

## 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 5 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591080

研究課題名（和文） A I F-1 分子の機能解析と関節リウマチの治療法の開発

研究課題名（英文） Functional analysis of AIF molecule and development of therapy of rheumatoid arthritis

研究代表者

川人 豊（KAWAHITO YUTAKA）

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50336731

研究成果の概要（和文）：A I F-1 分子の機能解析と関節リウマチの治療法の開発

Allograft-inflammatory factor-1(AIF-1) は、ラットの心移植に伴う慢性拒絶反応において移植片局所に浸潤するマクロファージから検出された分子である。しかし、その生物学的活性は、十分に解明されていない。本研究では、AIF-1 が単核球に誘導する分子をMicroarrayでmRNA の網羅的解析を行い、さらに AIFの単核球における生物学的活性として、IL-6のほか多くのケモカインの誘導と細胞走化性能を有する事を蛋白レベルで証明し、また、組織の線維化に関わる事を示した

研究成果の概要（英文）：Functional analysis of AIF molecule and development of therapy of rheumatoid arthritis

Allograft inflammatory factor (AIF)-1 has been identified in chronic rejection of rat cardiac allografts and is thought to be involved in the immune response, however its molecular function is not fully understood. In this study, we compared mRNA expression profile of rhAIF-1 stimulated peripheral blood mononuclear cells by using the high-density oligonucleotide microarray technique. As biological activity in mononuclear cells of AIF-1, we indicated that AIF-1 induced IL-6 and many chemokines leading to chemotaxis and tissue fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 23 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 24 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：関節リウマチ、AIF-1、ケモカイン、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

Allograft-inflammatory factor-1 (AIF-1) はラットの心移植に伴う慢性拒絶反応において移植片局所に浸潤するマクロファージから検出された 17kDa の 143 のアミノ酸から構成されるポリペプチドである。正常組織では、精巣、脾臓、リンパ節、肝臓、甲状腺等に発現し、現在まで、血管損傷モデルにおける平滑筋細胞、自己免疫性神経炎モデルや脳梗塞におけるマイクログリア細胞、強皮症の間質性病変、皮膚硬化病変での AIF-1 の強発現が確認されており、これら病態に関係する免疫反応や線維化に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、AIF-1 の生化学的機能については、AIF-1 を遺伝子導入した細胞で LPS 刺激下での IL-6 や IL-10 の産生の報告はあるが、AIF-1 がどのような刺激でサイトカインなどの生理活性物質を誘導するのか、また、AIF 自身の細胞にどのような生化学活性を有しているのか、その機能に関しては、ほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

我々は、以前の報告で、AIF-1 が炎症性単核球や線維芽細胞系の滑膜細胞に高発現し、関節液中にも AIF-1 が存在し IL-6 の関節液濃度と相関する事、さらに、AIF-1 は、関節リウマチの滑膜培養細胞増殖能を有し、濃度依存的に滑膜培養細胞とヒト末梢血単核球での IL-6 の産生を誘導することを報告した。(J Immunol. 2007) 機能が不明であった AIF-1 分子自身がサイトカイン誘導能を持つことが、我々の研究ではじめて示され、IL-6 の関連する疾患への AIF の病因への関与が考慮さ

れうる。本研究の主な目的は、IL-6 を誘導する AIF-1 の生化学活性さらに検討した上で、関節リウマチの病因における免疫反応と、IL-6 に関与する難治性疾患の治療薬の開発につながる知見を得ることにある。

## 3. 研究の方法

### 1. Microarray を用いた AIF-1 の CD14 陽性単球/マクロファージに及ぼす生物活性について解析

CD14 陽性ヒト末梢血単核球における AIF-1 が誘導する mRNA を網羅的に同定し、サイトカインやケモカインなどについての AIF の生物活性を検索する。具体的には、遺伝子発現への影響の網羅的解析には、パーフェクトマッチと一塩基ミスマッチの oligonucleotide が対になっている Affymetrix 社方式の High-density oligonucleotide microarray 法を用いた。さらに、得られた情報をもとに mRNA のネットワーク解析を用い、遺伝子間の相互作用の情報を得た上で、CD14 陽性単核球からの蛋白レベルでの発現を ELISA 法により解析した。

### 2. AIF の線維化メカニズムの解析

AIF は、ラットの心移植に伴う慢性拒絶反応の心移植片に浸潤するマクロファージにその存在が明らかになった分子であることから、慢性 GVHD (移植片対宿主病) マウスモデルにおける AIF 分子の発現と線維化を促す免疫反応、線維芽細胞に与える影響について検討した。

7 週令の B10. D2(H-2<sup>d</sup>)雄マウスをドナーとして、その骨髄細胞と脾細胞を 7 週令の BALB/c(H-2<sup>d</sup>)雌マウスに 7.5 Gy7Gy 放射線照

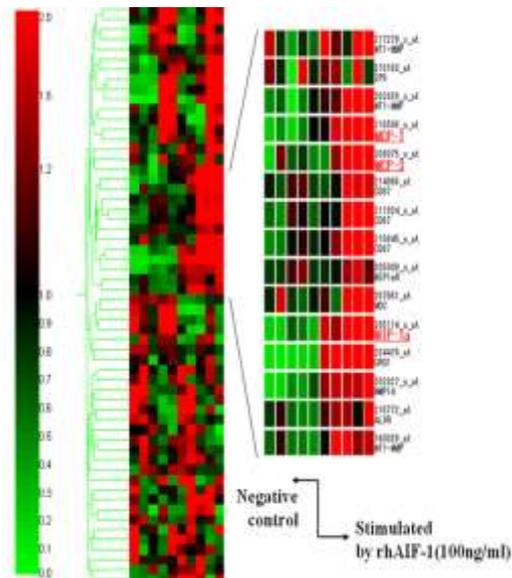
射を行い、その6時間後にドナー骨髄( $1 \times 10^6$ /マウス)と脾細胞( $2 \times 10^6$ /マウス)をRPMI1640に混じて尾静脈より静注し、異種骨髄移植を行う。移植14、21日後に皮膚組織を採取し、病理組織像、AIF-1抗体による免疫染色、Western blotを行い、その発現を解析した。また、線維芽細胞にAIF-1を添加し、増殖能や細胞遊走能について検討した。

#### 4. AIFトランスジェニックマウスを用いたAIFによる関節炎発症の検討

AIFトランスジェニックマウスとコントロールマウスにウシII型コラーゲンをComplete Freund's Adjuvantでエマルジョン化したものを尾部に皮下注射し、第21日にウシII型コラーゲンをIncomplete Freund's Adjuvantでエマルジョン化したものを同様に皮下注射し、Collagen-induced arthritisを誘導する。第21日以降関節炎、骨破壊度を組織学的に組織学的に評価した。

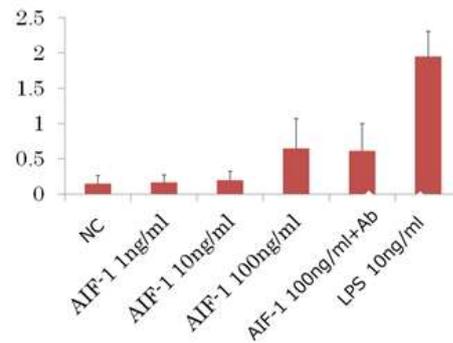
#### 5. 研究成果

1. Microarrayを用いたAIF-1のCD14陽性単球/マクロファージに及ぼす生物活性について解析



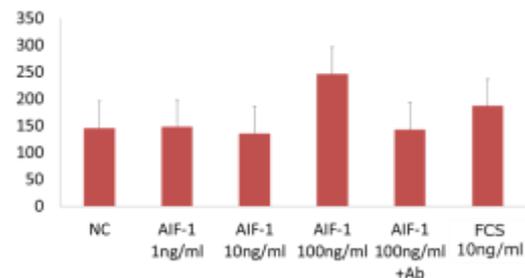
健常人から採集したCD14陽性細胞にrhAIF-1を添加することで細胞遊走に関与するCCケモカインであるCCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CCL7/MCP-3, CCL20/MIP-3a及びIL-6がRNAレベルでup-regulateされていることが確認された。

ELISA : CCL3



Microarrayで大きなRNA up-regulateを認めたCCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CCL7/MCP-3, CCL20/MIP-3a, IL-6について、ELISA法で蛋白発現を検討した。Negative Control群と比較して、AIF-1 100ng/ml群で、CD14陽性細胞よりIL-6とCCL3に有意な産生亢進を認めたが、CCL1, CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3とCCL20/MIP-3 $\alpha$ の産生は軽度であった。

Cell Migration Assay

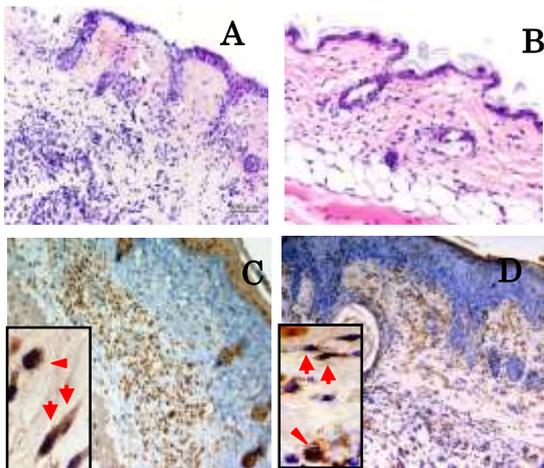


Cell Migration Assayで、rhAIF-1は100ng/mlを添加したCD14陽性細胞の上清でPBMCの遊走能を示した。このように、単核球において、AIF-1の刺激によりRNAレベルではCCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CCL7/MCP-3, CCL20/MIP-3a及びIL-6がup-

regulate され、タンパクレベルでは、有意な CCL1, CCL3, IL-6 の産生亢進を認めた。また、AIF-1 の刺激によって CD14 陽性細胞から産生されたサイトカイン・ケモカインが、末梢血単球を細胞遊走させることが示された。

## 2. AIF の線維化メカニズムの解析

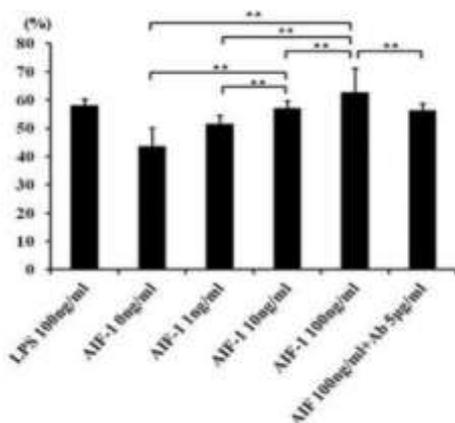
マウス GVHD ヒフ硬化モデルの免疫染色



A, C, D : 強皮症様 GVHD マウス皮膚組織 B : 対照マウス皮膚組織 C: 抗 AIF-1 抗体. D : 抗 IL-6 抗体

著明な線維化を認める強皮症様 GVHD モデルにおいて、浸潤炎症細胞、線維芽細胞に炎症促進性でありかつ線維化にも関与するサイトカイン IL-6 の発現を認めるとともに、AIF-1 の発現亢進を認めた。

線維芽細胞の遊走能 (wound healing assay)



\*\* p<0.01

健康人から採集した CD14 陽性細胞  $1 \times 10^6$  個に各濃度の rAIF-1 を添加して得られる上清をヒト線維芽細胞に添加し、0hr と比較して 24hr 後の細胞の遊走、増殖を観察し、rAIF-1 濃度依存的に %wound closure の上昇を認めた。rAIF-1 100ng/ml 添加群は LPS 100ng/ml 添加群と同程度の %wound closure であり、rAIF-1 0, 1, 10ng/ml 添加群、抗 AIF-1 抗体添加群とは有意差を認めた。

以上より、強皮症様 GVHD モデルの著明に線維化を認める皮膚組織において、浸潤炎症細胞や線維芽細胞の AIF-1、IL-6 の発現が亢進していることを証明した。また、直接 AIF-1 が、もしくは AIF-1 の刺激により単核球から産生されたサイトカインが、ヒト線維芽細胞を刺激、その遊走を誘導し、炎症性サイトカイン産生を亢進させることを、健康人の CD14 陽性細胞と rAIF-1 を用いて in vitro で証明した。

## 3. AIF トランスジェニックマウスを用いた AIF による関節炎発症の検討

AIF トランスジェニックマウスに Collagen-induced arthritis を誘導してコントロールマウスとの関節炎の重症度を比較したが、現時点で有意差が認められない。Collagen-induced arthritis 自身の関節炎誘導が強く、差がでにくいいためと考ええるが、今後の研究として、AIF のノックアウトマウスを作成中で、AIF ノックアウトマウスでの Collagen-induced arthritis の比較を予定している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Yamamoto A, Ashihara E, Nakagawa Y,

Obayashi H, Ohta M, Hara H, Adachi T, Seno T, Kadoya M, Hamaguchi M, Ishino H, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y. Allograft inflammatory factor-1 is overexpressed and induces fibroblast chemotaxis in the skin of sclerodermatous GVHD in a murine model. Immunology Letters. 135; 144-150, 2011. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 山本相浩、芦原英司、川人 豊、河野正孝、坪内康則、石野秀岳、濱口真英、角谷昌俊、妹尾高宏. サイトカイン 病態への作用 強皮症様 GVHD モデルの皮膚における AIF-1 の関与についての検討. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2010 年 4 月 22-25 日 ; 神戸.
- ② 山本相浩、河野正孝、荃田祐司、藤岡数記、永原秀剛、村上 憲、藤井 涉、中村 薫、妹尾高宏、角谷昌俊、川人 豊. 関節リウマチにおける Allograft inflammatory factor-1 のサイトカイン・ケモカイン産生能および細胞遊走能についての検討. 第 40 回日本臨床免疫学会. 2012 年 9 月 27 日 ; 東京.
- ③ Yamamoto A, Ashihara E, Obayashi H, Seno T, Kadoya M, Hamaguchi M, Ishino H, Tsubouchi Y, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y. Allograft inflammatory factor-1 is related with the pathogenesis of skin fibrosis in a murine model of fibromatous GVHD. The annual European League Against Rheumatism. 2010 年 6 月 18 日 Roma, Italy.

④ Yamamoto A, Ashihara E, Nakagawa Y, Obayashi H, Ohta M, Hara H, Adachi T, Seno T, Kadoya M, Hamaguchi M, Ishino H, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y. Allograft inflammatory factor-1 is overexpressed and induces fibroblast chemotaxis in the skin of sclerodermatous GVHD in a murine model. The 14th International Congress of Immunology; 2010 年 8 月 22-27 日 ; Kobe, Japan.

⑤ Yamamoto A, Ashihara E, Obayashi H, Seno T, Kadoya M, Hamaguchi M, Ishino H, Tsubouchi Y, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y. Allograft inflammatory factor-1 is related with the pathogenesis of skin fibrosis in a murine model of fibromatous GVHD. The 74st annual meeting of the American College of Rheumatology. 2011 年 11 月 8 日 Atlanta, USA.

[図書] 該当なし

[産業財産権] 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川人 豊 (KAWAHITO YUTAKA)  
京都府立医科大学・医学研究科 准教授  
研究者番号 : 50336731

### (2) 研究分担者

河野 正孝 (KOHNO MASATAKA)  
京都府立医科大学・医学研究科 助教  
研究者番号 : 60405256

研究分担者

内藤 裕二 (NAITO YUJI)  
京都府立医科大学・医学研究科 准教授  
研究者番号 : 00305575

研究分担者  
太田 光熙 (OHTA MITSUHIRO)  
神戸薬科大学・薬学部 教授  
研究者番号 : 00330423

(3) 連携研究者 該当なし