HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The role of Syndecan-4 in the development of autoimmune arthritis [an abstract of entire text]
Author(s)	遠藤, 努
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2113 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11486号
Issue Date	2014-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56708
Type	doctoral thesis
File Information	Tsutomu_Endo_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要　約）

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

【背景との目的】

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 阻害薬などの生物学的製剤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、また進行性の関節破壊を抑制できないことや重篤な感染症などの副作用が大きな問題である。このことから、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大きな意義があると考えられた。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、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も有効であることが実証されていることから、RA の病態には B 細胞が関与すると考えられている。また 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や、血清中にリウマトイド因子（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が知られており、これらはリンパ濾胞・胚中心形成、及び自己反応性 B 細胞による自己抗体産生が RA の病態にとって重要な因子であることを示唆している。

胚中心の形成・維持の過程においては、ケモカインーケモカインレセプターの相互作用（interaction）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 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・維持し、この過程で胚中心 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。

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であり、ヘパラン硫酸側鎖を介して細胞外基質・成長因子・ケモカインなどの受容体/リザーバーとして機能することから、炎症反応・創傷治癒・組織修復などを制御しているといわれている。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重要なメディエーターであると考えられている。過去の報告から Syn4 が B 細胞系統にも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可能性が示唆されていた。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。

【対象と方法】

本研究では C57B/L6 バックグラウンドの野生型（WT）マウスと Syn4 欠損マウスを用いた。両マウスにおいて、コラーゲン誘導性関節炎（collagen-induced arthritis ; CIA）モデル、コラーゲン抗体誘導性関節炎（collagen antibodies-induced arthritis ; CAIA）モデル、抗原誘導性関節炎（antigen-induced arthritis ; AIA）モデルの 3 つの異なる関節炎モデルを用いて、それぞれの臨床評価・病理組織学的評価の比較を行った。

また、CIA 誘導後の鼠径リンパ節（所属リンパ節）の免疫組織学的評価とフローサイトメトリーによる所属リンパ節の免疫細胞数･表面マーカー発現、血中活性化細胞 T 細胞数の比較を行い、ELISA により type II collagen 特異的血清抗体価を比較した。*In vitro* 試験においてはフローサイトメトリーにより、それぞれのマウスの脾臓細胞から単離した T 細胞・B 細胞の増殖試験を行った。またケモカインチャンバーを用いてケモカインに対する B 細胞の遊走能試験を行い、更にケモカイン刺激後の B 細胞シグナリングを Western blotting により評価した。また養子免疫細胞移入（adoptive transfer）によって、*in vivo* における関節病変部への活性化 T 細胞の遊走能、および所属リンパ節への B 細胞の遊走能の比較試験を行った。

【結果】

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 CIA モデルにおいて、Syn4 欠損マウス群は 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た（WT vs Syn4 欠損 ; 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））。一方、T 細胞依存的なメカニズムにより発症する AIA モデルと、T 細胞および B 細胞非依存的に発症する CAIA モデルにおいては両マウス群ともに、臨床症状に有意差を認めなかった。

臨床症状と病理組織像において両群間で有意差が認められた CIA モデルを用いて、免疫細胞における Syn4 の発現解析を行った。フローサイトメトリー解析により、WT マウスの所属リンパ節では Syn4 は所属リンパ節の B 細胞（$B220^+$）を含む B 細胞サブセット ; 濾胞性 B 細胞（$CD19^+$ IgM^{mid} $CD21/CD23^{low}$）、胚中心 B 細胞（$B220^+$ $GL\text{-}7^+$）に高発現し、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。免疫蛍光染色においてもフローサイトメトリーの解析結果と同様、Syn4 は所属リンパ節の B 細胞（$B220^+$）領域に一致して発現し、T 細胞（$CD3^+$）領域にはほとんど発現しないことが確認された。また CIA 誘導後の Syn4 欠損マウスでは WT マウスと比較し、所属リンパ節の B 細胞サブセット（total B 細胞、濾胞性 B 細胞、胚中心 B 細胞）数の減少、および胚中心形成の低下を認め、type II collagen 特異的な total IgG, IgG2a, IgG2b 産生も有意に低下していた。更に *in vitro* において Syn4 欠損マウスの脾臓由来の B 細胞は、SDF-1 に対する遊走能と、SDF-1 添加後の Akt のリン酸化が WT マウス由来の B 細胞と比較し有意に低下した。一方で Syn4 欠損 B 細胞は CXCL13 や CCL19/CCL21 に対する遊走能の

低下を示さなかった。また *in vivo* での B 細胞の adoptive transfer 実験において、CIA 誘導後の Syn4 欠損 B 細胞は所属リンパ節の二次リンパ濾胞への遊走が WT B 細胞と比較し有意に低下し、この B 細胞遊走低下は血管・リンパ管内皮細胞を含む微小環境に発現する Syn4 の欠損によるものではなく、B 細胞上の Syn4 の欠損によることが明らかとなった。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 欠損マウスの B 細胞サブセット上のケモカインレセプター発現（CXCR4、CXCR5、CCR7）には有意差がなかった。次に Syn4 が B 細胞増殖に与える影響について検討をしたが、Toll 様受容体（TLR）リガンドを含むアゴニストでの刺激による B 細胞増殖、および T 細胞との共培養後の B 細胞増殖は、WT B 細胞と比較して Syn4 欠損 B 細胞は明らかな低下を認めなかった。

一方、CIA の発症もしくは炎症の増幅に深く関わっていることが知られているヘルパーT 細胞の機能に Syn4 が影響するかについても検討したが、type II collagen 免疫後の血中・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 WT と Syn4 欠損マウス群で有意差を認めなかった。また所属リンパ節における Th1・Th17・Treg・Tfh の増殖や *in vitro* での抗 CD3ε 抗体・抗 CD28 抗体での刺激後の $CD4^+$ T 細胞の分化能、ヘルパーT 細胞遊走に関与するケモカインレセプター発現や adoptive transfer 実験における関節病変部への活性化 T 細胞の遊走能についても両マウス群間で有意差はなかった。

【考察】

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い、更に胚中心形成には T-B cell interaction が必須であることが知られている。本研究において我々は、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・細胞に最も作用しているかを検討した。T 細胞および B 細胞依存的な CIA モデルにおいてのみ Syn4 欠損マウス群で臨床スコアが抑制され、さらに所属リンパ節での胚中心形成障害を伴う自己抗体産生の低下も認められた。これらは Syn4 が自己免疫性関節炎の病態において、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を示唆する結果であった。

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こと、である。我々は上記のとおり *in vitro* での B 細胞遊走試験において Syn4 欠損 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 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。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。Allen らは、SDF-1 が胚中心暗帯で産生されていることと、B 細胞上の CXCR4 を欠損し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。これらは 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 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。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 欠損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。

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 欠損 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。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や、CIA の病態において T 細胞上にほとんど発現しないこと、ヘルパーT 細胞機能にはほとんど関与しないことなどから、自己免疫性関節炎の病態において Syn4 はヘルパーT 細胞にはあまり作用しないがこと示唆された。

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。

【結論】

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。