

論文の内容の要旨

論文題目 関節リウマチにおける Cas-L/Nedd9 の病態生理学的役割の解析

氏名 片寄智規

関節リウマチ (RA) は、滑膜を炎症の主座とし主に小関節に対称性の関節腫脹を呈す慢性炎症性の病態であり、進行性に骨破壊を来し全身合併症を伴う自己免疫疾患である。病理像は、毛細血管周囲に CD4 陽性主体の T 細胞浸潤、続いて B 細胞の浸潤が起り、滑膜細胞の重層化と絨毛化、単球や好中球の浸潤、毛細血管の増生が引き起こされ、滑膜での炎症性肉芽であるパンヌスの形成に至る。この後、破骨細胞の活性化とプロテアーゼの産生により骨破壊へと進行していく [1]。直接的な原因は明らかではないが、RA 発症におけるサイトカインやリンパ球の重要性が指摘 [2, 3] されており、抗サイトカイン療法などの生物学的製剤の導入により RA の治療予後に激的な改善効果をもたらした。しかし結核や真菌などに対する易感染性や、血液系の悪性腫瘍の発生リスクをはじめとして長期的な安全性が確立していないことが課題であり、新規治療方法の開発が期待されている。

Crk-associated substrate lymphocyte (Cas-L) は、 $\beta 1$ インテグリンからのシグナルを受けてチロシンリン酸化される 105 kDa の細胞内ドッキング蛋白質であり、共通の一次構造を有する Cas-L/HEF1/Nedd9, p130Cas/BCAR1, Efs/Sin から成る Cas ファミリーを構成している。これらは、生物学的機能として細胞接着や細胞遊走、細胞骨格系の再構成に必須の分子である。当研究室の Nishijima らはこれまでに自然関節炎発症モデルマウスである HTLV-I-tax トランスジェニックマウス関節滑膜の炎症局所に Cas-L が高発現していること、さらに炎症部位に浸潤したリンパ球において Cas-L 発現が亢進していることを見出しており [4]、Cas-L と関節炎病態形成との関連が示唆されている。

そこで本研究では、Cas-L が RA に対する新たな標的分子となりうる可能性を探り最終的に臨床への応用を目指し、Cas-L ノックアウトマウスを利用して Cas-L が関節炎の発症機構に果たす役割について解析を行った。まず、Cas-L ノックアウトマウス (-/-)、hetero マウス (-/+) [5]、コントロールとして野生型マウス (WT) にコラーゲン誘発関節炎モデル (Collagen-induced arthritis; CIA) を適用し、関節炎重症度と発症率、病理組織の比較検討を行った。II 型コラーゲン (II C) を Freund Complete Adjuvant とともに、1 日目と 21 日目に Cas-L (-/-) 群、Cas-L (-/+) 群、WT 群に投与し、関節炎の発症率と重症度を評価し計 56 日間観察した。その結果、Cas-L の欠損により関節炎の重症度が軽減されることが明らかとなった。レントゲンや病理組織標本の検討においても、Cas-L (-/-) 群では関節炎所見に乏しく、画像学のおよび病理学的にも Cas-L

(-/-) 群では関節炎が抑えられていることが示された。また、関節炎発症にかかわる細胞が幹細胞レベルでの異常かどうかを確認する目的で骨髄細胞移植実験を行った。その結果、WT 群由来の骨髄細胞を Cas-L(-/-)群に移植した群に対して CIA の誘導 9 を行ったところ、関節炎の発症を認めたが、逆に Cas-L(-/-)群由来骨髄細胞を移植した WT 群では CIA の発症が抑制された。この結果は、関節滑膜の細胞よりは、免疫担当細胞における Cas-L の低下が、関節炎発症抑制の原因であることを示している。また、Cas-L (-/-) 群では II C 特異的なリンパ節細胞の増殖は WT 群に比較し有意に低下しており、細胞性免疫に異常があることが示された。さらに、抗 II C 抗体価測定の結果、Cas-L (-/-) 群では抗原特異的抗体産生能の低下を認めた。CIA の発症には細胞性免疫と液性免疫がともに重要である[6-8]とされ、Cas-L (-/-) 群で関節炎発症が抑制されたメカニズムには、細胞性免疫だけではなく液性免疫の異常も関与することが示唆された。しかし、Cas-L (-/-) 群では重症化は抑制されたにもかかわらず、完全に発症を抑えることはできなかった。このことは、Cas-L を介するシグナル以外に、関節炎を誘導するシグナルが関与する可能性を示している。そこで Cas-L (-/-) 群で T 細胞活性化メカニズムに他のシグナル経路の関与を検討する目的で T 細胞の共刺激実験を行った。その結果、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による共刺激では、Cas-L (-/-) 群では WT 群に比べ有意に細胞取り込みが高く、刺激応答が高いことが明らかとなった。Cas-L が欠損した結果、CD28-B7 シグナル経路に T 細胞活性化シグナルが入りやすくなることを示し、Cas-L は CD28-B7 副シグナル分子の発現制御に関係している可能性が示唆された。次に血清中のサイトカイン産生について比較検討を行った。その結果、Th1 細胞産生サイトカインである IL-6 や TNF- α 、IFN- γ そして炎症性サイトカインである IL-17 は Cas-L (-/-) 群で有意に低値であったが、Th2 細胞産生サイトカインである IL-4 や IL-10 は Cas-L (-/-) 群で有意に高値であった。また抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体の共刺激実験系でも、その培養上清中 IL-10 は Cas-L (-/-) で高値であった。Cas-L はサイトカイン産生にも関与することを示しており、特に Th2 細胞の制御に関与していることが示唆された。以上の結果より、Cas-L (-/-) マウスで関節炎発症が抑制された原因として、これまでに明らかとなっている細胞遊走および細胞接着という生物学的機能によって炎症部位へ免疫担当細胞を動員・浸潤させるメカニズムが関与することのほかに、副シグナル経路の発現亢進が引き起こされ T 細胞を活性化させて特に Th2 細胞産生サイトカインを制御することで関節炎発症を抑制するというメカニズムも関与していることが示された。

本研究では、Cas-L ノックアウトマウスを用いて、Cas-L と関節炎の関わりについて解析を行った。その結果、Cas-L を欠損させると CIA では重症度が低いこと、Cas-L は細胞性免疫だけではなく液性免疫の制御にもかかわっている可能性があることを示した。これまでは炎症性サイトカインを制御する創薬が主体であり、確かに RA 治療に著明な効果をもたらした。その反面、感染症、infusion reaction などの重篤な有害事象や反応を示さない症例も指摘されている。炎症性サイトカインを標的にした治療はこうした有害事象を克服できる可能性がある。

<引用文献>

1. 鎌滝章央, 村上賢也, and 澤井高志, *RA* における骨・軟骨破壊の病理. *リウマチ科*, 2011. **45**(5): p. 554-559.
2. Arend, W.P., *Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2001. **45**(1): p. 101-6.
3. Senolt, L., et al., *Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis*. *Autoimmun Rev*, 2009. **9**(2): p. 102-7.
4. Miyake-Nishijima, R., et al., *Role of Crk-associated substrate lymphocyte type in the pathophysiology of rheumatoid arthritis in tax transgenic mice and in humans*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(7): p. 1890-900.
5. Seo, S., et al., *Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance*. *J Immunol*, 2005. **175**(6): p. 3492-501.
6. Stuart, J.M. and F.J. Dixon, *Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice*. *J Exp Med*, 1983. **158**(2): p. 378-92.
7. Hirofuji, T., et al., *Characterization of monoclonal antibody specific for human type II collagen: possible implication in collagen-induced arthritis*. *Clin Exp Immunol*, 1985. **62**(1): p. 159-66.
8. Bullard, D.C., et al., *Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1*. *J Immunol*, 1996. **157**(7): p. 3153-8.