

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

慢性関節リウマチ (RA) 患者の病変滑膜におけるケモカイン、ケモカインレセプター (特にSDF-1 / CXCR4) の役割の解析と新規治療薬開発の試み

所属 東京医科歯科大学 生体応答調節学
研究者 南木敏宏

要旨

慢性関節リウマチ(RA)滑膜細胞は、ケモカイン刺激によりサイトカイン産生が亢進する。また、RA滑膜組織へのT細胞浸潤にCX3CL1/CX3CR1相互作用が関与し、その浸潤したT細胞はRAの病態形成に関わっていることが示唆された。

1. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)は、慢性の多発関節炎を特徴とし、病気の進行に伴い罹患関節機能は低下し、骨破壊などもみられるようになり、患者の活動能は非常に低下する。現在、RA患者に対し各種抗リウマチ剤が投与されているが、それらの薬剤が無効の患者も多数みられ、RAに対する治療薬は十分ではない。RA罹患関節滑膜組織では、炎症細胞の浸潤、滑膜細胞の増殖がみられる。T細胞・マクロファージ様滑膜細胞(A型滑膜細胞)・樹状細胞様滑膜細胞(D型)は血管より滑膜炎部位に浸潤し、慢性炎症に関与していると考えられ、その浸潤には細胞表面に発現しているケモカインレセプターが重要な役割を果たしている。実際、我々も含め、いくつかのグループより、RA滑膜炎細胞が発現するケモカインレセプター、および、RA滑膜組織において産生されている各種のケモカインについて報告されている。一方、ケモカインは細胞浸潤を促すだけでなく、細胞刺激にも関与していると考えられており、RA滑膜組織のケモカインは、滑膜細胞増殖・炎症性サイトカインの産生を亢進させている可能性がある。これらのことより、ケモカイン・ケモカインレセプターは、RAの病態形成に深く関与していると考えられる。

RAの病態形成に関与するケモカイン・ケモカインレセプターを解析することにより、ケモカイン・ケモカインレセプター相互作用の阻害薬による、RAに対する新規治療薬の開発を目的とし、今回、ケモカインによるRA滑膜細胞刺激の検討、CX3CL1(fractalkine)/CX3C chemokine receptor-1 (CX3CR1)相互作用の、RA滑膜へのT細胞浸潤への関与について解析した。

2. 実験方法

RA患者滑膜組織より線維芽細胞様滑膜細胞を樹立した。その細胞に、MCP-1, RANTES, SDF-1で刺激し、細胞培養液中のIL-6, IL-8の濃度をELISAにて測定。

RA患者および健常者の末梢血 CD4, CD8 T細胞に発現するCX3CR1を、フローサイトメーターを用いて解析。また、CX3CR1陽性T細胞におけるCD27, CD28およびgranzyme A, perforinの発現を解析した。また末梢血T細胞をCX3CR1陰性、およびCX3CR1陽性細胞に分離し、PMA, ionomycinで刺激後に細胞内サイトカイン(IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α)産生をフローサイトメーターで解析した。

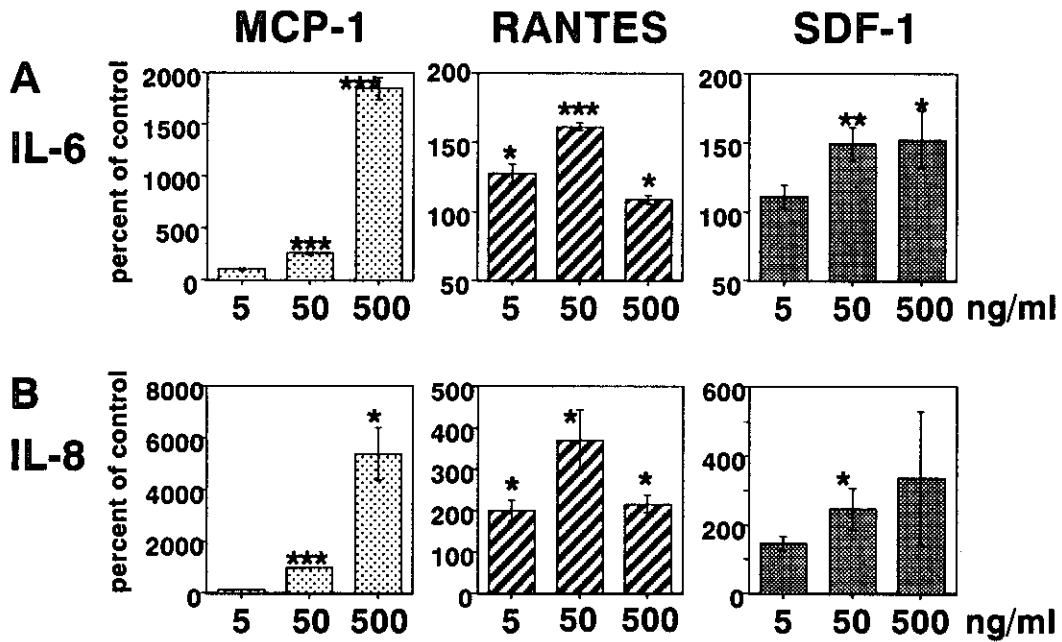
また、免疫組織染色により、RA滑膜組織に発現するCX3CR1, CX3CL1の発現を解析し、変形性関節症(OA)と比較した。

3. 研究成果

1) ケモカインによるRA滑膜細胞刺激

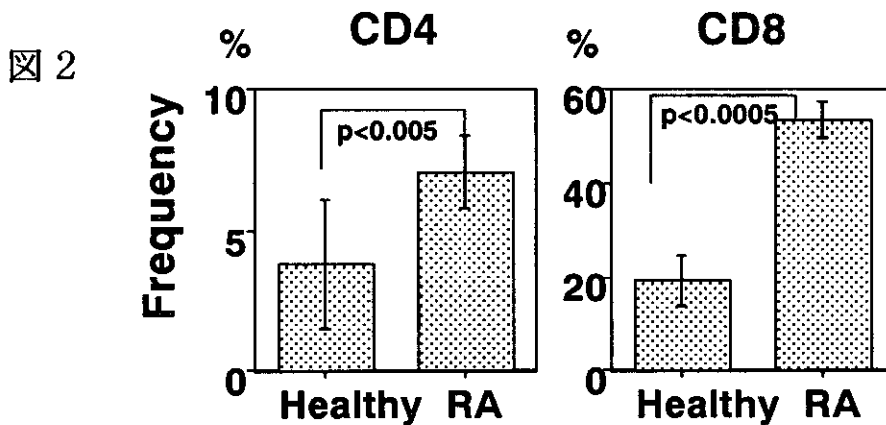
RA線維芽細胞様滑膜細胞は、MCP-1, RANTES, SDF-1刺激により、IL-6, IL-8の産生が亢進した。(図1)。

図1



2) 末梢血 T細胞によるCX3CR1の発現

末梢血 T細胞におけるCX3CR1の発現頻度をFACSにて解析し、RA患者と健常者と比較した。CD4 T細胞におけるCX3CR1の発現頻度は非常に低い、RA患者では健常者と比較し優位に上昇していた。CD8 T細胞では、CX3CR1の発現頻度は、CD4 T細胞と比し上昇し、またRA患者では健常者より有意にその発現頻度が高値であった(図2)。

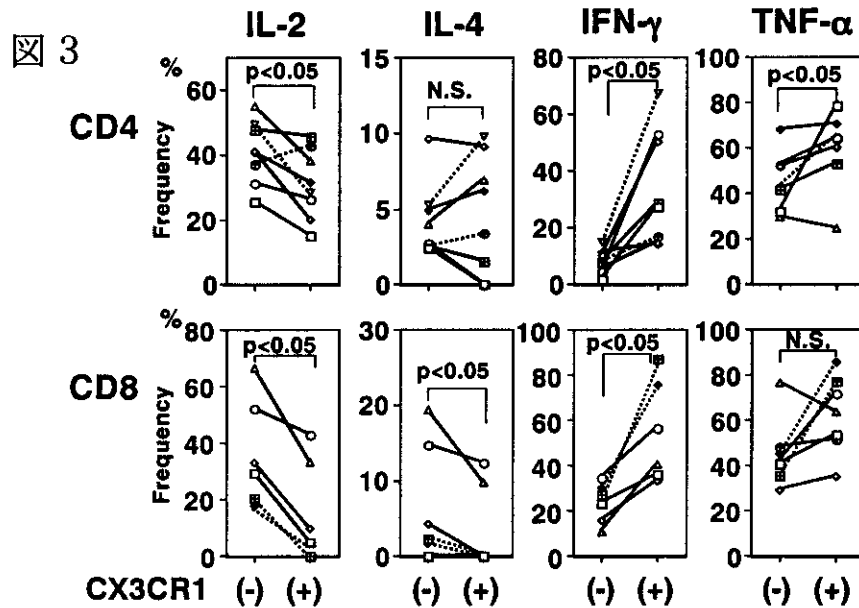


3) 末梢血CX3CR1陽性 T細胞のサイトカイン産生能

末梢血CX3CR1陰性、陽性 T細胞に分離後、PMA, ionomycinで刺激し、細胞内サイトカイン産生をFACSにて解析、比較した。

CD4 T細胞では、CX3CR1陽性 T細胞で、IFN- γ , TNF- α の産生頻度が上昇し、IL-2の産生頻度は低下、IL-4産生には有意差がなかった。

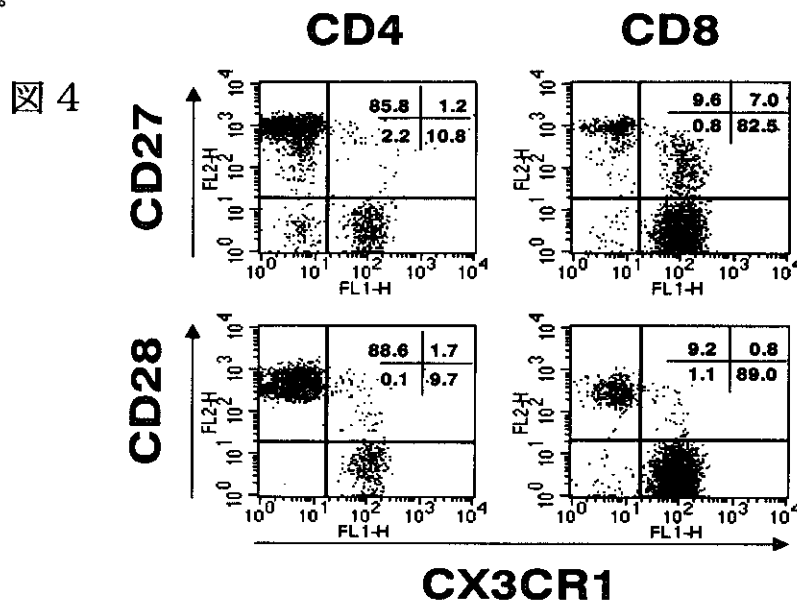
CD8 T細胞では、CX3CR1陽性 T細胞で、IFN- γ の産生頻度が上昇し、IL-2, IL-4の産生頻度が低下していた (図3)。



4) 末梢血CX3CR1陽性 T細胞によるCD27, CD28の発現

これまでに、RA患者の末梢血CD4 T細胞で発現の増加が報告されているCD28、およびRA滑膜のCD4 T細胞で発現の増加が報告されているCD27の発現と、CX3CR1の発現の関連を末梢血T細胞において解析した。

末梢血CD4, CD8 T細胞の、CX3CR1陽性T細胞では、大部分がCD27陰性、CD28陰性であった (図4)。

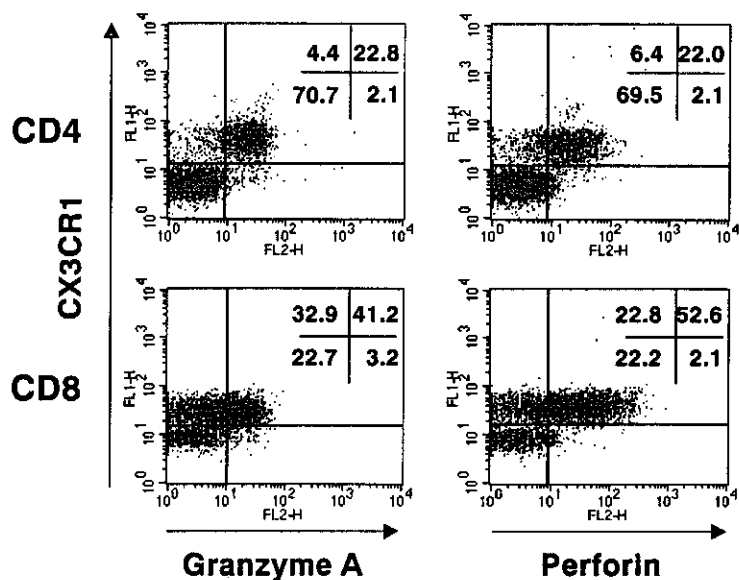


5) 末梢血CX3CR1陽性T細胞における、granzyme A, perforinの発現

末梢血CD4, CD8 T細胞における細胞内granzyme A, perforinの発現とCX3CR1の発現の関連をFACSにて解析した。

末梢血CD4, CD8 T細胞ともに、granzyme A, perforinを発現する細胞はほぼすべてCX3CR1陽性T細胞であった (図5)。

図 5



6) RA滑膜組織におけるCX3CR1の発現

免疫組織染色にて、RA滑膜におけるCX3CR1の発現を解析した。図5に示すように、血管周囲のCD3陽性細胞にて、CX3CR1が陽性であった。また、変形性関節症(OA)患者の滑膜では、CX3CR1の発現は軽微であった (図6下段)。

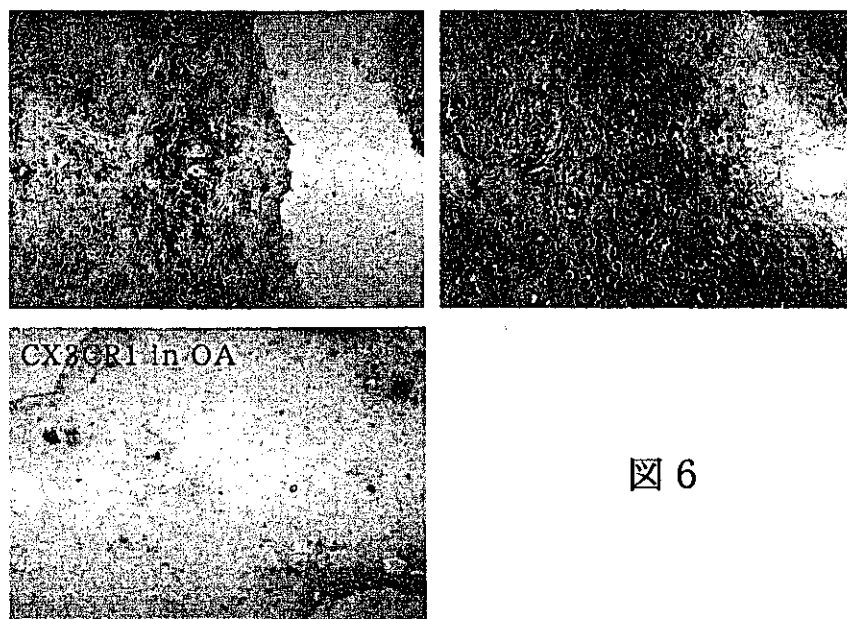
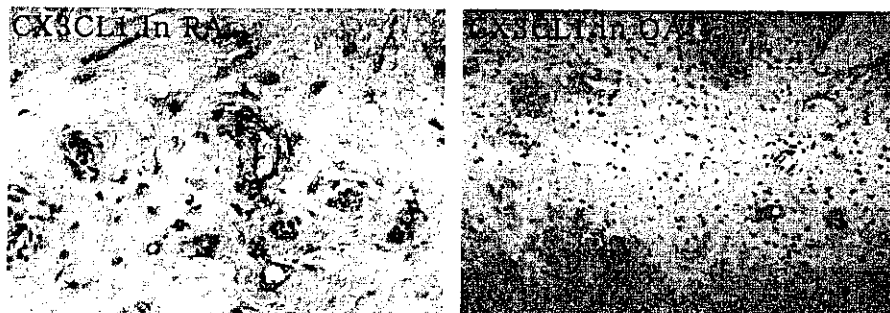


図 6

7) RA滑膜組織におけるCX3CL1の発現

RA滑膜組織における、CX3CL1の発現を免疫組織染色にて解析した。図6に示すように、RA滑膜の血管内皮細胞、および線維芽細胞様滑膜細胞にてCX3CL1の発現がみられた。OA滑膜では、CX3CL1の発現はほとんどみられなかった。

図 7



4. 考察

RA滑膜線維芽細胞様滑膜細胞は、RA滑膜組織での発現が報告されている、MCP-1, RANTES, SDF-1刺激により、IL-6, IL-8の産生が亢進された。このことは、RA滑膜組織で産生されるケモカインは、炎症細胞遊走を促すのみではなく、滑膜細胞を刺激し、サイトカインおよびケモカインの産生にも作用していると考えられる。

RA患者では、末梢血CD4, CD8 T細胞においてCX3CR1の発現頻度が高く、そのCX3CR1陽性T細胞は、Th1 または Tc1型のサイトカインを主に産生する。RA滑膜組織の血管周囲のT細胞でCX3CR1の発現がみられ、またRA滑膜において、CX3CL1の発現がみられていることより、CX3CL1/CX3CR1相互作用により、CX3CR1陽性 T細胞がRA滑膜に浸潤していると考えられる。

RA滑膜に浸潤しているT細胞は、Th1型のサイトカイン (IFN- γ , TNF- α) を産生することが知られており、CX3CL1/CX3CR1相互作用は、Th1, Tc1型の細胞を特異的に滑膜組織に集族させることに関与していることが疑われる。また、浸潤したT細胞は、IFN- γ , TNF- α を産生し、そのIFN- γ , TNF- α が血管内皮細胞を刺激し、CX3CL1産生を亢進させている可能性がある。このことより、CX3CL1/CX3CR1相互作用はTh1, Tc1型のT細胞の浸潤に深く関与している可能性がある。

また、大部分の末梢CX3CR1陽性T細胞は、CD27, CD28が陰性であった。CD27陰性T細胞のRA滑膜への浸潤は以前より報告されており、またRA患者においてCD28陰性T細胞の末梢血中での増加も報告されている。本研究結果は、以前からの報告に合致し、CX3CL1/CX3CR1相互作用がRA滑膜へのT細胞浸潤に重要な役割を担っていると考えられる。

5. まとめ

ケモカイン・ケモカインレセプター相互作用は、RAの病態形成に深く関与していると考えられる。

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社