

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

関節リウマチ(RA)の病態形成にケモカインが深く関与しているが、fractalkine (FKN)は関節滑膜へのT細胞集積に関与しており、FKN/CX3CR1相互作用を阻害することが、RAの新たな治療ターゲットとなる可能性がある。

1. 研究目的

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA)は、原因不明の難治性疾患であり、慢性の多発関節炎を特徴とする。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ている。また欧米で近年使用されるようになってきている抗TNF- α 抗体などの生物製剤に対しても不応性の患者がみられていることより、RAに対する治療薬は十分ではなく、新規治療薬の開発が期待されている。

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、本研究者も含め、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も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ている。そのため、ケモカイン・ケモカインレセプター阻害剤が、RAの新たな治療ターゲットとして研究が進められてきているが、まだ新規治療薬の開発には至っていない。

本研究は、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し、またケモカイン・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た。今回、これまでに本研究者がRAの病態形成への関与について報告してきた、stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) (CXCL12)/CXC chemokine receptor-4 (CXCR4)相互作用の阻害剤によるモデル動物を用いた関節炎治療効果について解析し、またケモカインによるRA滑膜細胞刺激作用について検討した。また、fractalkine (FKN) (CX3CL1)/CX3CR1相互作用によるRA滑膜へのT細胞浸潤への関与について解析し、抗FKN抗体による関節炎モデル動物に対する効果を解析し、RAに対する新規治療薬としての可能性を検討した。

2. 研究方法

1) ケモカインによるRA線維芽細胞様滑膜細胞刺激

手術時に得られたRA患者滑膜組織より、コラゲナーゼを用いて滑膜細胞を分離。10% FCS-DMEMで培養し、3回継代後、線維芽細胞様滑膜細胞を樹立した。その細胞を、monocyte chemotactic protein (MCP)-1 (CCL2), regulated upon activation, normal T expressed and secreted (RANTES) (CCL5), SDF-1で刺激し、細胞培養上清中のIL-6, IL-8の濃度をELISAにて測定した。

MCP-1刺激による、細胞内シグナル伝達の解析は、細胞刺激後に、各種リン酸化蛋白を認識する抗体でwestern blotを施行。

2) 関節炎モデルマウスに対するCXCR4拮抗剤による治療効果

モデル動物として、コラーゲン誘導関節炎マウスを用いた。DBA/1J マウス (雄、8 週令) に、bovine type II collagen と complete Freund's adjuvant のエマルジョンを尾根部に皮内投与。3 週後に再度 type II collagen + complete Freund's adjuvant を同様に投与した。2 回目の免疫時より AMD3100 (CXCR4 拮抗剤) を、infusion pump を用いて、持続的に皮下投与した。その後、2 週間四肢の関節炎の程度を、関節炎スコアにて評価し、コントロール群 (PBS を投与) と比較した。また、投与開始 2 週間後に四肢の関節を HE 染色により組織学的に解析した。

3) RA 滑膜組織への T 細胞浸潤における FKN/CX3CR1 の関与

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、および細胞内の granzyme A, perforin の発現をフローサイトメーターで解析した。

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 6 時間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。

RA 滑膜組織に発現する FKN, CX3CR1 を免疫組織学的に解析し、変形性関節症 (OA) と比較した。

pore size 5 μ m の trans-membrane で仕切られた末梢血の可溶性 FKN による細胞遊走を行い、遊走した CD4, CD8 T 細胞数を測定。また、FKN を細胞表面に発現するように、FKN を transfect した ECV 細胞を trans-membrane 上にコートし、RANTES に対する末梢血の細胞遊走に対する影響を解析し、FKN を発現しない ECV 細胞をコートしたものと比較、解析した。

4) 関節炎モデルマウスに対する抗 FKN 抗体の治療効果

2) と同様にコラーゲン誘導関節炎マウスを作成。2 回目のコラーゲン免疫時より週 3 回、抗マウス FKN 抗体、またはコントロール抗体を腹腔内に投与した。2 週間にわたり関節炎の程度を関節炎スコアにて計測。投与開始 2 週間後、血清中のコラーゲン抗体価を ELISA で測定した。また、四肢の関節組織を HE 染色、および CD3 を免疫染色し、組織学的に解析。また、関節組織における FKN の発現を western blot で解析し、また関節組織の凍結切片を用いて、炎症細胞上の CX3CR1 の発現を解析した。

3. 研究成果

1) ケモカインによる RA 滑膜細胞刺激

これまでに RA 滑膜組織での発現が報告されているケモカイン、MCP-1, RANTES, SDF-1 刺激により、RA 線維芽細胞様滑膜細胞からの IL-6, IL-8 の産生が亢進した。その効果は正常皮膚線維芽細胞よりも、RA 線維芽細胞様滑膜細胞でより効果的であった。また、MCP-1 による RA 線維芽細胞様滑膜細胞への刺激は、CCR2, Gi 蛋白を介し、ERK1/2 のリン酸化を活性化した。

2) CXCR4 拮抗剤によるマウスコラーゲン関節炎の抑制効果の検討

マウスコラーゲン誘導関節炎モデルを用い、CXCR4 拮抗剤 (AMD3100) を、コラーゲンの 2 回目免疫時より、持続的に皮下投与を行った。コントロールマウス群 (PBS 投与) と比較し、CXCR4 拮抗剤投与群において、関節炎スコアに有意な低下はなく、また組織学的にも炎症細胞浸潤に明らかな差は認められず、CXCR4 拮抗剤にはマウスコラーゲン誘導関節炎の抑制効果はみられなかった。

3) 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 にて解析した。末梢血 CD4 T 細胞における CX3CR1 の発現頻度は非常に低いですが、RA 患者では健常者と比較して優位に上昇していた (RA 患者 平均 7.1%、健常者 平均 3.8%)。CD8 T 細胞では、CX3CR1 の発現頻度は、CD4 T 細胞と比し有意に上昇し、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 (RA 患者 平均 53.4%、健常者 平均 19.2%)。

これまでに、RA 患者の末梢血において、CD28 陰性の CD4 T 細胞の増加が報告され、また、RA 滑膜組織では、CD27 陰性の CD4 T 細胞の増加が報告されている。一方、CD27, CD28 陰性の T 細胞はより分化したものであると考えられている。そこで、CD27, CD28 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 細胞において、CX3CR1 陽性 T 細胞は、大部分が CD27 陰性、CD28 陰性であり、CX3CR1 陽性 T 細胞は成熟した T 細胞であると考えられた。この結果は健常者の末梢血でも同様であった。

末梢血 CX3CR1 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能を解析するため、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 の産生頻度が有意に上昇し、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。末梢血 CX3CR1 陽性 T 細胞は、主に type 1 型のサイトカイン産生能がみられた。RA 患者、健常者ともに同様の結果であった。

RA 患者および健常者の末梢血 CD4、CD8 T 細胞において、細胞障害性分子と考えられている granzyme A、perforin の細胞内での発現と 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。

4) RA 滑膜組織における FKN、CX3CR1 の発現

RA 滑膜組織における、FKN の発現を免疫組織染色にて解析した。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 FKN の発現がみられた。変形性関節症(OA)滑膜では、FKN の発現はほとんどみられなかった。

免疫組織染色にて、RA 滑膜における CX3CR1 の発現を解析した。血管周囲の CD3 陽性細胞にて、CX3CR1 が陽性であった。しかし、follicle の T 細胞では、CX3CR1 の発現はほとんどみられなかった。また、OA 患者の滑膜組織では、CX3CR1 の発現は軽微であった。

in vitro において、RA 線維芽細胞様滑膜細胞は、FKN を発現し、その産生は TNF- α 、IFN- γ の刺激により亢進した。

5) FKN による細胞遊走能

可溶性 FKN を用いて、末梢 T 細胞に対する細胞遊走能を migration assay を用いて解析した。可溶性 FKN は、末梢血 CD4、CD8 T 細胞の遊走を誘導した。

膜型 FKN を発現した ECV 細胞を trans-membrane 上にコートし、RANTES による細胞遊走への影響を解析した。膜型 FKN を発現している ECV 細胞をコートした状態では、膜型 FKN を発現していない ECV 細胞をコートした状態と比較し、末梢血 CD4、CD8 T 細胞の RANTES に対する細胞遊走が亢進した。

6) 抗 FKN 抗体によるマウス関節炎の抑制効果

コラーゲン誘導関節炎マウスに、抗マウス FKN 抗体を、type II collagen の 2 回目の免疫時より腹腔内に投与した。抗マウス FKN 抗体投与群では、マウスの関節炎は、コントロール抗体投与群と比し、有意に抑制された。しかし、血清中のコラーゲン抗体産生には影響がみられなかった。組織学的に、抗 FKN 抗体投与群では、関節部への炎症細胞浸潤が著明に抑制されていた。関節炎罹患部位では、ヒト RA 滑膜組織と同様に、FKN の発現がみられ、また炎症細胞に CX3CR1 が発現していた。

4. 考察・まとめ

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ケモカイン、MCP-1、RANTES、SDF-1 の刺激により、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、関節局所への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などにも作用していると考えられる。

コラーゲン誘導関節炎マウスモデルにおいて、CXCR4 阻害剤では関節炎の抑制効果は認められなかった。しかしながら、IFN- γ receptor ノックアウトモデルマウスにおいて、CXCR4 阻害剤がコラーゲン誘導関節炎を抑制することが報告されている。これらのことより、モデルにより CXCR4 阻害剤による関節炎効果に違いがみられることになる。SDF-1/CXCR4 相互作用は、T 細胞浸潤のみならず、マクロファージ、樹状細胞の関節への浸潤にも関与している可能性がある。また、線維芽細胞様滑膜細胞による、T 細胞、B 細胞に対する、pseudemperipolexis に接着分子とともに重要な役割を果たしていることが報告されている。これらのことより、本研究結果が SDF-1/CXCR4 相互作用阻害薬の RA への治療薬としての可能性を完全には否定できないと考えられる。よりヒト RA に近いモデルでの研究が必要と考えられる。

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、RA への病態形成に関与していると考えられている、Th1 または Tc1 型のサイトカイン(IFN- γ 、TNF- α)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、FKN の発現がみられていることより、FKN/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。つまり、FKN/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、FKN 産生を亢進させている可能性がある。これらのことより、FKN/CX3CR1 相互作用は Th1、Tc1 型の T 細胞の滑膜組織への集族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、FKN/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。可溶性の FKN は直接的に T 細胞を滑膜組織に誘導し、また膜型 FKN は炎症部位の活性化された血管内皮細胞上に発現され、RANTES などの他のケモカインによる滑膜組織への遊走を亢進させていると考えられる。

コラーゲン誘導関節炎マウスにおいても、ヒト RA と同様に関節滑膜で FKN が発現され、炎症細胞に CX3CR1 が発現していた。実際に、コラーゲン誘導関節炎マウスにおいて、抗 FKN 抗体の投与により、関節炎は有意に抑制された。抗 FKN 抗体投与により、血清中のコラーゲン抗体産生に影響はみられなかったことより、抗 FKN 抗体はコラーゲン抗体産生には影響せず、局所への炎症細胞の浸潤を抑制することにより関節炎を軽減させていると考えられる。実際に抗 FKN 抗体の投与により関節炎局所での炎症細胞は著明に減少していた。この結果より、FKN/CX3CR1 相互作用阻害剤は、RA の新規治療薬としての可能性が示唆される。

CXCR4 は IL-15 刺激によりほとんどすべての T 細胞でその発現が増強されること、また SDF-1/CXCR4 相互作用が pseudoemperipolesis に関与していることより、SDF-1/CXCR4 相互作用は、炎症局所に遊走された T 細胞が滑膜組織にとどまることに関与していることが予想される。一方、CX3CR1 陽性 T 細胞は type 1 型のサイトカイン、細胞障害性分子を発現する特異な細胞であり、RA 滑膜組織への type 1 型の T 細胞の浸潤に深く関与していると考えられる。

これらの研究結果は、ケモカイン・ケモカインレセプターが RA の病態形成に深く関与していることを示唆し、その阻害薬は RA の新規治療薬として期待される。

5. 研究発表

Toshihiro Nanki, Toshio Imai, Kenji Nagasaka, Yasuyo Urasaki, Yoshinori Nonomura, Ken Taniguchi, Kenji Hayashida, Jun Hasegawa, Osamu Yoshie, Nobuyuki Miyasaka. Migration of CX3CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46(11): 2878-2883, 2002.

6. 知的所有権の取得状況

特になし。