

## 学内グラント 報告書

## 平成24年度 学内グラント終了時報告書

シミュレーションによる関節リウマチ末梢血の  
サイトカイン抑制機構の理解

研究代表者 三由 文彦 (大学病院 リウマチ膠原病科)

## 諸言

関節リウマチ (RA) は免疫システムが過剰に反応し、自己を攻撃してしまう病気である。その病態には、ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) が重要な役割を果たしており、Th 細胞が放出するサイトカインと呼ばれるタンパク質によって免疫が調節されている。Th 細胞には細胞性免疫に関与する Th1 細胞と、液性免疫に関与する Th2 細胞があり、このバランスの破綻が病気の原因だと言われて来た<sup>1)</sup>。しかし、近年、RA が Th1 型疾患ではないことを示唆するデータが報告され、更に、Th17 細胞と呼ばれる新しいサブセットが RA の病態形成に重要な役割を果たすことが示された<sup>2)</sup>。

我々は RA 患者の生物学的製剤 (サイトカインを抗体によって直接抑える新しい薬) による治療前の末梢血をサンプルとし、Th1/Th2/Th17 細胞サブセットが産生する代表的なサイトカイン IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 を定量した。これらのサイトカインは刺激がない状態では測定できず、RA に特異的な抗原も発見されていないことから、類似研究でも数多く用いられている抗原非特異的な刺激 (PMA + Ionomycin) を用いた。その結果、意外なことに RA 患者の末梢血では IL-17 はむしろ抑制されており、他の Th 性のサイトカイン産生も強く抑制されていた<sup>3,4)</sup>。さらに治療に効果がなかった患者群のサイトカイン産生は、効果があった患者群に比べて有意に抑制されていた (Miyoshi, et al. unpublished data)。

一方で、投与前に抑制されていたサイトカイン産生は、生物学的製剤の投与後にいずれも有意に上昇し、健常人と同じレベルまで回復する。よって末梢血においてサイトカイン産生が抑制されることが、RA の病態や治療効果と深く関連があると示唆される。しかし、慢性的な炎症によって本来 Th 細胞が活性化している RA 患者において、サイトカイン産生が増加するのではなく、むしろ減少

している結果は、既存の概念では説明が困難である。従って、この結果を説明するには、例えば、“RA 患者において、抗原特異的な Th 細胞による免疫応答が強まっており、一方で抗原非特異的な Th 細胞による免疫応答は抑制されているため、結果として非特異的な刺激によるサイトカイン産生が減少している”といった新しい理論が必要である。

RA において Th 細胞が炎症性サイトカインを産生するようになるには、Th 細胞が抗原提示される必要がある。この反応が起こる場所はリンパ節が中心であり、末梢血で見られている現象は、この結果に過ぎない。そのため、この仮説を検証するには末梢血だけではなく、炎症局所 (関節やリンパ節) の解析が必須である。しかしヒトは倫理的な面から末梢血以外の経時的なサンプリング測定が困難であり、この仮説をヒトで検証することは難しい。よって本研究では、RA のモデル動物マウスであるコラーゲン誘導性関節炎モデルを用いることにした。一方で、今回の仮説を理論的に説明するためには、炎症局所と末梢という2つの場、Th 細胞と Th 細胞を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) という2つの細胞集団、抗原特異的と抗原非特異的な細胞集団という2つの分類、これらの細胞集団の移動、最低限以上の点を考慮したモデルを考える必要があり、仮説を説明するための最も合理的な方法としてシミュレーションを用いたモデル構築に取り組むことにした。

## 材料と方法

再現性の高いシミュレーションモデルを作成するには、反応速度式のパラメーターや、細胞数などの初期値パラメーターが必要である。しかし、前述のようにヒトでは倫理的な問題点から末梢血以外の経時的なサンプルの取得は困難である。よって今回は、RA のモデル動物であるコラーゲン誘導性関節炎のマウスを用いて、関節炎を発症させてシミュレーションモデル

構築に必要なパラメーターを測定することにした。

### モデルの構築

モデル化する対象は、末梢（末梢血 or 脾臓）と炎症局所（鼠径リンパ節）の2部位とする。そして、それぞれの部位において抗原特異的・非特異的Th細胞の2種類とTregの2種類の細胞集団、計4種類の細胞集団を定義する（図1参照）。モデル化するサイトカインは、Th細胞とTregから算出・消費される代表的なサイトカインであるIL-2、Th細胞から産生されるIL-17（予備としてIFN- $\gamma$ 、IL-4）とする。

### 反応速度式の作成

詳細はパラメーターの測定の部分に後述するが、今回は測定した実験データを元に反応速度式のパラメーターを逆算して決定する必要がある。よって必要最低限のパラメーター数にし、8つの連立一次微分方程式で記述した。ただしモデルの再現性を見て、測定結果が再現できなければ、IL-2やIL-17といったサイトカイン産生の部分に関しては、汎用的な転写発現式<sup>5)</sup>に置き換える予定である。

### パラメーターの測定

2回コラーゲン免疫し、関節炎を発症させた後のマウスとコントロールマウスから必要なパラメーターの取得を行った。末梢血は採取が難しく、細胞数が少ないため、今回は脾臓（末梢）と鼠径リンパ節（炎症局所）を採取し、フローサイトメトリー法を用いて、Tregと活性化されたT細胞であるEffector memory T細胞（CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> CD4 T細胞）の細胞比と絶対数を測定した。またIL-2、IL-17（予備としてIFN- $\gamma$ 、IL-4）の産生に関しては、*in vitro*において、それぞれサンプルを調整した後、RAの末梢血におけるサイトカイン産生を測定した際と同様の抗原非特異的な刺激（PMA + Ionomycin）を行い、産生量をELISA法

を用いて測定した。抗原特異的な細胞と、それ以外の抗原非特異的な細胞の比に関しては、RAにおいて現在、区別する方法がない。よって上記で測定したそれぞれの細胞の全体数とそれぞれのサイトカイン産生量から、結果に最も合うように細胞比をパラメーター推定法を用いて予測した。モデルの構築、パラメーター推定、シミュレーションに関しては、細胞シミュレーションソフトウェアE-Cell 3<sup>6)</sup>を用いて行った。

### 結果

シミュレーションモデルの作成に必要なパラメーターを得るために、コラーゲン誘導性関節炎モデルのマウスを用いて、TregとEffector memory T細胞の比率、及び*in vitro*におけるIL-17のサイトカイン産生量の測定を行った（図2）。

末梢（脾臓、Sp）における培養上清中のサイトカイン産生量の結果は、ヒトの末梢血と同様の結果であり、IL-17産生量は関節炎を発症したマウス（day28）でコントロールマウス（control）に比べて有意に低かった。一方で炎症局所（鼠径リンパ節、LNs）においては、予想に反してIL-17産生量に有意差はなかった。Tregに関しては、末梢と炎症局所の両方でday28で有意に割合が多く、Effector memory T細胞に関しては炎症局所でのみ有意に割合が多かった。

シミュレーションモデルに関しては、まだ途中段階であるが、末梢と炎症局所のIL-17のサイトカイン産生は再現できている（図3）。今後は、2部位間の細胞移動などの部分に関して、T細胞の移動に関する論文<sup>7)</sup>を参考にしてパラメータチューニングを行なっていく予定である。

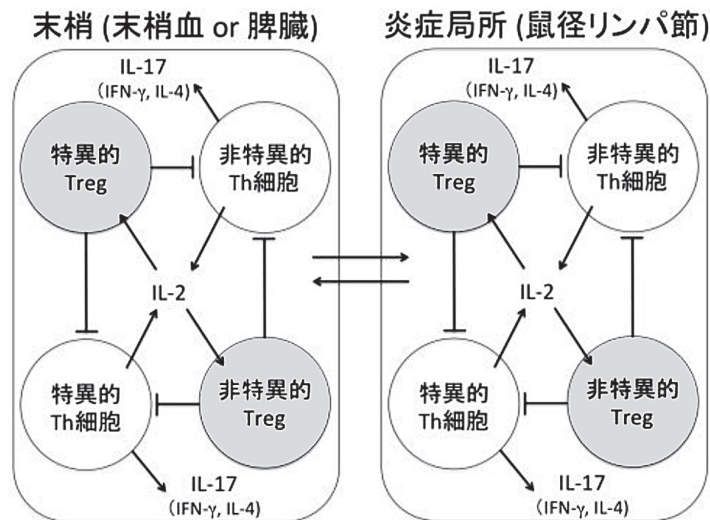


図1. シミュレーションのモデル図。

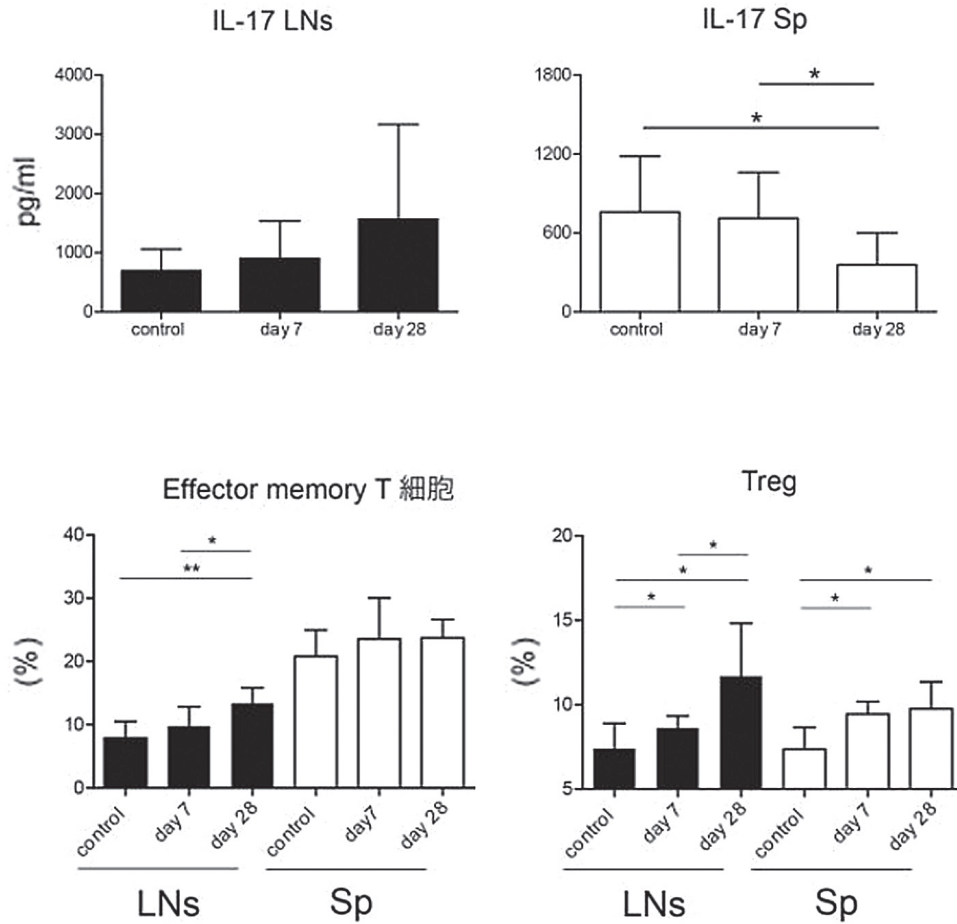


図2. シミュレーションのために必要なパラメーターの測定. LNsは鼠径リンパ節, Spは脾臓, controlはコラーゲンで免疫をしていないコントロールマウス, day7はコラーゲンを1回だけ免疫したマウス, day28はコラーゲンを2回免疫し, 関節炎を起こしたマウス. 細胞培養時間は24h. \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 (Mann-WhitneyのU-test).

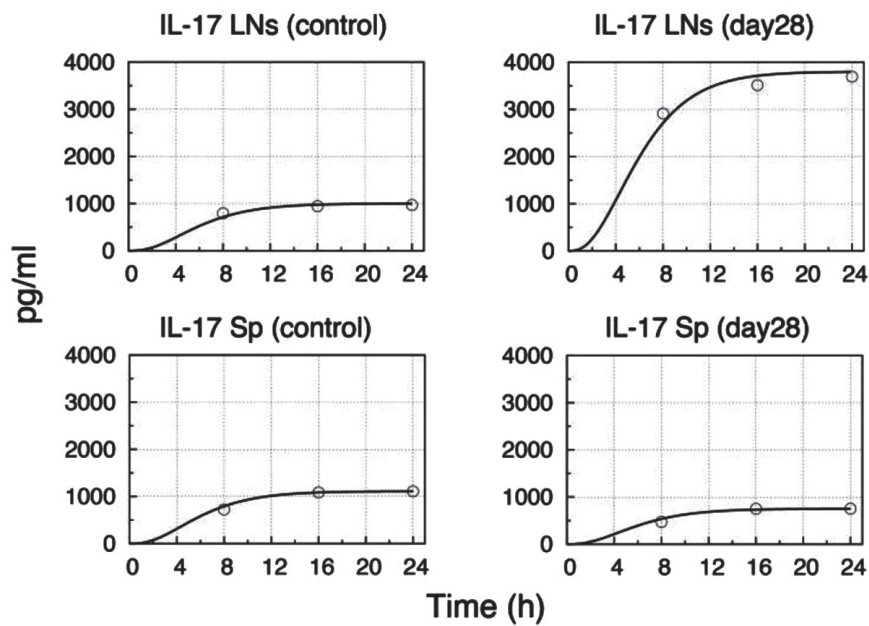


図3. IL-17のシミュレーションの結果. 実験結果(8h, 16h, 24h)は丸でプロットしてある.

## 考 察

シミュレーションモデルは構築するまでは手間がかかるが、一度構築すれば、*in silico* 実験によって、モデル化した細胞やサイトカイン濃度などの能動的な変化を網羅的に取得できること、そして倫理的な問題点が存在しないことから、薬剤の効果や影響を考察するのに大きな効力を発揮する手法である。

今回作成しているシミュレーションモデルは、末梢と炎症局所という2つの部位におけるTregとEffector memory T細胞の相互作用を考慮したシンプルな関節炎のモデルに過ぎないが、RAが全身性の炎症疾患であることを踏まえると、複数部位の相互作用を考慮することは病態を理解する上で非常に重要である。このような取り組みがまだ原因が不明であるRAの病因や治療効果の予測に繋がっていくと期待される。

## 謝 辞

本研究施行にあたり、埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の三村俊英教授と佐藤浩二郎講師には多大なご指導を頂き、感謝申し上げます。埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の方々や実験助手の皆様には本研究の施行にあたり様々ご協力を頂き、感謝致します。

## 引用文献

- 1) Smolen JS, Tohidast-Akrad M, Gal A, Kunaver M, Eberl G, Zenz P, et al. The role of T-lymphocytes and cytokines in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1996;25:1-4.
- 2) Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links

T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673-82.

- 3) Miyoshi F, Sato K, Mimura T. A Novel approach to the classification of collagen diseases utilizing Th1/Th2/Th17 Cytokine profile in the peripheral blood mononuclear cells and analysis of the profile before and after administration of infliximab. *Ann Rheum Dis* 2008;67:453.
- 4) Yamamoto A, Sato K, Miyoshi F, Shindo Y, Yoshida Y, Yokota K, et al. Analysis of cytokine production patterns of peripheral blood mononuclear cells from a rheumatoid arthritis patient successfully treated with rituximab. *Mod Rheumatol* 2010;20:183-7.
- 5) Miyoshi F, Nakayama Y, Kaizu K, Iwasaki H, Tomita M. A mathematical model for the Kai-protein-based chemical oscillator and clock gene expression rhythms in cyanobacteria. *J Biol Rhythms* 2007;22:69-80.
- 6) Takahashi K, Kaizu K, Hu B, Tomita M. A multi-algorithm, multi-timescale method for cell simulation. *Bioinformatics* 2004;20:538-46.
- 7) Tomura M, Yoshida N, Tanaka J, Karasawa S, Miwa Y, Miyawaki A, et al. Monitoring cellular movement *in vivo* with photoconvertible fluorescence protein “Kaede” transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10871-6.

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) 三由文彦, 本根杏子, 箕田清次, 三村俊英. infliximab投与前RA患者の臨床検査データを用いた新規効果判定予測法の開発, 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会/第22回国際リウマチシンポジウム, 2013年4月18日, 京都