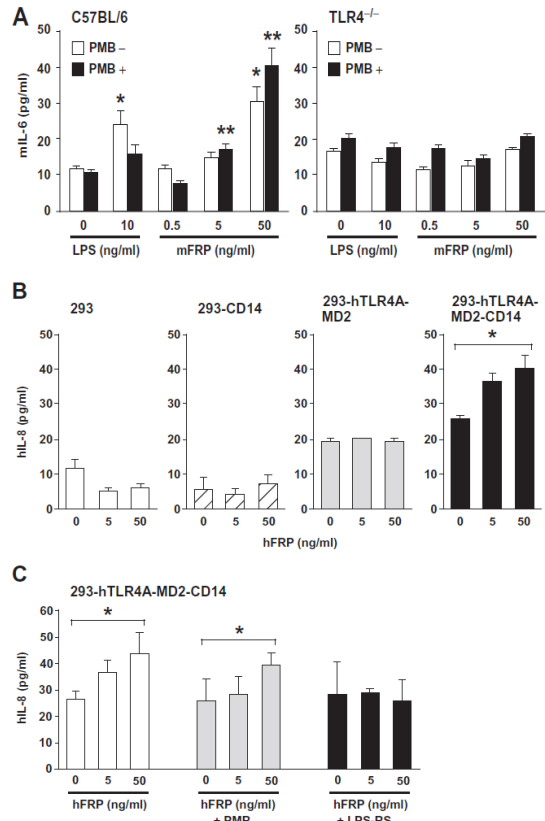


**②FRPのサイトカイン産生におけるCD14-TLR4の関与:** FRPがCD14分子と会合することは、CD14を発現させたHEK293細胞に、外部より添加したFRPが結合することによって証明された。

TLR4ノックアウトマウスではLPSのみならずFRP刺激においてもIL-6産生が誘導されないことが確認され、FRPの作用にはCD14-TLR4を会するシグナルが必要と考えられた(図4A)。

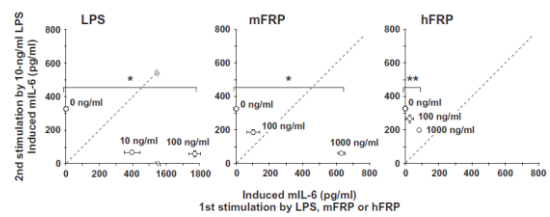
HEK293細胞はTLR4、MD2、CD14分子を欠損しており、LPS刺激に反応しない。ここにhTLR4、MD2、CD14分子をすべて再構成した場合のみ、hFRPによるIL-8産生能が回復した(図4B)。このFRPの作用はLPSの中和剤であるPMBでは影響を受けないが、LPSの特異的アンタゴニストであるLPS-RSで阻害された(図4C)。この作用はNF- $\kappa$ B活性化を介することが示唆された。

(図4)



**③FRPによるLPSトレランスの誘導:** 細胞を最初にhFRPおよびmFRPで刺激するといずれも、濃度依存的に2回目のLPS刺激によるIL-6産生を低下させ、FRPのLPSトレランス誘導能を示した(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の発症と増悪に関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。

FRPはRAの自己抗原として同定されたが、ヒトとマウスでの炎症に対する反応が相反

するなど、その生理的機能には不明の点が多かった。FRPがCD14と結合する知見が得られたことから、FRPがCD14とTLR4を介して自然免疫反応を惹起する可能性を検討した。hFRPはヒト培養関節滑膜細胞のIL-6産生を促進し、mFRPはマウス線維芽細胞株のIL-6産生を促進した。マウス関節炎モデルでは、mFRPを高発現させたT細胞を移入すると関節炎は増悪したが、hFRPでは見られず、FRPの作用には種特異性が存在することが示された。野生型マウス由来脾細胞では添加したmFRPの濃度依存性にIL-6産生が増加するのに対し、TLR4ノックアウトマウス脾細胞では無反応であった。また、CD14、MD2、TLR4を欠損するHEK293細胞では、これら3分子を強制発現させた場合のみFRP濃度依存性にIL-8産生が増加した。さらに、FRPは、リポ多糖(LPS)と同様にTLR4シグナルのトランスを誘導した。以上の成績はFRPの作用がCD14およびTLR4シグナルに依存することを示している。従って、自然免疫系においてFRPの作用は炎症反応を促進し、この場合の受容体がCD14を介したTLR4であることが明らかとなった。

レトロウイルスベクターにカルパスタチン機能ドメイン遺伝子を組み込むことによって、ヒトRA滑膜細胞とマウスCD4+T細胞にカルパスタチンを過剰発現させることに成功した。このシステムによりヒトRA滑膜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関わ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を過剰発現させることにより、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における抗カルパスタチン自己抗体の存在は、カルパインによる関節破壊や炎症惹起に直接関与するのみでなく、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、関節炎悪化に関与している可能性が考えられた。

以上の成績は、炎症抑制とT細胞分化におけるカルパスタチンの役割や自然免疫応答におけるFRPの役割の解明に貢献し、RAなどの慢性炎症性疾患の病態解明研究の進歩に寄与するとともに、今後の治療戦略への手がかりを与えてくれることが期待される。

## 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10件)

1) Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, Kawabata D, Fujii T, Iwakura Y, Mimori T: Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. *PLoS One* 8(5):e62231, 2013. (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0062231

2) Imura Y, Shirai Y, Nojima T, Nakashima R, Yamagata H, Miyachi K, Yoshifuji H, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Mimori T: NEFA/nucleobindin-2 is a target autoantigen of the anti-Wa antibody and is associated with transfer RNA. *Mod Rheumatol*. 22(5):685-94, 2012. (査読有)

DOI: 10.1007/s10165-011-0582-9

3) Nakano M, Fujii T, Hashimoto M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Nakaizumi A, Mimori T: Type I interferon induces CX3CL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 170(1): 94-100, 2012. (査読有)

DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04638.x

4) Kiyama K, Kawabata D, Hosono Y, Kitagori K, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Serum BAFF and APRIL levels in patients with IgG4-related disease and their clinical significance. *Arthritis Res Ther*. 14(2): R86, 2012. (査読有)

DOI: 10.1186/ar3810

5) Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Follistatin-related protein/ follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4. *FEBS Lett*. 586(4):319-24, 2012. (査読有)

DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.010

6) Iguchi-Hashimoto M, Usui T, Yoshifuji H, Shimizu M, Kobayashi S, Ito Y, Murakami K, Shiomi A, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: Overexpression of minimal domain of calpastatin suppresses IL-6 production and Th17 development via reduced NF- $\kappa$ B and increased STAT5 signals. *PLoS ONE* 6(10):e27020, 2011. (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0027020

7) Sato T, Fujii T, Yokoyama T, Fujita Y, Imura Y, Yukawa N, Kawabata D, Nojima N, Ohmura K, Usui T, Mimori T: Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* 62(12):3730-40, 2010. (査読有)

DOI: 10.1002/art.27700

8) Tanaka M, Murakami K, Ozaki S, Imura Y, Tong XP, Watanabe T, Sawaki T, Kawanami T, Kawabata D, Fujii T, Usui T, Masaki Y, Fukushima T, Jin ZX, Umehara H, Mimori T: DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (*Drosophilla*) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1. Analysis of their binding with TGF- $\beta$  superfamily proteins. *FEBS J.* 277(20): 4278-89, 2010. (査読有)

DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07816.x

9) Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, Maeda S, Teradaira S, Akizuki S, Prieto-Martin P, Nomura T, Sakaguchi N, Köhl J, Heyman B, Takahashi M, Fujita T, Mimori T, Sakaguchi S. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med* 207(6):1135-43, 2010. (査読有)

DOI: 10.1084/jem.20092301

10) Yamaguchi H, Fujimoto T, Nakamura S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Nagata S. Aberrant splicing of milk fat globule EGF factor 8 gene in human systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 40(6):1778-85, 2010. (査読有)

DOI: 10.1002/eji.200940096

[学会発表] (計 1 件)

Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M,

Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Umehara H, Mimori T: Follistatin-related protein (FRP/FSTL1) exacerbates the inflammatory process of arthritis. European League Against Rheumatism (EULAR 2011). London, May 25-28, 2011.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 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 なし

(3) 連携研究者

藤井 隆夫 (FUJII TAKAO)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号： 70255462  
臼井 隆 (USUI TAKASHI)  
京都大学・大学院医学研究科・非常勤講師  
研究者番号： 90362483  
大村 浩一郎 (OHMURA KOICHIRO)  
京都大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号： 40432372  
野島 崇樹 (NOJIMA TAKAKI)  
京都大学・大学院医学研究科・非常勤講師  
研究者番号： 30327514  
田中 真生 (TANAKA MASAO)  
金沢医科大学・医学部・准教授  
研究者番号： 10332719

(4) 研究協力者

井口 美季子 (IGUCHI MIKIKO)  
京都大学・大学院医学研究科・研究生  
村上 孝作 (MURAKLAMI KOSAKU)  
大阪赤十字病院・医師