



Podoplanin is an inflammatory protein upregulated in Th17 cells in SKG arthritic joints

宮本, 佳昭

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5865

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005865>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Podoplanin is an inflammatory protein upregulated in Th17 cells in SKG arthritic joints

ポドプラニンとは SKG 関節炎の Th17 細胞で増強する炎症性タンパク質

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

免疫内科学

(指導教員：森信 暁雄 准教授)

宮本 佳昭

Th17 細胞は、炎症性サイトカイン IL-17 を産生し、転写因子 ROR γ t や表面抗原分子 IL-23R、及び CCR6 を発現するヘルパー T (Th) 細胞サブセットであり、細菌や真菌類に対する感染防御機能を担っている。一方、関節リウマチをはじめとする自己免疫疾患の病態形成に関与していることが知られており、Th17 細胞特異的分子の探索は、関節リウマチなどの自己免疫疾患の診断に有用であると考えられる。

我々は、Th17 細胞特異的分子探索のために、BALB/c マウスから naïve Th 細胞を単離し、IL-2, IL-6, TGF- β 存在下での分化培養することで Th17 細胞の取得を試みた。しかしながら、上記の方法での Th17 細胞への分化効率、約 10% であった。より高純度な Th17 細胞を取得するために、IL-6 と TGF- β に Th17 細胞分化促進因子として報告されている IL-1 β , IL-23, TNF α を加え、さらに分化抑制因子である IL-2 を抗体により中和したところ、Th17 分化効率は約 80% となった。Th17 細胞の比較対照として、Th1, Th2 及び Treg 細胞を既存の条件により naïve Th 細胞から分化誘導した。これら分化誘導した 4 種の Th サブセットの特異的分子の発現を、FACS, pRT-PCR 及び ELISA を用いて解析したところ、4 種の Th サブセット全てが、良好な分化状態であることを確認した。

次に、Th17 細胞特異的分子を抽出するために、上記 Th サブセットのマイクロアレイ解析を実施した。その結果、Th1, Th2 及び Treg 細胞と比較して、Th17 細胞で高発現している 120 分子を抽出した。その中には、既知 Th17 細胞マーカーである ROR γ t, IL-23R, CCR6 も含まれていることから、妥当な解析結果であると考えられた。我々は、120 分子の中から 29 の表面抗原分子に着目して解析を進めた。

29 の細胞表面分子について、3 種の自己免疫疾患モデルマウスを用いた遺伝子発現解析を実施した。すなわち、関節炎モデルは、自然発症型関節炎モデルマウスである SKG マウスを用い、大腸炎モデルは、SCID マウスへ CD4 陽性 naïve Th 細胞を移入し作製し、実験的脳脊髄炎 (EAE) モデルは、SJL マウスに PLP(139-151) ペプチド抗原エマルジョンと百日咳毒素を投与し作製し、各モデルマウスの炎症組織 (関節、大腸、脊髄) における、29 分子の遺伝子発現解析を qRT-PCR にて実施した。対照マウスとの遺伝子発現量比を検討したところ、いずれかのモデルマウスで 10 倍以上発現増強していた 13 分子を確認した。なお、各炎症組織には Th17 細胞が浸潤していることも確認した。関節炎組織では、13 分子の中で podoplanin が高発現していたことから、我々は、podoplanin に着目して解析を進めた。

Podoplanin が、タンパク質レベルで発現しているか否かを検討するため、naïve Th 細胞から分化誘導した Th サブセットを用い FACS 解析を実施したところ、Th17 細胞の約 80% は podoplanin 陽性であった。なお、Th1, Th2, Treg 細胞の 30-40% が podoplanin 陽性であった。

最後に、関節炎炎症組織における podoplanin の発現解析を実施した。SKG マウスを用いた関節炎モデルの関節炎組織の免疫組織染色により、浸潤血球細胞や滑膜細胞に podoplanin が発現していることが示された。さらに、CD4 陽性細胞の podoplanin 陽性率を検討したところ、脾臓と所属リンパ節では、対照マウスと大差ないが、関節炎組織に浸潤している CD4 陽性細胞の約 40% は podoplanin 陽性であり、その大部分が Th17 細胞であることを確認した。

本研究において、我々は、Th1, Th2, Treg 及び Th17 細胞を naïve Th 細胞から分化誘導し、マイクロアレイ解析により、Th17 細胞特異的な表面抗原分子の同定を試みた。分化誘導条件の改良により、高純度の Th17 細胞を取得し、29 の Th17 細胞特異的な表面抗原分子を同定した。さらに、疾患モデルマウスを用い、関節炎組織で高発現していた Th17 細胞特異的な表面抗原分子として podoplanin を同定し、関節炎組織に浸潤している Th17 細胞に発現していることを確認した。

Podoplanin は、滑膜細胞、ケラチノサイト、リンパ管内皮細胞及び癌細胞などに発現しており、IFN- γ , TGF- β , TNF- α 及び IL-1 β により発現増強する。Peters らは、Th17 細胞に podoplanin が発現しており、EAE モデルマウスにおいて、GC 形成に関与することを報告している。我々の結果も、Peters らと同じく Th17 細胞で podoplanin が発現していることを示しており、さらに、関節炎モデルマウスの Th17 細胞で発現していることを新たに示した。

また、podoplanin は好中球、単球、血小板などに発現している C-type lectin like receptor.2 (CLEC-2) と結合することにより、炎症性サイトカインが誘導されることが報告されていることから、Th17 細胞に発現している podoplanin と好中球等に発現している CLEC-2 との相互作用が、自己免疫疾患の炎症増悪に重要な役割を担うことを示唆している。

近年、いくつかのグループにおいて、マウス Th17 細胞には、機能の異なるサブポピュレーションが存在することが報告されている。特に、IL-6 と TGF- β により誘導された Th17 細胞は、軽度の EAE モデルを誘導するのに対し、IL-6 と IL-23 により誘導された Th17 細胞は重度な EAE モデルを誘導することを報告した。さらに、ヒト Th17 細胞においても、KLRB1 や MCAM 陽性 Th17 細胞が、腸炎やベーチェット病等の病態形成に関与することが報告されている。これらの報告は、Th17 細胞には、いくつかのサブポピュレーションが含まれており、それらは、異なる機能及び表面抗原分子を発現していることを示している。

Th17 細胞は、関節リウマチ、若年性炎症性関節炎、乾癬とアレルギー性障害を含む自己免疫不全患者の末梢血、滑液及び炎症組織で増加していることが報告されている。これらの報告は、Th17 細胞を測定することは、上記の免疫疾患に対する新たな診断法を確立するのに役立つことを示唆している。

Podoplanin は、関節リウマチをはじめとする自己免疫疾患において、Th17 細胞を検出するマーカーとして役立つ可能性がある。しかし、podoplanin 発現と臨床パラメータとの相関関係は明らかにされておらず、今後は、臨床研究により、その有用性を確かなものにする必要があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2314号	氏 名	宮本 佳昭
論文題目 Title of Dissertation	Podoplanin is an inflammatory protein upregulated in Th17 cells in SKG arthritic joints ポドプランインはSKG関節炎のTh17細胞で増強する炎症性タンパク質		
審査委員 Examiner	主 査 南 康博 Chief Examiner 副 査 山崎 尚 Vice-examiner 副 査 吉田 優 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

Th17細胞は、IL-17を産生するヘルパーT (Th) 細胞サブセットであり、細菌や真菌類に対する感染防御機能を担っている。一方、関節リウマチをはじめとする自己免疫疾患の病態形成に関与していることが知られており、Th17細胞特異的分子の探索は、関節リウマチなどの自己免疫疾患の診断に有用であると考えられる。本研究は、マイクロアレイを用いてTh17細胞特異的分子探索し、動物モデルにて検証して、将来的に自己免疫疾患の診断への応用を目指したものである。

はじめに、BALB/cマウス由来naïve Th細胞をIL-2, IL-6, TGF- β 存在下での分化培養することでTh17細胞の取得を試みたが、Th17細胞への分化効率率は、約10%であった。そこで、Th17細胞分化促進因子IL-1 β , IL-23, TNF α を上記条件に加え、さらに分化抑制因子であるIL-2を抗体により中和したところ、Th17分化効率率は約80%となった。また、比較対照としてTh1, Th2及びTreg細胞を既存の分化誘導法にて取得した。これら4種のThサブセットをマイクロアレイにて解析することで、Th17細胞に特異的な120分子を抽出した。

次に、120分子の中から29の細胞表面分子について、SKGマウスの関節炎、腸炎、脳脊髄炎モデルでの検証を実施した。Th17細胞が浸潤している炎症組織（関節、大腸、脊髄）における遺伝子発現解析から、13分子が対照マウスより10倍以上発現増強していることを確認し、特に、関節炎組織において最も高発現していたpodoplaninに着目した。

Podoplaninが、タンパク質レベルで発現しているか否かを検討するため、FACS解析を実施したところ、Th17細胞の約80%はpodoplanin陽性であることを確認した。なお、Th1, Th2, Treg細胞の30-40%がpodoplanin陽性であった。

最後に、関節炎組織におけるpodoplaninの発現解析を実施し、関節炎組織の免疫組織染色により、浸潤血球細胞や滑膜細胞にpodoplaninが発現していることを示した。さらに、FACS解析により、関節炎組織に浸潤しているCD4陽性細胞の約40%はpodoplanin陽性であり、その大部分がTh17細胞であることを確認した。

Podoplaninは、滑膜細胞、ケラチノサイト、リンパ管内皮細胞及び癌細胞などに発現しており、IFN- γ , TNF- α などにより発現増強する。Petersらは、Th17細胞にpodoplaninが発現しており、EAEモデルマウスにおいて、GC形成に関与することを報告している。本研究においても、Petersらと同じくTh17細胞でpodoplaninが発現していることを示しており、新たに、関節炎においても発現していることを明らかにした。

また、podoplaninは好中球、血小板などに発現しているC-type lectin like receptor 2 (CLEC-2)と結合することにより、炎症性サイトカインが誘導されることが報告されていることから、Th17細胞に発現しているpodoplaninと好中球等に発現しているCLEC-2との相互作用が、自己免疫疾患の炎症増悪に重要な役割を担うことを示唆している。

近年、いくつかのグループにおいて、Th17細胞のサブポピュレーションが報告されており、それらは、異なる機能及び表面抗原分子を発現していることが提唱されており、

podoplanin 陽性 Th17 細胞もサブポピュレーションの一つであることが示唆される。また、本研究は、podoplanin が、Th17 細胞を検出するマーカーとして役立つ可能性があることや、Th17 細胞の機能等を理解する上で新たな視点を提供するものと思われる。

本研究は、Th17 細胞に特異的分子であり、かつ炎症組織において発現が亢進している分子として podoplanin を同定し、SKG 関節炎モデルにおいて podoplanin の発現について研究したものであるが、従来知られていなかった podoplanin 陽性 Th17 サブポピュレーションを見出し、podoplanin の病態マーカーとしての重要性を示したもので、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。