

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591440

研究課題名(和文) 関節炎におけるマクロファージと自己免疫応答相互の制御機構の解明

研究課題名(英文) Exploring inhibitory mechanisms of autoinflammation by macrophage in 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節炎誘導期に上昇するTNF 誘導分子TIARPを同定し、その欠損マウスが関節炎を自然発症することを明らかにした。この欠損マウスではTNF 誘導性のIL-6産生増強が病態に強く関わり、またマウス、ヒトともに単球、好中球と滑膜細胞に強発現している。末梢血単球ではRA特異的に発現が上昇し、末梢血の挙動はTNF阻害剤やIL-6阻害剤によって減弱し、特に有効性が高い群でその低下が顕著であることが明らかになった。また、抗環状シトルリン化ペプチドGPI抗体はRA特異的に出現し、疾患活動性に伴って変動し、新たなRAのバイオマーカーになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified TNF-induced protein such as TIARP from active arthritic mice. TIARP-deficient mice spontaneously develop arthritis, and their expression is localized in monocytes, neutrophil and fibroblast in mice and humans. In humans, their expression in PBMC is clearly regulated by TNF and IL-6 inhibitors, and related to the therapeutic response. In addition, anti-citrullinated GPI-peptide antibodies were specifically identified in patients with RA, and correlated to disease activity, possibly belongs to one of the new biomarkers in RA.

研究分野：膠原病・リウマチ・アレルギー

キーワード：関節リウマチ 炎症性サイトカイン 炎症制御 単球 好中球 シトルリン化タンパク抗体 GPI

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) において、炎症性サイトカインである TNF や IL-6 を制御する薬剤や、T 細胞活性化を抑える CTLA-4Ig などの生物学的製剤の登場により治療体系が大きく変わりつつある。しかしながら劇的な効果を認める患者群もいるが無効例も存在し、病因については未だ不明点が多い。臨床現場から判明してきた知見を統合すると、上記炎症性サイトカイン、自己反応性 T 細胞、自己抗体の病因的な 3 軸が複雑に絡み合い、RA 病態を形成していることが示唆されている。

研究代表者らは今までに K/BxN マウスという自然発症関節炎モデルを用いて、ユビキタな解糖系酵素 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) に対する免疫応答が単独で関節炎を惹起することを明らかにしてきた。さらに、GPI 免疫により誘発されるもう 1 つの関節炎モデルを独自に作成し解析を行ってきた (GPI 誘導関節炎)。このモデルは自己抗体及び自己反応性 T 細胞が必須で、炎症性サイトカインの依存性や生物学的製剤の有効プロファイルが RA に近似している。また、GPI 誘導関節炎モデルの T 細胞 epitope を同定し、その 15mer の GPI ペプチドで誘発できる関節炎モデルを開発した。

本応募研究では RA の病因本態と考えられる上記 3 軸の更なるメカニズム解明を目指して、これらのマウス、及びヒトで詳細に検討を進めていく。以下の 2 つのテーマに沿って、研究を進めた。

## 2. 研究の目的

### 1) 関節炎における TIARP/STEAP4 の制御メカニズム—ヒト及びマウスの解析

GPI 誘導関節炎を用いて得られた分子 TNF-induced adipose related protein (TIARP) に注目し、その欠損マウス及びヒトマクロファージとその細胞株を用い、関節炎における病因的意義の解析を行う。

### 2) 抗シトルリン化蛋白抗体 (抗環状シトルリン化 GPI 抗体を含む) の病因的意義

RA の自己抗体で抗シトルリン化蛋白抗体が感度、特異度とも優れているが、病因的意義に関しては明らかでない。マウスで関節炎原

生が証明されている GPI のシトルリン化 peptide に対する免疫応答が我々の検討で RA 患者特異的に認められ、その病因的意義の探索を行う。

## 3. 研究の方法

### 1) 関節炎における TIARP/STEAP4 の制御メカニズム—ヒト及びマウスの解析

本研究では dominant な発現細胞である CD11b 陽性 (マウス) 及び CD14 陽性 (ヒト) マクロファージに着目して、関節炎での病因的意義を更に進める。TIARP 欠損マウスにおいては、TNF 依存性のカスケードにおいて IL-6 を強く誘導することが判明している。TIARP 欠損及び WT マウスよりマクロファージをチオグリコネートで誘導し採取する。

まず TIARP 欠損マウスでの関節炎病態の経時的解析を行う。特 TIARP 欠損マクロファージにおいては、TNF, IL-6 下流のシグナル伝達異常が考えられる。TNF, LPS, IL-6 各刺激を用いて、リン酸化 STAT3 や SOCS3, Erk1/2 を蛋白レベルで解析し比較検討する。また同様に NFκB 経路に関しても検索を進める。また抗 IL-6R 抗体を用いて、関節炎発症後でも TIARP 欠損マウスの CIA を抑制できるかも検討する (通常の CIA では抑制できないと考えられる)。

ヒトの解析においては CD14 陽性細胞に注目し、現在までに RA 患者 CD14 陽性細胞での発現を健常人と比較する。抗 TNF 抗体、抗 IL-6 受容体抗体、CTLA-4Ig 治療によるこの分子の挙動や治療反応性を治療前後で、CD14 細胞に特化して比較する。ヒト CD14 陽性細胞自体にサイトカインを添加した場合の TIARP 挙動も検討する。

### 2) 抗シトルリン化蛋白抗体 (抗環状シトルリン化 GPI 抗体を含む) の病因的意義

我々は GPI 全長に分布する環状シトルリン化 GPI peptide を 9 部位 (CCG-1-9) 作成し、RA、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群患者及び健常人の血清中の抗 CCG 抗体の有無を ELISA で検討し、環状シトルリン化 anolase peptide (CEP-1)、CCP に対する抗体も測定し比較した。また、RA 患者の HLA-DR genotyping を行ない、shared epitope allele (SE) の有無と ACPA の関連を検討した。更に ACPA 陽性 RA 患者において、TNF アンタゴニスト治療前と 6 ヶ月後での抗 CCG、CEP-1 抗体価を比較した。

抗 CCG-2、7 抗体の affinity purify を行い、免疫染色でこの ACPA の沈着と、細胞表面マーカー (CD4, CD20, CD68) とのリンク、及び PAD 酵素とのリンクを検討する。

#### 4 . 研究成果

##### 1) 関節炎における TIARP/STEAP4 の制御メカニズム—ヒト及びマウスの解析

TIARP 欠損マウスが関節炎を自然発症することが明らかになった (Arthritis Rheum 2012)。この欠損マウスでは TNF 誘導性の IL-6 産生増強が病態に強く関わり、欠損単球の解析では NFkB 抑制因子である Ikb $\alpha$  発現の発現遅延・低下、及び IL-6 刺激での STAT3 リン酸化低下が判明していた。また CIA を誘導すると、IL-6 受容体抗体により発症後でも関節炎が減弱した (Arthritis Rheum. 2012)。

発現細胞解析では、マウス、ヒトともに単球、好中球と滑膜細胞に強発現している (Clin Immunol. 2014)。末梢血単球では RA 特異的に発現が上昇し特に CD14+CD16dim 細胞に発現が強かった。末梢血の挙動は TNF 阻害剤や IL-6 阻害剤によって減弱するものの CTLA-4Ig では変化は認められず、また抗サイトカイン製剤においては、特に有効性が高い群でその低下が顕著であることが明らかになった (Clin Exp Immunol. in press)。CD14+ 細胞の解析においては、TNFa の刺激で IL-6 産生に続いて TIARP 発現が認められることが判明した。

##### 2) 抗シトルリン化蛋白抗体 (抗環状シトルリン化 GPI 抗体を含む) の病因的意義

9 部位のうち CCG2,7 の 2 部位の CCG に対し RA で特異的かつ強い反応が認められ、特に抗 CCG-2 抗体は RA での特異度は 99.7% と高く、感度は 26% であった。抗 CCG-2,7、CEP-1、CCP 抗体は有意な相関を示し、すべての抗体の陽性率は SE を有する群で有意に高く SE との関連が示唆された。患者群で治療 6 ヶ月後には疾患活動性 (DAS28) は抗 CCG-2,7 抗体で有意に低下していたが、CEP-1 に対する抗体価は有意な変化を認めなかった。複数の環状シトルリン化 GPI ペプチドに対する自己抗体が RA 患者血清に存在することが判明し、RA の活動性とリンクして変動することが想定され、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 (Clin Exp Immunol 2013)。

抗 CCG-7 抗体の沈着は CD68 細胞に認められ、シトルリン化蛋白のソースである可能性が考えられた。PAD 酵素とのリンクは現在検

討中である。

#### 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 11 件)

1. Takai C, \*Matsumoto I, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Kurashima Y, Wada Y, Narita I, Sumida T. Specific overexpression of TNFAIP9 in CD14+CD16- monocytes in patients with rheumatoid arthritis-Comparative analysis with TNFAIP3. Clin Exp Immunol (in press)(査読有)
2. Tanaka Y, \*Matsumoto I, Inoue A, Umeda N, Takai C, Sumida T. Antigen-specific overexpression of human cartilage glycoprotein 39 on CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells in the generation of glucose-6-phosphate isomerase induced arthritis. Clin Exp Immunol 177:419-27, 2014 (査読有)
3. Tsuboi H, Nakai Y, Iizuka M, Asashima H, Hagiya C, Tsuzuki S, Hirota T, Miki H, Hagiwara S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Yoshihara T, Abe K, Sumida T. DNA microarray analysis of labial salivary glands in IgG4-related disease. Comparison with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 66:2892-9, 2014 (査読有)
4. \*Matsumoto I, Inoue A, Takai C, Umeda N, Tanaka Y, Kurashima Y, Sumida T. Regulatory roles of tumor necrosis factor alpha-induced proteins (TNFAIP) 3 and 9 in arthritis. Clin Immunol 153:73-78, 2014 (査読有)
5. 松本功、梅田直人、住田孝之 RA における抗環状シトルリン化ペプチド抗体 リウマチ科 51(3): 326-330, 2014
6. 松本功、井上明日香、高井千夏、倉島悠子、住田孝之 TNF -induced adipose related protein (TIARP) の関節炎における新作用機序 日本臨床 増刊号 72:144-147, 2014
7. Umeda N, \*Matsumoto I, Ito I, Kawasaki A, Tanaka Y, Inoue A, Tanaka Y, Tsuboi

- H, Suzuki T, Hayashi T, Ito S, Tsuchiya N, Sumida T. Anti-citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with HLA-DRB1 shared epitope alleles and disease activity. Clin. Exp. Immunol. 172: 44-53, 2013 (査読有)
8. 松本功 特集：関節リウマチ 関節リウマチの動物モデルとその臨床的意義 Medical Practice 36: 564-567, 2013
  9. 井上明日香、松本功、住田孝之 マウス関節炎発症におけるTNF $\alpha$ -induced adipose-related protein (TIARP)の役割 リウマチ科 50(1):132-137, 2013
  10. Inoue A, \*Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, Sumida T. Murine tumor necrosis factor $\alpha$ -induced adipose-related protein (tumor necrosis factor $\alpha$ -induced protein 9) deficiency leads to arthritis via interleukin-6 overproduction with enhanced NF- $\kappa$ B, STAT-3 signaling, and dysregulated apoptosis of macrophages. Arthritis Rheum 64:3877-3885, 2012 (査読有)
  11. 松本功、梅田直人 関節リウマチにおける解糖系酵素に対するシトルリン化自己抗体 リウマチ科 47: 594-597, 2012

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 松本功: Biological action of anti-TNF therapy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-CZP and the beyond. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会クリニカルセミナー (京都)、2014.12.10-12
2. 松本功: RA の早期診断・治療における小関節炎の評価 イメージングモダリティを含めて 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 ランチョンセミナー (東京) 2014.4.24-26

3. Matsumoto I: The regulatory role of TNF $\alpha$ -induced protein9(TNFAIP9) in arthritis with mice and humans. Autoimmunity Congress Asia 2013 Satellite Symposium( Hong Kong )Nov 21th, 2013
4. 松本功: 関節炎モデルにおける IL-6 阻害の効果-Th17, TNF 誘導蛋白とのリンク- 第 2 回 RA と IL-6 研究会 (品川) 11月9日、2013
5. Matsumoto I:. Role of IL-6 and TNF $\alpha$ -induced proteins in autoimmune arthritis JSICR and MNCB (Tokyo), May 20<sup>th</sup>, 2013
6. 松本功: 関節リウマチの病因論 update 第 16 回リウマチフォーラム (品川) 2012.7.9
7. Matsumoto I:. Autoimmune arthritis mediated by glycolytic enzyme-focusing on regulatory TNF $\alpha$ -induced protein- International Congress on Autoimmunology (in Granada), May 10<sup>th</sup>, 2012

〔図書〕(計 1 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 101:2839-2843, 2012

〔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

<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：2030343081