

自己免疫性関節炎における $\alpha 9$ インテグリンの機能解析

学位論文内容の要旨

$\alpha 9$ インテグリンはオステオポンチン (OPN) やテネイシン-C (TN-C) を含む、多くの細胞外マトリックス (ECM) タンパク質をリガンドとして認識する接着分子である。これまで、OPN 内の $\alpha 9$ インテグリン結合配列を抗体により阻害すると自己免疫性関節炎が抑制されること、そして、破骨細胞の分化や機能発現に $\alpha 9$ インテグリンが重要であることが報告されている。このため、骨破壊を伴う自己免疫性関節炎、すなわち関節リウマチにおいて $\alpha 9$ インテグリンが重要な役割を果たしているのではないかと考えた。しかし、 $\alpha 9$ インテグリンの欠損マウスは生後 10 日ほどで死に至ること、これまで抗マウス $\alpha 9$ インテグリン抗体が存在しなかったことから、病態における $\alpha 9$ インテグリンの役割についてはほとんど解析が行われていなかった。そこで、当研究室で独自に樹立した抗マウス $\alpha 9$ インテグリン抗体を用いて自己免疫性関節炎における $\alpha 9$ インテグリンの機能を解析した。

まず、T 細胞非依存的な自己免疫性関節炎モデルであるコラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) を用いて、炎症局所の滑膜組織における $\alpha 9$ インテグリンの役割を検討したところ、滑膜の構成細胞である滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージが $\alpha 9$ インテグリンを発現していた。さらに関節炎の発症に伴って、関節の炎症局所で $\alpha 9$ インテグリンのリガンドである OPN や TN-C が発現亢進することも分かった。この OPN や TN-C による $\alpha 9$ インテグリン依存的な刺激によって、滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージはサイトカインやケモカイン、プロテアーゼなどの多様な炎症性因子や組織傷害因子の産生を亢進することが分かった。また、マウスに $\alpha 9$ インテグリンの阻害抗体を投与すると、関節局所における種々のサイトカインやケモカインの発現が低下した。驚くべきことに、発症する直前 (day1) においても、抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体投与群で関節局所のケモカイン発現 (CCL2、CCL4) の発現が抑制されていた。実際に、抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体を投与したマウスでは、発症前投与と発症後投与のどちらにおいても、顕著に関節炎の臨床スコアが低下することが分かった。また、足ごとの関節炎の発症率も有意に低下していた。さらに、抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体の投与は関節リウマチに特徴的な病理所見である滑膜の肥厚、炎症細胞の浸潤、パンヌスの形成、骨・軟骨の破壊についても有意に抑制することが分かった。興味深いことに、OPN や TN-C による $\alpha 9$ インテグリン依存的な刺激は滑膜線維芽細胞からの OPN、TN-C 産生をさらに亢進させた。これは滑膜細胞と ECM タンパク質間で、正のフィードバ

ックループが形成していることを示している。以上のことから、 $\alpha 9$ インテグリンは滑膜細胞の活性化を促進することで、関節局所の炎症維持に重要な役割を果たしていることが分かった。

近年、関節リウマチを含む自己免疫疾患に必須のエフェクター細胞として、IL-17を産生するヘルパーT細胞サブセット (Th17) が注目されている。Th1 や Th17 など特定のヘルパーT細胞への分化には、特定のサイトカインが必須である。これらのサイトカインの供給は主にリンパ組織の抗原提示細胞が担っており、Toll-like receptor (TLR) は抗原提示細胞からのサイトカイン産生を誘導する因子として知られている。しかしながら、TLR 依存的な刺激は Th1 誘導性のサイトカインと Th17 誘導性のサイトカインを両方誘導することから、Th1 や Th17 の優位性を決定するためには他の因子が必要になると考えられる。これまでの研究の結果より、 $\alpha 9$ インテグリン依存的なシグナルは滑膜細胞から Th17 誘導性サイトカインである IL-6 の産生を強く促すという知見を得ていたため、 $\alpha 9$ インテグリン依存的な刺激がリンパ節において抗原提示細胞の IL-6 産生を増強し、Th17 優位な微小環境を与えるのではないかと考えた。この仮説を検証するために、Th17 細胞依存的な関節炎モデル、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) を用いてリンパ節における Th17 の発達に関与する $\alpha 9$ インテグリンが関与するか検討した。まず、リンパ節の抗原提示細胞において $\alpha 9$ インテグリンの発現を確認したところ、conventional dendritic cell (cDC) やマクロファージが $\alpha 9$ インテグリンを発現していることが分かった。また、免疫後リンパ節では OPN や TN-C が速やかに発現亢進すること、そして活性化した cDC やマクロファージは OPN や TN-C を産生することが分かった。このように、免疫後のリンパ節は $\alpha 9$ インテグリンが機能できる環境であることが分かった。さらに、*in vitro* で cDC やマクロファージを $\alpha 9$ インテグリンのリガンドである OPN や TN-C により刺激したところ、これらの細胞から Th17 誘導性サイトカインである IL-6 の産生が有意に亢進することが分かった。さらに、驚くべきことに、 $\alpha 9$ インテグリン依存的な刺激は TLR2 や TLR4 依存的な刺激に対して相乗的に作用し、IL-6 産生をさらに亢進させることが分かった。興味深いことに、Th1 を誘導するサイトカインである IL-12p40 の産生に対しては、 $\alpha 9$ インテグリン依存的な刺激はほとんど影響を与えなかった。CIA において IL-6 依存的な Th17 分化が誘導される時期 (day0-day7) に $\alpha 9$ インテグリンが機能しているか調べるため、day-1 と day2 に抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体をマウスに投与したところ、day3 のリンパ節における IL-6 の発現が低下し、day7 のリンパ節における Th17 の分化が有意に抑制された。また、抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体を投与したマウス由来の Th17 では、Th17 の遊走に重要なケモカイン受容体 (CCR6) の発現も低下しており、2 回目の免疫 (day21) 後にはリンパ節において Th17 の蓄積が観察された。このように、 $\alpha 9$ インテグリンの阻害は機能的な Th17 の発達が阻害することが分かった。実際、抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体の投与は、CIA 関節炎の発症を遅延させ、関節炎の悪性化も抑制した。このように、 $\alpha 9$ インテグリンはリンパ節における Th17 の機能的な発達を促進することで、自己免疫性関節炎の発症に重要な働きを担っていることが証明された。

本研究の結果は、 $\alpha 9$ インテグリンの病態における重要性を証明したものであり、 $\alpha 9$ インテグリンが関節リウマチの有望な治療標的になりうる可能性を示している。また本研究は、4つの新規 $\alpha 9$ インテグリン発現細胞を同定し、炎症性因子の産生誘導という $\alpha 9$ インテグリンの新たな機能を報告したという点において分子生物学的にも意義のある報告である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 有 川 二 郎

学位論文題名

自己免疫性関節炎における $\alpha 9$ インテグリンの機能解析

申請者は、自己免疫性関節炎モデルを用い、炎症が起こる関節病変部と抗原提示やエフェクター細胞の分化、増殖が起こる所属リンパ節という2つの組織において $\alpha 9$ インテグリンの役割を詳細に解析し、その研究結果を報告した。

関節の炎症局所では、滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージが $\alpha 9$ インテグリンを発現しており、炎症に伴って発現亢進するオステオポンチン (OPN) やテネイシン (TN-C) と $\alpha 9$ インテグリンが結合することで、滑膜線維芽細胞や滑膜マクロファージからのサイトカインやケモカインといった炎症性因子の発現を誘導できることを明らかにした。また、 $\alpha 9$ インテグリンの阻害抗体 (55A2C) をマウスに投与することにより、コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) が著しく抑制されることを発見した。さらに、T細胞依存的な自己免疫性関節炎モデルであるコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) を用いて、所属リンパ節における Th17 細胞の分化や機能に、 $\alpha 9$ インテグリン依存的なシグナルがどのような役割を担っているのか解析した。その結果、所属リンパ節では conventional dendritic cell (cDC) とマクロファージが $\alpha 9$ インテグリンを発現していることを発見した。また、リンパ節では免疫後に $\alpha 9$ インテグリンのリガンドである OPN や TN-C が速やかに発現亢進すること、 $\alpha 9$ インテグリンの発現細胞である cDC やマクロファージ自身が OPN や TN-C の供給源であることを明らかにした。さらに、CIA の初期段階 (免疫前日と2日後) に 55A2C 抗体を投与すると、免疫後3日目のリンパ節において IL-6 と IL-23 のサイトカイン発現が低下し、免疫後7日目のリンパ節では Th17 の特異的な分化抑制が認められた。実際、関節炎の進行においても、CIA 初期の 55A2C 抗体投与によって、関節炎の発症が遅延することや炎症・組織傷害が有意に抑制されることを、臨床学のおよび病理学的手法を用いて証明した。次に、cDC やマクロファージのサイトカイン産生が $\alpha 9$ インテグリン依存的なシグナルによって影響を受けるのか検討し、TN-C 等を用いた $\alpha 9$ インテグリン依存的な刺激が、Toll-like receptor (TLR)-2 や TLR-4 依存的なシグナルと相乗的に、cDC やマクロファージから IL-6 の産生を誘導することを明らかにした。

また、この $\alpha 9$ インテグリン依存的な刺激は Th1 誘導性サイトカインである IL-12p40 の産生にはほとんど影響を与えないことを明らかにした。さらに、CIA 初期の 55A2C 抗体投与は Th17 に発現している CCR6 というケモカイン受容体の発現を低下させることで、発症直前の免疫後 24 日目では、リンパ節における Th17 細胞の蓄積が引き起こされることを示した。また、*in vitro* の実験系を用いて、Th17 の分化誘導を行った場合、 $\alpha 9$ インテグリン依存的な刺激が存在すると、Th17 の分化や CCR6 発現が促進されることを明らかにした。

主査の笠原教授からは、1) 関節リウマチの患者と自己免疫性関節炎の動物モデルにおいて、抗 IL-6 受容体抗体の治療効果の違いが生じる理由について、2) IL-21 の発現における $\alpha 9$ インテグリンの関与について、3) Th17 細胞の CCR6 発現を抑制する分子メカニズムについて、副査の小池教授から、4) CIA と CAIA の違いについて、5) OPN や TN-C 欠損マウスと $\alpha 9$ インテグリンの阻害では自己免疫性関節炎に対して異なる結果が得られる理由について、6) CIA モデルにおける TNF α の重要性と 55A2C 抗体の関節炎抑制効果における TNF α の関与について、7) 55A2C 抗体のアゴニスト活性について、8) $\alpha 9$ インテグリンが IL-6 産生の上流にあるという論拠について、副査の三浪教授からは、9) CIA と関節リウマチの違いについて、10) CIA の IL-6 依存的な Th17 細胞の分化誘導に関して、11) 抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体の創薬・臨床応用の可能性について、副査の有川教授からは、12) CIA の感受性を規定する遺伝学的な背景について、13) 関節リウマチにおけるヒト HLA ハプロタイプの重要性について、14) 中間的なフェーズ（免疫後 9 日、10 日目）におけるコントロール抗体と 55A2C 抗体の発症率の差について、そして副査の上出教授から、15) TN-C や OPN 以外の $\alpha 9$ インテグリンに対するリガンドが関与している可能性について質問を受けた。申請者は何れの質問に対しても、自己の実験データや過去の報告を引用しながら概ね適切な回答をなし得た。

この論文は、これまで生体内特に病態における役割が詳しく分かっていなかった $\alpha 9$ インテグリンという分子について、自己免疫性関節炎における役割を明らかにした。また、4 つの新たな $\alpha 9$ インテグリン発現細胞を同定するとともに、Th17 といった特定のヘルパー T 細胞の分化において $\alpha 9$ インテグリンが促進的に寄与することを明らかにし、免疫システムにおける $\alpha 9$ インテグリンの重要性を高めた。これらの成果は、滑膜細胞と所属リンパ節の抗原提示細胞という 2 つの作用標的を有した新規関節リウマチ治療薬としての可能性を示すものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。