

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791552

研究課題名(和文)関節リウマチ病態におけるC型レクチンの役割

研究課題名(英文)Roles of C-type lectin in the pathogenesis in rheumatoid arthritis.

研究代表者

小山田 亜希子(堀亜希子)(Oyamada, Akiko)

九州大学・大学病院・研究員

研究者番号：30589461

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、関節リウマチ(RA)病態における滑膜マクロファージのC型レクチンであるMincleの関与について検討を行った。

野生型(WT)マウスとMincle遺伝子欠損(Mincle KO)マウスにコラーゲン誘導性関節炎(CIA)を誘導したところ、WTマウスに比してMincle KOマウスでは関節炎が減弱しており、CIAモデルにおいてMincleが病態形成にかかわっていることが考えられた。健康人の末梢血のリンパ球においては、LPSの濃度依存的にCD14陽性単球系細胞でのMincleの発現上昇が認められた。一方で、RA患者の末梢血などでは明らかなMincleの発現は認められなかった。

研究成果の概要(英文): Mincle is a member of C-type lectin. In this study, we examined the involvement of Mincle of synovial macrophage in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

Collagen-induced arthritis (CIA) were induced in wild-type (WT) mice and Mincle knockout (Mincle KO) mice. Although Mincle KO mice as well as WT mice developed CIA, the clinical scores of arthritis were lower in Mincle KO mice compared with those of WT mice, indicating that Mincle is involved in the pathogenesis of CIA. When mononuclear cells isolated from peripheral blood (PB) of healthy subjects were incubated with LPS, the expression of Mincle was observed on CD14 cells and the level of Mincle expression depended on the density of LPS. On the other hand, Mincle was not detected on mononuclear cells of PB or synovial membrane from RA patients without stimulation.

研究分野：リウマチ学

キーワード：C型レクチン

1. 研究開始当初の背景

RA 関節では関節滑膜を構成する線維芽細胞やマクロファージが異常増殖し、これらの細胞から産生される種々のサイトカインが疾患持続と調節に働き、進行すると破骨細胞による骨・軟骨破壊が生じる。滑膜マクロファージ活性化機構の中心は現在ヘルパー (CD4) T 細胞から産生されるサイトカインであると考えられているが、申請者らは、RA 関節の CD4 T 細胞浸潤は変形性関節症(OA)と比して著増していなかったことを見出し(Yamada, J Rheumatol. 2010)、CD4 T 細胞の関節浸潤は炎症の原因ではなく結果を反映し、滑膜マクロファージは自然免疫系によって活性化されている可能性が考えられた。マクロファージなどの自然免疫担当細胞は、パターン認識受容体(pattern recognition receptors; PRR)を介して様々な病原体由来の構成分子パターン(pathogen-associated molecular pattern; PAMPs)を認識することによって活性化され、免疫応答を引き起こす。PRR の代表的なものに toll-like receptor (TLR)があげられる。TLR はヒトでは 10 種類知られ、通常は病原体認識によって感染に対する宿主防御に働くが、自己DNAやRNAなどの認識により自己免疫疾患に関与することも知られている。TLR の RA 病態への関与については、RA 関節内における TLR2/3/4 のリガンドの存在や滑膜細胞の TLR2、TLR3 の発現上昇が見られること、マウス関節炎モデルにおいて TLR2 や TLR4 が病態形成に関与していることなどが報告されている(Clanchy, Expert Opin Biol Ther. 2010)。

更にマクロファージ系細胞に発現する PRR には微生物糖鎖を認識する C 型レクチンがあり、主に真菌に対する感染防御に寄与している。最近、C 型レクチンの一つである macrophage inducible C-type lectin(Mincle)が、ストレスなどによる自己死細胞から放出された spliceosome associated protein 130(SAP130)を認識し、ITAM を持つ FcR γ 鎖と会合して活性化シグナルを伝え、炎症性サイトカインを大量に産生することが明らかとなり注目を集めている(Yamasaki, Nat Immunol. 2008)。更に Mincle はマラセチア真菌や結核菌の trehalose-6, 6'-dimycolate(TDM)を認識することが報告された(Yamasaki, PNAS 2009 and Ishikawa, J Exp Med. 2009(申請者は研究協力者として貢献))。

C 型レクチンの RA への関与については、滑膜細胞の DC-SIGN や骨髄由来単球の Mincle の発現が高かったということが報告されている(van Lent, Arthritis Rheum. 2003 and Nakamura, DNA res. 2006)が、その病態における役割に関しては明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、RA 滑膜炎や骨破壊をもたらす滑膜マクロファージや破骨細胞における C 型

レクチンの役割について Mincle を中心に研究することによって RA 病因解明の糸口とし、新規治療の確立につなげることを目指し、以下の点について明らかとする。

3. 研究の方法

<RA 患者および健常人/OA 患者の定常状態における Mincle 発現>

RA 群、およびコントロール群の検体からリンパ球を分離し、RT-PCR による Mincle の mRNA 発現、多重蛍光染色フローサイトメーター解析(現有設備)による CD14 陽性単球系細胞上の Mincle 発現を検出する。更に、CD14 陽性細胞以外にも発現細胞がないかどうかを調べる。

また、RA、及びコントロール群から得られた滑膜組織の凍結切片を作製し、Mincle や CD14 などの免疫組織染色を行い、Mincle がどのような部位のどの細胞群に発現しているかを調べる。

これらの実験については検体数を増やし検討していくため、平成 25 年度以降も引き続き行っていく予定である。

2. ヒトマクロファージの Mincle を介するサイトカイン産生のメカニズム解析

マウスではマクロファージを LPS によって Mincle 発現が上昇することが知られているが、ヒトの細胞でも同様であるかを RA・コントロール検体、あるいはヒト単球系細胞株である U937 細胞、THP-1 細胞株を用いて確認し、更に TNF-a や IL-6 などのサイトカイン産生能も調べる。

<マウス関節炎モデル>

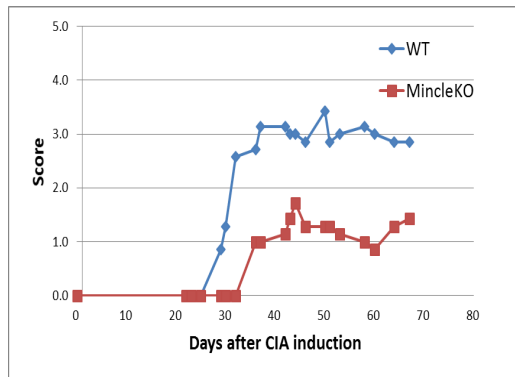
CIA は、ニワトリ由来 II 型コラーゲン(CII)と完全フロイントアジュバント(CFA)の乳濁液をマウスの背部に皮内注射を 2 回(0 日、21 日)することで誘導する。C57BL/6 系統 WT マウスにおいてはこの方法での CIA 発症がほぼ 100%であることを既に確認している。

WT マウスと Mincle KO マウスに CIA を誘導し、以下について両者間で比較検討し、Mincle の CIA 発症への重要性を解析する。

4. 研究成果

本研究では、関節リウマチ(RA)病態における滑膜マクロファージの C 型レクチンである Mincle の関与について検討を行った。

野生型(WT)マウスと Mincle 遺伝子欠損(Mincle KO)マウスにコラーゲン誘導性関節炎(CIA)を誘導したところ、WT マウスに比して Mincle KO マウスでは関節炎が减弱しており、CIA モデルにおいて Mincle が病態形成にかかわっていることが考えられた。健常人の末梢血のリンパ球においては、LPS の濃度依存的に CD14 陽性単球系細胞での Mincle の発現上昇が認められた。一方で、RA 患者の末梢血などでは明らかな Mincle の発現は認められなかった。



◁WT マウスと Mincle KO マウスにおける CIA 誘導後の臨床スコア ▷

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Sakuraba K, Fujimura K, Nakashima Y, Okazaki K, Fukushi JI, Ohishi M, Oyamada A, Esaki Y, Miyahara H, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H.

Successful *in vitro* culture of synovial explants from rheumatoid arthritis at the air-liquid interface.

Arthritis Rheumatol. 査読有, 67(4):887-92, 2015

doi: 10.1002/art.39019

Shinoda K, Sun X, Oyamada A, Yamada H, Muta H, Podack ER, Kira J, Yoshikai Y. CD30 ligand is a new therapeutic target for central nervous system autoimmunity.

Journal of Autoimmunity 査読有, 57:14-23, 2015

doi: 10.1016/j.jaut.2014.11.005

Hashiguchi T, Oyamada A, Sakuraba K, Shimoda K, Nakayama KI, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H

Tyk2-dependent bystander activation of conventional and nonconventional Th1 cell subsets contributes to innate host defense against *Listeria monocytogenes* infection.

J Immunol 査読有, 192(10):4739-47, 2014

doi: 10.4049/jimmunol

Tashiro Y, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi J, Ohishi M, Oyamada A, Yamada H, Iwamoto Y

Effects of adalimumab administration in bio-naive and bio-switch rheumatoid arthritis patients in daily clinical practice: two-year results from single center.

Fukuoka Igaku Zasshi 104(11):413-23,

2013

Ueda S, Oryoji D, Yamamoto K, Noh JY, Okamura K, Noda M, Kashiwase K, Kosuga Y, Sekiya K, Inoue K, Yamada H, Oyamada A, Nishimura Y, Yoshikai Y, Ito K, Sasazuki T

Identification of independent susceptible and protective HLA alleles in Japanese autoimmune thyroid disease and their epistasis.

J Clin Endocrinol Metab 査読有 99(2):E379-83, 2013

doi: 10.1210/jc.2013-2841

Fujimura K, Oyamada A, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H

CD4 T cell-intrinsic IL-2 signaling differentially affects Th1 and Th17 development.

J Leukoc Biol 査読有, 94(2):271-9, 2013

doi: 10.1189/jlb.1112581

Miyake Y, Toyonaga K, Mori D, Kakuta S, Hoshino Y, Oyamada A, Yamada H, Ono K, Suyama M, Iwakura Y, Yoshikai Y, Yamasaki S

C-type lectin MCL is an FcR γ -coupled receptor that mediates the adjuvant activity of mycobacterial cord factor.

Immunity 査読有, 38(5):1050-62, 2013

doi: 10.1016/j.immuni.2013.03.010

[学会発表](計18件)

第49回九州リウマチ学会(2015.3.21-22 福岡)

インフリキシマブでの治療が困難な強直性脊椎炎症例に対するアダリムマブへのスイッチの有効性

畑 和宏, 大石 正信, 中島 康晴, 岡崎 賢, 福土 純一, 小山田 亜希子, 久保 祐介, 岩本 幸英

リウマチ足趾病変に対する関節温存手術の成績

福土 純一, 中島 康晴, 岡崎 賢, 大石 正信, 小山田 亜希子, 橋口智光, 岩本 幸英

第42回 日本関節病学会(2014.11.6-7 東京)

強直性脊椎炎の外科的治療

大石 正信, 中島 康晴, 久保 祐介, 岡崎 賢, 福土 純一, 小山田 亜希子, 岩本 幸英

第48回九州リウマチ学会(2014.9.6-7 久留米)

RA 前足部に対する関節温存手術の経験
福土 純一, 中島 康晴, 岡崎 賢, 大石 正信, 小山田 亜希子, 岩本 幸英

第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 合同学術集会 (2014.9.4-6 金沢)

CD30 リガンドは実験的自己免疫性脳脊髄炎の新規治療標的となる
篠田 紘司, 孫 遜, 小山田 亜希子, 山田 久方, 吉良 潤一, 吉開 泰信

第 127 回西日本整形・災害外科学会学術集会 (2014.6.7-8 福岡)

関節リウマチ前足部病変に対する手術治療
福土 純一, 中島 康晴, 岡崎 賢, 大石 正信, 水内 秀城, 田代 泰隆, 小山田 亜希子, 岩本 幸英

第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 22 回国際リウマチシンポジウム (2013.4.18-20 東京)

手根管症候群にて初発した関節リウマチ症例の検討
福土 純一, 芳田 辰也, 中島 康晴, 岡崎 賢, 大石 正信, 田代 泰隆, 小山田 亜希子, 岩本 幸英

骨軟化症症例における股関節周辺骨折の検討
大石 正信, 中島 康晴, 山本 卓明, 岡崎 賢, 福土 純一, 本村 悟朗, 田代 泰隆, 小山田 亜希子, 岩本 幸英

サルコイドーシスに難治性の膝関節滑膜炎を来し、鏡視下滑膜切除が奏功した 1 例
田代 泰隆, 廣瀬 毅, 山田 久方, 中島 康晴, 岡崎 賢, 福土 純一, 大石 正信, 小山田 亜希子, 岩本 幸英

関節リウマチ滑膜組織培養法の開発
櫻庭 康司, 藤村 謙次郎, 中島 康晴, 岡崎 賢, 福土 純一, 大石 正信, 田代 泰隆, 小山田 亜希子, 橋口 智光, 江崎 幸雄, 宮原 寿明, 岩本 幸英, 吉開 泰信, 山田 久方

第 47 回九州リウマチ学会 (2014.3.15-16 長崎)

肘部に腫瘍性病変を呈した MTX 関連リンパ増殖性疾患の一例
畑野 崇, 大石 正信, 松延知也, 中島 康晴, 岡崎 賢, 福土 純一, 田代 泰隆, 小山田 亜希子

亜希子, 岩本 幸英, 吉本 五一, 山内 盛泰, 小田 義直, 山元英崇, 前川 啓

第 42 回日本免疫学会学術集会 (2013.12.11-13 千葉)

CD30 ligand is a target for a novel biological therapy against experimental autoimmune encephalomyelitis
Shinoda Koji, Sun Xun, Oyamada Akiko, Yamada Hisakata, Kira Jun-ichi, Yoshikai Yasunobu

第 41 回日本臨床免疫学会総会 (2013.11.27-29 下関)

自己 II 型コラーゲンの糖鎖修飾が自己免疫寛容に及ぼす影響
山田 久方, Backlund Johan, 小山田 亜希子, Holmdahl Rikard, 吉開 泰信

第 126 回西日本整形・災害外科学会学術集会 (2013.11.9-10 宇部)

難治性の膝関節滑膜炎を来したサルコイドーシスの 1 例
廣瀬 毅, 田代 泰隆, 山田 久方, 井浦 国生, 中島 康晴, 岡崎 賢, 福土 純一, 大石 正信, 小山田 亜希子, 小田 義直, 岩本 幸英

第 24 回日本生体防御学会学術総会 (2013.7.10-12 熊本)

異なる Th1 細胞サブセットの分化、機能における Tyk2 の役割
橋口 智光, 小山田 亜希子, 櫻庭 康司, 吉開 泰信, 信山田 久方

第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 22 回国際リウマチシンポジウム (2013.4.18-20 京都)

IL-21 シグナルはコラーゲン誘導関節炎の発症に重要な役割を果たす
櫻庭 康司, 小山田 亜希子, 藤村 謙次郎, 橋口 智光, 岩本幸英, 吉開 泰信, 山田 久方

第 41 回日本免疫学会学術集会 (2012.12.5-7 神戸)

IL-21 plays critical role in the production of pathogenic autoantibody in

a murine autoimmune arthritis
山田 久方, 櫻庭 康司, 小山田 亜希子, 中
村 梨沙, 藤村 謙次郎, 吉開 泰信

第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第
21 回 国 際 リウ マ チ シ ン ポ ジ ウ ム
(2012.4.26-28 東京)

抗原特異的 Th17 細胞のクローン増殖におけ
る IL-2 の役割
藤村 謙次郎, 橋口 智光, 櫻庭 康司, 小山
田 亜希子, 岩本 幸英, 吉開 泰信, 山田
久方

〔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 :
出願年月日 :
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
小山田 亜希子 (OYAMADA, Akiko)

研究者番号 : 30589461

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし