

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 金山 剛士

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

$\alpha 9$ 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、驚くべきごとに、 $\alpha 9$ 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。