



Title	The role of Syndecan-4 in the development of autoimmune arthritis
Author(s)	遠藤, 努
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第11486号
Issue Date	2014-06-30
DOI	10.14943/doctoral.k11486
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/61240
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2113
File Information	Tsutomu_Endo.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

**The role of Syndecan-4 in the development of
autoimmune arthritis**

(自己免疫性関節炎におけるシンデカン-4 の機能解析)

2014 年 6 月

北海道大学

遠藤 努

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	4 頁
略語表	7 頁
実験方法	9 頁
実験結果	17 頁
考察	39 頁
総括および結論	44 頁
謝辞	45 頁
引用文献	46 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の投稿中の論文に発表している。

Syndecan-4 regulates the development of autoimmune arthritis by modulating B cell migration and germinal center formation

Tsutomu Endo, Koyu Ito, Junko Morimoto, Masashi Kanayama, Masahiro Ikesue, Daichi Ota, Shigeyuki Kon, Daisuke Takahashi, Tomohiro Onodera, Norimasa Iwasaki and Toshimitsu Uede

Proc. Natl. Acad. Sci. USA に投稿中

本研究の結果は以下の学会において発表した。

1) The Role of Syndecan-4 in the Development of Rheumatoid Arthritis

Tsutomu Endo, Junko Morimoto, Koyu Ito, Masashi Kanayama, Norimasa Iwasaki, Akio Minami and Toshimitsu Uede

第40回 日本免疫学会総会 2011年11月27-29日 (千葉)

2) 関節リウマチにおける Syndecan-4 の関与

遠藤努 森本純子 伊藤甲雄 岩崎倫政 上出利光

第27回 日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 (名古屋)

3) The Role of Syndecan-4 in the Development of Rheumatoid Arthritis

Tsutomu Endo, Junko Morimoto, Koyu Ito, Norimasa Iwasaki and Toshimitsu Uede

第41回 日本免疫学会総会 2012年12月5-7日 (神戸)

4) 関節リウマチにおける Syndecan-4 の役割

遠藤努 森本純子 伊藤甲雄 小野寺智洋 岩崎倫政 上出利光

第26回 日本軟骨代謝学会 2013年3月1-2日 (名古屋)

5) The Role of Syndecan-4 in the Development of Rheumatoid Arthritis

Tsutomu Endo, Junko Morimoto, Koyu Ito, Masashi Kanayama, Norimasa Iwasaki, Akio Minami and Toshimitsu Uede

99th Annual Meeting the American Association of Immunologists

2012年5月4-8日 (ボストン, USA)

6) The Role of Syndecan-4 in the Development of Rheumatoid Arthritis

Tsutomu Endo, Junko Morimoto, Koyu Ito, Masashi Kanayama, Norimasa Iwasaki

and Toshimitsu Uede

100th Annual Meeting the American Association of Immunologists

2013年5月3-7日 (ホノルル, ハワイ, USA)

7) 関節リウマチにおける Syndecan-4 の役割

遠藤努 森本純子 伊藤甲雄 小野寺智洋 岩崎倫政 上出利光

第125回 北海道整形災害外科学会 2013年6月15-16日 (札幌)

8) 関節リウマチにおける Syndecan-4 の関与

遠藤努 森本純子 伊藤甲雄 高橋大介 小野寺智洋 岩崎倫政 上出利光

第28回 日本整形外科学会基礎学術集会 2013年10月17-18日 (千葉)

9) The Role of Syndecan-4 in the Development of Rheumatoid Arthritis

Tsutomu Endo, Koyu Ito, Junko Morimoto, Masashi Kanayama, Norimasa Iwasaki and Toshimitsu Uede

第42回 日本免疫学会総会 2013年12月11-13日 (千葉)

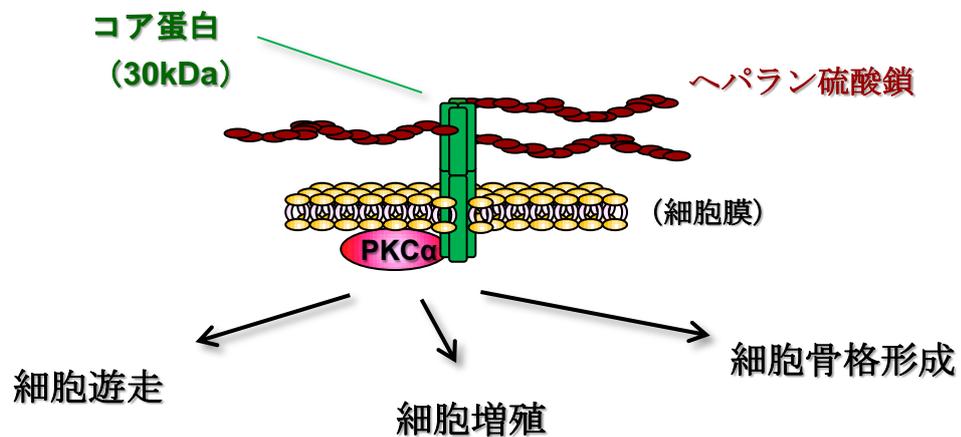
10) Syndecan4 on B cell regulates generation of germinal center in the development of autoimmune arthritis

Tsutomu Endo, Koyu Ito, Junko Morimoto, Masashi Kanayama, Tomohiro Onodera, Norimasa Iwasaki and Toshimitsu Uede

60th Annual Meeting the Orthopaedic Research Society

2014年3月15-18日 (ニューオリンズ, USA)

《Syndecan-4 (Syn4) の構造と主な機能》



補足図1 Syndecan-4 (Syn4) の構造と主な機能

分布	平滑筋細胞、内皮細胞、線維芽細胞、リンパ球、マクロファージ etc.
リガンド	細胞外マトリクス； ラミニン、コラーゲン、ファイブロネクチン マトリセルラープロテイン； テネイシン-C、オステオポンチン 成長因子； ケモカイン、サイトカイン
共受容体	bFGF、CXCL12/SDF-1、ファイブロネクチン

補足図2 Syn4 の主な分布とリガンド

1. 緒言

1-1. 関節リウマチにおける B 細胞

関節リウマチ (RA) は多くの因子が関与する代表的な自己免疫性疾患の一つと考えられ、本邦の罹患数は 70 万人に上る。従来、RA の特徴である進行性の関節炎・関節破壊に対する有効な治療法がなかったが、TNF- α 阻害薬・IL-6 受容体拮抗薬などの生物学的製剤の登場で、早期治療開始により関節炎の抑制が可能となった。しかしこれらの薬剤が無効な患者が多く存在し、臨床的な寛解は約 3 割程度に留まる。また進行性の関節破壊を抑制できないことや感染症や間質性肺炎などの重篤な副作用があることなどが大きな問題である。このことから、今後は RA の発症および重篤化のメカニズムを明らかにし、新薬の開発への可能性を模索することは極めて大きな意義がある。

これまで RA の病態と炎症細胞との関連については多くの研究がなされてきた。いくつかの臨床研究において、抗 CD20 抗体 (リツキシマブ) による B 細胞標的治療が TNF- α 阻害療法の治療抵抗例に対して有効であることが実証されており¹、RA の病態には B 細胞が強く関与していると考えられている²。加えて RA 患者の炎症滑膜にはリンパ濾胞様構造がしばしば観察されることが知られており³、更に RA 患者の血清中にはリウマトイド因子 (RF)・抗 II 型コラーゲン抗体・抗グリコプロテイン (GPI) 抗体・抗シトルリン化 (CCP) 抗体などの自己抗体価の上昇が認められることも多く報告されている^{4,7}。これらのことから、リンパ濾胞・胚中心形成や、自己反応性 B 細胞による自己抗体産生が RA の病態には非常に重要な因子であることが強く示唆される。

1-2 自己免疫疾患モデルにおけるリンパ濾胞/胚中心形成

全身性エリテマトーデス (SLE) を含む自己免疫性疾患モデルにおいて、二次リンパ組織におけるリンパ濾胞・胚中心形成が自己抗体産生にとって非常に重要であることが多くの研究によって証明されてきた⁸。自己抗体は免疫複合体の組織沈着と補体 (C5a) の活性を誘導し、様々な組織の障害を引き起こす。その自己抗体産生の場合として中心的な役割を果たすのが胚中心であり、ヘルパー T 細胞依存型のタンパク質抗原に対する抗体応答時に観察されるといわれている。胚中心の形成・維持の過程においては、近年、ケモカイン-ケモカインレセプターの相互作用により制御される B 細胞遊走が深く関わっていると考えられている。生体内で抗原を認識し活性化した B 細胞は、二次リンパ組織内で産生される stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) と CXCR4 の相互依存的に、リンパ組織内へと流入する。さらに活性化 B 細胞上には CCR7 が発現上昇し、CCL19/CCL21 の濃度勾配に従い、T 細胞との接触を求めて B 細胞は T-B 境界領域へと遊走する。その後、T-B 境界領域での濾胞性ヘルパー T 細

胞 (Tfh) との相互作用 (interaction) により、CXCR5 を発現する B 細胞は CXCL13 の濃度勾配に従ってリンパ濾胞内へと遊走する。リンパ濾胞内部で B 細胞は、胚中心暗帯 (SDF-1 が高濃度) での急激な増殖と、胚中心明帯 (CXCL13 が高濃度) でのアポトーシスを繰り返すことで胚中心を形成・維持する。またこの過程の中で、胚中心 B 細胞は抗原への親和性を高め、長寿命形質細胞 (long-lived plasma cells) やメモリー B 細胞へと分化する⁹。

RA の発症や進行にはヘルパー T 細胞が重要な役割を果たすことが広く知られ、このことから、T 細胞および B 細胞の両者が密接に関与する胚中心形成が RA の病態に深く関わっていることが予想される。一方、臨床においては、RA 患者の血清抗体価と実際の病勢が必ずしも一致しない場合があることが知られており、このような理由からこれまで RA の病態における B 細胞機能や胚中心形成に関わる研究があまりされてこなかった、と筆者は考えている。今後は胚中心形成・自己抗体産生のメカニズムを探ることで、新たな治療標的につながる可能性があると考えた。

1-3. シンデカン-4 (Syndecan-4)

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (extracellular matrix : ECM) の構成要素である。シンデカン (Syndecan) は主要な細胞膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つとして知られており、自身が有するヘパラン硫酸側鎖を介して ECM・成長因子・ケモカインなどの受容体/リザーバー、もしくはケモカインレセプターの共受容体としても機能することから、炎症反応・創傷治癒・組織修復などを制御していると考えられる¹⁰。Syndecan-4 (Syn4) は Syndecan family に属し、血管平滑筋細胞・内皮細胞・線維芽細胞・マクロファージなど多くの細胞に発現することから、種々の炎症反応において非常に重要なメディエーターであると考えられている¹¹⁻¹³。過去の報告からは Syn4 が B 細胞系統に発現することが知られ、B 細胞機能に何らかの影響を及ぼすことで生体内の免疫応答に関わっている可能性が示唆されていた^{14,15}。

これらのことから我々は、RA の病態を制御している B 細胞機能にとって Syn4 が重要な機能を担っている可能性を考え、マウス自己免疫性関節炎モデルにおける Syn4 の機能を明らかにすることを目的とした。

【本研究の成果】

それぞれの病態が異なる 3 つのマウス自己免疫性関節炎モデルにおいて、野生型 (Syn4 +/+ ; WT) マウスと Syn4 欠損 (Syn4 -/- ; Syn4 KO) マウスの表現型を比較することで、自己免疫性関節炎の病態において生体内で Syn4 が最も深く関与している局面 (phase) を限定した。その上で、T 細胞および B 細胞依存型の関節炎モデル：collagen-induced arthritis (CIA) において、Syn4 が所属リンパ節の主に B 細胞に発現し、Syn4 欠損によって所属リンパ節での胚中心形成が障害され、コラーゲン特異的な抗体産生が低下することで CIA の進行が抑えられることを示した。更に、B 細胞上の Syn4 は SDF-1 に対する細胞遊走を制御し、生体内においても所属リンパ節のリンパ濾胞内への B 細胞遊走を制御することで、胚中心形成を促進することを示した。本研究は、自己免疫性関節炎において B 細胞機能および胚中心形成に関わる Syn4 の役割を解析した初めての報告である。

このように本研究は臨床学および分子生物学的に新たな知見を生んだものと考えられる。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AIA	antigen-induced arthritis
APC	allophycocyanin
BCR	B cell receptor
CAIA	collagen antibodies-induced arthritis
CCL	CC chemokine ligand
CCP	cyclic citrullinated peptide
CCR	CC chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
cDC	conventional dendritic cell
CFA	complete freund's adjuvant
C5a	complement fragment 5a
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CIA	collagen-induced arthritis
CpG	cytosine guanine nucleotide
CXCL	CXC chemokine ligand
DC-HIL	dendritic cell-associated heparan sulfate proteoglycan-dependent integrin ligand
DTH	delayed-type hypersensitivity
ECM	extracellular matrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
Foxp3	forkhead box P3
GPI	glucose-6-phosphatase isomerase
HE	hematoxylin eosine
HEV	high endothelial venule
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
KO	knock out
LPS	lipopolysaccharide
MACS	magnetic cell sorting
mBSA	methylated bovine serum albumin
MFI	mean fluorescence intensity

PBS	phosphate-buffered saline
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PE	phycoerythrin
PMA	phorbol myristate acetate
RA	rheumatoid arthritis
RPMI	Roswell park memorial institute
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
SLE	systemic lupus erythematosus
SPF	specific pathogen free
Syn4	Syndecan-4
TCR	T cell receptor
Th	T helper
Tfh	follicular helper T cells
TLR	toll like receptor
TNF	tumor necrosis factor
WT	wild type

2. 実験方法

2-1. 実験動物

マウスは野生型 C57B/L6 を日本 SLC 株式会社 (Shizuoka, Japan) から購入した。Syndecan-4 欠損 (Syn4 KO) マウス (C57B/L6 バックグラウンドへ 10 回以上のバッククロス済み) は熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究部門 (CARD) から供与された。マウスはすべて specific pathogen free (SPF) の環境下で飼育し使用した。全ての動物実験は「北海道大学動物研究に関する規程」に準じて行った。

2-2. 使用抗体

・フローサイトメトリーで使用した抗マウス抗体は以下の通り。

FITC 標識 CD3 ϵ (145-2C11)、CD62L (MEL-14)、Gr-1 (RB6-8C5)、B220 (R3A-6B2)、GL7 (Ly-77)、CD11b (M1/70)、PE 標識 CD138 (281-2)、Per CP/Cy5.5 標識 CD4 (GK1.5)、CXCR3 (CXCR3-173)、PE/Cy7 標識 PD-1 (RMP1-30)、APC/Cy7 標識 CD21/CD35 (7E9)、B220 (RA3-6B2)、pacific blue 標識 CD19 (6D5)、APC 標識 IFN- γ (XMG1.2)、IL-17 (TC11-18H10.1)、CCR6 (29-2L17)、Alexa Fluor 647 標識 Foxp3 (150D) (すべて Biologend)。ビオチン化 CXCR5 (2G8)、FITC 標識 IgM (R6-60.2)、PE 標識 Syn4 (KY/8.2)、CD44 (IM7) (すべて BD)。ビオチン化 CXCR4 (2B11)、PE 標識 CCR7 (4B12) (すべて eBioscience)。

・免疫組織染色・免疫蛍光染色で使用した抗マウス抗体は以下の通り。

ビオチン化 CD3 ϵ (145-2C11)、B220 (RA3-6B2)、Alexa Fluor 647 標識 IgD (11-26c.2a) (すべて Biologend)。ビオチン化 GL-7 (GL7) (eBioscience)。ポリクローナル Syn4 (IBL)。

・ELISA で使用した抗マウス抗体は以下の通り。

horseradish peroxidase (HRP) 標識ポリクローナル IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 (すべて Bethyl Laboratories)。HRP 標識ポリクローナル IgM (Zymed Laboratories)。

・Western blotting で使用した抗マウス抗体は以下の通り。

リン酸化 Akt (Ser473)、pan-Akt (C67E7) (すべて eBioscience)。GAPDH (6C5) (Calbiochem)。

・T 細胞ならびに B 細胞刺激に使用した抗マウス抗体は以下の通り。

CD3 ϵ (17A2)、CD40 (HM40-3) (すべて Biologend)。CD28 (37.51) (Becton

Dickinson) polyclonal IgD (eBioscience)。

2-3. コラーゲン誘導性関節炎 (collagen-induced arthritis ; CIA)

CIA の発症実験には 8 週齢、雌の WT・Syn4 KO マウスを用いた。day-21、day0 および day21 に、5mg/ml の結核菌死菌を含有した complete freund's adjuvant (CFA) (Chondrex, WA, USA) でエマルジョン化したウシ type II collagen (100 μ l) (Chondrex, WA, USA) をマウスの尾根部に皮内投与し関節炎を誘導した。(本研究では 2 回目の免疫日を day0 としている。)

2-4. 抗 II 型コラーゲン抗体誘導性関節炎 (collagen antibodies-induced arthritis ; CAIA)

CAIA の発症実験には 8 週齢、雌の WT・Syn4 KO マウスを用いた。CAIA 惹起用の抗 type II collagen 抗体カクテル (10mg) (Chondrex, WA, USA) を腹腔内投与し、更にその 3 日後に lipopolysaccharide (LPS) (0.1mg) を腹腔内投与して関節炎を誘導した。

2-5. 抗原誘導性関節炎 (antigen-induced arthritis ; AIA)

AIA の発症実験には 8 週齢、雌の WT・Syn4 KO マウスを用いた。day-21 および day-14 に、4mg/ml の結核菌死菌 (H37RA; BD Bioscience, CA, USA) を含有した CFA でエマルジョン化した methylated bovine serum albumin (mBSA) (100 μ l) をマウス尾根部の皮内に免疫し、同時に百日咳毒素 (200ng) (List biological laboratories, CA, USA) を腹腔内投与した。day0 に、右足関節に mBSA (25 μ l) を、左足関節にコントロールとして PBS (25 μ l) を関節内投与し関節炎を誘導した。day0 より両足関節の横径をノギスで測定した。臨床症状の評価は、コントロール足関節の横径に対する関節炎発症足関節の横径比で表した。

2-6. 関節炎 (CIA・CAIA) の臨床学的評価

関節炎は以下の基準に従って評価した。スコアは脚一本につき 0-4 で、最大スコアが 16 となるように採点した。

スコア 0: 正常

スコア 1: 1 本の指節間関節でのみ、発赤や腫脹が認められる

スコア 2: 2 本以上の指節間関節、あるいは指節間関節と中手指 (足趾) 節関節、橈骨手根関節 (足根中足関節、距腿関節) のような大関節のうち、一か所に緩やかな腫脹・発赤が認められる

スコア 3: 複数の大関節で比較的顕著な発赤や腫脹が認められる

スコア 4: 脚全体で最大限の腫脹・発赤、あるいは関節の変形や強直が認められる

2-7. 関節炎（CIA）の病理学的評価

関節炎の病理学的評価はマウスの後脚にて行った。パンヌス形成は hematoxylin eosin (HE) 染色、軟骨変性は safranin-O 染色により行った。後脚の足関節以下の部位を回収後にホルマリン固定、さらに脱灰後にパラフィン包埋し、足関節から趾先にかけて矢状方向に切断した厚さ 5 μ m の切片を作製した。パラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし、エタノールで脱水した後、水洗した。HE 染色はカラッチのヘマトキシリン液 (Merck Japan, Tokyo, Japan) で 10 分間核染色を行い、0.2% HCl を含む 70% エタノールで洗浄した。次に温水による水洗を 10 分間行いエオジン液に 5 分間浸漬した後、アルコール脱水し、キシレンで透徹して封入した。safranin-O 染色は、鉄ヘマトキシリンに 4 分間漬けた後に流水で 5 分間洗浄した。0.03% ファーストグリーン FCF (Wako, Osaka, Japan) を含む 1% 酢酸水に 4 分間浸した後、1% 酢酸水で分別した。次に 0.1% safranin-O (CHROMA, Fueurstenfeldruck, Germany) で 10 分間浸漬し水洗後に 95% エタノールで洗浄した。その後 100% エタノールで脱水し、キシレンで透徹し封入した。

病理学的評価は以下の基準に基づいて行った。

《パンヌス形成》

スコア 0： 正常

スコア 1： 滑膜組織への穏やかな炎症細胞の浸潤が確認される

スコア 2： 穏やかな滑膜の肥厚が認められる

スコア 3： 滑膜組織の関節内への浸潤、中程度の炎症細胞浸潤が認められる

スコア 4： 著しい炎症細胞の浸潤、顕著なパンヌスの形成が認められる

《軟骨変性》

スコア 0： 正常

スコア 1： 軽微な軟骨の変性が認められる

スコア 2： 穏やかな軟骨の変性が認められる

スコア 3： 軟骨の変性と、一部に軟骨下骨に至る変性が認められる

スコア 4： 全層で軟骨下骨に至る変性が認められる

2-8. マウスの滑膜病変部から滑膜線維芽細胞および滑膜マクロファージの同定

関節炎を発症したマウスの足関節病変部の皮膚を外科的に剥離し、37°C で 20 分間、0.1% type II collagenase (Worthington Biochemical)/PBS を用いて攪拌しながらインキュベートした。分離した細胞を回収し、再び新たな 0.1% type II collagenase/PBS を加え、同様の作業を 6 回ほど繰り返した。得られた細胞は回収後速やかに fetal calf serum (FCS) を終濃度 5%以上になるように加え、氷上で保持した。遠心分離によって細胞

を沈殿させ上清を除いた後、10% FCS DMEM で洗浄した。10% FCS DMEM で 72 時間培養後、上清中に浮遊した細胞を除去し、接着した細胞をフローサイトメトリーで解析した。滑膜線維芽細胞は Gr-1⁻ Mac-1⁻ であり、滑膜マクロファージは Gr-1⁻ Mac-1⁺ とした。

2-9. フローサイトメトリー解析

細胞懸濁液を 96 well V 底プレートに $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/well になるように添加し、1500rpm で 1 分間遠心して細胞を沈殿させ上清を除去した。fluorescende-activated cell sorting (FACS) buffer (0.5% BSA、0.05% NaN₃/PBS) で洗浄した後 2.4G2 の培養上清に懸濁した 5 μ g/ml の標識抗体を加えて 4°C で 30 分間インキュベートした。FACS buffer で 2 回洗浄した後、400~600 μ l の FACS buffer に懸濁して FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) により解析を行った。データ解析には FlowJo (Tree Star, OR, USA) を用いた。

《細胞内 IFN- γ ・IL-17・Foxp3 染色》

リンパ節細胞を PMA (20ng/ml)・イオノマイシン (250ng/ml)・ブレフェルディン A (1 μ l/ml) (GolgiPlug; BD Biosciences) で 5.5 時間刺激後、FACS buffer で 2 回洗浄し、Fc γ blocker (1 μ g/ml) (BD Pharmingen) を用いて 4°C で 30 分間ブロッキングした。抗 CD3 ϵ 、CD4 抗体で染色した後に、BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) もしくは Foxp3 Fix/Perm buffer (BioLegend) を用いて細胞膜透過処理 (permeabilization) をした。その後は抗 IFN- γ ・IL-17・Foxp3 抗体で細胞内染色をした。

・それぞれの細胞・レセプターを認識するため、以下の抗体を組み合わせた。

濾胞性 B 細胞 ; FITC 標識抗 IgM 抗体、pacific blue 標識抗 CD19 抗体、APC/Cy7 標識抗 CD21/CD35 抗体。胚中心 B 細胞 ; FITC 標識抗 GL-7 抗体、APC/Cy7 標識抗 B220 抗体。形質細胞 ; APC/Cy7 標識抗 B220 抗体、pacific blue 標識抗 CD19 抗体、PE 標識抗 CD138 抗体。FITC 標識抗 Gr-1、B220、CD11b 抗体。Th1 ; APC 標識抗 IFN- γ 抗体。Th17 ; APC 標識抗 IL-17 抗体。Treg ; Alexa Fluor 647 標識 Foxp3 抗体。濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) ; Per CP/Cy5.5 標識抗 CD4 抗体、PE/Cy7 標識抗 PD-1 抗体、ビオチン化抗 CXCR5 抗体。ケモカインレセプター ; Per CP/Cy5.5 標識抗 CCR7 抗体、ビオチン化抗 CXCR4 抗体、ビオチン化抗 CXCR5 抗体。滑膜線維芽細胞 ; FITC 標識 Gr-1 抗体、抗 PE 標識抗 Mac-1 抗体。滑膜マクロファージ ; FITC 標識 Gr-1 抗体、抗 PE 標識抗 Mac-1 抗体。

2-10. リンパ節の免疫染色

免疫組織染色においては、マウスから回収したリンパ節を液体窒素で凍結させた。その後、6 μ m の厚さで凍結切片を作成し 10% normal goat serum/PBS で 30 分間室温に

てインキュベートしブロッキングした。続いて切片を PBS で 3 回洗浄し、Histofine Avidin/Biotin blocking kit (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) を用いて内在性ビオチン/アビジンをブロッキングした。その後切片を PBS で洗浄し、10% normal goat serum/PBS で 1000 倍希釈した一次抗体のビオチン化抗 B220 抗体 (B 細胞) を 2 時間室温で反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、Vecstain ABC kit (Vector Laboratories, CA, USA) を室温で 30 分間反応させた。発色は DAKO EnVision TM system/HRP (DAB) (Dako Japan, Tokyo, Japan) を用い、カウンター染色はヘマトキシリンを用いた。

免疫蛍光染色においては上記と同様の過程で、一次抗体として FITC 標識抗 B220 抗体 (B 細胞)、FITC 標識抗 CD3 ϵ 抗体もしくはビオチン化 CD3 ϵ 抗体 (T 細胞)、rabbit 抗 Syn4 抗体 (Syn4)、ビオチン化抗 GL-7 抗体 (胚中心)、Alexa Fluor 647 標識抗 IgD 抗体 (リンパ濾胞) を一次抗体として用いた。また二次抗体としては Alexa Fluor 647 標識 streptavidin (500 倍希釈) と Alexa Fluor 647 標識抗 rabbit 抗体 (500 倍希釈) を室温で 30 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄後に包埋した。解析は共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000) (Olympus, Tokyo, Japan) にておこなった。

2-11. T 細胞増殖試験

96 well 平底プレート (BD, NJ, USA) に抗 CD3 ϵ 抗体 (2C11) (1 μ g/ml) を 4°C で一晩固相した。マウスの脾臓細胞を carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (1 μ M) でラベルした後 well に添加し、抗 CD28 抗体 (37.51) (5 μ g/ml) を加え 10% FCS RPMI 1640 で 37°C で 4 日間培養した。その後、細胞を抗 CD4 抗体と 7-amino-actinomycin. D (7AAD) で染色し、フローサイトメトリーによって CD4⁺ 細胞の増殖を CFSE の dilution で評価した。

2-12. 養子免疫細胞移入 (adoptive transfer) による関節病変部への T 細胞遊走試験

所属リンパ節から関節病変部までの活性化 CD4⁺ T 細胞の遊走を AIA model を用いて検証した。WT コンジェニックマウス (Ly5.1) と Syn4 KO マウス (Ly5.2) のそれぞれに mBSA + CFA で免疫し、同時に百日咳毒素を腹腔内投与した。その後、それぞれの所属リンパ節から活性化 T 細胞 (CD62L^{low} CD4⁺) を FACS Aria (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) で単離し同数ずつ混合した。これらの細胞を、AIA を誘導後 1 日目の WT 宿主マウス (Ly5.1/5.2) に静脈内投与し (各 T 細胞 : 7 \times 10⁶ cells/匹)、さらに 48 時間後に関節病変部を採取した。関節病変部の皮膚を外科的に剥離した後、Liberase TM (1U/ml) (Roche, Basel, Swiss) 含有無血清 RPMI 1640 を用いて 37°C で 3 時間、攪拌しながらインキュベートした。分離した細胞を回収し 10% FCS RPMI 1640 で洗浄した後、抗 CD4 (Ly5.1)、CD4 (Ly5.2) 抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。

2-13. ELISA 法による type II collagen 特異的な血清抗体価測定

96 well ELISA 用平底プレートにウシ type II collagen (5 μ g/ml) (Chondrex, WA, USA) を 4°C で一晩固相した。その後 0.05% Tween 20/PBS で洗浄後、1% BSA/PBS を用いて 37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後に 10~10000 倍に段階希釈した、type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目の血清サンプル (100 μ l/well) を添加し、2 時間室温でインキュベートした。洗浄後に HRP 標識した抗 IgM、IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 抗体 (10000 倍希釈) を添加し 1 時間室温でインキュベートした。洗浄後に TMB 発色基質 (100 μ l/well) (BD OptEIA) (BD, NJ, USA) を添加し、遮光しながら 30 分間室温でインキュベートした後、2N H₂SO₄ (50 μ l/well) で反応停止させプレートリーダーで OD 450nm の吸光度を測定した。

2-14. ケモカインチャンバーを用いた B 細胞遊走試験

Type II collagen を 2 回免疫後 7 日目に、WT マウスと Syn4 KO マウスの脾臓細胞を回収し、B220 陽性細胞を magnetic cell sorting (MACS) system (Miltenyi Biotec) により単離した。単離したそれぞれの B220⁺ 細胞 (1 \times 10⁶ cells) を 10% FCS RPMI 1640 で 37°C で 1 時間インキュベートした後、24 well 5 μ m pore size transwell system (Coster, MA, USA) の upper well に添加した。lower well にはリコンビナント SDF-1、CCL19、CCL21 (それぞれ 100ng/ml) および CXCL13 (1000ng/ml) をそれぞれ含有した 10% FCS RPMI 1640 (600 μ l) を添加し 4 時間インキュベートした後、lower well に遊走した B 細胞数をオートセルカウンター (Countess) (Life Technologies Corporation, CA, USA) で計測した。

2-15. Western blotting 法による Akt のリン酸化の評価

ナイーブな WT マウスと Syn4 KO マウスの脾臓細胞を回収し、B220 陽性細胞を MACS system によって単離した。単離したそれぞれの B220⁺ 細胞を無血清の RPMI 1640 培地で洗浄し 37°C で 1 時間インキュベートした後、これらの細胞 (5 \times 10⁶ cells) にリコンビナント SDF-1 (100ng/ml) を継時的に加えた (0-40 分)。上清を除去した後に、60 μ l のプロテアーゼインヒビター非含有 RIPA バッファーを添加し細胞溶解液を作成した。これらの細胞溶解液におけるタンパク質の濃度を Pierce BCA protein assay kit (Thermo SCIENTIFIC) を用いて算出し、45 μ g の細胞溶解タンパク質を 10% SDS-PAGE 用ゲルで泳動した後に PVDF 膜 (Millipore) に転写した。転写した PVDF 膜を 5% スキムミルク/TBS-T で室温で 1 時間ブロッキング反応を行い TBS-T で 3 回洗浄した後に一次抗体として抗 phospho-Akt または抗 total-Akt (1000 倍希釈/5% BSA/TBS-T) を添加し 4°C で一晩反応させた。TBS-T で 3 回洗浄後に 10000 倍希釈した二次抗体 (HRP 標識した抗 rabbit IgG) (Jackson immunoresearch) を添加し、室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄後に ECL 溶液 (GE imaginationatwork) を室温

で5分間反応させ、暗室にてフィルムへ転写し現像した。その後 phospho-Akt または抗 total-Akt のバンドについてそれぞれの強度を NIH Image J ソフトウェアを用いて数値化し、その比率を算出した。

2-16. 養子免疫細胞移入 (adoptive transfer) による所属リンパ節へ B 細胞遊走試験

Type II collagen を2回 (ないし3回) 免疫後7日目に、WT マウスと Syn4 KO マウスの脾臓細胞より、B220 陽性 B 細胞を MACS system により単離した。単離したそれぞれの B220⁺ 細胞を CFSE (1 μ M) もしくは PKH26 (6 μ M) (Sigma-Aldrich, MO, USA) でラベルした。ラベルしたそれぞれの B220⁺ 細胞を同数ずつ混合し、type II collagen を2回 (ないし3回) 免疫後7日目の WT と Syn4 KO の各宿主マウスに静脈内投与した (各 B 細胞: 1-2 $\times 10^7$ cells/匹)。20 時間後に宿主マウスから鼠径リンパ節を採取し凍結させ、免疫蛍光染色によって、移入した B 細胞のリンパ節内での局在を確認した。リンパ節構造を認識するために用いた抗体: リンパ濾胞; Alexa Fluor 647 標識抗 IgD 抗体。胚中心; ビオチン化抗 GL-7 抗体。T 細胞; ビオチン化抗 CD3 ϵ 抗体。二次抗体; Alexa Fluor 647 標識 streptavidin。

2-17. 遺伝子発現解析

ナイーブなマウスあるいは type II collagen を2回免疫後7日目のマウスのリンパ節を TRIzol (Invitrogen) に溶解し、cDNA を回収した後に LightCycler FastStart DNA Master SYBER Green I system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) の添付プロトコルに従って real-time PCR による遺伝子発現解析を行った。データはすべて G3PDH の発現値によって標準化した。使用したプライマーは以下の通り。SDF-1; FW 5'-GAGCCAACGTCAAGCATCTG-3' and RV 5'-CGGGTCAATGCACACTTGTC-3'; and G3PDH; FW 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and RV 5'-TCCACCACCCCTGTTGCTGTA-3'。

2-18. B 細胞刺激による細胞増殖試験

ナイーブなマウスの脾臓細胞を回収し、B220 陽性細胞を MACS system によって単離した。それらの細胞を CFSE (1 μ M) でラベルした後に 96 well U 底プレートに添加 (1 $\times 10^6$ cells/well) し、B 細胞アゴニストを加え、10% FCS RPMI 1640 で 37 $^{\circ}$ C で3日間培養した。その後細胞を抗 CD19 抗体と 7AAD で染色し、フローサイトメトリーによって B 細胞の増殖を CFSE の dilution で評価した。使用した B 細胞アゴニスト; Poly (I:C) (25 μ g/ml) , LPS (5 μ g/ml) , Gardiqui mod (3 μ g/ml) , cytosine guanine nucleotide (CpG) (1 μ g/ml) , 抗 CD40 抗体 (1 μ g/ml)、抗 IgD 抗体 (10 μ g/ml)。

2-19. T細胞との共培養によるB細胞増殖試験

ナイーブな WT マウスの脾臓細胞を回収し、CD4 陽性細胞を MACS system によって単離した。また、WT マウスと Syn4 KO マウスのそれぞれの脾臓細胞から B220 陽性細胞を MACS system によって単離し、CFSE (1 μ M) でラベルした。ラベルした WT および Syn4 KO B220⁺ 細胞 (1 \times 10⁶cells) と WT CD4⁺細胞 (1 \times 10⁶cells) を 96 well U 底プレートに添加し、10% FCS RPMI 1640 で 37°C で 3 日間培養した。その後細胞を抗 CD19 抗体と 7AAD で染色し、フローサイトメトリーによって B 細胞の増殖を CFSE の dilution で評価した。

2-20. 統計解析

グループ間の統計学的評価は Student の t-test を用いて行った。関節炎の発症率に関しては Microsoft Excel の CHIDIST によりカイ二乗分布の片側確率を計算した。相関性における有意差を解析するために、Microsoft Excel の CORREL および TDIST を使用した。*、**、***はそれぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.005$ の統計学的有意差を示している。評価した値は、 \pm standard error of the mean (SEM) で表記した。

3. 実験結果

3-1. 自己免疫性関節炎マウスモデルにおける Syn4 欠損による表現型

Syn4 は生体内においては内皮細胞・線維芽細胞・マクロファージなど様々な細胞に発現し、多彩な機能を有すると考えられていることから、まずは、RA の病態において Syn4 が重要な役割を果たしているのかを検討することとした。この目的において我々は、発症メカニズムが異なる 3 つの自己免疫性関節炎マウスモデルを用いて、野生型 (Syn4 +/+ ; WT) マウスと Syn4 欠損 (Syn4 -/- ; Syn4 KO) マウスの両群間の表現型を比較した。まず最初に、T 細胞および B 細胞依存的なメカニズムで発症し、抗原認識から関節炎の effector phase の解析まで広く使用されている、collagen-induced arthritis (CIA) model での検討を行った。CIA においては、day-21、day0 および day21 の計 3 回、complete freund's adjuvant (CFA) でエマルジョン化した type II collagen をマウスの尾根部に皮内投与し CIA を誘導した (図 1A)。(このプロトコルは、CIA の発症率が低い C57B/L6 バックグラウンドのマウスに対して関節炎を誘導するために改良したものであり、本研究では 2 回目の免疫日を day 0 としている。) 我々は、CIA において Syn4 KO マウス群は WT マウス群と比較し、関節炎の発症率・臨床スコアが有意に抑制され (WT vs Syn4 KO ; 発症率 ; 50% vs 9%、発症日 ; day18 (±4.95) vs day24 (±0)、最大臨床スコア ; 5.8 (±1.61) vs 3.0 (±9.09)) (図 1B)、更に day 45 での足関節病理組織評価においても、WT マウス群と比較してパンス形成や軟骨変性が有意に抑制されることを確認した (図 1C)。

次に、T 細胞依存的なメカニズムにより発症すると考えられている antigen-induced arthritis (AIA) model と、更に T 細胞および B 細胞非依存的に発症するとされる collagen antibodies-induced arthritis (CAIA) model において¹⁶、両群間での比較を行った。

AIA においては、day-21 および day-14 に CFA でエマルジョン化した methylated bovine serum albumin (mBSA) をマウスの尾根部に免疫し、day0 に右足関節に mBSA を、左足関節にコントロールとしての PBS を関節内投与し関節炎を発症させた (図 2)。AIA は抗原特異的な T 細胞活性や T 細胞遊走により誘導されることから、遅延型過敏症 (DTH ; delayed-type hypersensitivity) の病態を模しており、RA 発症初期の病態 (induction phase) の一部を反映すると考えられている^{17,18}。加えて CAIA は、抗 type II collagen 抗体のカクテルを腹腔内投与し、その 3 日後に lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与することで誘導され (図 3)、補体 (C5a) の活性により関節内へ浸潤した好中球やマクロファージによって関節破壊が誘導される¹⁹。よってこのモデルは B 細胞から自己抗体が産生された後の、RA 後期の病態 (effector phase) を反映していると考えられる。AIA および CAIA の両モデルにおいては発症率・臨床スコアで WT・Syn4 KO マウス群間で有意差を認めなかった (図 2、3)。

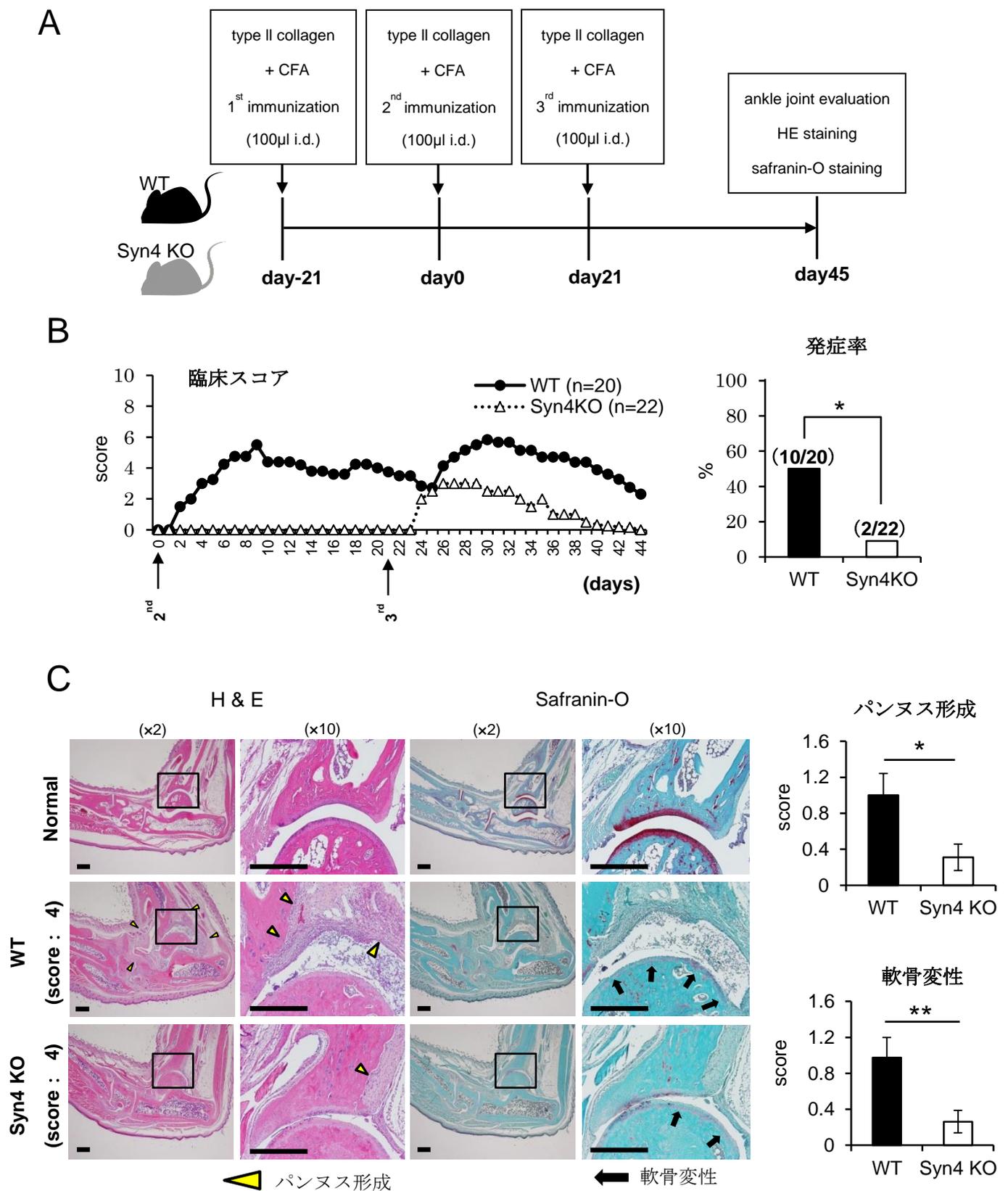


図1 Collagen-induced arthritis (CIA) のプロトコル・臨床成績・組織学的評価

(A) CIA プロトコル。i.d. : 皮内投与。

(B) CIA の臨床スコア・発症率 (WT, Syn4 KO : n = 20, 22)。

(C) day45 における両マウス群の足関節の病理組織と関節破壊の評価 (WT, Syn4 KO : n = 40, 44)。

スケールバー ; 500μm、* : <math><0.05</math>、**<math><0.01</math>。

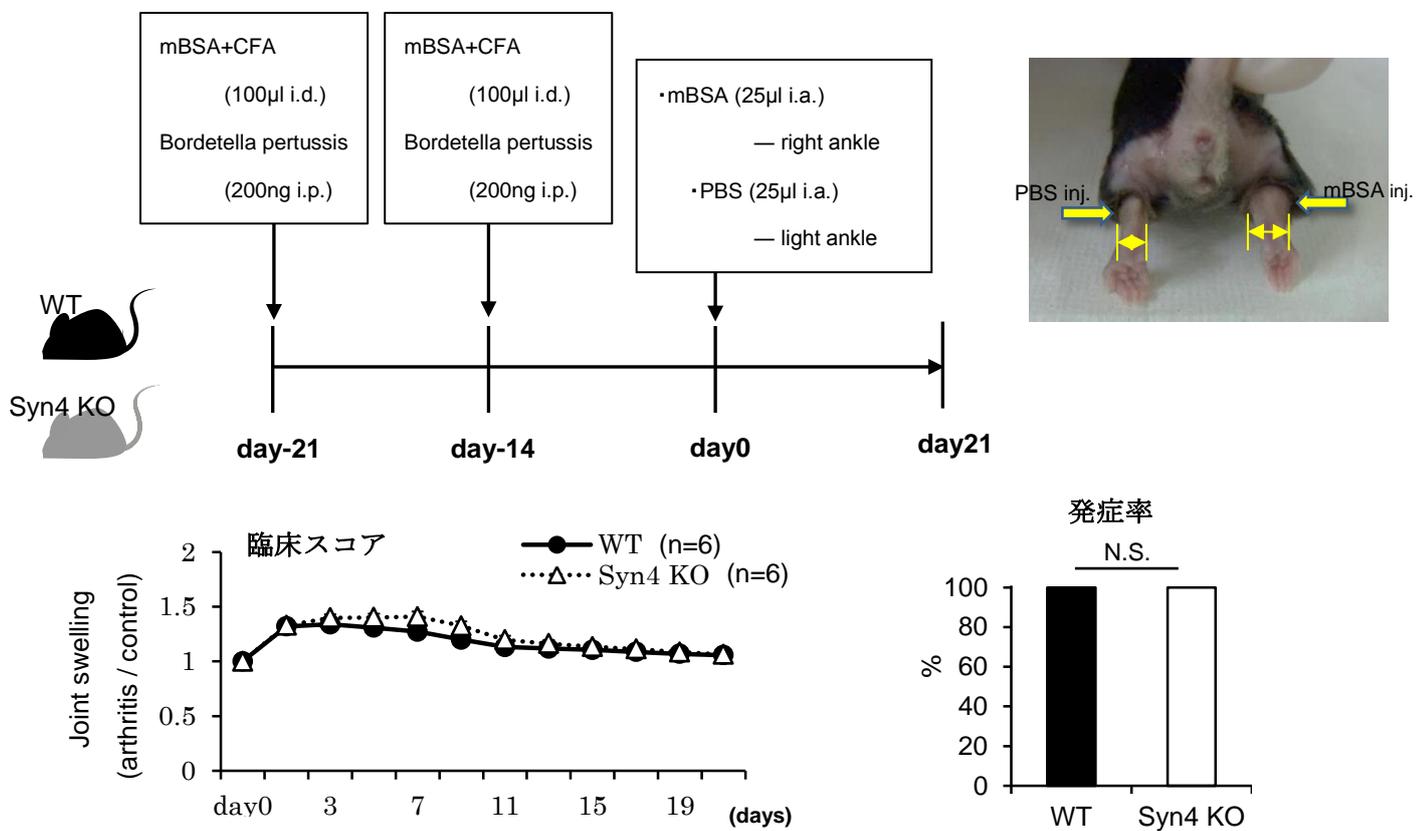


図2 Antigen-induced arthritis (AIA) のプロトコルと臨床成績

AIA プロトコルと臨床スコア・発症率 (WT, Syn4 KO : n = 6, 6)。

i.d. : 皮内投与、i.p. : 腹腔内投与、i.a. : 関節内投与、N.S. : 有意差なし。

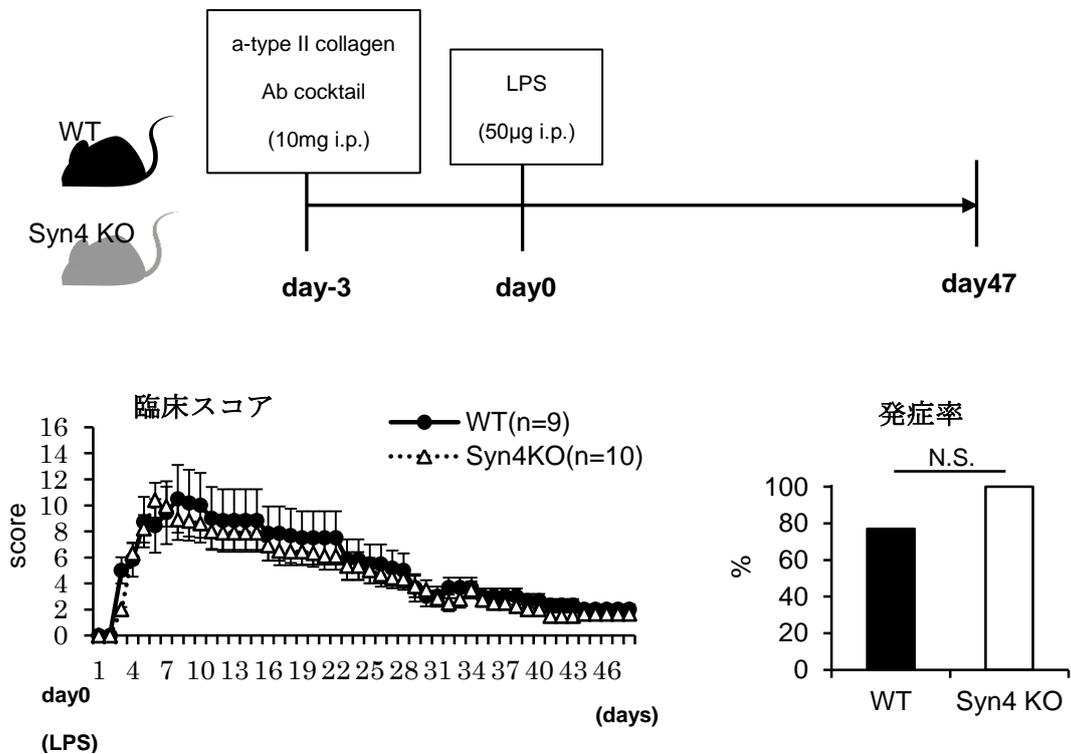


図3 Collagen antibodies-induced arthritis (CAIA) のプロトコルと臨床成績

CAIA プロトコルと臨床スコア・発症率 (WT, Syn4 KO : n = 9, 10)。

i.p. : 腹腔内投与、N.S. : 有意差なし。

本研究におけるこれらの3つのRAモデル（CIA・AIA・CAIA）による検討から、Syn4はT-B細胞相互依存（T-B cell interaction）かつ/もしくはB細胞機能を制御してRAの病態発症（induction）に関与する可能性が示唆された。

3-2. 所属リンパ節でのヘルパーT細胞におけるSyn4の発現

上記の結果を踏まえ、臨床症状と病理組織像において両者間で有意な差が認められたCIA modelを用いて更なる検討を加えた。所属リンパ節におけるSyn4の発現細胞を同定する目的で、WTマウスの鼠径リンパ節中の様々な免疫細胞のフローサイトメトリー解析を行った。まず我々は、CIAの発症に重要とされてきたCD4⁺T細胞においてSyn4の発現解析を行ったところ、Syn4はナイーブT細胞にはほとんど発現せず、type II collagenを免疫後のT細胞にわずかに発現上昇していた（図4A）。更にヘルパーT細胞サブセットの発現解析を加えたところ、Syn4はTh1の一部に発現するのみであり、Th17・濾胞性ヘルパーT細胞（follicular helper T cells : Tfh）、さらにヘルパーT細胞を抑制的に制御する御性T細胞（regulatory T cells : Treg）には発現しないことが確認された（図4B）。

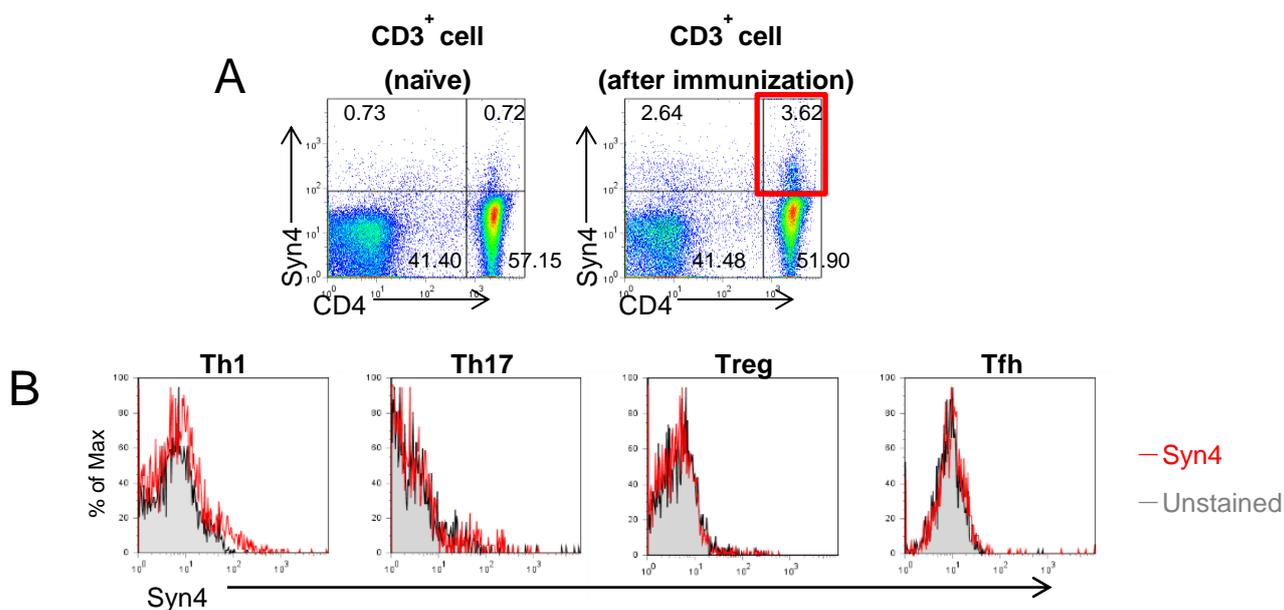


図4 WTマウスの所属リンパ節でのヘルパーT細胞におけるSyn4発現

- (A) Type II collagen 免疫前・後のCD4⁺T細胞のSyn4発現（フローサイトメトリー）。
- (B) 細胞内染色によるTh1（CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺）・Th17（CD3⁺CD4⁺IL-17⁺）・Treg（CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺）と、表面マーカー染色によるTfh（CD4⁺PD-1⁺CXCR5⁺）のSyn4発現（フローサイトメトリー）。

3-3. Syn4 欠損のヘルパーT 細胞の増殖・活性化への影響

これまでの多くの報告から、CIA の発症もしくは炎症の増幅には特に Th1・Th17・Tfh が深く関わっていることが示唆されている²⁰⁻²²。このことから、次に我々は Syn4 がヘルパーT 細胞増殖に影響しているかどうかを確認するために、type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目 (day7) の WT マウスと Syn4 KO マウスの所属リンパ節におけるヘルパーT 細胞数の比較をフローサイトメトリーで行った。ナイーブ (免疫前) な所属リンパ節では両マウス群の total CD4⁺ T 細胞および Th1・Th17・Treg 数に有意差はなく、免疫後にこれらの細胞は増殖を見せたものの、両マウス群間でヘルパーT 細胞数に有意差はなかった (図 5)。

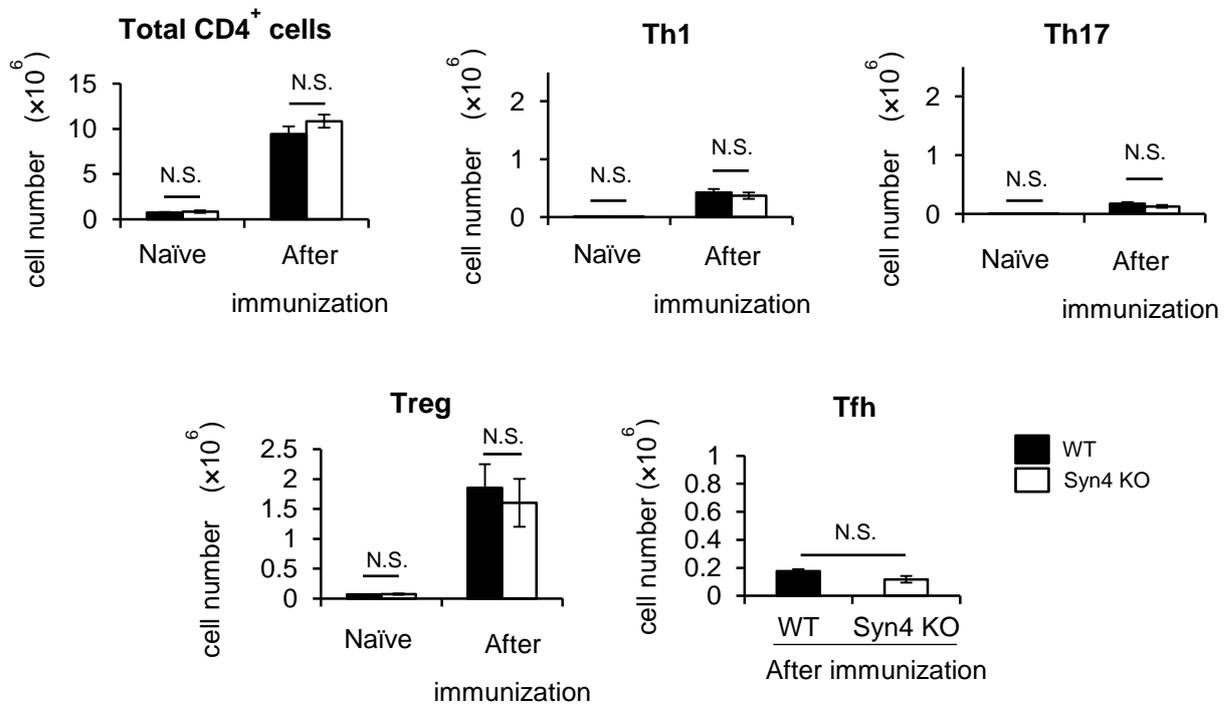


図 5 WT・Syn4KO マウスの所属リンパ節におけるヘルパーT 細胞数の比較

Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目における Th1・Th17・Treg・Tfh 数 (フローサイトメトリー)。n=5、N.S.: 有意差なし。これらは独立した 2 回の実験で同様の結果を示した。

さらに近年、樹状細胞上に発現する Syn4 のリガンドとして知られる、dendritic cell-associated heparan sulfate proteoglycan-dependent integrin ligand (DC-HIL) と、活性化 T 細胞上の Syn4 が結合することにより T 細胞応答が抑制される可能性があることが報告されている^{23,24}。このことから更に我々は、Syn4 が T 細胞活性に与える影響を検討することとした。Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目における血中・所属リンパ節中の活性化 CD4⁺ T 細胞 (CD62L^{low} CD44^{high} CD4⁺) 数・割合はともに、我々の予想とは反して WT と Syn4 KO マウス群間で有意差を認めなかった (図 6・7)。更に、CD4⁺ T 細胞の分化に Syn4 が与える影響を検討するため、WT と Syn4 KO マウスのそれぞれの脾臓から採取した細胞を carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) でラベルし、*in vitro* で抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体を用いて 4 日間刺激した後にフローサイトメトリーによって CD4⁺ T 細胞の分化能を解析した。しかしその結果も、Syn4 KO CD4⁺ T 細胞は WT CD4⁺ T 細胞と比較して分化能に有意な差を認めなかったことから (図 8)、Syn4 は CD4⁺ T 細胞の活性化もしくは増殖に影響を与えないことが示唆された。

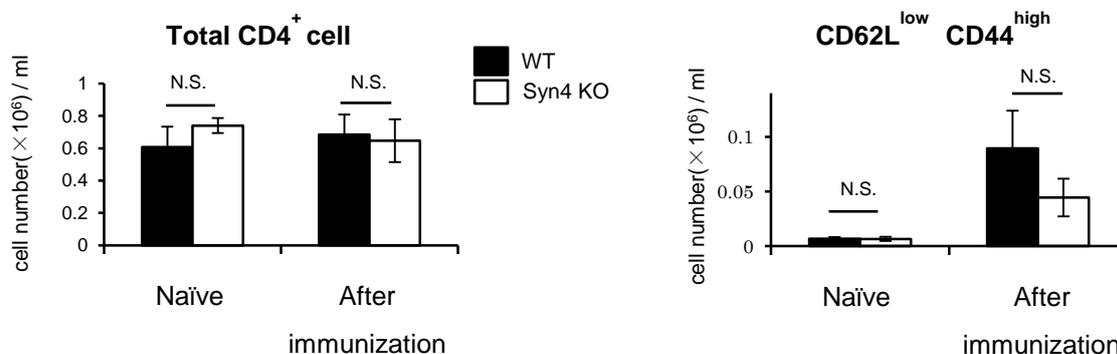


図 6 WT・Syn4KO マウスの血中における活性化 T 細胞数の比較

Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目における活性化 T 細胞 (CD62L^{low} CD44^{high} CD4⁺) 数 (フローサイトメトリー)。n>6、N.S.: 有意差なし。これらは独立した 2 回の実験で同様の結果を示した。

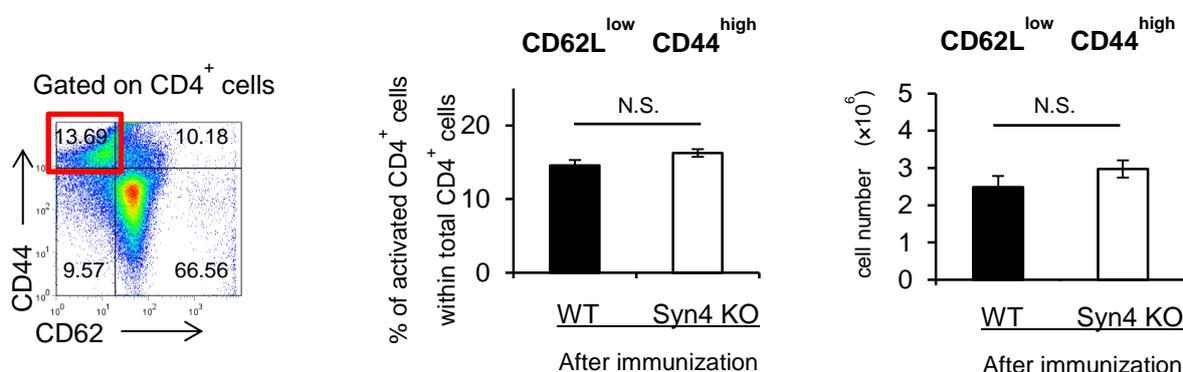


図 7 WT・Syn4KO マウスの所属リンパ節における活性化 T 細胞数の比較

Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目における活性化 T 細胞 (CD62L^{low} CD44^{high} CD4⁺) 数 (フローサイトメトリー)。n=6、N.S.: 有意差なし。これらは独立した 2 回の実験で同様の結果を示した。

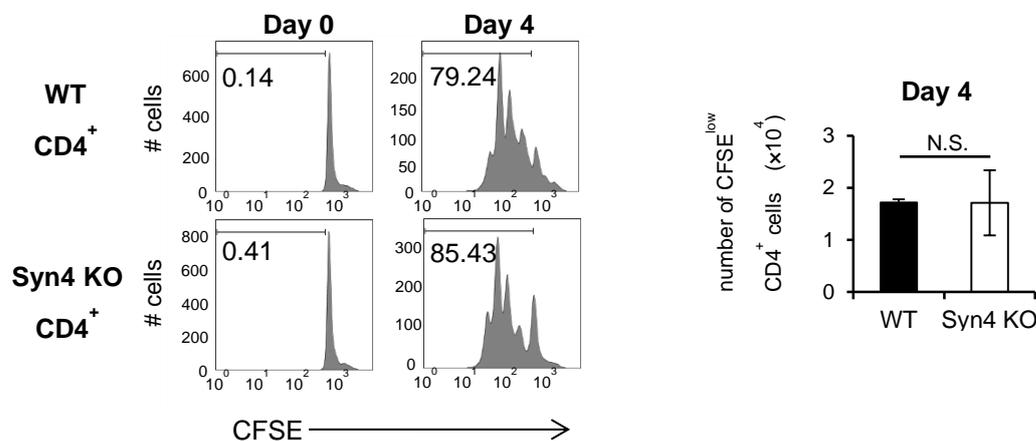


図8 T細胞増殖に対するSyn4欠損の影響

WT・Syn4 KO マウスの脾臓細胞をそれぞれCFSEでラベルした後、抗CD3ε抗体+抗CD28抗体で刺激し4日間培養した。その後、CD4⁺細胞の増殖をCFSEのdilutionによって評価した（フローサイトメトリー）。n=3、N.S.:有意差なし。これらは独立した2回の実験で同様の結果を示した。

3-4. Syn4欠損のヘルパーT細胞の遊走への影響

次に我々はSyn4のT細胞遊走に対する影響を検討した。はじめに、WTマウス群とSyn4 KOマウス群における、CIA誘導後の血中の活性化T細胞数の比較をフローサイトメトリーで行った。免疫後の血中CD62L^{low}CD44^{high}CD4⁺T細胞数はWTマウス群と比較してSyn4 KOマウス群でわずかに減少していたものの有意差はなかった(図9)。次に*in vivo*における、T細胞遊走へのSyn4の影響を検討する目的で、養子免疫細胞移入(adoptive transfer)実験により、WT活性化CD4⁺T細胞とSyn4 KO活性化CD4⁺T細胞とで関節病変部への遊走能の違いがあるかを検討した。(この実験においてはT細胞依存型の関節炎モデルであるAIA modelを用いたが、その理由はこのモデルの関節炎発症にはT細胞遊走が非常に重要な役割を果たしていると考えられるためである。)WTコンジェニックマウス(Ly5.1)とSyn4 KOマウス(Ly5.2)にmBSAで免疫した後に、それぞれの所属リンパ節から活性化T細胞(CD62L^{low}CD4⁺)を単離し1:1で混合した。これらの細胞を、AIAを誘導後1日目のWT宿主マウス(Ly5.1/5.2)に静脈内投与し、さらに48時間後の関節病変部に遊走したCD62L^{low}CD4⁺T細胞数の比較をフローサイトメトリーで行った。その結果、WT CD4⁺T細胞とSyn4 KO CD4⁺T細胞とでは関節病変部に遊走した数には有意差はなく(図9)、更にヘルパーT細胞の遊走に密接に関わるケモカインレセプターの発現比較も行ったが、両マウス群間でTh1・Th17上のケモカインレセプター発現に有意差を認めなかった(図10)。

上記の実験結果から、自己免疫性関節炎の病態において、Syn4はヘルパーT細胞機能にはほとんど関与していないことが示唆された。

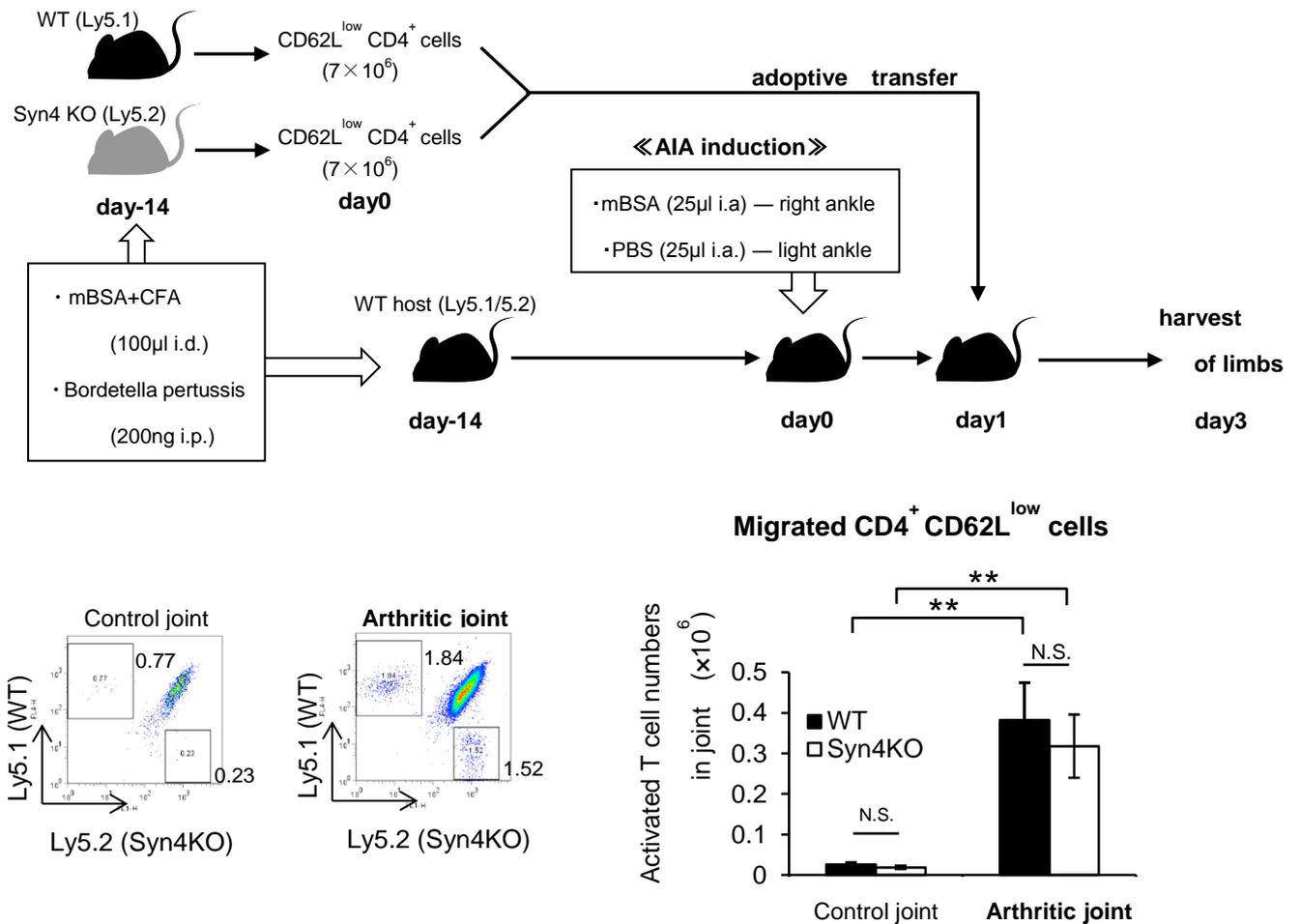


図9 adoptive transfer 実験による、*in vivo* における T 細胞遊走への Syn4 欠損の影響

AIA model を用いた所属リンパ節から関節病変部までの活性化 CD4⁺ T 細胞の遊走評価。mBSA で免疫後の WT (Ly5.1) と Syn4 KO マウス (Ly5.2) のそれぞれの所属リンパ節から活性化 T 細胞 (CD62L^{low} CD4⁺) を単離した。1:1 の割合で混合したこれらの細胞を、AIA を誘導後 1 日目の WT 宿主マウス (Ly5.1/5.2) に静脈内投与し、48 時間後に関節病変部に遊走した CD4⁺ T 細胞数をフローサイトメトリーで解析した。それぞれの T 細胞を区別するために、抗 CD4 (Ly5.1) 抗体、抗 CD4 (Ly5.2) 抗体で染色した。i.d. : 皮内投与、i.p. : 腹腔内投与、i.a. : 関節内投与、n=5、N.S. : 有意差なし。

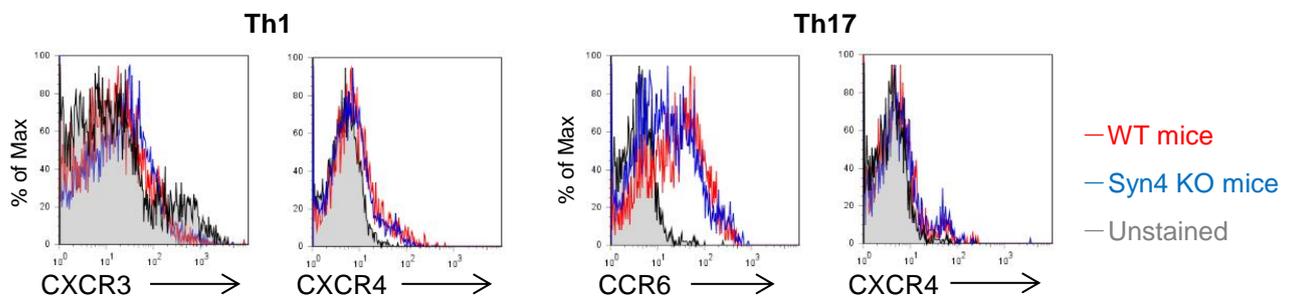


図10 WT・Syn4KO マウスのヘルパーT 細胞上のケモカインレセプター発現の比較

Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目における Th1・Th17 のケモカインレセプター発現 (フローサイトメトリー)。

3-5. 所属リンパ節での B 細胞における Syn4 の発現

次に我々は、B 細胞における Syn4 の発現解析を行った。フローサイトメトリーの解析により、WT マウスの所属リンパ節では B 細胞 (B220⁺) を含む B 細胞サブセット；濾胞性 B 細胞 (follicular B cells : CD19⁺ IgM^{mid} CD21/CD23^{low})、胚中心 B 細胞 (germinal center B cells : B220⁺ GL-7⁺) に Syn4 が高発現しており、その発現レベルは type II collagen の免疫前・後で変化がないことが分かった (図 11)。更に免疫蛍光染色においてもフローサイトメトリーでの解析結果と同様、Syn4 は所属リンパ節の B 細胞領域 (B220⁺) に一致して発現し、T 細胞領域 (CD3⁺) にはほとんど発現していないことが確認された (図 12)。

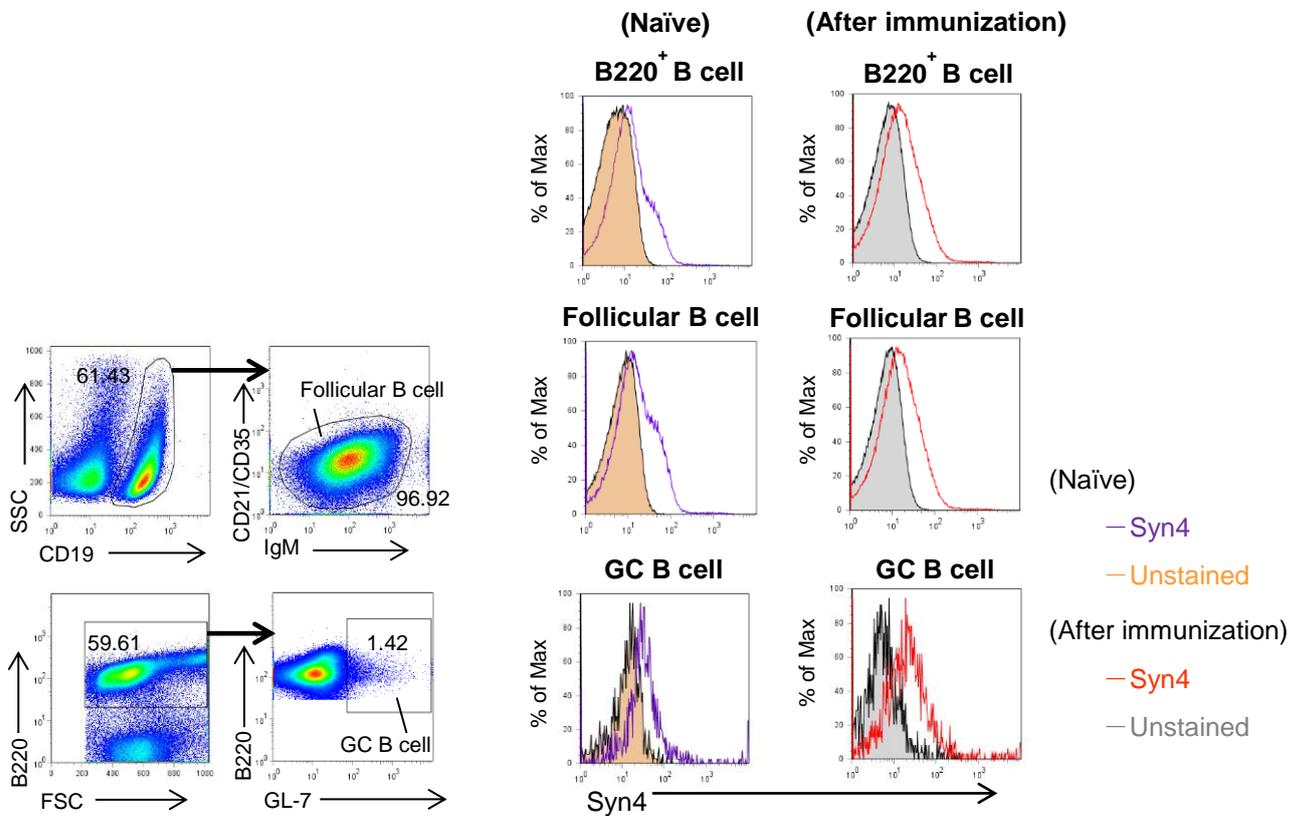


図 11 WT マウスの所属リンパ節での B 細胞サブセットにおける Syn4 発現

Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目における total B 細胞 (B220⁺) ・濾胞性 B 細胞 (follicular B cell : CD19⁺ IgM^{int} CD21/CD35^{low}) ・胚中心 B 細胞 (germinal center (GC) B cell : B220⁺ GL-7⁺) の Syn4 発現 (フローサイトメトリー)。

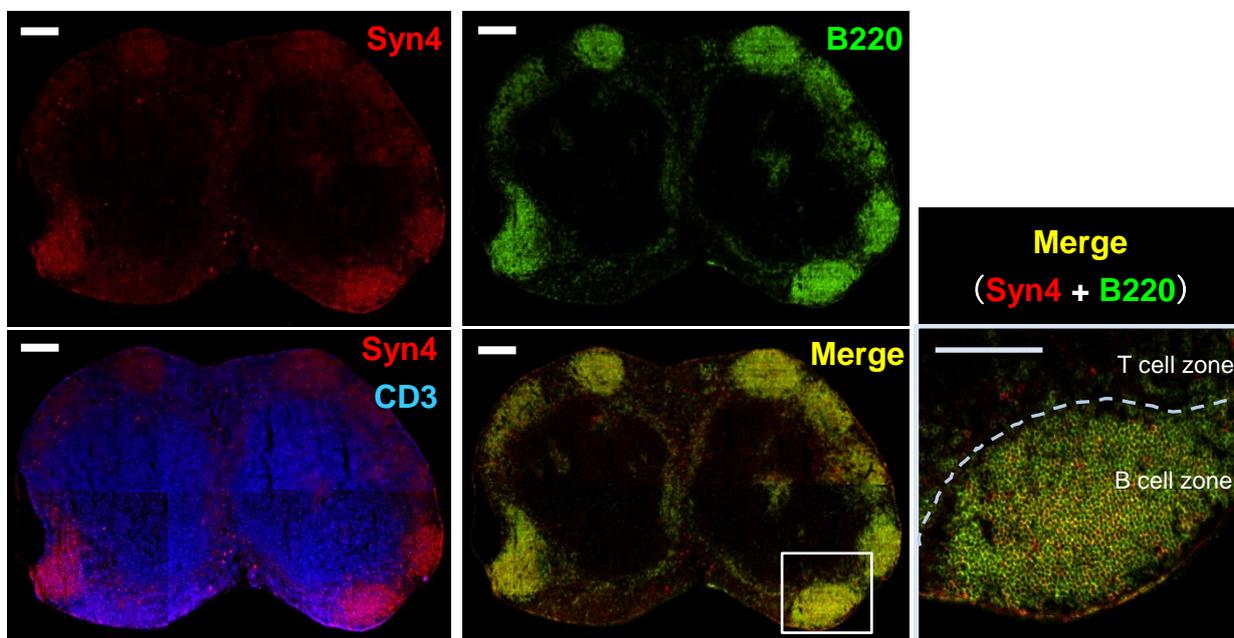


図 12 WT マウスの所属リンパ節の免疫蛍光染色

WT マウスのナイーブリンパ節の免疫蛍光染色。スケールバー ; 200 μ m。

3-6. Syn4 欠損による type II collagen 特異的な抗体産生の低下

このことから我々は Syn4 が高発現している B 細胞機能に着目し、WT マウスと Syn4 KO マウスの type II collagen 特異的な血清抗体価を比較した。その結果、type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目において、両マウス群で IgM 産生に有意差はなかったが、Syn4 KO マウス群では IgG サブクラス (total IgG, IgG2a, IgG2b) の産生が WT マウス群と比較して有意に低下していることが分かった (図 13)。

これらの研究結果から、Syn4 は所属リンパ節の B 細胞に高発現していることが明らかとなり、Syn4 が B 細胞機能を制御して CIA の病態に関与している可能性が示唆された。

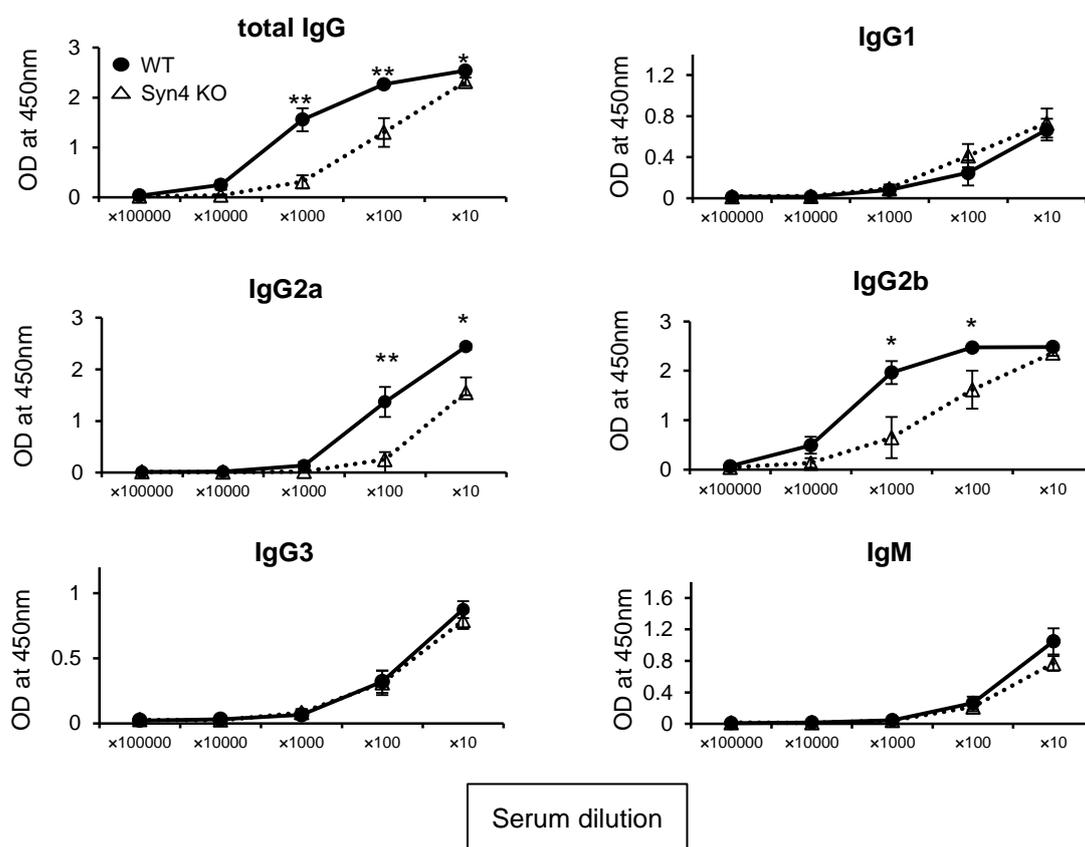


図 13 WT・Syn4KO マウスの type II collagen 特異的な血清抗体価の比較

Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目の血清サンプルにおける、type II collagen 特異的な血清抗体価の比較。OD 450nm (ELISA)。n=5、* : < 0.05、**< 0.01。これらは独立した 3 回の実験で同様の結果を示した。

3-7. Syn4 欠損による所属リンパ節での胚中心形成の障害

ナイーブな所属リンパ節における一次リンパ濾胞形成には、WT と Syn4 KO マウスでは明らかな差を認めなかったため (図 14)、我々は CIA model における二次リンパ濾胞と胚中心形成に着目した。3 回目免疫後 7 日目 (day28) において、WT マウスの所属リンパ節では二次リンパ濾胞と胚中心がよく形成されることが確認できたが、興味深いことに、Syn4 KO マウスの所属リンパ節では、二次リンパ濾胞と胚中心形成が障害されていることが分かった (図 15A)。画像解析ソフト (ImageJ) (NIH, MD, USA) により所属リンパ節の免疫組織染色を統計解析した結果、Syn4 KO マウス群はリンパ節に占める二次リンパ濾胞数と胚中心数は WT マウスの半数以下であり、二次リンパ濾胞・胚中心面積も半分以下であった (図 15B)。

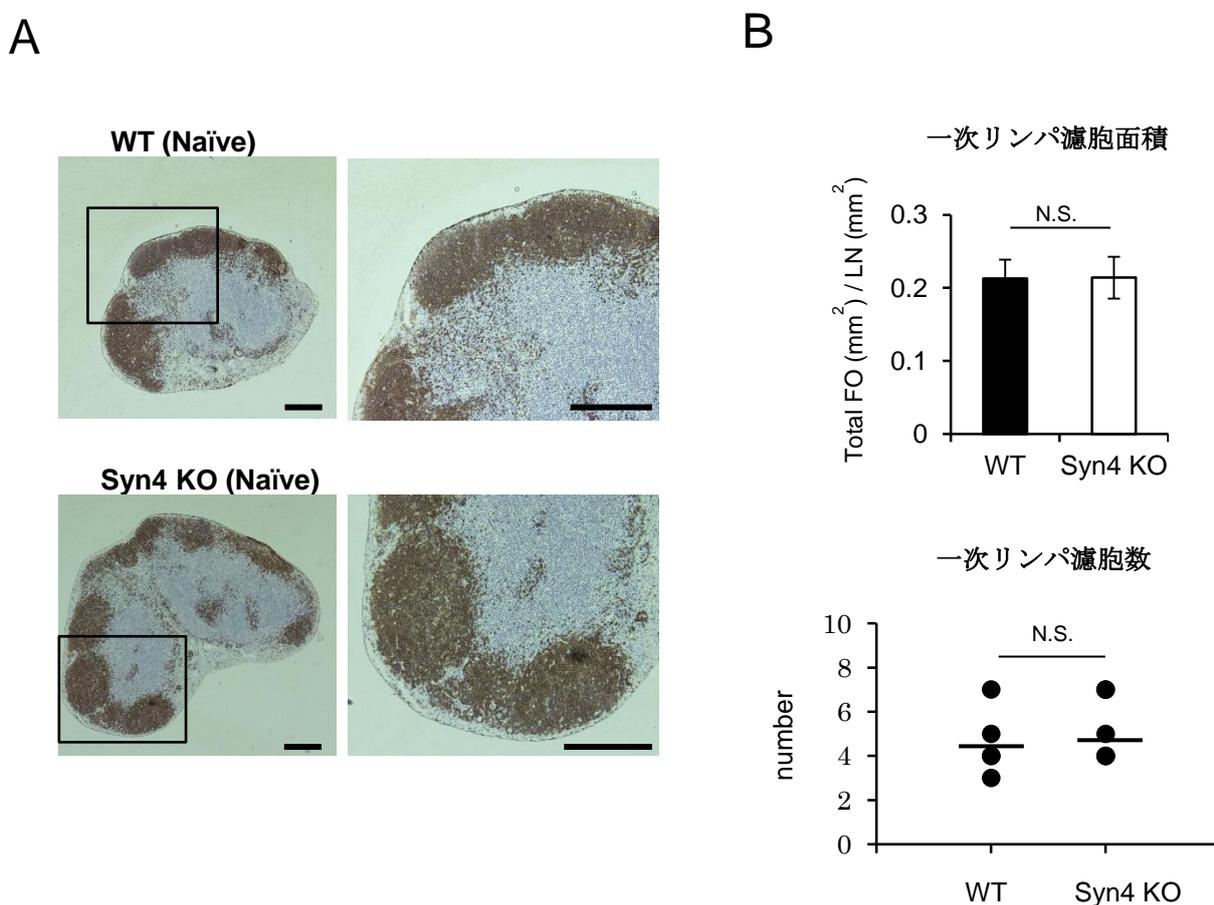


図 14 WT・Syn4KO マウスのナイーブリンパ節の比較

(A) 免疫組織染色 (茶; B220) (DAB 染色)、スケールバー; 300 μ m。

(B) 画像解析ソフトによるリンパ節 (LN) に占める一次リンパ濾胞 (FO) 面積と一次リンパ濾胞数。

n>5、 N.S.: 有意差なし。

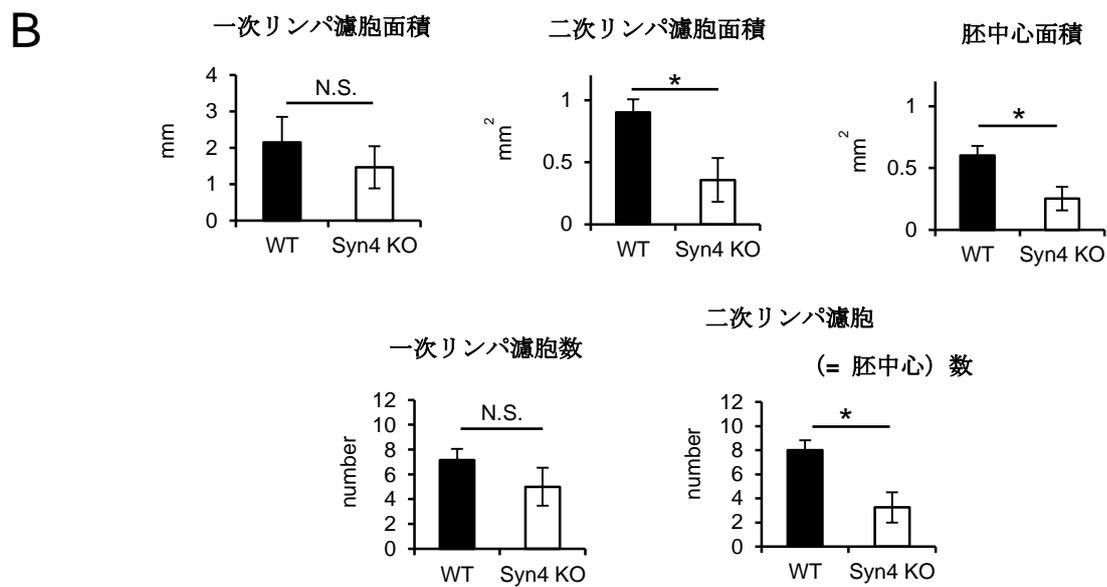
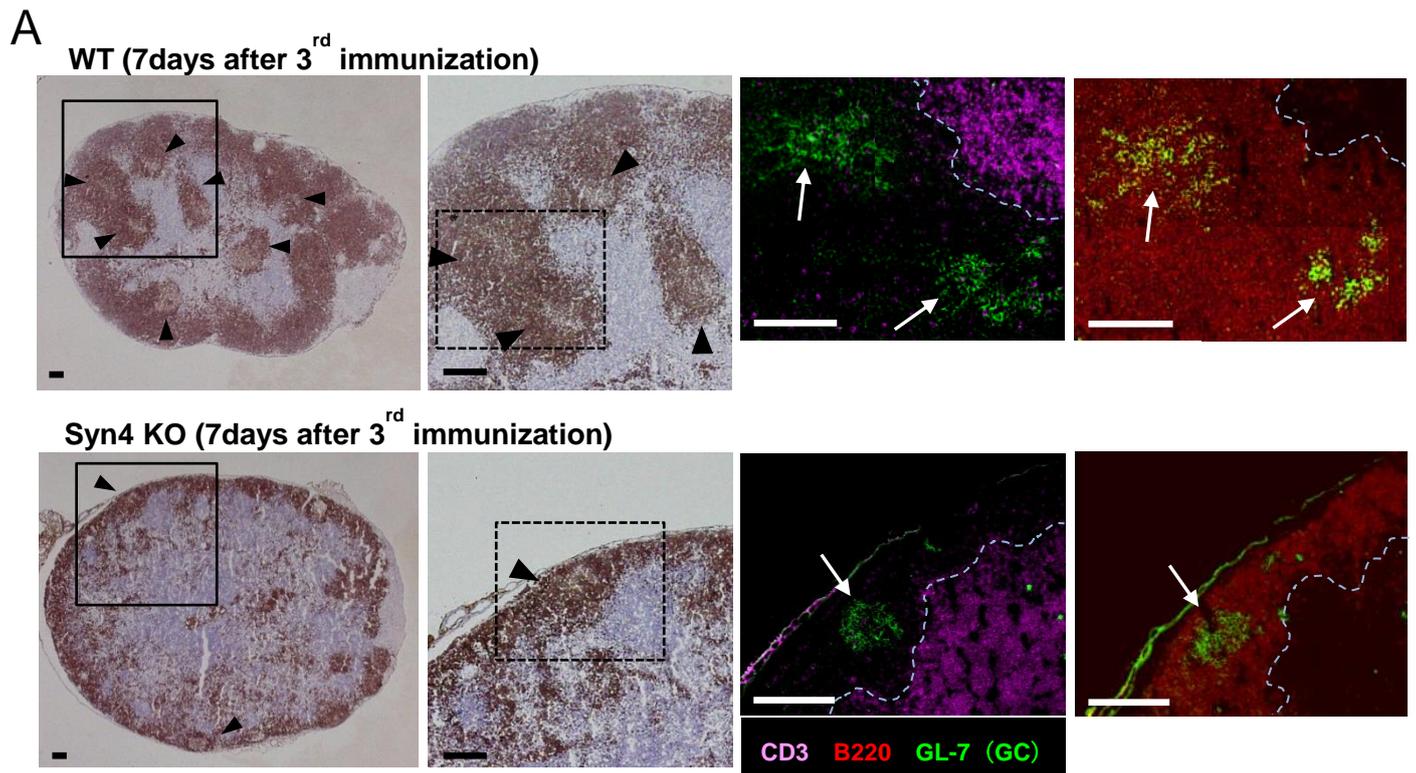


図 15 WT・Syn4KO マウスの CIA 誘導後の所属リンパ節の比較

- (A) Type II collagen の 3 回目免疫後 7 日目における所属リンパ節の免疫組織染色 (茶; B220) (DAB 染色) と、連続切片による免疫蛍光染色。矢頭; 二次リンパ濾胞、矢印; 胚中心スケールバー; 200 μ m。
- (B) 画像解析ソフトによるリンパ節に占めるリンパ濾胞・胚中心面積とリンパ濾胞数。
n>5、* : <0.05、**<0.01、N.S. : 有意差なし。

3-8. Syn4 欠損による所属リンパ節での B 細胞数の減少

更に CIA 誘導後の所属リンパ節の、胚中心形成に参与する B 細胞サブセット数をフローサイトメトリーで比較したところ、2 回目免疫後 7 日目において、Syn4 KO マウス群では total B 細胞、濾胞性 B 細胞、胚中心 B 細胞数が WT マウス群と比較し有意に減少しており (図 16)、上記の免疫組織染色の結果を支持する結果であった。

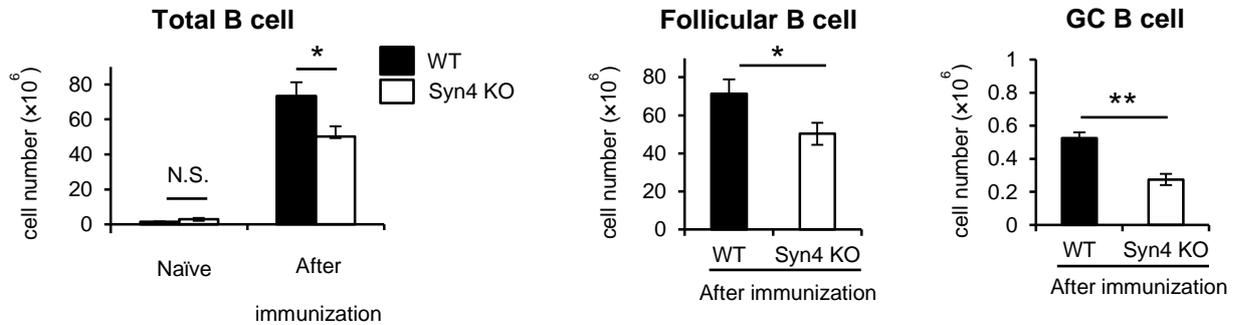


図 16 WT・Syn4KO マウスの所属リンパ節での B 細胞サブセット数の比較

Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目の total B 細胞 (B220⁺)、濾胞性 B 細胞: follicular B cell (CD19⁺ IgM^{int} CD21/CD35^{low})、胚中心 B 細胞: GC B cell (B220⁺ GL-7⁺) 数 (フローサイトメトリー)。n=5、* : <0.05、**<0.01、N.S.: 有意差なし。これらは独立した 2 回の実験で同様の結果を示した。

3-9. SDF-1 に対する Syn4 欠損 B 細胞の遊走能の低下

T 細胞依存的な抗原に対する免疫反応において、抗原を認識し活性化した B 細胞は、二次リンパ組織内の T 細胞領域や髄洞 (medullary sinus) で産生される SDF-1-CXCR4 依存的に、高内皮静脈 (HEV) からリンパ組織内の T 細胞領域へと流入する。さらに活性化 B 細胞上には CCR7 が発現上昇し、CCL19/CCL21 の濃度勾配によって T 細胞との接触のために、B 細胞は T-B 境界領域へと遊走する^{25,26}。T-B 境界領域での Tfh との相互作用を経て、CXCR5 を発現する B 細胞は CXCR5⁺ Tfh と共に CXCL13 の濃度勾配に従ってリンパ濾胞内へと遊走していく。その後のリンパ濾胞内部では胚中心が形成されていく過程で、B 細胞はセントロブラストとしてクローナルに増殖し胚中心暗帯 (SDF-1 が高濃度) を形成し²⁷、更にクラススイッチ・体細胞突然変異を起こす中でセントロサイトへと分化し、胚中心明帯 (CXCL13 が高濃度) を形成する²⁸。この過程において胚中心内部では、SDF-1 と CXCL13 の濃度勾配に従ってセントロブラストからセントロサイトへの分化を繰り返すことで胚中心を形成・維持しながら、胚中心 B 細胞は抗原への親和性を高め、長寿命形質細胞 (long-lived plasma cells) やメモリー B 細胞へと分化する⁹。これら事象は、ケモカイン-ケモカ

インレセプターの相互作用による細胞遊走が胚中心形成にとって重要な役割を果たしていることを示していると考えられた。

我々の実験において、WT マウス群と比較し Syn4 KO マウス群の所属リンパ節で B 細胞数が低下し、それに伴い胚中心形成に障害が生じていたことは、そのメカニズムを考える上で少なくとも下記の 2 つの可能性があると考えた。

- 1) Syn4 を欠損した B 細胞がリンパ濾胞領域への遊走が低下することで、Tfh との接触機会が減じた結果による。
- 2) Syn4 を欠損した B 細胞の、type II collagen を認識後の増殖低下による。

第一の可能性を考える根拠として、以前より Syn4 は自身が有するヘパラン硫酸側鎖を介してケモカインの共受容体/リザーバーとして機能し、特に SDF-1 に対しては受容体もしくは CXCR4 (SDF-1 受容体) の共受容体としても機能することが知られていることが挙げられる²⁹。このことから我々は B 細胞上の Syn4 が B 細胞遊走を促進させることで所属リンパ節での胚中心形成を促す可能性を考えた。このことを検証する目的で、我々はケモカインチャンバーを用いた *in vitro* での B 細胞遊走試験を行った。上層には type II collagen を免疫後の WT マウスと Syn4 KO マウスの脾臓から単離した B 細胞をそれぞれ添加し、下層には胚中心形成の過程で重要と考えられているリコンビナントケモカイン(SDF-1, CXCL13, CCL19, CCL21)をそれぞれ添加した。4 時間後のそれぞれのケモカインに対する B 細胞遊走の比較を行ったところ、WT マウスの脾臓から単離した B 細胞 (WT B 細胞) と比較して Syn4 KO マウスの脾臓から単離した B 細胞 (Syn4 KO B 細胞) は SDF-1 に対する遊走が有意に低下することが確認され、CXCL13・CCL19・CCL21 に対する遊走は両マウス由来の B 細胞間では有意差を認めなかった (図 17)。

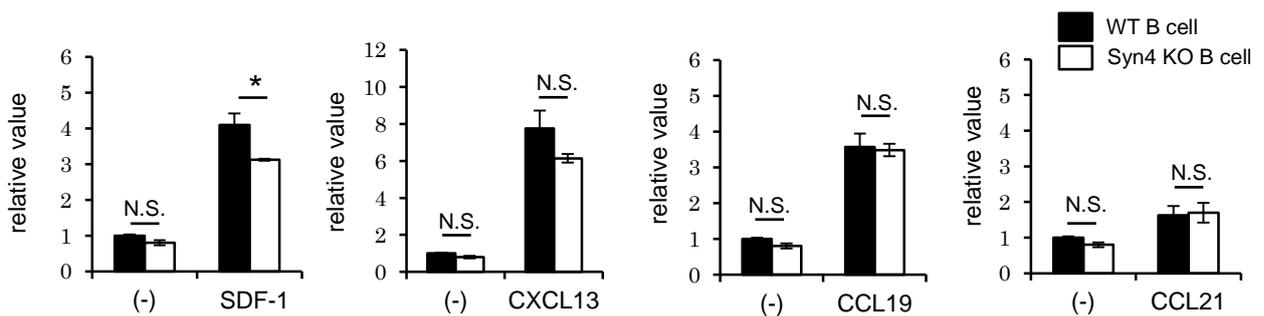


図 17 ケモカインに対する B 細胞遊走への Syn4 欠損の影響

ケモカインチャンバーを用いた B 細胞遊走試験。Type II collagen を 2 回免疫後 7 日目に、WT・Syn4 KO マウスの脾臓から B220⁺ 細胞を単離し、ケモカインチャンバーの upper well に添加した。lower well に SDF-1、CCL19、CCL21 (それぞれ 100ng/ml) および CXCL13 (1000ng/ml) を添加し、4 時間インキュベートした後 lower well に遊走した B 細胞数を計測した。n=3、* : <0.05、N.S. : 有意差なし。これらは独立した 3 回の実験で同様の結果を示した。

更に上記の結果を支持する目的で、SDF-1 添加後の B 細胞のシグナルの比較を行った。phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt シグナルは多くの細胞において細胞遊走を制御していることが知られており、SDF-1/CXCR4 を介する細胞遊走もこれに含まれる。これらから我々は SDF-1 刺激後の WT B 細胞と Syn4 KO B 細胞の Akt のリン酸化の比較をしたところ、WT B 細胞はそのリン酸化レベルが刺激後 20 分の時点でピークに達するのに対し、Syn4 KO B 細胞のリン酸化レベルは実験のタイムコースを通じて抑制されており、WT B 細胞と比較して Syn4 KO B 細胞の刺激後 20 分でのリン酸化は有意に低下していた (図 18)。

また、CIA 誘導後の所属リンパ節中においては、WT マウスと Syn4 KO マウスの B 細胞サブセット上の上記のケモカインに対応するケモカインレセプター発現 (CXCR4、CXCR5、CCR7) には有意差がないことが確認された (図 19)。

以上の結果より、B 細胞上の Syn4 は Akt のリン酸化によって SDF-1 に対する B 細胞遊走を制御していると考えられた。

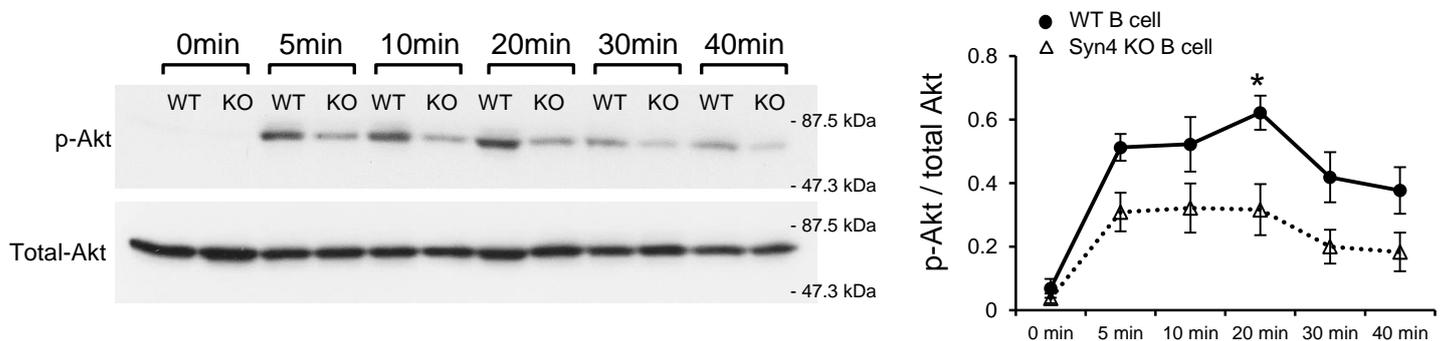


図 18 SDF-1 刺激に対する B 細胞の Akt のリン酸化の比較

ナイーブな WT・Syn4 KO マウスの脾臓から B220⁺ 細胞を単離し、SDF-1 (100ng/ml) を添加後の Akt のリン酸化の比較 (Western blotting)。*: <0.05。これらは独立した 3 回の実験で同様の結果を示した。

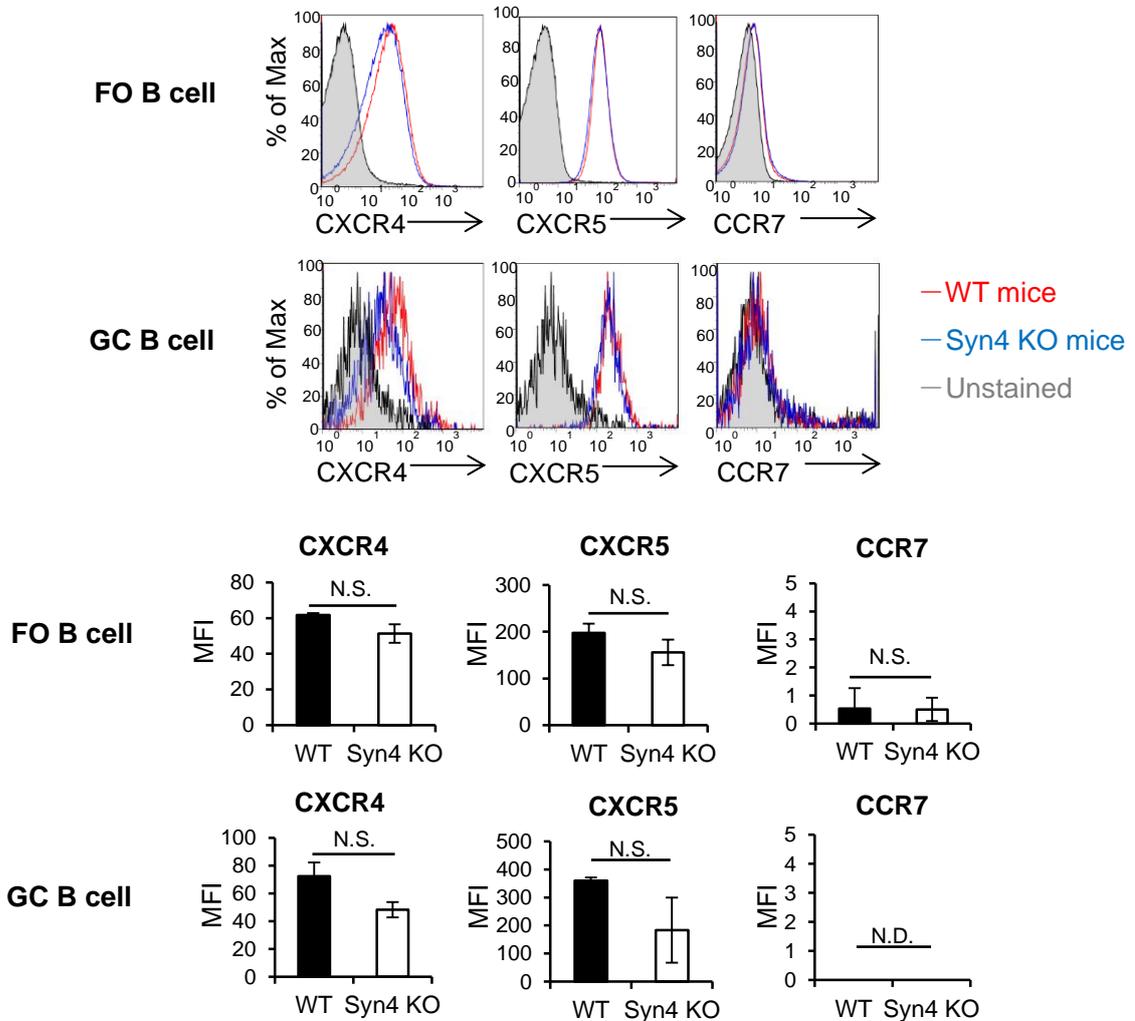


図 19 WT・Syn4KO マウスの所属リンパ節の B 細胞サブセットにおけるケモカインレセプター発現の比較

Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目における濾胞性 B 細胞 (FO B cell) と胚中心 B 細胞 (GC B cell) のケモカインレセプター発現 (フローサイトメトリー)。n>5、N.S.: 有意差なし。N.D.: 検出限界以下。これらは独立した 2 回の実験で同様の結果を示した。

次に CIA の病態進行に伴い、*in vivo* において所属リンパ節の二次リンパ濾胞への B 細胞の遊走に Syn4 が重要であることを確認する目的に、B 細胞の adoptive transfer 実験を行った。type II collagen を免疫後の WT マウスと Syn4 KO マウスの脾臓から B 細胞を単離し、それぞれの B 細胞を CFSE と PKH26 でラベルし混合した。これらの細胞を、CIA 誘導後 (day7) の WT 宿主マウスに静脈内投与し、20 時間後の所属リンパ節へと遊走した B 細胞数の比較を免疫染色により行った (図 20A)。この結果、WT B 細胞に比べて所属リンパ節内の二次リンパ濾胞領域に達した Syn4 KO B 細胞数は有意に減少しており (図 20B)、更に胚中心がはっきりと形成されている day28 での WT 宿主マウスにおいて同様の実験をしたところ、day7 と同様に Syn4 KO B 細胞の二次リンパ濾胞領域への遊走が有意に低下していた (図 20C)。

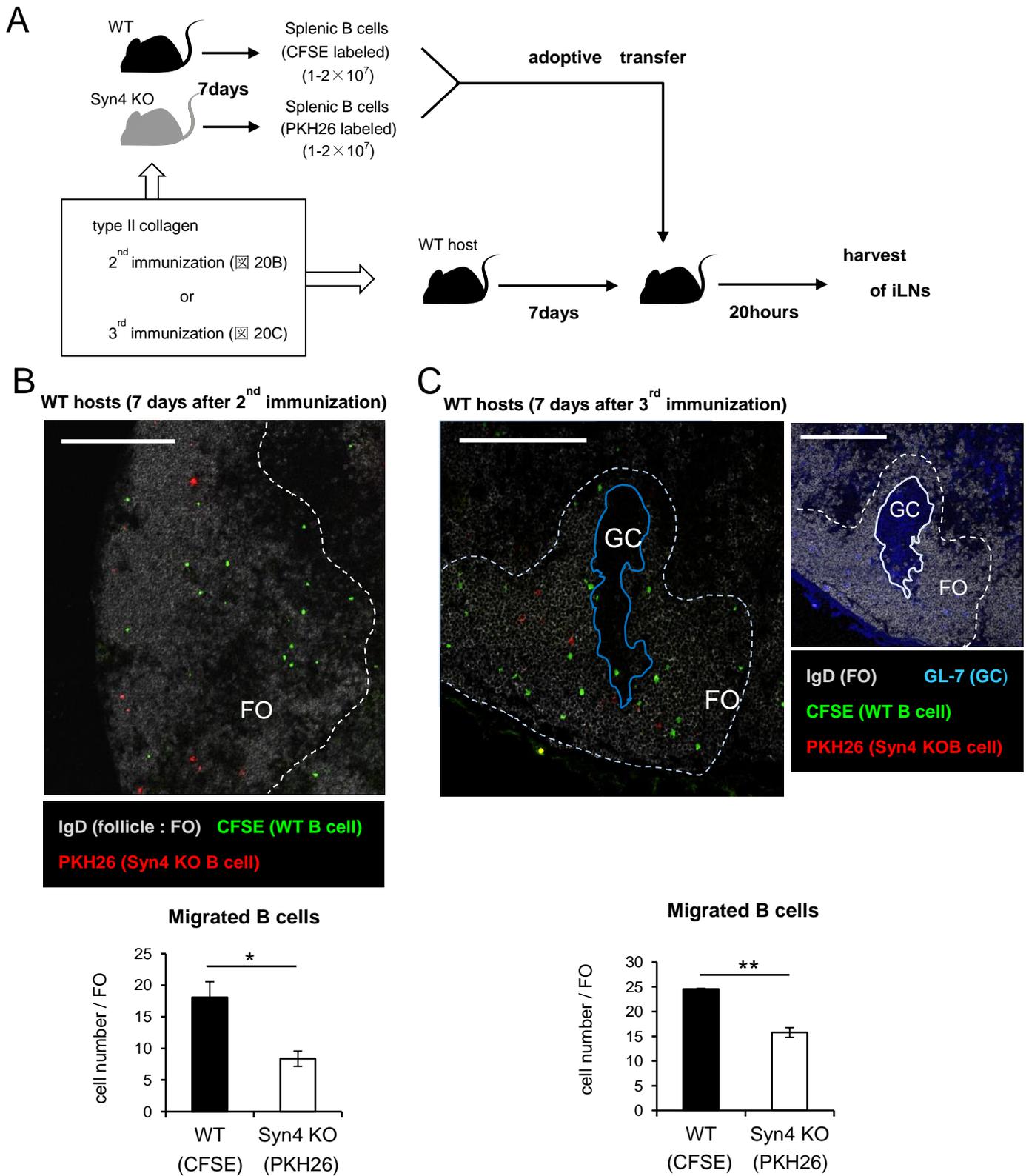


図 20 adoptive transfer 実験による、リンパ濾胞への B 細胞遊走に対する Syn4 欠損の影響

(A) プロトコル。

(B) type II collagen の 2 回目免疫後 (day7) における宿主マウスの鼠径リンパ節の一次リンパ濾胞。

(C) type II collagen の 3 回目免疫後 (day28) における宿主マウスの鼠径リンパ節の二次リンパ濾胞。

スケールバー ; 200 μ m、n=4-6、* : <0.05、**<0.01、これらは独立した 2 回の実験で同様の結果を示した。

3-10. 微小環境における Syn4 欠損が B 細胞遊走に与える影響

Syn4 は血管・リンパ管内皮細胞に発現する主要なヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、リンパ球の homing やリンパ節内へ移入 (transmigration) の際にケモカインのリザーバーとして機能することが知られているため³⁰、我々は宿主の Syn4 の欠損が B 細胞の homing に影響していないかどうかを検討した。type II collagen を免疫後の WT マウスと Syn4 KO マウスから単離したそれぞれの B 細胞 (WT B 細胞 : CFSE、Syn4 KO B 細胞 : PKH26) を混合し、type II collagen を初回免疫後 7 日目の WT 宿主マウスと Syn4 KO 宿主マウスのそれぞれに静脈内投与したところ、宿主における Syn4 発現の有無は、所属リンパ節の二次リンパ濾胞領域への WT B 細胞と Syn4 KO B 細胞それぞれの遊走には影響しないことが確認された (図 21)。また、Syn4 KO マウスの type II collagen を免疫後の所属リンパ節における SDF-1 の mRNA 発現量は WT マウスと比較しても有意差がなかった (図 22)。

これらの結果は、血管・リンパ管内皮細胞を含むリンパ節の微小環境に発現する Syn4 ではなく、B 細胞上の Syn4 が所属リンパ節への B 細胞遊走を制御している可能性を強く示唆するものであった。

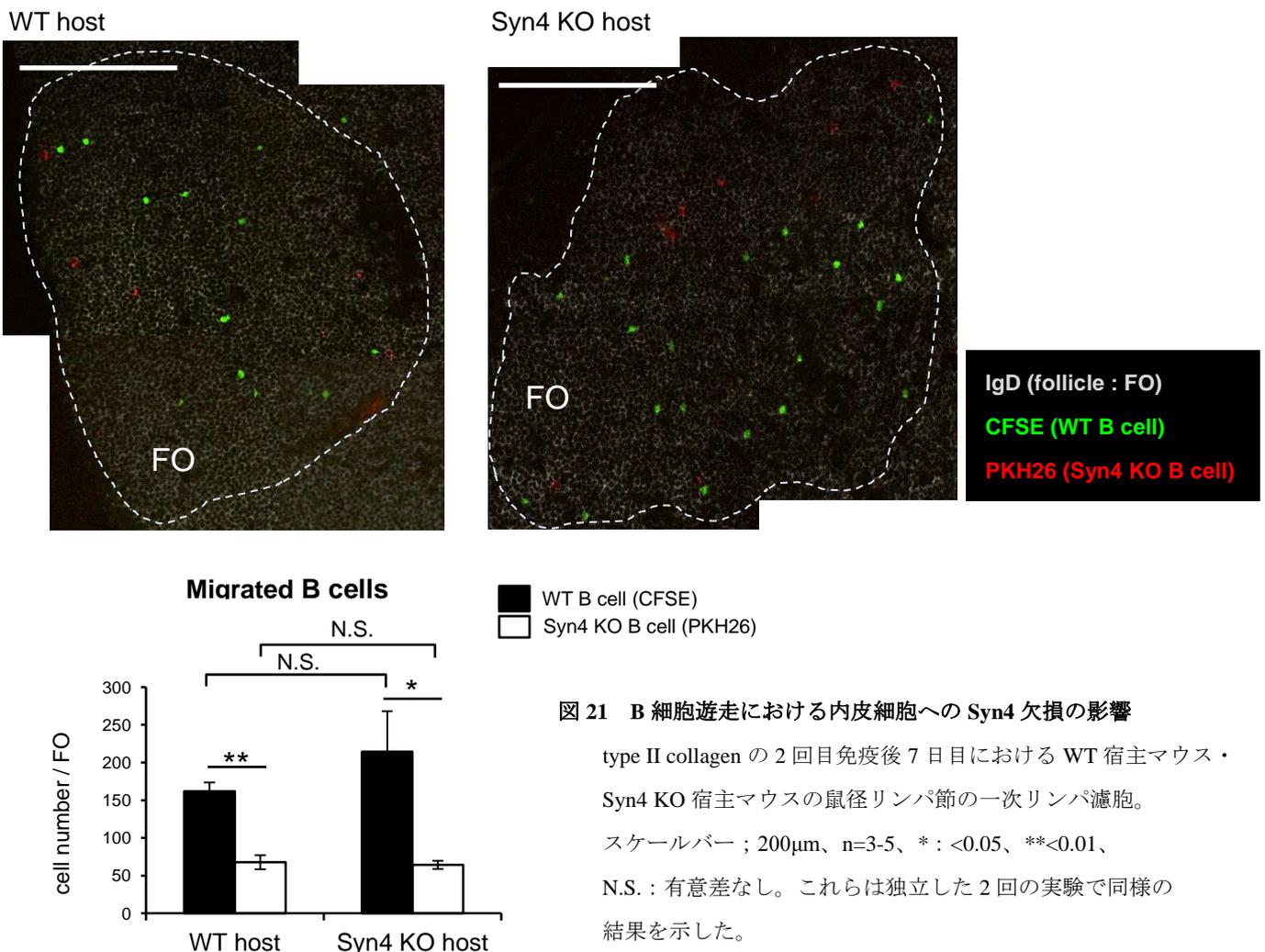


図 21 B 細胞遊走における内皮細胞への Syn4 欠損の影響

type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目における WT 宿主マウス・Syn4 KO 宿主マウスの鼠径リンパ節の一次リンパ濾胞。スケールバー ; 200 μ m、n=3-5、* : <0.05、**<0.01、N.S. : 有意差なし。これらは独立した 2 回の実験で同様の結果を示した。

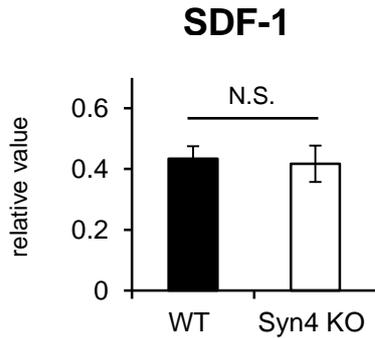


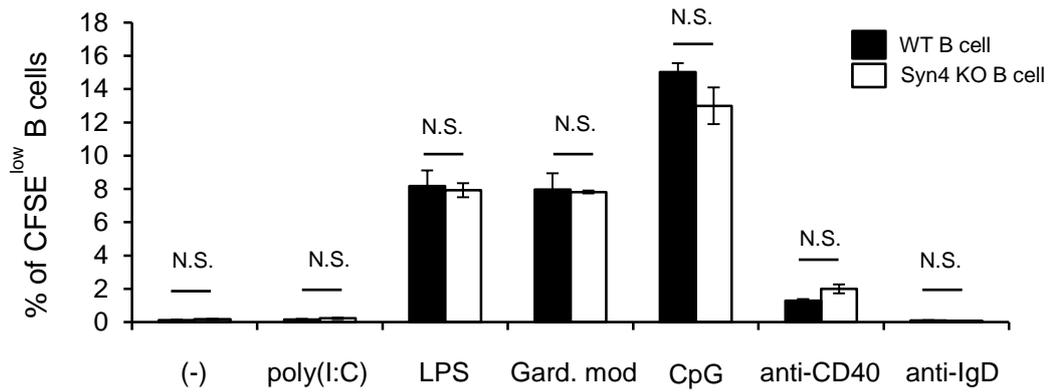
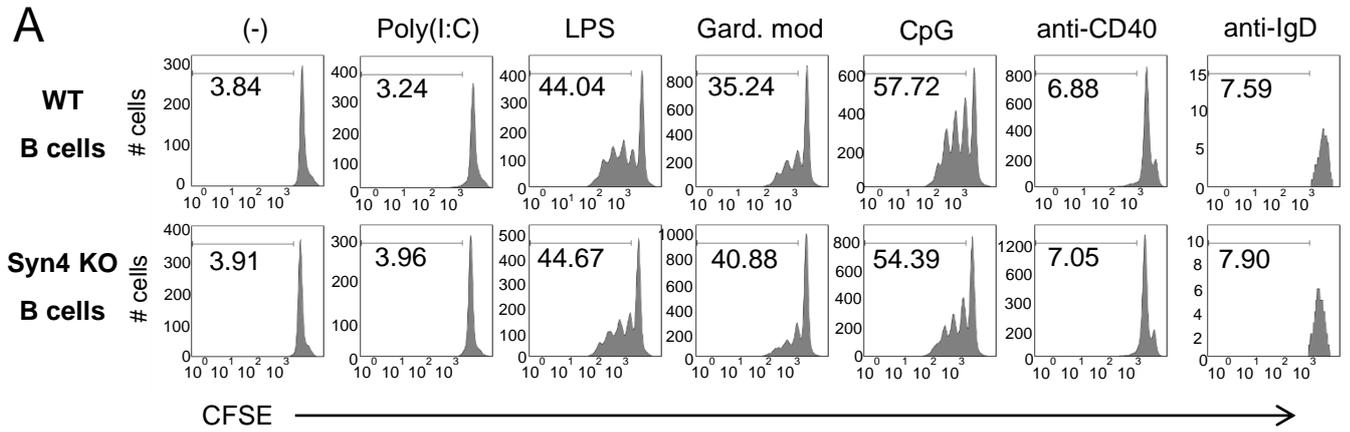
図 22 WT・Syn4KO マウスの CIA 誘導後の所属リンパ節における SDF-1 発現の比較

Type II collagen の 2 回目免疫後 7 日目における所属リンパ節の SDF-1 発現 (mRNA)。数値は G3PDH の値で補正した。

n>6、N.S.: 有意差なし。これらは独立した 2 回の実験で同様の結果を示した。

3-11. Syn4 欠損 B 細胞の細胞増殖への影響

次に我々は、Syn4 欠損が胚中心形成の障害を引き起こすもう一つの可能性として、Syn4 の B 細胞増殖に与える影響について検討をした。まず、WT と Syn4 KO マウスの脾臓から単離した B 細胞をそれぞれ CFSE でラベルし、Toll 様受容体 (toll like receptor ; TLR) リガンドを含むアゴニストによって刺激した後の B 細胞増殖をフローサイトメトリーにより解析した。刺激後 3 日目で LPS (TLR4 リガンド)、Gardiqui mod (TLR7 リガンド)、CpG (TLR9 リガンド)、抗 CD40 抗体によって B 細胞分化は誘導されたが、WT B 細胞と Syn4 KO B 細胞の分化には有意差を認めなかった (図 23A)。更に B 細胞分化にとって T 細胞からの補助シグナルが非常に重要であることから、T 細胞との共培養後の B 細胞分化についても検討を加えたが、WT B 細胞と比較して Syn4 KO B 細胞の分化に明らかな低下は認められなかった (図 23B)。以上から Syn4 は B 細胞増殖にはあまり重要ではないと考えた。



B

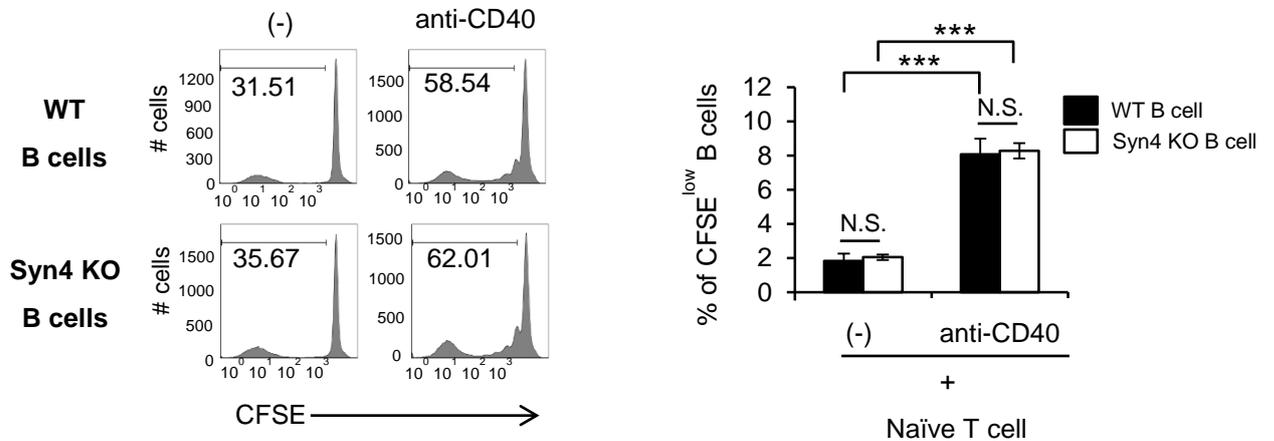


図 23 *in vitro* における B 細胞増殖に対する Syn4 欠損の影響

- (A) ナイーブな WT・Syn4 KO マウスの脾細胞から B220⁺ 細胞を単離した後に CFSE でラベルした。Poly (I:C)、LPS、Gardiqui mod、CpG、抗 CD40 抗体、抗 IgD 抗体を含む B 細胞アゴニストで刺激し 3 日間培養した後に、B220⁺ 細胞の増殖を CFSE の dilution によって評価した。(フローサイトメトリー)
- (B) ナイーブな WT マウスの脾細胞から CD4⁺ 細胞を単離した。また、ナイーブな WT マウスと Syn4 KO マウスのそれぞれの脾細胞から B220⁺ 細胞を単離し CFSE でラベルした。ラベルした WT および Syn4 KO B220⁺ 細胞と WT CD4⁺ 細胞を 3 日間共培養した。その後 B220⁺ 細胞の増殖を CFSE の dilution によって評価した。(フローサイトメトリー)

3-12. 関節滑膜細胞における Syn4 発現

最後に我々は WT マウスの関節滑膜における Syn4 の発現を確認した。CIA 誘導後に関節炎が発症した後肢をコラゲナーゼで処理して得られた細胞を 72 時間培養し、滑膜線維芽細胞と炎症滑膜に浸潤したマクロファージにおける Syn4 発現をフローサイトメトリーによって解析した。炎症前に比べて炎症後の滑膜線維芽細胞における Syn4 の発現は上昇しており、また滑膜マクロファージにも Syn4 は発現していた (図 24)。このことから滑膜線維芽細胞の Syn4 も、CIA の病態に関わっている可能性は考えられたが、本研究においてそれらの検討は行っていない。一方で、本研究における CAIA model (マクロファージや滑膜線維芽細胞によって関節炎発症が制御されると考えられるモデル) の検討から、Syn4 KO マウス群と WT マウス群の発症率や臨床スコアで有意差がなかったことを考慮すると、関節滑膜細胞における Syn4 は炎症の増幅にはあまり影響していない可能性も考えられた。

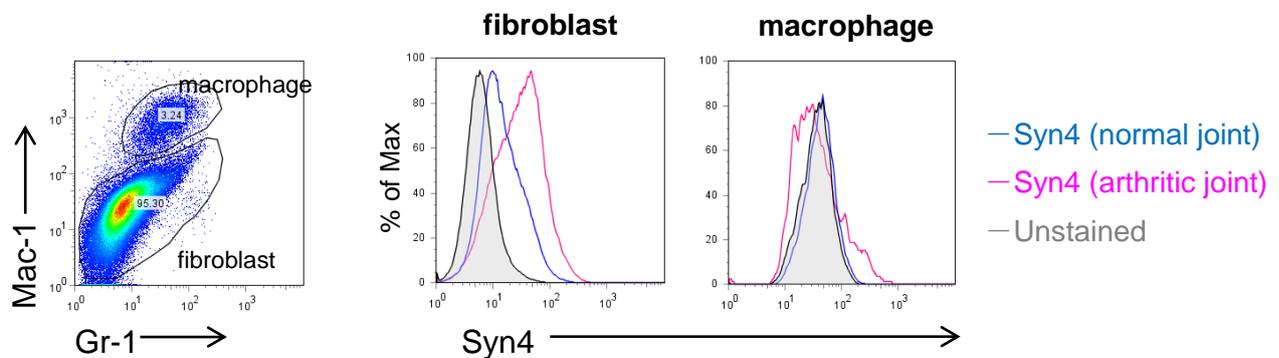


図 24 WT マウスの CIA 誘導後の関節における Syn4 発現

Type II collagen を免疫後に関節炎を発症した WT マウスの足関節と正常の WT マウスの足関節をそれぞれ 0.1% type II collagenase で処理し、細胞を回収後に 10% FCS DMEM で 72 時間培養した。上清中に浮遊した細胞を除去し、接着した細胞をフローサイトメトリーで解析した。滑膜線維芽細胞 (fibroblast) は Gr-1⁻ Mac-1⁻ であり、滑膜マクロファージ (macrophage) は Gr-1⁻ Mac-1⁺ とした。

4. 考察

過去の報告において、B 細胞標的治療が RA 患者の臨床症状を改善させることや^{2,31-33}、B 細胞除去によりマウス CIA model においては関節炎がほぼ完全に発症しないことなどから³⁴⁻³⁶、B 細胞は RA の病態に強く関与していると考えられている。これらの事象にも関わらず多くの RA の動物モデルにおいてはこれまで、関節炎のエフェクター細胞として CD4⁺ ヘルパーT 細胞、その中でも特に Th1 と Th17 に焦点が当てられてきた^{21,37,38}。さらに最近のいくつかの報告により、新たなヘルパーT 細胞サブセットの一つである Tfh が関与する自己抗体産生と、それに伴う炎症反応が CIA の病態増悪に強く影響していることが明らかになりつつある³⁹。Levenworth らの研究において、Rag2^{-/-} Prf1^{-/-} (T 細胞・B 細胞・NK 細胞が欠損) マウスに Th17 と B 細胞を共に adoptive transfer した後に type II collagen を免疫しても CIA の進行は強くは誘導されないものの、Rag2^{-/-} Prf1^{-/-} マウスに Tfh+Th17 と B 細胞を共に adoptive transfer した後では CIA の進行が増幅されることが報告されている⁴⁰。このことは T-B cell interaction によって誘導される自己抗体産生が CIA 発症とその増幅に欠かせない要因の一つであることを示唆している。本研究においては、異なる関節炎の病態と発症メカニズムを示す 3 種類の自己免疫性関節炎のマウスモデル (CIA・AIA・CAIA) を用いて、Syn4 がどの病態・組織・細胞に最も強く作用しているのかを検討した。T 細胞および B 細胞依存型の CIA model において、Syn4 KO マウスは WT マウスに比べて関節炎の進行が有意に抑制されたが、一方で T 細胞依存型の AIA model と、T 細胞および B 細胞非依存的型の CAIA model においては、Syn4 欠損は発症率・臨床スコアに影響を与えなかった。これらの異なる自己免疫性関節炎モデルの検討から、RA の病態において Syn4 は、T-B cell interaction かつ/もしくは自己抗体産生を制御し、関節炎の発症に関与している可能性が示唆された。

Chung らの研究において、樹状細胞上の Syn4 のリガンドである DC-HIL と活性化 T 細胞上の Syn4 とが結合することで T 細胞応答が抑制され、更に Syn4 抗体による Syn4 の機能阻害によって、マウスモデルの皮膚の DTH 反応が抑制されるという報告がなされている^{23,41}。これらを踏まえ、更に RA の病態を考えた場合にも上記の理由から CD4⁺ T 細胞の関与は無視できないと考えたため、本研究において当初我々はまず Syn4 の CD4⁺ T 細胞活性に対する影響を詳細に検討した。しかしながら我々の予想と反し、Syn4 欠損は所属リンパ節のヘルパーT 細胞増殖・CD4⁺ T 細胞の分化・活性化 CD4⁺ の増殖、更には活性化 CD4⁺ T 細胞の関節病変部への遊走や Th1・Th17 上のケモカインレセプター発現にもほとんど影響しないことが確認された。また Syn4 欠損が T 細胞依存型の AIA model の発症率・臨床スコアに影響を与えなかったこともこれらの結果を支持するものであった。この結果から自己免疫性関節炎の病態において Syn4 は、ヘルパーT 細胞機能にはほとんど関与しないことが示唆されたが、過去の報

告と本研究の結果との矛盾についてははっきりとはしていない。しかしながらその一つの考察として、Syn4-DC-HIL の相互作用は T 細胞受容体 (TCR) 刺激の強度に応じて T 細胞に対し、促進性/抑制性のどちらにもシグナルを伝達しうることが挙げられる。この意味において、本研究における *in vitro* での CD4⁺ T 細胞分化の検討に用いた TCR 刺激強度が、Syn4 KO CD4⁺ T cell 分化を促進させなかった結果は過去の報告と一致している。*in vivo* 実験においては、過去の報告における皮膚の DTH model と本研究における AIA model とでは免疫抗原の種類や投与方法・炎症反応組織 (皮膚・関節滑膜) などの相違点があることも考慮すべき点と考えられたが、詳細な検討は今後の課題である。

注目すべきこととして我々は、T 細胞および B 細胞依存型の CIA model において、type II collagen を免疫前・後の所属リンパ節の B 細胞サブセットに Syn4 が高発現していることを示し、更に、Syn4 欠損が CIA model の病態進行に伴う胚中心形成を障害することを示した。これらの結果を支持するように、Syn4 KO マウス群の所属リンパ節では、胚中心形成に関与する B 細胞サブセット数が WT マウス群に比べて減少していた。T 細胞依存的な抗原に対する抗体産生には、二次リンパ組織における胚中心が中心的な役割を担うことが古くから知られており、胚中心形成には T-B cell interaction が必須であることが分かっている。さらに近年、胚中心形成および抗体産生には、Tfh-B 細胞の相互作用が特に重要である報告がなされている^{42,43}。これらのことを踏まえ我々は、B 細胞上の Syn4 が T-B cell interaction を制御することで胚中心形成を促進させている可能性を考えるに至った。またこれまでに、マウス CIA model の関節炎の重症度は type II collagen 特異的な血清抗体価に比例することから、CIA 発症とその増幅には type II collagen 特異的 IgG が非常に重要な因子であるとの報告もなされている⁴⁰。本研究においては Syn4 欠損によって、type II collagen を免疫後の type II collagen 特異的な IgG サブクラス (total IgG, IgG2a, IgG2b) の産生が低下することが確認されている。これらの研究結果から我々は、Syn4 欠損により生じた CIA の臨床症状の抑制は、胚中心形成障害に伴う type II collagen 特異的な抗体産生の低下による可能性が非常に高いと考えた。

ここでの我々の疑問としては、どのように Syn4 が所属リンパ節での胚中心形成に関与しているのか? というものであり、そのメカニズムを解析する上で着目したのが Syn4 とケモカインの関係性であった。なぜならば Syn4 は自身が有するヘパラン硫酸側鎖を介してケモカインのリザーバー、もしくはケモカインレセプターの共受容体として機能することが知られているからである。これまで数多くの報告によって、二次リンパ組織内ではある特定の領域で個々のケモカインが産生されていることが明らかとなっている。代表的には、CCL19/CCL21 が T 細胞領域や HEV、SDF-1 が T 細胞領域・髄洞 (medullary sinus)・高内皮静脈 (HEV)・胚中心暗帯、CXCL13 がリンパ濾胞内や胚中心明帯などで産生されており、胚中心形成の過程ではこれらのケモカインの濃度勾配に従って B 細胞が遊走すると考えられる。活性化 B 細胞は SDF-1-

CXCR4 依存的に HEV からリンパ節内へと流入し、T 細胞領域を通過して CCL19/CCL21-CCR7 依存的に T-B 境界領域へと遊走する^{26,44}。T-B 境界領域での Tfh との相互作用を経て、CXCL13-CXCR5 依存的にリンパ濾胞内へと遊走した B 細胞は、胚中心暗帯 (SDF-1 が高濃度) でのクローナルな増殖と胚中心明帯 (CXCL13 が高濃度) でのアポトーシスを繰り返しながら胚中心を形成・維持していく²⁷。これらの事象は、胚中心形成のメカニズムを考える上で、ケモカイン-ケモカインレセプターの相互作用により制御される細胞遊走が一つの重要な鍵であることを示唆しているといえる。

本研究で我々は、Syn4 欠損により生じた B 細胞サブセット数の減少と、それに伴う胚中心形成障害のメカニズムを考える上で、胚中心形成の過程における B 細胞遊走に対する Syn4 の影響に焦点を当てた。この論理的な根拠としては、第一に Syn4 が B 細胞に高発現していることであり、第二に Syn4 が SDF-1 の受容体、もしくは CXCR4 (SDF-1 受容体) の共受容体として機能する可能性があること²⁹、である。我々は *in vitro* での B 細胞遊走試験において Syn4 KO B 細胞の SDF-1 に対する遊走が WT B 細胞と比べて減弱することを示し、また SDF-1 添加後の B 細胞の Akt のリン酸化も減弱することを確認した。更に B 細胞の adoptive transfer 実験によって、*in vivo* で活性化 B 細胞は、Syn4 依存的にリンパ濾胞領域・胚中心周囲へと集積することを示した。SDF-1 は T 細胞および B 細胞・リンパ腫細胞を末梢リンパ節へと移入 (homing) もしくは維持 (retention) させる際に重要なケモカインの一つである⁴⁵。また、*in vivo* における T 細胞・B 細胞遊走は SDF-1 単独よりも CCL19/CL21 が協同して作用することで更に促進されることも報告されている⁴⁵。Allen らは、SDF-1 が胚中心暗帯でも産生されていることと、更に B 細胞上の CXCR4 を欠損させたマウスのリンパ節では胚中心形成の障害が生じることを報告した⁴⁶。これらのことは SDF-1 に対する B 細胞遊走が胚中心形成の過程で非常に重要であることを示唆している。また過去の報告から、リンパ球やマクロファージ、HeLa 細胞において Syn4 と CXCR4 はタンパク結合によってヘテロ複合体を形成していることが知られて⁴⁷、さらに Syn4 が SDF-1 に対しては受容体として、もしくは CXCR4 の共受容体としても機能することが知られている⁴⁷。本研究において、Syn4 欠損により B 細胞上のケモカインレセプター (CXCR4、CXCR5、CCR7) 発現が影響を受けないにも関わらず、SDF-1 添加後の Syn4 KO B 細胞の Akt のリン酸化が減弱することから、我々は B 細胞上においても、Syn4 は SDF-1 に対して CXCR4 と共同的に作用していると推察している。

また Syn4 は血管・リンパ管内皮細胞に発現する主要なヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、リンパ球・好中球・樹状細胞などが血管・リンパ管内をローリングし、末梢リンパ節内へ移入する際の種々のケモカインのリザーバーとして、他のヘパラン硫酸プロテオグリカンと協同的に機能していることも知られている³⁰。(これまでの認識として、免疫細胞への作用としては主にこの機能が考えられていたと推察される。) これらを踏まえて我々は、上記に示したリンパ濾胞領域への B 細胞遊走が、B 細胞上の Syn4 依存的なのか、それとも B 細胞以外の血管・リンパ管内皮細胞を含む微小環境に発現する Syn4 依存的なのかを検証した。本研究において、WT マウスと

Syn4 KO マウスの両方を宿主マウスとして用いた B 細胞の adoptive transfer 実験によって我々は、所属リンパ節のリンパ濾胞領域への B 細胞遊走は、血管・リンパ管内皮細胞などの微小環境に発現する Syn4 ではなく、B 細胞上の Syn4 依存的であることを示した。

最後に我々は、Syn4 が胚中心形成を促進させるもう一つのメカニズムとして、B 細胞増殖に与える Syn4 の影響について検討したが、TLR 刺激や B 細胞受容体 (BCR) 刺激・抗 CD40 抗体によっても Syn4 KO B 細胞は WT B 細胞と比較して明らかな分化能低下を示さず、更に T・B 細胞の共培養による T-B cell interaction によっても両マウス由来の B 細胞でその分化能に違いがなかったことから、B 細胞上の Syn4 は B 細胞増殖にはあまり重要ではないと考えた。

本研究により得られた知見を図 25・26 に要約した。1) Syn4 欠損は B 細胞上の CXCR4・CXCR5・CCR7 の発現には影響を与えない。2) B 細胞上の Syn4 は CXCL13 や CCL19/CCL21 などのケモカインとは作用しない。3) B 細胞上の Syn4 は CXCR4 との相互作用している可能性が高く、Akt のリン酸化を介して SDF-1 への B 細胞遊走を促進させる。4) CIA の病態において、Syn4 は活性化 B 細胞の SDF-1 を介した遊走を制御することで、所属リンパ節のリンパ濾胞内への B 細胞遊走を促進させる。5) その結果、リンパ濾胞内へと遊走した B 細胞は、T-B 境界領域において Tfh と相互作用することで胚中心形成を促進させ、自己抗体産生を促すことで CIA の病態を進行させる。

本研究は自己免疫性関節炎において B 細胞上の Syn4 の機能を初めて明らかとした。今後は RA 発症に対し、Syn4 が新しい治療標的になる可能性が示唆される。

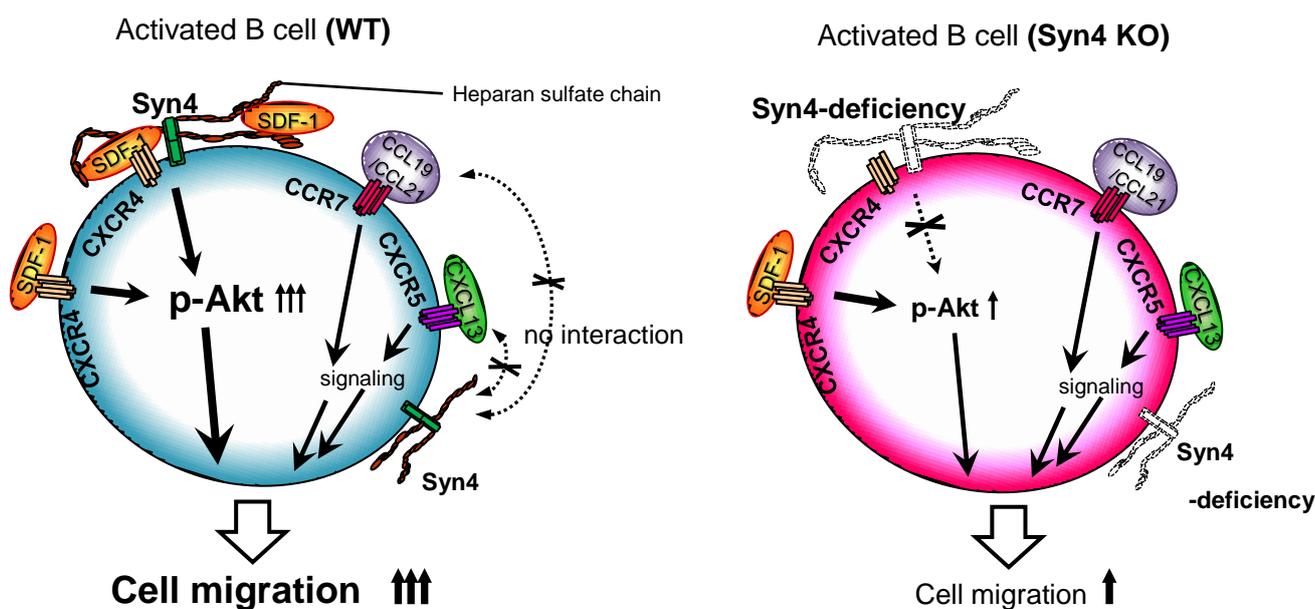


図 25 WT B 細胞と Syn4 KO B 細胞の細胞内シグナル

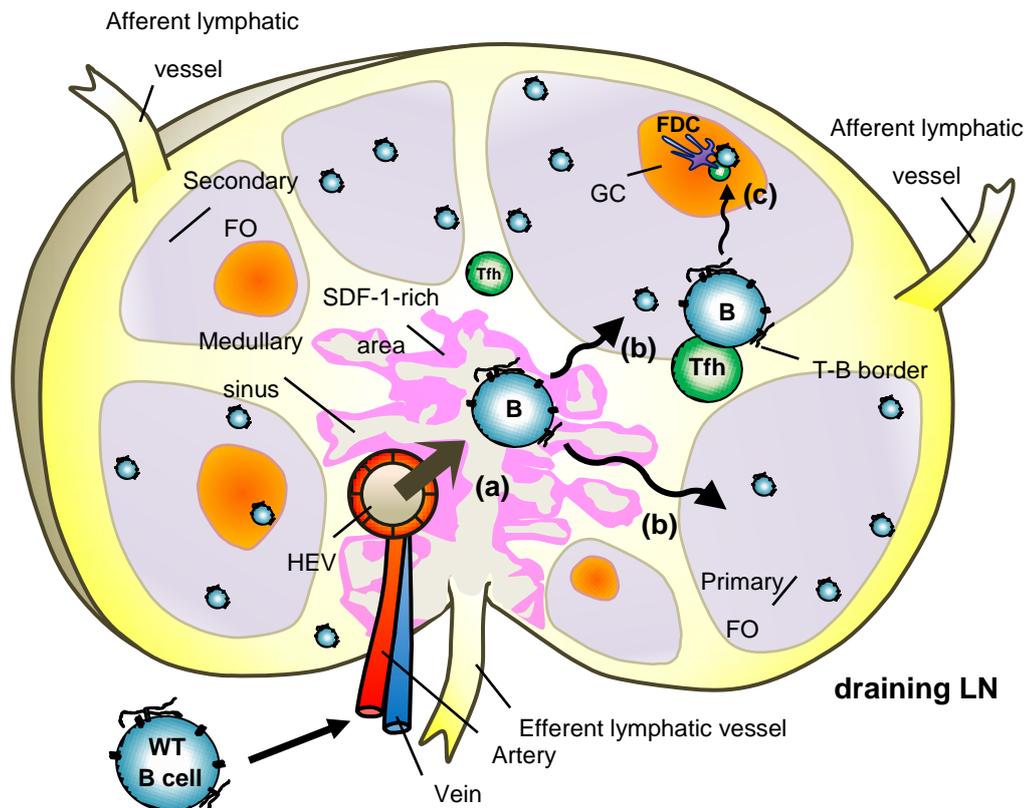


図 26 所属リンパ節における WT B 細胞の遊走と胚中心形成の過程

- (a) 自己反応性 B 細胞は HEV から Syn4 と CXCR4 の依存的に SDF-1 が高濃度に発現し、高内皮静脈 (HEV) から所属リンパ節へ移入する。
- (b) 更に B 細胞は SDF-1 が高濃度な T 細胞領域を通過してリンパ濾胞内へと遊走し、T-B 境界領域 (T-B border) で Tfh と相互作用する。
- (c) Tfh と共にリンパ濾胞中央部へと遊走した B 細胞は胚中心暗帯 (SDF-1 が高濃度) でのクローナルな増殖と、胚中心明帯 (CXCL13 が高濃度) でのアポトーシスを繰り返す。その過程で抗原親和性を高めた胚中心 B 細胞は FDC・Tfh と協同し、胚中心を形成・維持する。その後、胚中心 B 細胞は長寿命形質細胞 (long-lived plasma cells) やメモリー B 細胞へと分化する。

総括および結論

- 1) 自己免疫性関節炎において Syn4 は T 細胞および B 細胞依存的な病態に関与する。
- 2) CIA model (T 細胞および B 細胞依存型の RA マウスモデル) において、Syn4 は所属リンパ節の主に B 細胞サブセットに高発現する。
- 3) B 細胞上の Syn4 は Akt のリン酸化を介して、SDF-1 へ B 細胞遊走を促進させる。
- 4) B 細胞上の Syn4 は所属リンパ節のリンパ濾胞内への B 細胞遊走を制御することで、胚中心形成ならびに自己抗体産生を促進させ CIA の病態を進行させる。
- 5) 血管・リンパ管内皮細胞を含む微小環境に発現する Syn4 はリンパ濾胞への B 細胞遊走にはほとんど影響を与えない。
- 6) 自己免疫性関節炎の病態において、Syn4 はヘルパー T 細胞機能にはほとんど影響を与えない。

今後は、抗 Syn4 抗体などによる Syn4 機能の抑制によって、胚中心形成や自己免疫性関節炎の病態進行が抑制されるか、などが主な検討課題と考えられた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、日々の熱心な御指導を賜り、研究者としてだけでなく一人の人間として多くのことを授けて頂いたこと、また恵まれた研究環境・心より尊敬できるスタッフの方々の育成を含め、教室をこれまで発展・維持されてきた御尽力に対し、北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野 上出利光教授に深く感謝申し上げます。

免疫学的研究の手法・方向性のほぼすべてを御教示頂くとともに、討論や論文作成に至るまで全面的に親身な御指導を賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所マトリックスメディスン研究部門 伊藤甲雄特任助教に厚く感謝申し上げます。

教室全体の運営、並びに論文作成や国内外での発表に至る多岐に渡り、熱心に御指導下さいました徳島大学疾患酵素学研究センター免疫病態研究部門 森本純子助教に心より感謝申し上げます。

自己免疫性関節炎の背景・研究の基本方針・データ解析の方法などを御教示頂くとともに、数多くの実験技術を御指導下さいました Department of Immunology, Duke University Medical Center 金山剛士博士研究員に心より感謝申し上げます。

Syndecan-4 欠損マウスや抗 Syndecan-4 抗体などを提供頂き、本研究の礎を築いて下さいました北海道大学遺伝子病制御研究所マトリックスメディスン研究部門 池末昌弘博士研究員に心より感謝申し上げます。

多くの実験技術・アイデア・論文作成など細部に渡り丁寧な御助言を下さいました北海道大学遺伝子病制御研究所マトリックスメディスン研究部門 太田大地博士研究員に心より感謝申し上げます。

SDF-1、CXCL13 リコンビナントタンパクの提供をして頂きました北海道大学薬学研究院創薬科学部門生体機能科学分野 今重之准教授に心より感謝申し上げます。

日頃より発表・論文作成指導など、全面的に御指導下さいました北海道大学整形外科 小野寺智洋助教に心より感謝申し上げます。

発表指導・研究費用の面などで多くのサポートをして下さいました北海道大学整形外科 高橋大介助教に心より感謝申し上げます。

整形外科教室全体の運営、並びに細やかな御配慮により、臨床と基礎研究を両立させる提案をして頂き、整形外科医として成長する機会を与えて下さいました北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野 岩崎倫政教授に深く感謝申し上げます。

基礎研究の経験のなかった私を温かく迎え入れて下さり、至らない多くの面を親身に支えて下さいました北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野・マトリックスメディスン研究部門の皆様心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1 Cohen, S. B. *et al.* Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* **54**, 2793-2806 (2006).
- 2 Townsend, M. J., Monroe, J. G. & Chan, A. C. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunol. Rev.* **237**, 264-283 (2010).
- 3 Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann. NY. Acad. Sci.* **987**, 140-149 (2003).
- 4 Mullazehi, M., Wick, M. C., Klareskog, L., van Vollenhoven, R. & Ronnelid, J. Anti-type II collagen antibodies are associated with early radiographic destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R100 (2012).
- 5 Rowley, M. J., Nandakumar, K. S. & Holmdahl, R. The role of collagen antibodies in mediating arthritis. *Mod. Rheumatol.* **18**, 429-441 (2008).
- 6 Schaller, M., Burton, D. R. & Ditzel, H. J. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat. Immunol.* **2**, 746-753 (2001).
- 7 Schellekens, G. A. *et al.* The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* **43**, 155-163 (2000).
- 8 Vinuesa, C. G., Sanz, I. & Cook, M. C. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 845-857 (2009).
- 9 Hauser, A. E. *et al.* Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* **26**, 655-667 (2007).
- 10 Gallo, R., Kim, C., Kokenyesi, R., Adzick, N. S. & Bernfield, M. Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 676-683 (1996).
- 11 Kaneider, N. C. *et al.* Expression and function of syndecan-4 in human platelets. *Thromb. Haemostasis* **93**, 1120-1127 (2005).
- 12 Kon, S. *et al.* Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J. Exp. Med.* **205**, 25-33 (2008).
- 13 Matsui, Y. *et al.* Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. *Circ. Res.* **108**, 1328-1339 (2011).
- 14 Reijmers, R. M. *et al.* Disruption of heparan sulfate proteoglycan conformation perturbs B-cell maturation and APRIL-mediated plasma cell survival. *Blood* **117**, 6162-6171 (2011).
- 15 Yamashita, Y. *et al.* Syndecan-4 is expressed by B lineage lymphocytes and can transmit a signal for formation of dendritic processes. *J. Immunol.* **162**, 5940-5948 (1999).
- 16 Nandakumar, K. S., Backlund, J., Vestberg, M. & Holmdahl, R. Collagen type II

- (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells. *Arthritis Res. Ther.* **6**, R544-550 (2004).
- 17 Brackertz, D., Mitchell, G. F., Vadas, M. A. & Mackay, I. R. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J. Immunol.* **118**, 1645-1648 (1977).
- 18 Pohlers, D. *et al.* Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin. Exp. Immunol.* **135**, 409-415 (2004).
- 19 Tanaka, D., Kagari, T., Doi, H. & Shimozato, T. Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. *Immunology* **119**, 195-202 (2006).
- 20 Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R. I. & Lord, G. M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.* **148**, 32-46 (2007).
- 21 Liblau, R. S., Singer, S. M. & McDevitt, H. O. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today* **16**, 34-38 (1995).
- 22 Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.* **171**, 6173-6177 (2003).
- 23 Chung, J. S., Bonkobara, M., Tomihari, M., Cruz, P. D., Jr. & Ariizumi, K. The DC-HIL/syndecan-4 pathway inhibits human allogeneic T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* **39**, 965-974 (2009).
- 24 Chung, J. S., Sato, K., Dougherty, II, Cruz, P. D., Jr. & Ariizumi, K. DC-HIL is a negative regulator of T lymphocyte activation. *Blood* **109**, 4320-4327 (2007).
- 25 Reif, K. *et al.* Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* **416**, 94-99 (2002).
- 26 Vinuesa, C. G. & Cyster, J. G. *Immunity* Vol. 35 671-680 (2011).
- 27 Allen, C. D., Okada, T. & Cyster, J. G. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* **27**, 190-202 (2007).
- 28 Takahashi, Y. *et al.* Relaxed negative selection in germinal centers and impaired affinity maturation in bcl-xL transgenic mice. *J. Exp. Med.* **190**, 399-410 (1999).
- 29 Charnaux, N. *et al.* Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12. *FEBS J.* **272**, 1937-1951 (2005).
- 30 Bao, X. *et al.* Endothelial heparan sulfate controls chemokine presentation in recruitment of lymphocytes and dendritic cells to lymph nodes. *Immunity* **33**, 817-829 (2010).
- 31 Edwards, J. C. *et al.* Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2572-2581 (2004).
- 32 Schuna, A. A. Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacotherapy* **27**, 1702-1710 (2007).
- 33 Smith, M. R. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and

- resistance. *Oncogene* **22**, 7359-7368 (2003).
- 34 Dunussi-Joannopoulos, K. *et al.* B-cell depletion inhibits arthritis in a collagen-induced arthritis (CIA) model, but does not adversely affect humoral responses in a respiratory syncytial virus (RSV) vaccination model. *Blood* **106**, 2235-2243 (2005).
- 35 Svensson, L., Jirholt, J., Holmdahl, R. & Jansson, L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin. Exp. Immunol.* **111**, 521-526 (1998).
- 36 Yanaba, K. *et al.* B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J. Immunol.* **179**, 1369-1380 (2007).
- 37 Cho, Y. G., Cho, M. L., Min, S. Y. & Kim, H. Y. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **7**, 65-70 (2007).
- 38 Leipe, J. *et al.* Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 2876-2885 (2010).
- 39 Leavenworth, J. W., Tang, X., Kim, H. J., Wang, X. & Cantor, H. Amelioration of arthritis through mobilization of peptide-specific CD8⁺ regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 1382-1389 (2013).
- 40 Leavenworth, J. W., Wang, X., Wenander, C. S., Spee, P. & Cantor, H. Mobilization of natural killer cells inhibits development of collagen-induced arthritis. *P. Natl. Acad. Sci. U SA* **108**, 14584-14589 (2011).
- 41 Chung, J. S., Dougherty, I., Cruz, P. D., Jr. & Ariizumi, K. Syndecan-4 mediates the coinhibitory function of DC-HIL on T cell activation. *J Immunol* **179**, 5778-5784 (2007).
- 42 Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621-663 (2011).
- 43 Vinuesa, C. G., Tangye, S. G., Moser, B. & Mackay, C. R. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 853-865 (2005).
- 44 Coelho, F. M. *et al.* Naive B-cell trafficking is shaped by local chemokine availability and LFA-1-independent stromal interactions. *Blood* **121**, 4101-4109 (2013).
- 45 Okada, T. *et al.* Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **196**, 65-75 (2002).
- 46 Allen, C. D. *et al.* Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. immunol.* **5**, 943-952 (2004).
- 47 Hamon, M. *et al.* A syndecan-4/CXCR4 complex expressed on human primary lymphocytes and macrophages and HeLa cell line binds the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Glycobiology* **14**, 311-323 (2004).