



Title	Four-step model for class II MHC-associated autoimmune disease development
Author(s)	奥山, 祐子
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/58501
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博 士 論 文

**Four-step model for class II
MHC-associated autoimmune
disease development**

大阪大学大学院生命機能研究科生命機能専攻

免疫発生学研究室

奥山 祐子

2011 年 3 月修了

目次

要旨	ページ 2
序論	ページ 3
結果	ページ 6
考察	ページ 10
実験材料、手法	ページ 14
図表注釈	ページ 19
図表	ページ 24
謝辞	ページ 39
参考文献	ページ 40
業績一覧	ページ 45

要旨

これまで、多くのMHCクラス2拘束性自己免疫疾患において、CD4陽性T細胞による自己抗原の認識が、組織特異性を決定する主な要因であると考えられてきた。本研究において我々は、F759マウスのMHCクラス2拘束性関節炎発症について、これまでとは異なる新たな機序を明らかにした。

F759マウス関節炎発症には特にTh17細胞が重要であり、産生されるIL-17は1型コラーゲン陽性の線維芽細胞においてIL-6と協調的に作用しIL-6の発現を相乗的に上昇させる。このIL-6は更なるIL-6産生を引き起こしIL-6ループが形成される。過剰に産生されたIL-6,IL-17の相乗効果によりIL-6を始め様々な炎症性サイトカインやケモカイン等の発現が1型コラーゲン陽性の細胞にて亢進する。この現象を我々はIL-6誘導性炎症Amplifier (IL-6 Amp)と呼び、IL-6 Ampの活性化が、関節炎や多発性硬化症等の慢性炎症を伴う自己免疫疾患の発症に深く寄与することを示してきた。

本研究においては、変異マウスを用いた関節炎の解析より、CD4陽性T細胞による組織特異的自己抗原の認識はF759マウス関節炎の発症に必須ではないことを証明した。F759関節炎の関節特異的な病態の形成メカニズムを以下のように証明した。関節への物理的ストレスに因る微小出血に起因してTh17細胞が関節局所に集積することを継起とし、Th17細胞から産生されるIL-17Aにて局所において一過性にIL-6 Ampが活性化する。このIL-6 Ampの活性化が、Th17細胞の遊走因子“CCL20”を誘導してさらにTh17細胞の関節局所への集積が生じる。このことが、さらに、IL-6 Ampを活性化して他の細胞の集積を引き起こし、最終的に関節局所に慢性的なIL-6 Ampの活性化が生じ関節炎が発症する。微小出血のような局所的事象が組織特異的自己抗原認識に代わる特異性決定要因となり得ることが示唆された。

これらの結果から、私は、慢性炎症を伴うMHCクラス2拘束性自己免疫疾患発症における“4ステップモデル”を確立した。それら4つの事象とは、1) CD4陽性T細胞の活性化とサイトカイン産生、2) CD4陽性T細胞の標的臓器への集積、3) 標的臓器における一過性のIL-6 Ampの活性化、4) CD4陽性T細胞が産生するサイトカインに対する感受性の亢進、である。CD4陽性T細胞の活性化と標的臓器への集積は、必ずしも標的臓器抗原に依存している必要は無い。F759マウスの関節炎ばかりでなく、臓器特異的な慢性炎症を伴う自己免疫疾患の発症一般に、臓器特異的なIL-6 Ampの慢性的な活性化亢進は重要な役割を担っていると考えられる。本研究は、これまで多くの自己免疫疾患において、病因となる自己抗原が特定されていなかった理由のひとつの説明となり得る。

序論

免疫応答は本来、外来の異物を排除する生体防御機構であり、生命体として自己の恒常性を維持する生存に必須の機構である。免疫担当細胞は自己と非自己を識別する特有の能力を持ち、免疫寛容により自己への攻撃は抑制される。一方で自己免疫疾患は、この免疫系が自己の組織を攻撃し機能障害と難治性慢性炎症が引き起こされるものである。自己免疫疾患には、1型糖尿病やバセドウ病、橋本病などの臓器特異性自己免疫疾患と、全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ(RA)などの全身性自己免疫疾患とがある。いずれも遺伝的要因、環境要因などの複合的な要因が考えられ、免疫応答の過剰亢進が見られる(Marrack et al., 2001; Mathis and Benoist, 2004)。いくつかの自己免疫疾患、特に関節リウマチのような主要組織適合抗原複合体クラス2(MHC class II)対立遺伝子に随伴する疾患は、CD4陽性T細胞による自己抗原認識により、抗原の発現する組織で特異的に発症すると考えられてきた(Imboden, 2009; Steinman, 2001; Zhang et al., 2008)。実際ヒト関節リウマチ患者において、プロテオグリカン、フィブリン、コラーゲンなど、いくつかの関節組織特異的な自己抗原ペプチドが同定されている(Chapuy-Regaud et al., 2005; Elsaid and Chichester, 2006; Polgár et al., 2003; Takizawa et al., 2006; Van Steendam et al., 2010)。また、マウスのコラーゲン誘導性関節炎モデルにおいて、免疫優性のMHCクラス2分子に提示される抗原ペプチドはそれらのペプチドの集積が関節組織の損傷の結果であるのか、原因であるのかは不明であるが、ヒトの関節リウマチに見られるものと一致している(Andersson et al., 2010)。そのため、自己抗原に対する免疫寛容の決定機構が自己免疫疾患の病因解明の主眼となっている。これら多くのMHCクラス2拘束性疾患において、抗原特異的なT細胞活性化の知見はいくつか報告されているにもかかわらず、活性化T細胞によって認識される組織特異的な自己及び非自己の抗原が同定されていない疾患も多い(Mocci et al., 2000; Skapenko et al., 2005)。このことは、CD4陽性T細胞における組織特異的な抗原に対する免疫寛容の破綻は、必ずしも自己免疫疾患発症において決定的ではないことを示唆している。むしろ、CD4陽性T細胞の活性化は、何らかの遺伝的もしくは環境的要因により標的組織で生じる炎症反応の結果として起こる現象であるかもしれない(Hirano, 1998; Marrack et al., 2001; Matsumoto et al., 1999)。その場合、活性化CD4陽性T細胞による自己抗原の認識よりもむしろ、直接的もしくは間接的なサイトカイン産生の亢進が、組織特異性を決定する主な要因である可能性が考えられる。CD4陽性T細胞にはいくつかのサブセットがあり、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞はそれぞれIFN- γ 、IL-4、IL-17Aを多量に産生する(Bettelli et al., 2007; Cua et al., 2003; Glimcher and Murphy, 2000; Harrington et al., 2005; Mosmann and Coffman, 1989; Park et al., 2005; Veldhoen et al., 2006; Zhu et al., 2006)。これらの細胞群が、T細胞受容体(TCR)の交差依存的なサイトカイン産生により疾患の発症と進行を引き起こすのかもしれない。

加えて、加齢に伴い胸腺からのT細胞の供給が減少するため、末梢におけるT細胞の恒常的な増殖(homeostatic proliferation; HP)が生じ、記憶・活性化CD4陽性T細胞が増加する(Surh and Sprent, 2000)。さらに、加齢に伴い末梢のナイーブCD4陽性T細胞が減少することで、免疫寛容の正の選択に関与するような、自己抗原を含むペプチドを提示した自己のMHCクラス2とTCRとの弱い相互作用の頻度が増える。また、T細胞の生存維持を担うIL-7などのサイトカイ

ンの細胞あたりの消費量が増える、といったことが言われている(Surh and Sprent, 2000)。いくつかのグループにより、CD4陽性T細胞の恒常的増殖が、糖尿病、関節炎、オーメン症候群といった自己免疫疾患発症に関与することが報告されている(Jang et al., 2006; Khiong et al., 2007; King et al., 2004; Sawa et al., 2006)。また、この過程はIL-17AやIFN γ を含む特定のサイトカイン産生の特性にも関与する(Gudmundsdottir and Turka, 2001; Khiong et al., 2007; Nishihara et al., 2007)。なかでも、IL-6(Interleukin-6)について着目すると、自己免疫疾患において重要な役割を示唆する報告がいくつかある(Awasthi and Kuchroo, 2009; Hirano, 1998; Hirano, 2010; O'Shea et al., 2002; Sakaguchi and Sakaguchi, 2005)。IL-6は神経細胞、血球系細胞など多様な細胞に作用し、細胞増殖、分化、生存、運動など種々の細胞運命を決定し、生命機能の制御に重要な役割を果たす。IL-6は細胞膜表面のIL-6受容体 α および、IL-6ファミリーに共通の受容体であるgp130と複合体を形成し、その下流に2つのシグナル伝達経路を有する。一つはgp130のチロシン767, 824, 905, 915のYXXQモチーフを介したSTAT3の活性化経路、もう一つはgp130の759番目のチロシン残基(Y759)を介したSHP-2, GAB, ERK/MAPKの活性化経路である。この2つ目の経路の下流の分子であるSOCS3(Suppressor of cytokine signaling 3)は、STAT3の活性を負のフィードバック機構により制御している。本研究室では、IL-6-gp130シグナル伝達の生体内における役割を解明するため、シグナル特異的変異gp130を発現するノックインマウスを樹立した。ヒトgp130のチロシン759およびYXXQモチーフを持ったチロシン767, 824, 905, 915をフェニルアラニンに変換した変異体は、それぞれSOCS3・STAT3を介するシグナルを伝達することができない。これら変異体及び野生型cDNAの細胞膜・細胞内領域を含む断片をマウスgp130染色体DNAの同じ部分に相同組み換え法により挿入しノックインマウスを作製した。このマウスにおいては、細胞外をマウスgp130、細胞膜・細胞内領域をヒトgp130及びその変異体に置換されたマウス-ヒトキメラgp130を発現する。その結果、gp130^{Y759F}発現マウス(F759マウス)において生後1年から1年半以内にほぼ100%の個体において自己免疫性の関節炎を発症することが明らかになった(Atsumi et al., 2002; Sawa et al., 2006)。このマウスでは、SOCS3によるSTAT3活性化抑制が欠損していることにより、STAT3の活性化が亢進している(Ohtani, 2000; Sawa et al., 2006)。免疫系の異常として、ガンマグロブリン高値、リウマトイド因子等の自己抗体形成、脾腫大、リンパ節肥大、記憶/活性化T細胞の増加が見られる。関節炎は慢性、進行性であり、好中球の浸潤、滑膜繊維芽細胞の過形成、パンヌス形成、関節破壊・強直性変異を伴い、ヒトの慢性関節リウマチ(RA)に酷似している。IL-6シグナル伝達の恒常的な活性化が自己免疫疾患発症に寄与することを示唆している。さらに、抗IL-6受容体抗体療法は、いくつかのRA患者に対し有効性が確認され、実用化されつつある(Nishimoto and Kishimoto, 2004)。このことから、F759マウスはRAの発症機構を研究する上で有用な動物モデルであるといえる。

これまでに、F759マウス関節炎発症機序について、いくつかの知見が得られている。まず、CD8陽性T細胞やB細胞ではなく、MHCクラス2拘束性のCD4陽性T細胞が発症に寄与する(Sawa et al., 2006)。一方、Foxp3発現CD8陽性T細胞サブセットは関節炎発症に抑制的に作用する(Nakagawa et al., 2010)。1型コラーゲン陽性細胞における過剰なIL-6シグナルはT細胞生存因子であるIL-7の産生を誘導する。IL-7によりホメオスタティック増殖が亢進し、記憶・活性化CD4陽性T細胞が増加する。このことがF759マウス関節炎発症に必須の機序である(Sawa et al., 2006)。これらの知見から、F759マウスでの1型コラーゲン陽性細胞と活性化CD4陽性細胞のように、非免疫系組織

と免疫系組織との相互作用が自己免疫疾患発症に重要な役割を果たすと考えられる(Hirano, 2010)。さらに、F759マウス生体内には、記憶・活性化のIL-17A発現CD4陽性T細胞が存在し(Nishihara et al., 2007; Ogura et al., 2008)、F759マウス関節炎発症はIL-17A依存性である(Ogura et al., 2008)。すなわち、IL-6を介したIL-7の発現に因るホメオスタティック増殖が加齢に伴い増加し、IL-17Aを発現する記憶・活性化型のCD4陽性T細胞の集積を引き起こすと考えられる。IL-6シグナルが亢進しているF759マウスにおいてはこの現象が特に当てはまる。

また、もう一つ重要な知見として”IL-6 Amp”の発見がある。1型コラーゲン陽性の線維芽細胞においてIL-17AとIL-6が協調的に作用しIL-6の発現を相乗的に上昇させるという現象が見いだされた。このIL-6は更なるIL-6産生を引き起こしIL-6ループが形成される。過剰に産生されたIL-6と、Th17細胞由来のIL-17Aは、それぞれのシグナル伝達経路の下流の転写因子であるSTAT3とNF- κ B依存的な相乗効果を示す。その結果、1型コラーゲン陽性細胞において、IL-6を始め様々な炎症性サイトカインやケモカイン等の発現を亢進させる。この現象を我々はIL-6誘導性炎症Amplifier (IL-6 Amp)と名付けた(Ogura et al., 2008 ; Hirano, 2010)。IL-6 Ampの活性化は、F759マウス関節炎以外にも、MOG抗原特異的なT細胞が関与する多発性硬化症のマウス実験モデルであるEAE発症にも深く関与していることが示された(Ogura et al., 2008)。すなわち、慢性炎症を伴う多くの自己免疫疾患の発症に深く寄与することが示唆されている。

そこで、次なる重要な疑問は、F759マウス関節炎において、組織特異性がどのように決められているのか、関節局所でIL-6 Ampを活性化させる引き金となる要因は何か、という点である。本研究はこれに着目した。解析結果より、この関節炎モデルにおいては、エフェクターT細胞による自己抗原の認識は、組織特異性決定に必ずしも必要ではない、という可能性が示された。むしろ、関節における微小出血をはじめとする局所的な事象が、Th17細胞の集積とIL-17依存的なIL-6 Ampの活性化を引き起こし、組織特異性決定に寄与していることを示した。さまざまな実験結果に基づき、RAを含む多くのMHCクラス2拘束性自己免疫疾患発症において必要十分な事象をモデル化した”4ステップ仮説”を提唱する。これは、自己免疫疾患発症機序において、新規の概念である。

結果

F759 マウス関節炎発症において CD4 陽性 T 細胞による抗原認識は必須ではない

これまで報告されていたように リンパ球を欠損した F759RAG^{-/-} マウスでは加齢に伴う関節炎の自然発症は認められなかった(Ogura et al., 2008; Sawa et al., 2006)(図. 1a, b)。CD4 陽性 T 細胞による関節組織特異的自己抗原の認識の関与を検証するため、遺伝子組み換えにより関節組織には発現しない非自己抗原に対する単一の T 細胞受容体(TCR)を発現する F759 マウスを作製した。結核菌由来の抗原に対する TCR を持つ F759RAG^{-/-}-P25 マウス、ニワトリ卵白アルブミンに対する TCR を持つ F759RAG^{-/-}-OT2 マウス、いずれにおいても、通常の F759 マウスと同等の関節炎の自然発症が認められた。一方で F759^{+/+} RAG^{-/-}-P25 マウス及び F759^{+/+} RAG^{-/-}-OT2 マウスにおいて発症は認められなかった(Fig. 1a, b)。踵関節患部の病理組織標本においても、関節滑膜組織における細胞の集積が認められ、関節炎の病態が裏付けられた(図.S1a,b)。また、F759RAG^{-/-}-P25 マウスにおいては標準検体 RAG^{-/-}-P25 マウス及び F759^{+/+} RAG^{-/-}-P25 マウスと比較して、脾臓及びリンパ節組織における総細胞数、CD4 陽性 T 細胞、記憶/活性化 CD4 陽性 T 細胞、IL-17A 産生 CD4 陽性 T 細胞、それぞれの細胞数はいずれも増加していた(図 2a-d)。また、同群において血清中の IL-17A 及び IL-6 濃度の上昇も認められた(図 2e-f)。以上の結果より、F759 マウスの関節炎発症において、CD4 陽性 T 細胞による自己根源の認識は、組織特異性の決定に必ずしも必要ではないことが示唆された。

局所的事象が引き金となって Th17 細胞の集積と IL-6 Amp の活性化を亢進させ関節炎発症を引き起こす

それでは、自己免疫疾患の組織特異性を決定する要因は何であるのか。そこで、関節局所への Th17 細胞の集積とそれに伴う IL-6 Amp の活性化の引き金となる何らかの局所的事象が関節組織で起こっていると予想した。関節の運動性の高さから、重力、圧力、伸展等、物理的ストレスの関与が考えられた。そのなかで微小出血(microbleeding)という現象に着目した。健常人においても通常、関節において一定頻度で微小な出血が生じているが血液凝固系により修復されている。重症の血友病患者では血液凝固系が破綻しているため、微小出血により血液性の関節症を発症することが報告されている(Aledort et al., 1994; Hakobyan et al., 2008; Manco-Johnson et al., 2007)。興味深いことに、F759 マウス関節炎と同様、出血性関節症においてもその影響は踵関節で特に頻度が高い(Manco-Johnson et al., 2007)。このことから F759 マウスに Th17 細胞存在下で実験的な微小出血を施すことで関節炎が誘導されるのではないかと予測した。

まず始めに試験管内で Th17 細胞、活性化非極性 CD4T 細胞を含むエフェクターCD4 陽性 T 細胞を分化誘導した(図.S2)。なお、分離した CD4 陽性 T 細胞集団の全体的な TCRV β 鎖レパトアの比率に大きな偏りは見られないことを確認した (データ不掲載)。関節炎発症前の若齢(8-10

週齢)の F759 マウスに単離した細胞を尾静脈より移入し、その後片足踵関節に針刺激による人工的微小出血を施した。その結果微小出血を誘導した足でのみ関節炎の発症が誘導され、微小出血を施していない逆の足では発症は誘導されなかった(図. 3a,b)。病理組織標本においても病態が確認された(図.S1d,e)。一方、非極性エフェクターCD4 陽性 T 細胞、もしくは Th1 細胞を移入し微小出血を誘導した群においては Th17 細胞移入群と比較して発症が減弱した(図.3c, 図.S3)。また、T 細胞を移入せず微小出血のみを誘導した群での関節炎発症は見られなかった(Fig.3d)。野生型 C57BL/6 マウスに同様の処置を行った場合、いずれの条件においても関節炎の発症は誘導されなかった(図.3a, 3b)。さらに、L-17A-GFP トランスジェニックマウス由来の細胞を移入し、微小出血を誘導後関節組織に集積している細胞の IL-17-GFP 発現を解析し、移入した Th17 細胞が IL-17 産生能をもち、その表現型を維持していることを確認した(図.S4)。これらの結果から F759 マウスにおいて、末梢血やリンパ組織の Th17 細胞の存在依存的に、局所での微小出血が関節炎発症の引き金となると考えられる。さらには、F759 マウスでは関節炎発症が誘導されたにも関わらず、野生型マウスを宿主として同様の処置を施しても関節炎の発症が認められなかったことから、疾患発症には受け手側の組織でのサイトカインシグナルに対する感受性の亢進が必要であることが示唆された。

類遺伝子マウス由来の Th17 細胞を移入し微小出血を誘導した F759 マウス関節組織において、集積しているドナー由来細胞集団についてフローサイトメトリー法による解析を行った結果、微小出血を誘導していない群と比較して CCR6 陽性細胞を含むエフェクターCD4 陽性 T 細胞の細胞数が有意に増加していた(Fig. 3e)。加えて、関節組織における IL-6 遺伝子発現を定量性 PCR により解析した結果、Th17 細胞移入と微小出血誘導を施した群において発現の上昇が見られた(図.3f)。IL-17A 欠損マウス由来の T 細胞を移入した場合、微小出血誘導後の関節炎の発症は減弱した(図. 3g)。また、IL-6 欠損 F759 マウス(IL-6^{-/-}F759)、もしくは 1 型コラーゲン陽性細胞特異的に STAT3 を欠損した F759 マウス(Coll1a-Cre STAT3^{fl/fl} F759) を宿主として Th17 細胞移入と微小出血処置を行った場合にも、関節炎の発症は誘導されなかった(図.3h, i)。これらの結果から、微小出血のような局所的現象が関節組織への Th17 細胞の集積と関節局所での IL-6 Amp の活性化を誘導することが示唆された。

CCL20 は 1 型コラーゲン陽性細胞における IL-17,IL-6 相乗効果、IL-6 Amp の標的分子の一つであり、Th17 細胞の集積を引き起こし関節炎発症に寄与する

微小出血誘導後の関節組織には Th17 細胞の集積は見られるが、その数はわずかであった。このことから局所での一過的 IL-6 Amp 活性化の後、Th17 細胞を含むエフェクターCD4 陽性 T 細胞の局所への集積を更に亢進させる IL-6 Amp の決定的な標的遺伝子が存在すると考え、その同定を試みた。そこで、Th17 細胞の走化性を誘導する CCL20 をはじめとするケモカインの関与が考えられた(Hirota et al., 2007; Williams, 2006)。微小出血によって初期的な少数の Th17 細胞の関節組織への集積が生じ、その後ケモカインの安定的な発現が誘導され、Th17 細胞の更なる集積と IL-6 Amp の局所的な活性化を亢進させると推測した。一方、試験管内において 1 型コラーゲン陽性の線維芽細胞である MEF 細胞を IL-6 及び IL-17A で共刺激すると、CCL20 の発現が相乗的に上昇した(Fig. 4a)。さらに、関節炎の自然発症が見られる老齢(12 週齢) F759 マウスは、発症

が見られない野生型マウス、若齢(8 週齢)の F759 マウスと比較して関節における CCL20 遺伝子発現が上昇していた(図.4b)。また、老齢(12 週齢)の F759 マウスは、若齢(8 週齢)の F759 マウスと比較して関節に浸潤している CD4⁺CCR6⁺ T 細胞の細胞数の上昇が見られた(図.4c)。これらのことから、CCL20 の関節組織での発現上昇が関節炎発症を引き起こすと予想し、これを検証することとした。若齢 F759 マウスに試験管内で分化誘導した Th17 細胞を尾静脈より移入し、片足の踵関節腔内に CCL20 を投与したところ、関節炎の発症が認められた(図.4d, S1c)。同一個体で生理食塩水を投与した逆足の踵関節においては関節炎の発症は認められなかった(図.S5)。同様の処置を行った野生型 C57BL/6 マウスにおいても関節炎の発症は見られなかった(図.4d,S5)。また、Th17 細胞を移入し人工的微小出血を施した F759 マウス関節組織において、CCL20 遺伝子発現の上昇が認められた(図.4 e)。これらの結果は、微小出血により関節組織で CCL20 の発現が誘導され、組織特異的、抗原非依存的な CCR6 陽性 Th17 細胞の集積を引き起こす、という仮説を支持するものである。さらに、IL-17A 欠損マウス由来の T 細胞を移入した群、もしくは Th1 細胞を移入した群では、野生型マウス由来 Th17 細胞を移入した群と比較して CCL20 投与後の関節炎の発症は減弱した(図. 4f,S3)。また、IL-6 欠損 F759 マウス(IL-6^{-/-}F759)、もしくは 1 型コラーゲン陽性細胞特異的に STAT3 を欠損した F759 マウス(Coll1a-Cre STAT3^{fl/fl} F759) を宿主として Th17 細胞移入と CCL20 投与を行った場合には、関節炎の発症は認められなかった(図. 4g, h)。加えて、F759 マウスにおいて sh-RNA 組み込みレンチウイルスの踵関節腔内投与により関節局所で CCL20 もしくは STAT3 の発現を抑制した後、Th17 細胞移入と実験的微小出血を施したところ、関節炎の発症は誘導されなかった(図.4i)。すなわち、これらの結果から、関節における微小出血が Th17 細胞の集積を引き起こし関節局所の 1 型コラーゲン陽性細胞において IL-6 Amp 活性化と CCL20 の発現が誘導されることが示唆された。そしてこれが、エフェクター CD4 陽性 T 細胞の細胞数が増加し、標的組織における T 細胞由来サイトカインに対する感受性が亢進した個体において、CD4 陽性 T 細胞依存性の組織特異的自己免疫疾患の発症を引き起こすと考えられる。

Th17 細胞は IL-17A の供給源として働き、局所に集積して F759 マウス関節炎発症を引き起こす

最後に、微小出血のような局所的な事象を介さず、Th17 細胞、もしくはサイトカイン IL-17A を直接関節腔内に注入することで、F759 マウス関節炎発症が誘導されるかを検証した。まず、試験管内で分化誘導した Th17 細胞を若齢 F759 マウス踵関節腔内に投与したところ、関節炎発症が誘導され、非極性 CD4 陽性 T 細胞、もしくは Th1 細胞投与群での関節炎発症は認められなかった(図.5a)。しかしながら、野生型マウスに同様の処置を行っても関節炎の発症は誘導されなかった(図.5b)。IL-17A 欠損マウス由来の T 細胞を移入した群では、野生型マウス由来 Th17 細胞を移入した群と比較して関節炎の発症は減弱した(図.5c)。また、IL-6 欠損 F759 マウス(IL-6^{-/-}F759)、もしくは 1 型コラーゲン陽性細胞特異的に STAT3 を欠損した F759 マウス(Coll1a-Cre STAT3^{fl/fl} F759) に、野生型マウス由来の Th17 細胞を関節腔内に投与した群でも、関節炎の発症は減弱した(図. 5d, e)。これらの結果から、Th17 細胞由来の IL-17A を介した 1 型コラーゲン陽性細胞にお

ける IL-6 Amp 活性化が F759 マウス関節炎発症において重要な役割を果たすことが強く示唆された。関節組織には発現しない非自己の抗原に対する単一の TCR のみを持つ OT2-RAG^{-/-} マウス由来の Th17 細胞を若齢 F759 マウス踵関節腔内に投与した場合にも関節炎発症が誘導された(図.5 f)。このことから、関節局所への Th17 細胞の集積は関節炎発症に必要十分であり、関節特異的な自己抗原の認識は必須ではないことが裏付けられた。

最後に、IL-17A を若齢 F759 マウス踵関節腔内に投与したところ、関節炎発症が誘導され、野生型マウスに同様の処置を行っても関節炎の発症は誘導されなかった(図.6a, 6b, S1f)。また各群において、Th17 細胞もしくは IL-17A を投与していない足においてはいずれも関節炎の発症は見られなかった(図. S6a-e)。以上すべての結果より、関節局所への Th17 細胞の集積が IL-17A をはじめとするサイトカインを供与し、抗原認識非依存的に IL-6 Amp の活性化を亢進させ、F759 マウス関節炎発症に大きく寄与することが示唆された。

考察

多くの自己免疫疾患において、T 細胞による自己抗原の認識が組織特異性決定に寄与していることは明らかである(Marrack et al., 2001; Mathis and Benoist, 2004)。しかしながら、MHC クラス 2 拘束性の疾患でさえも、記憶・活性化 T 細胞によって認識される組織特異的な自己抗原が同定されていない疾患は多くある(Mocci et al., 2000; Skapenko et al., 2005)。ヒト関節リウマチ(RA)や F759 マウス関節炎もまたその例である(Falgarone et al., 2009)。興味深いことに、いくつかの知見から、これら二つの疾患において CD4 陽性 T 細胞が発症に寄与することが裏付けられている。いずれの場合も、MHC クラス 2 と CD4 分子の相互作用が見られ、疾患進行に伴う記憶・活性化 CD4 陽性 T 細胞の細胞数の増加が見られる。そして MHC クラス 2、CD4 分子の阻害もしくは欠損により症状は改善する。また T 細胞の生存維持に作用する IL-7 が発症に寄与している。IL-7 は CD4 陽性 T 細胞のホメオスタティック増殖を亢進させ、F759 マウス関節炎発症を引き起こす(Ogura et al., 2008; Sawa et al., 2006)。

これらのことから、F759 マウスにおいて関節局所の炎症を引き起こす引き金は何か、という疑問に対し、CD4 陽性 T 細胞による組織特異的自己抗原の認識がもっとも妥当な説明であると考えた。しかしながら驚くべきことに、今回の実験結果はこれを支持するものではなかった。むしろ、活性化 CD4 陽性 T 細胞の関節局所への抗原非特異的な集積こそが、F759 マウス関節炎の発症に必須であることを見いだした。実際に、関節局所での微小出血を引き金として Th17 細胞を関節局所に抗原非特異的に集積させると、局所に IL-6 Amp の活性化が生じ、CCL20 の発現上昇を伴い更なる Th17 細胞の集積が亢進し、関節炎の発症が引き起こされることが、関節炎誘導実験より示された。

ヒト関節リウマチ患者のなかには、自己抗体の増加、組織特異的な抗原を介した免疫応答、もしくは IL-6 や TNF などの炎症性サイトカインに依存する病態など、いくつか異なるサブグループが存在する。そのため、IL-6 受容体、TNF などの特定の分子を標的とした治療法は、すべての関節リウマチ患者に対して有効であるわけではない。つまり、少なくとも一部の RA サブグループを含む MHC クラス 2 拘束性の組織特異的自己免疫疾患のなかには、局所的な事象により抗原非依存的に CD4 陽性 T 細胞が集積し、CD4 陽性 T 細胞由来のサイトカインにより標的組織で IL-6 Amp が活性化して引き起こされるものもあると考えられる。

これらの研究結果から、関節リウマチをはじめ、慢性炎症を伴う MHC クラス 2 拘束性自己免疫疾患発症における“4 ステップモデル”を確立した。それら 4 つの事象とは、1) CD4 陽性 T 細胞の活性化とサイトカイン産生、2) CD4 陽性 T 細胞の標的臓器への集積、3) 標的臓器における一過性の IL-6 Amp の活性化、4) CD4 陽性 T 細胞が産生するサイトカインに対する感受性の亢進、である。

このような 4 つの事象が原因となって最終的には、標的臓器において IL-6 Amp の慢性的活性化が生じ、大量の IL-6 やケモカイン等が局所で発現されて臓器特異的な慢性炎症に発展する。これらの 4 つの事象は、時間的な序列は関係なく相互に密接に影響し合い、それぞれの過程の自己免疫疾患の発症や病態への貢献度は様々な疾患により異なると考えられる。

CD4 陽性 T 細胞の活性化はサイトカインの供給源として重要であるが、この活性化は必ずしも

標的臓器抗原に特異的である必要は無い。今回の F759 マウスの場合には、gp130 変異という遺伝的な要因から、STAT3 の活性化により末梢でのホメオスタティック増殖が亢進し、全身で記憶・活性化 CD4 陽性 T 細胞が増加していた。一般に、加齢に伴いさまざまな病原体に対する記憶 T 細胞が蓄積し、また CD4 陽性 T 細胞のホメオスタティック増殖が亢進するため、記憶・活性化 CD4 陽性 T 細胞の細胞数は増加する。結果として、記憶・活性化 CD4 陽性 T 細胞は、リンパ組織よりもむしろ消化管等の柔組織に多く集積する。そのため、定常状態においても記憶・活性化 CD4 陽性 T 細胞が組織に移動して留まり、自己免疫疾患を引き起こす危険性は存在している。これを裏付けるように、これらの疾患は高齢の人でより発症しやすい。彼らの体内では記憶・活性化 CD4 陽性 T 細胞集団が増加しており、これらがホメオスタティック増殖や慢性炎症によってさまざまなサイトカインを産生するためである(Hasler and Zouali, 2005; Larbi et al., 2008)。このことから、4 ステップモデルの 1 つ目と 2 つ目のステップ、CD4 陽性 T 細胞の活性化と集積は、健常人においてもある程度起こりうることである。記憶・活性化 T 細胞集団を多く持つ高齢の人で、その頻度はより高い。にもかかわらず、関節リウマチを含めた自己免疫疾患は、すべての人で発症するわけではない。この発症率の低さは、4 つ目のステップである標的臓器での IL-6 等のサイトカインシグナルに対する感受性を高める要因が、比較的稀なものであることに因る。

標的臓器局所でサイトカインに対する感受性を亢進させる因子のひとつとして、ウイルスや細菌感染で生じる産物が考えられる(Münz et al., 2009)。例えば、ヒト成人 T 細胞白血病ウイルス HTLV1 の感染は顕著な関節炎発症の危険因子である(Uchiyama, 1997)。一方、HTLV1 のもつ転写活性化因子 p40 Tax は NF- κ B を活性化させ、p40 Tax トランスジェニックマウスは関節リウマチ様の関節炎を発症する(Iwakura et al., 1991)。また、p40 Tax を高発現した F759 マウスでは関節炎発症が早期化、重篤化する(Ishihara et al., 2004)。さらに、C 型肝炎ウイルスのコアタンパク質や EB ウイルスの EBNA2 などのいくつかのウイルス由来の分子が、強力な STAT3 活性化因子であることが報告されている(Muromoto et al., 2009; Yoshida et al., 2002)。病原体由来の産物が Toll 様受容体シグナルを刺激し NF- κ B の活性化を引き起こすことも知られている。ウイルスや細菌感染時には、それぞれ異なる優先的な標的細胞、臓器があるため、感染した組織で特異的にサイトカイン感受性が亢進し、疾患の組織特異性が決定されることになる。その裏付けとして、自己免疫疾患はしばしば感染時に発症し、このときサイトカインを産生する病原体特異的な活性化 CD4 陽性 T 細胞が増加する(Kivity et al., 2009)。

さらに、自己免疫疾患はさまざまな遺伝的変異との関連性がいわれている。例えば、gp130 の体細胞突然変異により STAT3 の異常な活性化が亢進する例や、NF- κ B 制御因子の遺伝子変異に因る NF- κ B シグナルの活性化などが数多く報告されている(Compagno et al., 2009; Lenz et al., 2008; Rebouissou et al., 2009)。また、高 IgE 症候群の患者において新規の STAT3 遺伝子変異が発見されている(Minegishi et al., 2007)。すなわちこのように、局所への細菌感染、病原体由来産物の蓄積、あるいは遺伝子変異による STAT3 や NF- κ B 制御因子の活性化が、標的組織の T 細胞由来サイトカインに対する感受性の亢進に寄与していると考えられる。

もうひとつの自己抗原非特異的な自己免疫疾患発症の引き金要因として注目されるのが、物理的・機械的ストレスであり、本研究において非常に新規性、独自性の高い点である。加齢とともに増悪する組織の破壊はストレスの度合いによって異なり、関節のように運動性の高い組織では

その危険性はより高い。これが3つ目のステップである組織特異的な IL-6 Amp 活性化の引き金要因となり得る。また、培養細胞を用いた研究からは、特に筋組織や循環器系組織由来の細胞において、圧迫刺激、伸展刺激等の物理的ストレスにより、NF- κ B や STAT3 の活性化およびサイトカイン産生の亢進が引き起こされることが報告されている。これらのことから、物理的ストレスを受けた組織で抗原非特異的に IL-6 Amp が活性化しサイトカインシグナルへの感受性が亢進し、自己免疫疾患が引き起こされる可能性は大いに考えられる。特に今回は微小出血 (microbleeding) という現象に着目している。物理的・機械的ストレスによりこのような局所的現象が誘導され、NF- κ B の活性化を介して IL-6 発現上昇が引き起こされる。

関節における微小出血が、3つ目のステップである関節局所での IL-6 Amp 活性化を引き起こす仕組みは直接的には解明されていないが、いくつかの状況証拠より血管の損傷により血液細胞が血管外に流出し組織内へ浸潤することがきっかけとなると考えられる。関節局所での微小出血により Th17 細胞を含めた記憶・活性化 T 細胞以外にも赤血球、好中球、マクロファージ、樹状細胞などのさまざまな種類の細胞の集積を引き起こす。本研究においては特に関節に集積する IL-17A を産生する Th17 細胞の重要性に着目している。F759 マウスでの実験的微小出血による関節炎誘導において、関節炎の発症は移入する Th17 細胞と産生される IL-17A に依存することから、この重要性が示唆されている。しかしながら、関節局所での微小出血は異なる要因から炎症反応を亢進させる可能性もあり得ることは確かである。例えば、関節滑膜の環境変化、死細胞の発生によりヘムやミトコンドリアを含めた DAMPs (danger-associated molecular patterns) などの細胞内刺激物質が産生される可能性がある (Zhang et al., 2010)。これらの刺激物質はヘムの毒性効果により二次的な細胞死を誘発する。また死細胞が放出する DAMPs が直接あるいは間接的に NF- κ B シグナル伝達経路を活性化させるという報告があることから、それらにより IL-6 や CCL20 の発現が誘導されることも考えられる (Bianchi, 2007; Sims et al., 2010)。今回の結果からは、これらの可能性を否定することは出来ない。微小出血により IL-6 Amp 活性化が引き起こされる機序、そして微小出血以外の物理的・機械的ストレスによる IL-6 Amp 活性化、サイトカインに対する感受性亢進の可能性とその機序については、新規の自己免疫疾患発症機序として非常に注目すべき点である。実際これまでに示唆的な実験結果として、F759 マウス関節部位への圧迫刺激、及び 2G の過重力環境下での飼育、トラッドミルを用いた運動性促進により、関節炎発症が誘導される傾向が見られている。培養細胞においては、血管内皮細胞株および滑膜細胞の細胞株を用い、伸展刺激を加えることで IL-6 遺伝子発現の上昇傾向が見られた。これらについて、今後さらに解析を進める必要がある。

興味深いことに、IL-17 を引き金とする IL-6 Amp 活性化は、ヒト多発性硬化症のマウスモデルである EAE においても関与することがわかっている (Ogura et al., 2008)。EAE モデルは標的組織である神経組織特異的な MOG 抗原ペプチドに依存するため、この知見から、エフェクター CD4 陽性 T 細胞による抗原特異性と標的臓器での IL-6 Amp 活性化は、組織特異的自己免疫疾患発症において互いに独立して機能するものではないことが示唆される。この場合、CD4 陽性 T 細胞による抗原認識は、標的臓器での IL-6 Amp 活性化の上流で生じ、CD4 陽性 T 細胞の抗原特異性は初期の標的臓器への T 細胞の集積を引き起こす。言い換えれば、抗原特異性が F759 マウスにおける微小出血のような局所的現象に置き換わり、活性化 T 細胞の組織特異的な集積を引き起こしているといえる。そして特異的組織に活性化 CD4 陽性 T 細胞が蓄積することで、サイトカ

インの供給源となり IL-6 Amp の活性化を引き起こす。すなわち、エフェクターCD4 陽性 T 細胞の標的組織への集積を引き起こす要因は何であれ、その疾患発症に活性化 CD4 陽性 T 細胞由来のサイトカインが関与する多くの炎症性疾患は、MHC クラス 2 分子に随伴するものであるといえる。

今回その重要性について着目した IL-17A 以外のサイトカインにおいても、1 型コラーゲン陽性細胞において IL-6 Amp を活性化し、MHC クラス 2 拘束性の疾患発症に貢献する可能性はある。これは、分化誘導した CD4 陽性 T 細胞をマウスに移入し、関節炎発症を誘導したいくつかの実験結果において、非極性 CD4 陽性 T 細胞、Th1 細胞、もしくは IL-17A 欠損マウス由来の Th17 細胞を移入した群においても、軽度の関節炎発症が誘導されたことから示唆される。例えば TNF は NF- κ B の活性化を介して標的組織で IL-6 シグナル活性化を引き起こし、局所的な MHC クラス 2 拘束性自己免疫疾患発症に関与する可能性がある。その裏付けとして、関節リウマチをはじめ多くの慢性自己免疫疾患において、TNF を標的とした治療の有効性が示されており、またその大部分は MHC クラス 2 依存性の疾患である(Feldmann and Maini, 2001)。さらに、活性化 CD4 陽性 T 細胞は TNF を産生することが知られており(Cherwinski et al., 1987; Constant and Bottomly, 1997; Williams et al., 2008)、またこれまでの解析結果から TNF の欠損により F759 マウスにおける関節炎自然発症は減弱することがわかっている(データ未公開)。さらに興味深いことに、過剰の Th1 細胞を持つマウスの関節部位周辺に LPS を注入することで、関節炎発症が誘導されるという報告がある(Nickdel et al., 2009)。このことは、LPS を介して関節周辺部位で IL-6 が産生されることにより、IL-6 Amp の活性化を介して関節局所への Th1 細胞の集積が引き起こされることを示唆している。またこれと一致する知見として、少なくとも *in vitro* においては、血管内皮細胞株への IL-6 および IFN γ の共刺激によって IL-6 産生が相乗的に上昇することが示されている(データ不掲載)。さらに、IL-22 もまた *in vitro* 1 型コラーゲン陽性細胞において IL-17A 存在下での IL-6 産生を促進させることがわかった(Supplementary Figure 7a)。しかしながら、F759 マウス関節腔内への Th17 細胞投与による関節炎誘導において、IL-22 受容体特異的 shRNA レンチウイルスの関節腔内投与により関節炎発症の減弱はほとんど見られなかった(Supplementary Figure 7b)。すなわち、Th17 細胞より産生される IL-22 は、F759 マウスの Th17 細胞誘導性関節炎への寄与は小さいものと考えられる。

以上の研究結果から、本研究は F759 マウスの MHC クラス 2 依存性の組織特異的自己免疫性関節炎の発症機序を明らかとし、その説明として 4 ステップモデルを提唱した。このモデルは、これまで関節リウマチを含め多くの MHC クラス 2 依存性の組織特異的自己免疫疾患において、活性化 CD4 陽性 T 細胞により認識される組織特異的自己抗原が同定されていない理由の、ひとつの新しい説明となり得る。F759 マウスの関節炎ばかりでなく、臓器特異的な慢性炎症を伴う自己免疫疾患の発症一般に、臓器特異的な IL-6 Amp の慢性的な活性化亢進は重要な役割を担っていると考えられる。この 4 ステップモデルが、自己免疫疾患を引き起こす一般的な機構であることが多くの MHC クラス 2 に関連する病気において証明されると予想される。今後、IL-6 Amp の活性化亢進、抑制機構をより詳細に研究することで、様々な難治性自己免疫疾患の治療起点が生まれることが期待される。

実験材料・手法

マウス

- ・ C57BL/6 マウス : 日本 SLC より購入。
- ・ gp130^{F759/F759} (F759 マウス) : C57BL/6 マウスと 10 世代以上戻し交配した。
- ・ IL-6 ノックアウトマウス: Dr. M. Kopf (Max-Planck-Institute of Immunobiology, Germany) より譲渡され、C57BL/6 マウスと 10 世代以上戻し交配した。さらに F759 マウスと交配した。
- ・ Type I collagen Cre マウス: Dr. G. Karsenty (Baylor College of Medicine, Houston, TX) より譲渡。
- ・ STAT3^{flax/flax} マウス: 審良静男氏(Osaka University, Japan) より譲渡。Type I collagen Cre マウスと交配した(Takeda et al., 1998)。
- ・ IL-17A ノックアウトマウス: C57BL/6 背景 (Iwakura and Ishigame, 2006) を F759 マウスと交配した。
- ・ C57BL/6/P25 TCR トランスジェニックマウス : 本研究室にて樹立した(Tamura et al., 2004)。
- ・ C57BL/6 OT2 TCR トランスジェニックマウス : Dr. W. R. Heath (University of Melbourne, Australia) より寄贈。
- ・ IL-17A-GFP ノックインマウス : Biocytogen (Worcester, MA) より購入。
- ・ C57BL/6 SJL (CD45.1)マウス : JAX (Bar Harbor, Maine) より購入。

すべてのマウスは大阪大学医学部動物実験施設にて、規定に従い無菌環境下で飼育した。すべての動物実験は大阪大学大学院医学系研究科、生命機能研究科の動物管理使用委員会の規定に従い実施した。

抗体

- ・ 抗 CD3 抗体
- ・ 抗 IFN- γ 抗体
- ・ APC 標識
 - 抗マウス CD8(Ly-2)抗体 (Clone 53.6.7 : eBioscience)
 - 抗マウス TCR β 抗体 (eBioscience)
 - 抗マウス IFN- γ 抗体(eBioscience)
 - 抗マウス/ラット Foxp3 抗体 (Clone FJK-16s : eBioscience)
 - ラット IgG1 アイソタイプコントロール抗体 (eBioscience)
- ・ FITC 標識
 - 抗マウス CD8(Ly-2)抗体 (Clone 53.6.7 : eBioscience)
 - 抗マウス CD19 抗体 (Clone MB19-1 : BioLegend)
 - 抗マウス/ヒト CD44 (Pgp-1, Ly-24)抗体 (Clone IM7: eBioscience)
 - 抗マウス/ヒト CD45R(B220)抗体 (BD Pharmingen)
 - 抗マウス NK1.1 抗体 (Clone PK136 : BioLegend)
 - 抗マウス MHC クラス II(I-A/I-E)抗体 (Clone M5/114.15.2 : eBioscience)
- ・ PE 標識
 - 抗マウス CD25 (IL-12Ra,p55)抗体 (Clone PC61.5 : eBioscience)

- 抗マウス IL-17A 抗体 (Clone eBio17B7 : eBioscience)
- 抗マウス CD45.1 抗体 (eBioscience)
- 抗マウス CD62L 抗体 (eBioscience)
- 抗マウス/ヒト CD45R(B220)抗体 (BD Pharmingen)
- 抗マウス MHC クラス II(I-A/I-E)抗体 (Clone M5/114.15.2 : eBioscience)
- PE-Cy5 標識
 - 抗マウス CD4 抗体 (Clone RM4-5 : BioLegend)
- PE-Cy7 標識
 - 抗マウス CD4 抗体 (Clone RM4-5 : BioLegend)
- Pacific Blue 標識
 - 抗マウス CD44 抗体 (eBioscience)
 - 抗マウス CD8(Ly-2)抗体 (Clone 53.6.7 : eBioscience)
- Alexa647 標識
 - 抗マウス CCR6 抗体 (BD Pharmingen)

試薬

- BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (with BD GolgiPlug™ protein transport inhibitor containing brefeldin A) (BD Bioscience)
- RPMI1640 メディウム (nacalai)
- ペニシリン (明治製菓株式会社)
- ストレプトマイシン (明治製菓株式会社)
- 生理食塩水 (大塚製薬株式会社)
- GM-CSF
- ウシ胎児血清 (EQUITECH)
- recombinant mouse IL-6 (Prospec)
- recombinant mouse IL-17A (PEPRO TECH,INC.)
- recombinant mouse IL-23 (R&D)
- recombinant mouse IL-12 (PEPRO TECH,INC.)
- recombinant human IL-6 (Toray, Tokyo)
- recombinant human TGF- β -1 (PEPRO TECH,INC.)
- recombinant mouse CCL20 (R&D)
- Pacific Blue 標識ストレプトアビジン
- MISSION sh-RNA Lentiviral Transduction Particles (Sigma-Aldrich)

マウス関節炎スコアリング

文献(Atsumi et al., 2002; Ishihara et al., 2004; Sawa et al., 2006) に従いマウス関節炎を点数化した。具体的には、踵関節炎の重症度を、踵及び足首の腫れと可動性の制限の二つのパラメーターにより各肢につきその重症度に従い 0-4 点に点数化した。各個体の関節炎スコアは 4 肢の総和とし、自然発症の場合各個体の最高スコアは 16 点となる。関節腔内への細胞、サイトカイン、ケモカ

イン投与による関節炎誘導実験においては、後肢腫の左右にそれぞれ異なる処置を施し、単独の肢でのスコアを解析しており、最高スコアは4点となる。

病理組織学的解析

関節組織を 4% パラホルムアルデヒドにて固定し、Morse's solution (22.5% bornyl formate and 10% sodium acid citrate solution) にて 12 時間脱灰処理し、パラフィンで包埋した。組織切片をヘマトキシリン・エオジンにて染色した(Sawa et al., 2006)。

細胞内サイトカイン産生の解析

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞の Th17 分化誘導条件下での培養 4 日目に、BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD Bioscience) を用い、キットのプロトコルに従い細胞内サイトカイン産生を解析した。関節組織浸潤細胞の解析においては、関節組織を摘出し、1mg/mL コラゲナーゼ入り RPMI1640 培地にて 37°C で 30 分静置後、60µm ナイロンセルストレイナーにより濾過し、同様に解析した。

ELISA

血清中および培養上清中の IL-6、IL-17A 濃度を mouse IL-6 ELISA Ready Set Go Kit (eBioscience)、mouse IL-17A ELISA Ready Set Go Kit (eBioscience)を用いて測定した。

フローサイトメトリー

10⁶ の細胞を蛍光標識抗体で氷上にて 30 分染色した。細胞試料を CyAn flow cytometers (Beckman Coulter)を用いて解析した。得られたデータを Summit software (Beckman Coulter)、Flowjo software (Tree Star)を用いて解析した。

マウス骨髓細胞由来樹状細胞の誘導

マウス後肢より採取した骨髓細胞を 100µm ナイロンセルストレイナーにより濾過し 0.167M NH₄Cl を用い溶血する。ペニシリン、ストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地に溶解し、37°C で約 3 時間培養し、浮遊細胞のみを回収する。この細胞を 10ng/ml GM-CSF、10% ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地で培養し、2 日おきに培地を交換することにより非接着系細胞を除く。そして培養開始から 7 日目の細胞を骨髓由来樹状細胞(BMDC)とした。

In vitro 非極性 CD4 陽性 T 細胞, Th1 細胞, Th17 細胞分化誘導

野生型および IL-17A 欠損マウスよりリンパ節、脾臓を摘出し 100µm ナイロンセルストレイナーにより濾過し 0.167M NH₄Cl を用い溶血する。ペニシリン、ストレプトマイシン、5%ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地に溶解した細胞を、ナイロンウールカラムに添加し 37°C で 30 分静置する。溶出、遠心後細胞を MACS バッファー (2%FCS, 5mM EDTA を含む PBS)に溶解し、蛍光標識抗体 (FITC 標識抗 CD44 抗体、PE 標識抗 MHC クラス II 抗体、PE 標識抗 B220 抗体、PE 標識抗 CD25 抗体、PE-Cy5 標識抗 CD4 抗体、APC 標識抗 CD8 抗体) で染色する。洗浄後細胞を RPMI1640 培地に溶解し 60µm ナイロンセルストレイナーにより濾過し、セルソー

ター (MoFlo; Dako Cytomation)を用いて CD4⁺CD8⁻CD44^{low}の細胞集団を分離し、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を得る。これを 24 ウェルプレートにペニシリン、ストレプトマイシン、10% ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地 2mL/well で 5×10^5 cells/well 撒き、BMDC 2×10^5 cells/well と 1 μ g/mL 抗 CD3 抗体存在下、各 T 細胞のサブセットに合わせて適切なサイトカインを入れ(以下)、4 日間培養した。

Th17 細胞 ; rhIL-6 (1 μ g/ml; Toray, Tokyo), rhTGF- β (5 ng/ml; PeproTech), rmIL-23 (10 ng/ml; R&D),
抗-IFN- γ 抗体 (10 μ g/ml)

Th1 細胞 ; rmIL-12 (20 ng/ml; PeproTech)

非極性 CD4 陽性 T 細胞 ; 抗-IFN- γ 抗体 (10 μ g/ml)

マウスへの T 細胞移入

先に示した手法で *in vitro* にて調整した Th1 細胞、Th17 細胞、及び活性化非極性 CD4 陽性 T 細胞を、培養 4 日目にピペッティングにより 50mL チューブに回収し、1,500 r.p.m. で 5 分間遠心する。上清をアスピレーターで除去し、生理食塩水で 2 回洗浄後、生理食塩水に溶解し 1×10^7 cells/匹でマウス尾静脈へ注射した。

関節腔内注入

In vitro にて調整した Th1 細胞、Th17 細胞、及び活性化非極性 CD4 陽性 T 細胞は、培養 4 日目にピペッティングにより 50mL チューブに回収し、1500 r.p.m. で 5 分間遠心する。上清をアスピレーターで除去し、生理食塩水で 2 回洗浄後、生理食塩水に溶解し 5×10^6 cells/50 μ L に調製し 50 μ L を踵関節腔内に 30G の注射針で注入する(Maffia et al., 2004)。ケモカイン(rmCCL20)、サイトカイン(rmIL-17A)は生理食塩水にて 100ng/20 μ L に調製し、20 μ L を踵関節腔内に 30G の注射針で注入した(Maffia et al., 2004)。

実験的微小出血の誘導

文献(Hakobyan et al., 2008)を参考に膝蓋下及び踵関節に 30G の注射針を用いて 10 回程度の穿刺を施し、実験的微小出血を誘導した。

リアルタイム PCR

GeneAmp 5700 sequence detection system(ABI, Warrington, USA)、SYBER greenPCR Master Mix(Sigma-Aldrich)を用いて CCL20 mRNA、IL-6 mRNA 及び HPRT mRNA の遺伝子発現量を定量化した。MEF 細胞および関節滑膜組織の RNA を GenElute Mammalian Total RNA kit (Sigma-Aldrich) を用いて精製し、DNase I (Sigma-Aldrich)で室温にて 15 分処理した。リアルタイム PCR は以下の配列のプライマーペアを用いた。

マウス HPRT プライマー	5'-GATTAGCGATGATGAACCAGGTT-3'
	5'-CCTCCCATCTCCTTCATGACA-3'
マウス IL-6 プライマー	5'-GTGGCAGGTAGAGGAGGAAG-3'
	5'-CCACCTGAAAGGCACTCTGT-3'
マウス CCL20 プライマー	5'-ACAGTGTGGGAAGCAAGTCC-3'

5'-CCGTGAACTCCTTTGACCAT-3'

リアルタイムPCR反応条件；94°C 15秒、60°C 60秒を40サイクル。

相対的遺伝子発現量をHPRT mRNA.発現量にて規準化した。

統計学的解析

スチューデント t 検定(両側検定) を用いて異なる 2 群間の差を統計学的に解析した。

図表及び注釈

図1. 関節非特異的外来抗原に対する単一のTCRを発現するF759マウスは関節炎を発症する

a-b, RAG2^{-/-} F759-P25 マウス (**a** 黒丸; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ヶ月につき各; n = 76, 73, 62, 56, 46, 30, 14, 7)、RAG2^{-/-} F759-OT2 マウス (**b** 黒丸; 1, 2, 3, 4, 5, 6 ヶ月につき各 n = 5, 5, 5, 7, 8, 2) の関節炎スコアを実験手法に記載したとおり解析した。標準検体として RAG2^{-/-} F759 マウス(**a**, **b** 白四角; n = 15), RAG2^{-/-} F759^{+/+} P25 マウス(**a** 白丸; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ヶ月につき各 n = 47, 47, 40, 37, 31, 20, 10, 6), RAG2^{-/-} F759^{+/+} OT2 マウス(**b** 白丸; 1, 2, 3, 4, 5, 6 ヶ月につき各 n = 36, 36, 28, 22, 17, 9) の関節炎スコアを解析し比較した(RAG2^{-/-} F759^{+/+} TCR Tg マウス 対 RAG2^{-/-} F759-TCR Tg マウス; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.005$)。スコア平均値(± SEM) を実験手法に記載したとおり算出した。スチューデント t 検定により P 値を算出した。

図2. 関節非特異的外来抗原に対する単一のTCRを発現するF759マウスではTh17細胞分化の恒常的促進が見られる

6ヶ月齢RAG2^{-/-} F759-P25マウス(白丸, n = 14) および標準検体(黒丸, n = 11: RAGKO-P25 (n=3) F759^{+/+} RAGKO-P25 (n=8))の脾臓、リンパ節組織における総細胞(**a**), CD4陽性T細胞 (**b**), 記憶・活性化CD4陽性T細胞(**c**), 及び Th17細胞(**d**) の数をフローサイトメトリー法により解析した。 **e-f**, 6ヶ月齢RAG2^{-/-} F759-P25マウス(白丸, 各n = 9, 10) および標準検体(黒丸, 各n = 15, 10)の血清中 IL-17A および IL-6濃度を解析した。6ヶ月齢RAG2^{-/-} F759-P25マウスにおいて総細胞 (***, $P < 0.005$), CD4陽性T細胞(*, $P < 0.05$), 記憶・活性化CD4陽性T細胞(*, $P < 0.05$), 及び Th17細胞(*, $P < 0.05$) の細胞数, 血清中 IL-17A濃度(*, $P < 0.05$), IL-6濃度(*, $P < 0.05$)が有意に上昇した。スチューデント t 検定により P 値を算出した。

図3. 微小出血はF759 マウス関節炎発症に寄与する

a, F759 マウス(白丸; n=4) およびC57BL/6マウス (白三角; n=4)に 5×10^6 のTh17 細胞を尾静脈投与後、実験的微小出血を誘導した左肢の関節炎スコアを解析した (3, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 14日目につき各 *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$)。 **b**, F759 マウス(白丸; n=4) およびC57BL/6マウス (白三角; n=4)に 5×10^6 のTh17 細胞を尾静脈投与後、実験的微小出血を施していない右肢の関節炎スコアを解析した。 **c**, 5×10^6 のTh17 細胞を尾静脈投与後、実験的微小出血を誘導したF759 マウス(黒丸; n= 5)、 5×10^6 の活性化非極性CD4陽性T細胞を尾静脈投与後、実験的微小出血を誘導したF759 マウス(黒三角; n= 5) の関節炎スコアを解析した。結果を、それぞれ微小出血を施していないF759 マウスと比較した(白丸: Th17細胞移入群 (n=5), 12, 14, 15, 16日目につき各**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$; 白三角; 活性化非極性CD4陽性T細胞移入群(n=5))。 **d**, T細胞を移入せず実験的微小出血を誘導したF759 マウス(白三角; n = 4) と 5×10^6 のTh17 細胞を尾静脈投与後、実験的微小出血を誘導したF759 マウス(白丸; n = 4;) の関節炎スコアを解析した(6, 7, 10, 11, 13, 14日目につき各* $P < 0.05$; ***, $P < 0.005$)。 **e**, F759 マウスに 2×10^7 のTh17 細胞を尾静脈投与後、実験的微小出血を誘導した肢(横軸右側)と、 実験的微小出血を誘導していない肢(横軸左側)

について、微小出血誘導24時間後の関節組織に集積している細胞について総細胞、CD4⁺ T細胞、CD4⁺CD45.1⁺ T細胞、CD4⁺CD45.1⁺CCR6⁺ T細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した(*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.005$)。f, F759マウスに 5×10^6 のTh17細胞移入した群、移入していない群において実験的微小出血を誘導した場合、誘導していない場合について関節組織におけるIL-6 mRNA発現量をリアルタイムPCRにより解析した(*, $P < 0.05$)。g, F759マウスにC57BL/6マウス由来Th17細胞(白丸; $n = 7$)もしくはIL-17A欠損マウス由来のTh17細胞(白三角; $n = 5$)を尾静脈投与後、実験的微小出血を誘導した肢の関節炎スコアを解析した(10, 11, 12, 14日目において*, $P < 0.05$)。h and i, F759マウス(IL-6^{-/-} F759; 白丸; $n = 8$ Type I collagen-Cre STAT3^{flox/flox} F759マウスとの比較実験; $n = 10$)とIL-6欠損 F759マウス(図. 3h, 十字; $n = 6$)もしくはType I collagen-Cre STAT3^{flox/flox} F759マウス(図. 3i, 黒四角; $n = 6$)において、 5×10^6 のTh17細胞移入し実験的微小出血を誘導した肢の関節炎スコアを解析した(IL-6欠損 F759マウス: 9, 10, 13, 15日目につき各*, $P < 0.05$; Type I collagen-Cre STAT3^{flox/flox} F759マウス: 7, 8, 10, 12, 15日目につき各*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$)。スコア平均値($\pm$ SEM)を実験手法に記載したとおり算出した。スチューデントt検定によりP値を算出した。この実験はそれぞれ少なくとも2回の独立した実験を行い再現性が得られた。

図4. CCL20はF759マウス関節炎発症に寄与する

a, マウス胎児由来線維芽細胞(MEF細胞)を調製し、ヒトIL-6、可溶性IL-6受容体及びIL-17Aの存在、非存在下で3時間刺激をした。細胞を回収しRNAを精製し、リアルタイムPCRによりCCL20 mRNA遺伝子発現量を解析した(***, $P < 0.005$)。b and c, 8週齢、12月齢のF759マウスおよびC57BL/6マウス関節組織と摘出し、CCL20 mRNA発現量およびCD4⁺CCR6⁺細胞数の比率を解析した(*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.005$)。d, 5×10^6 のTh17細胞移入しCCL20 (0.1 μ g)を踵関節腔内に投与したF759マウス(黒丸; $n = 8$)およびC57BL/6マウス(黒三角; $n = 8$)、Th17細胞移入せずCCL20 (0.1 μ g)を踵関節腔内に投与したF759マウス(白丸; $n = 8$)およびC57BL/6マウス(白三角; $n = 8$)の関節炎スコアを解析した(Th17対 saline: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$)。e, F759マウスにC57BL/6マウス由来Th17細胞(黒丸; $n = 8$)もしくはIL-17A欠損マウス由来のTh17細胞(白丸; $n = 7$)を尾静脈投与後、CCL20 (0.1 μ g)を踵関節腔内に投与した肢の関節炎スコアを解析した(5, 9, 11日目において*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.005$)。f, F759マウス(黒丸; $n = 7$)とIL-6欠損 F759マウス(白丸; $n = 5$)において、 5×10^6 のTh17細胞移入後、CCL20 (0.1 μ g)を踵関節腔内に投与した左肢の関節炎スコアを解析した(3, 6, 10日目において*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。g, F759マウス(黒丸; $n = 6$)とType I collagen-Cre STAT3^{flox/flox} F759マウス(白四角; $n = 4$)において、 5×10^6 のTh17細胞移入後、CCL20 (0.1 μ g)を踵関節腔内に投与した左肢の関節炎スコアを解析した(4, 6, 10日目において*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.005$)。h, F759マウスに 5×10^6 のTh17細胞移入した群、移入していない群において実験的微小出血を誘導した肢、誘導していない足について関節組織におけるCCL20 mRNA発現量をリアルタイムPCRにより解析した(微小出血処理 対 未処理: *, $P < 0.05$)。i, F759マウスにレンチウイルスshRNA、sh-CCL20 (白四角; $n = 6$)、sh-STAT3 (白三角; $n = 5$)、またはnon-target shRNA (白丸; $n = 4$)を関節腔内に投与し、 5×10^6 のTh17細胞を尾静脈投与により移入後、実験的微小出血を誘導し関節炎スコアを解析した(non-target shRNA投与群 対 sh-CCL20投与群: 11, 12, 13, 14日目において***, $P < 0.005$ r; non-target shRNA投与群 対 sh-STAT3投与群: 9, 11, 12, 13, 14

日目において**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$)。スコア平均値($\pm$ SEM) を実験手法に記載したとおり算出した。スチューデントt検定によりP値を算出した。この実験はそれぞれ少なくとも2回の独立した実験を行い、再現をとった。

図5. Th17細胞を介したIL-6 Amp活性化亢進はF759 マウス関節炎発症に必須である

a, F759 マウスにおいて 5×10^6 のTh17細胞を踵関節腔内に投与した群(丸; $n = 9$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.005$ for 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, and 14 days), またはTh1細胞を踵関節腔内に投与した群(三角; $n = 4$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ for 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, and 14 days), または活性化非極性CD4⁺ T 細胞を踵関節腔内に投与した群(ダイヤ; $n = 6$)の肢の関節炎スコアを解析し、生理食塩水を投与した群(四角, $n = 9$)のスコアと比較した。**b**, C57BL/6マウスにおいて 5×10^6 のTh17細胞(丸; $n = 7$), またはTh1細胞(三角; $n = 4$), または活性化非極性CD4⁺ T 細胞(ダイヤ; $n = 4$), または生理食塩水(四角; $n = 7$)を踵関節腔内に投与した肢の関節炎スコアを解析した。**c**, F759 マウスにC57BL/6マウス由来Th17細胞(丸; $n = 8$)もしくはIL-17A欠損マウス由来のTh17細胞(三角; $n = 3$), もしくは生理食塩水(四角; $n = 5$) を踵関節腔内に投与した肢の関節炎スコアを解析した。(WTマウス由来Th17細胞移入群 対 IL-17A欠損マウス由来Th17細胞移入群: 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14日目において *, $P < 0.05$)。 **d**, F759マウス(丸; $n = 9$)とIL-6欠損 F759マウス(三角; $n = 5$)において 5×10^6 のTh17細胞を踵関節腔内に投与した肢の関節炎スコアを解析した (4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14日目において*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$)。 **e**, F759マウス(丸; $n = 8$)とIL-6欠損 F759マウスType I collagen-Cre STAT3^{flx/flx} F759マウス(三角; $n = 3$)において 5×10^6 のTh17細胞を踵関節腔内に投与した肢の関節炎スコアを解析した (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14日目において*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$)。 **f**, F759 マウスにC57BL/6マウス由来Th17細胞(黒丸; $n = 4$)もしくはOT2 RAG2^{-/-}マウス由来のTh17細胞(ダイヤ; $n = 3$), もしくは生理食塩水(白丸; $n = 7$) を踵関節腔内に投与した肢の関節炎スコアを解析した。(OT2 RAG2^{-/-}マウス由来Th17細胞移入群 対 生理食塩水投与群: 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14日目において*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$)。スコア平均値($\pm$ SEM) を実験手法に記載したとおり算出した。スチューデントt検定によりP値を算出した。これらの実験はそれぞれ少なくとも2回の独立した実験を行い、再現をとった。

図6. F759マウスにおいてIL-17A関節腔内投与により関節炎が誘導される

a, F759マウスにおいて0, 1, 2日目にIL-17A(0.1 μ g)を踵関節腔内に投与した肢(丸; $n = 5$)と生理食塩水を投与した肢(三角, $n = 3$)について関節炎スコアを解析した(4, 7, 10 日目において*, $P < 0.05$)。 **b**, C57BL/6 マウスにおいて0, 1, 2日目にIL-17A(0.1 μ g)を踵関節腔内に投与した肢(丸; $n = 4$)と生理食塩水を投与した肢(三角, $n = 4$)について関節炎スコアを解析した。これらの実験はそれぞれ少なくとも3回の独立した実験を行い、再現をとった。

補足データ

図 S1.

a, F759^{+/+} RAG^{-/-}-P25 マウス(Control) および F759RAG^{-/-}-P25 マウスの関節組織。**b**, F759^{+/+} RAGKO-OT2 マウス (Control) および F759RAG^{-/-}-OT2 マウスの関節組織。**c**, F759 マウスに 5×10^6 の Th17 細胞移入後、CCL20 を踵関節腔内に投与した左肢、および投与していない右肢の関節組織。**d**, F759 マウスに 5×10^6 の Th17 細胞移入後、踵関節に実験的微小出血を誘導した左肢、および処置していない右肢の関節組織。**e**, F759 マウスに 5×10^6 の Th17 細胞を踵関節腔内に投与した左肢、および投与していない右肢の関節組織。**f**, F759 マウスに IL-17A を踵関節腔内に投与した左肢、および投与していない右肢の関節組織。**a-f** の各マウスの踵関節組織を固定し、パラフィンにて包埋した。組織切片をヘマトキシリン・エオジンにて染色し組織学的解析を行った。スケールバーは 100 μm を表す。これらの実験はそれぞれ少なくとも 3 回の独立した実験を行い、再現をとった。

図 S 2.

活性化非極性 CD4 陽性 T 細胞、Th1 細胞、及び Th17 細胞の各サイトカイン発現を、フローサイトメトリーにより解析した。これらの実験はそれぞれ少なくとも 10 回の独立した実験を行い、再現をとった。

図 S 3.

上段: F759 マウスに 5×10^6 の Th1 細胞もしくは Th17 細胞を移入後、踵関節に実験的微小出血を誘導した左肢の関節炎スコアを解析した。下段: F759 マウスに 5×10^6 の Th1 細胞もしくは Th17 細胞を移入後、CCL20 を踵関節腔内に投与した左肢の関節炎スコアを解析した。スチューデント t 検定により P 値を算出した(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。これらの実験はそれぞれ少なくとも 2 回の独立した実験を行い、再現をとった。

図 S 4.

F759 マウスに IL-17A-GFP ノックインマウス由来 Th17 細胞を尾静脈投与し微小出血を誘導した 6 時間後の踵関節組織における IL-17A 発現 Th17 細胞の細胞数を、GFP を指標にフローサイトメトリーにより解析した。エラーバーは SEM を示す。スチューデント t 検定により P 値を算出した(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$)。これらの実験はそれぞれ少なくとも 2 回の独立した実験を行い、再現をとった。

図 S 5.

F759 マウスに 5×10^6 の Th17 細胞移入後、踵関節腔内に生理食塩水を投与した右肢(丸; $n = 9$)、および C57BL/6 マウスに 5×10^6 の Th17 細胞移入後、CCL20 (0.1 μg) を踵関節腔内に投与した左肢(三角; $n = 6$)の関節炎スコアを解析した。これらの実験はそれぞれ少なくとも 2 回の独立した実験を行い、再現をとった。

図 S 6.

a, F759 マウス左肢踵関節腔内に 5×10^6 の Th17 細胞を投与した群(丸; $n = 9$)、Th1 細胞を投与した群(三角; $n = 5$)、活性化非極性 CD4 陽性 T 細胞を投与した群(ダイヤ; $n = 6$)、および生理食塩水を投与した群(四角; $n = 9$)において、それぞれ投与していない右肢の関節炎スコアを解析した。**b**, C57BL/6 マウス左肢踵関節腔内に 5×10^6 の Th17 細胞を投与した群(丸; $n = 7$)、Th1 細胞を投与した群(三角; $n = 4$)、活性化非極性 CD4 陽性 T 細胞を投与した群(ダイヤ; $n = 4$)、および生理食塩水を投与した群(四角; $n = 7$)において、それぞれ投与していない右肢の関節炎スコアを解析した。**c**, F759 マウス左肢踵関節腔内に C57BL/6 マウス由来の 5×10^6 の Th17 細胞を投与した群(丸; $n = 9$)、IL-17A 欠損マウス由来の 5×10^6 の Th17 細胞を投与した群(三角; $n = 3$)、および生理食塩水を投与した群(四角; $n = 5$)において、それぞれ投与していない右肢の関節炎スコアを解析した。**d**, F759 マウス(丸; $n = 9$)、および IL-6 欠損マウス (三角; $n = 5$)において、左肢踵関節腔内に 5×10^6 の Th17 細胞を投与し、それぞれ投与していない右肢の関節炎スコアを解析した。**e**, F759 マウス(丸; $n = 8$)、および Type I collagen-Cre STAT3^{flax/flax} F759 マウス (三角; $n = 3$)において、左肢踵関節腔内に 5×10^6 の Th17 細胞を投与し、それぞれ投与していない右肢の関節炎スコアを解析した。これらの実験はそれぞれ少なくとも 2 回の独立した実験を行い、再現をとった。

図 S 7.

a, 1 型コラーゲン陽性の 2 種類の細胞株 (BC1 and W26)において、IL-22 および IL-17A で 24 時間刺激を行った。培養上清を回収し ELISA により IL-6 濃度を測定した。エラーバーは SEM を示す。スチューデント t 検定により P 値を算出した(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$)。 **b**, F759 マウスにレンチウイルス shRNA、sh-IL-22R α (四角; $n = 6$)、sh-STAT3 (三角; $n = 5$)、または non-target shRNA (白丸; $n = 4$)を関節腔内に投与し、 5×10^6 の Th17 細胞を踵関節腔内に投与し、関節炎スコアを解析した。スチューデント t 検定により P 値を算出した(*, $P < 0.05$)。これらの実験はそれぞれ少なくとも 2 回の独立した実験を行い、再現をとった。

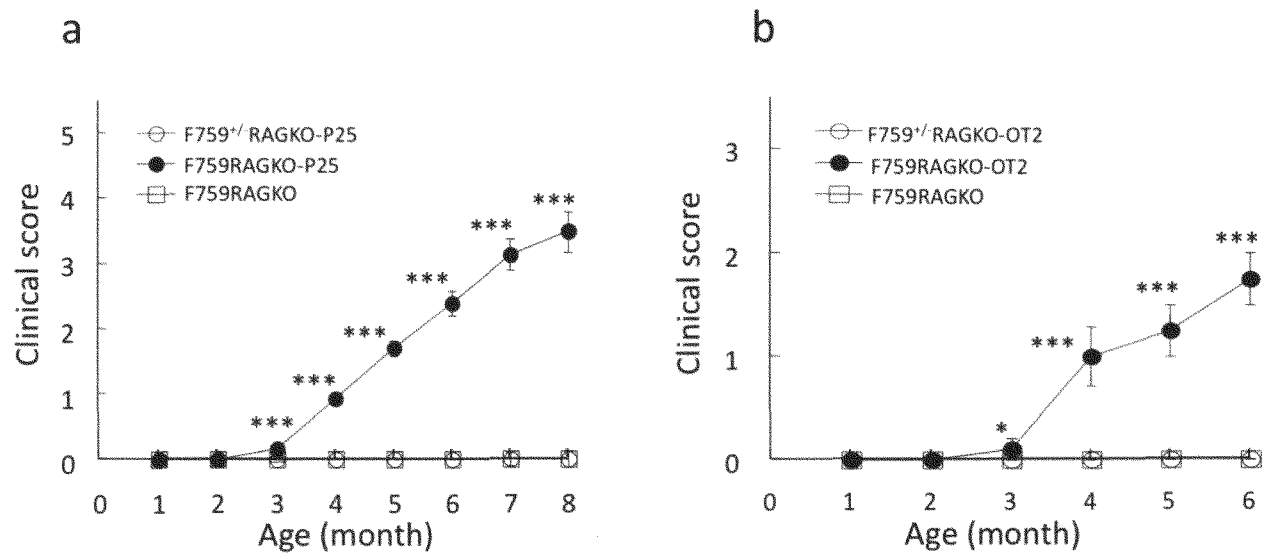


図. 1 関節非特異的外来抗原に対する単一の TCR を発現する F759 マウスは関節炎を発症する

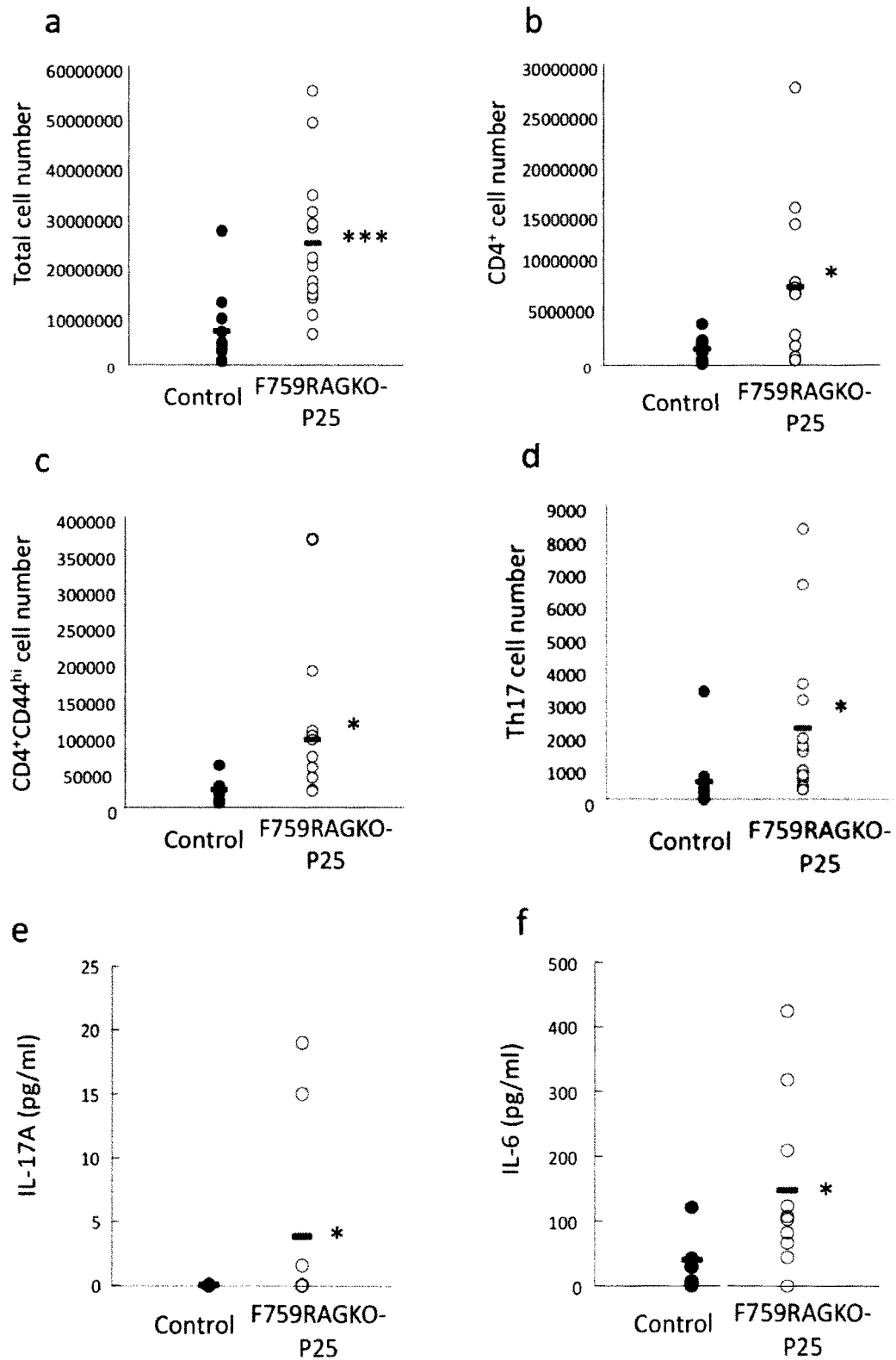


図. 2 関節非特異的外来抗原に対する単一のTCRを発現するF759マウスではTh17細胞分化の恒常的促進が見られる

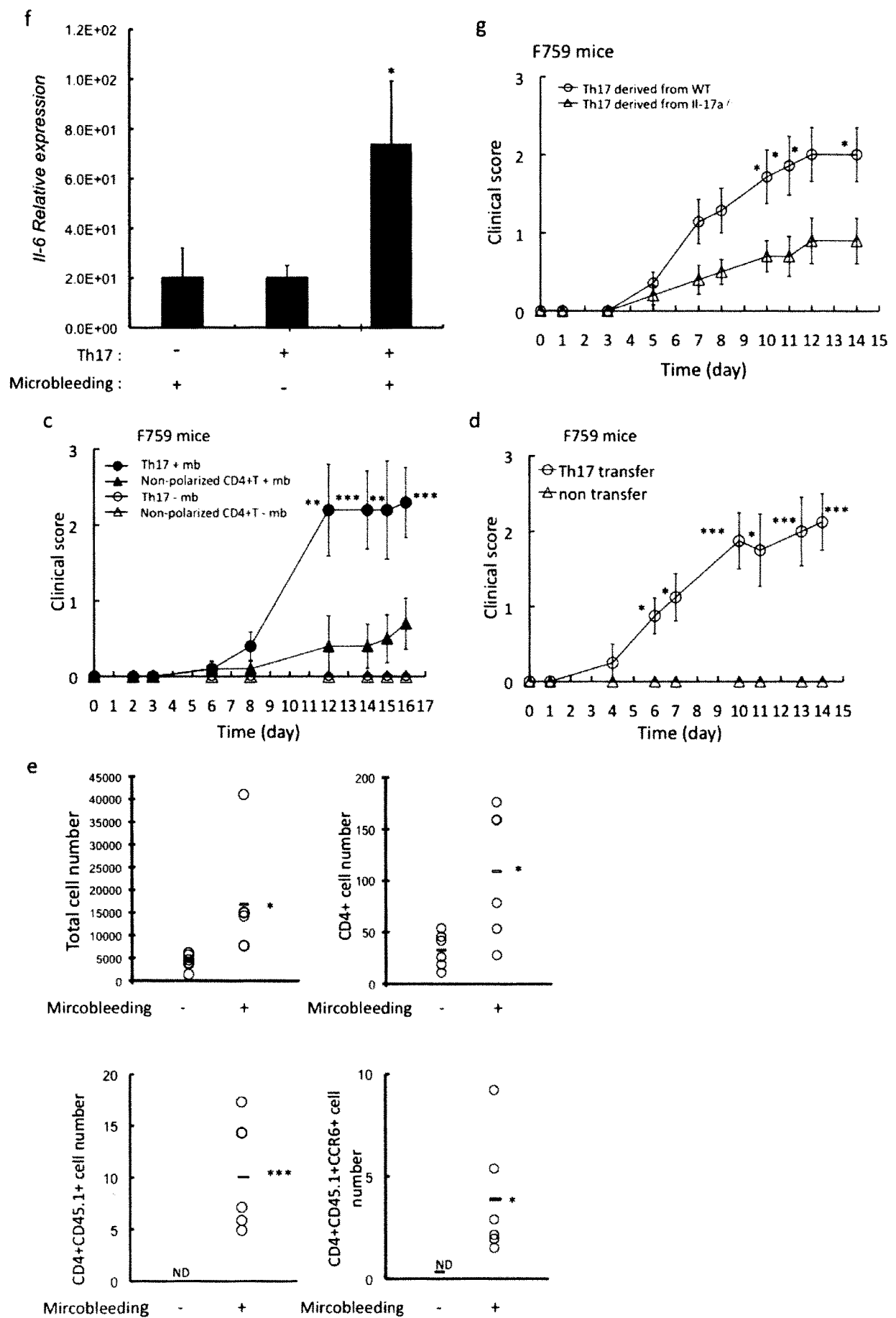


図. 3. a-e 微小出血は F759 マウス関節炎発症に寄与する

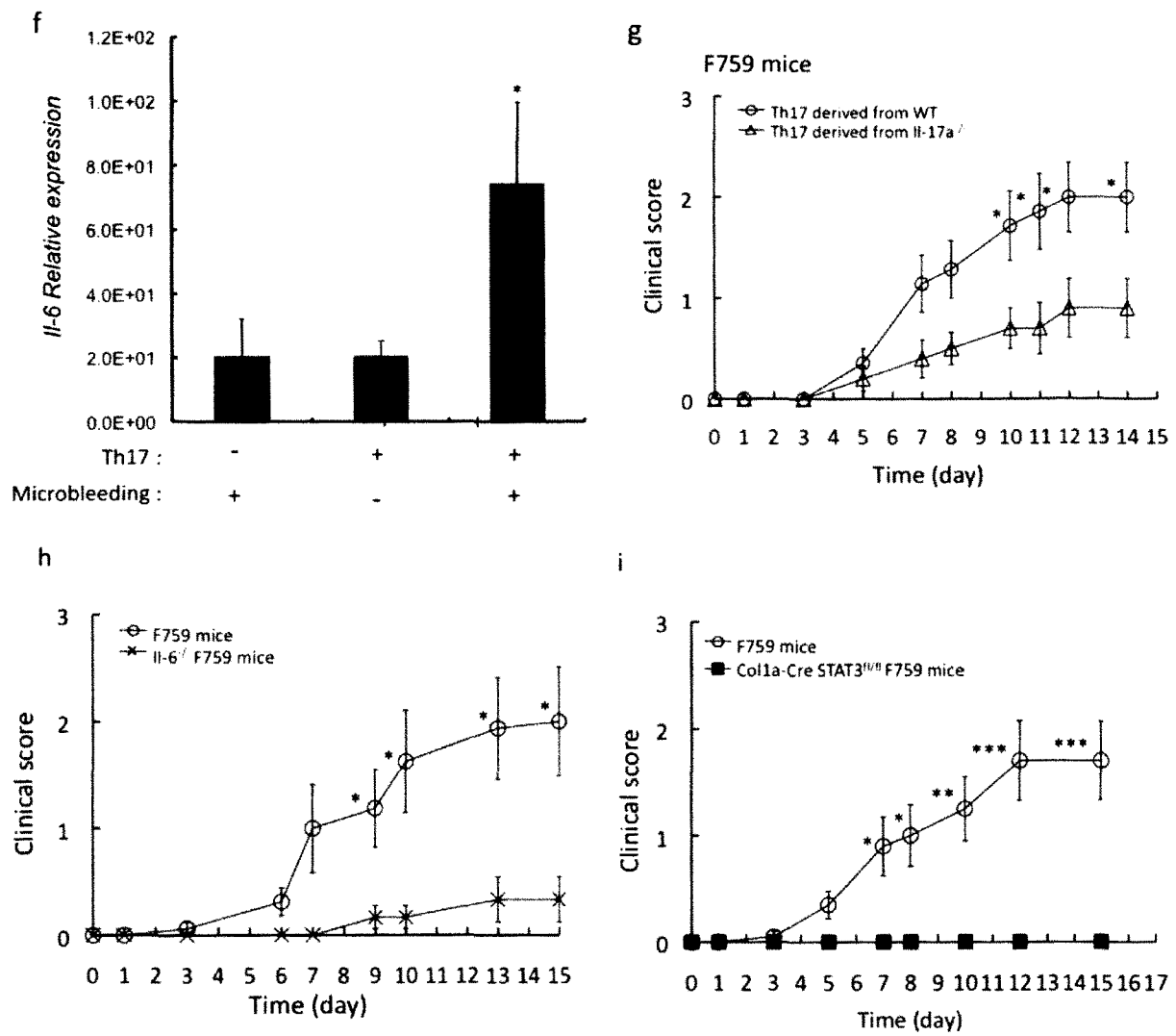


図.3. f-i 微小出血は F759 マウス関節炎発症に寄与する

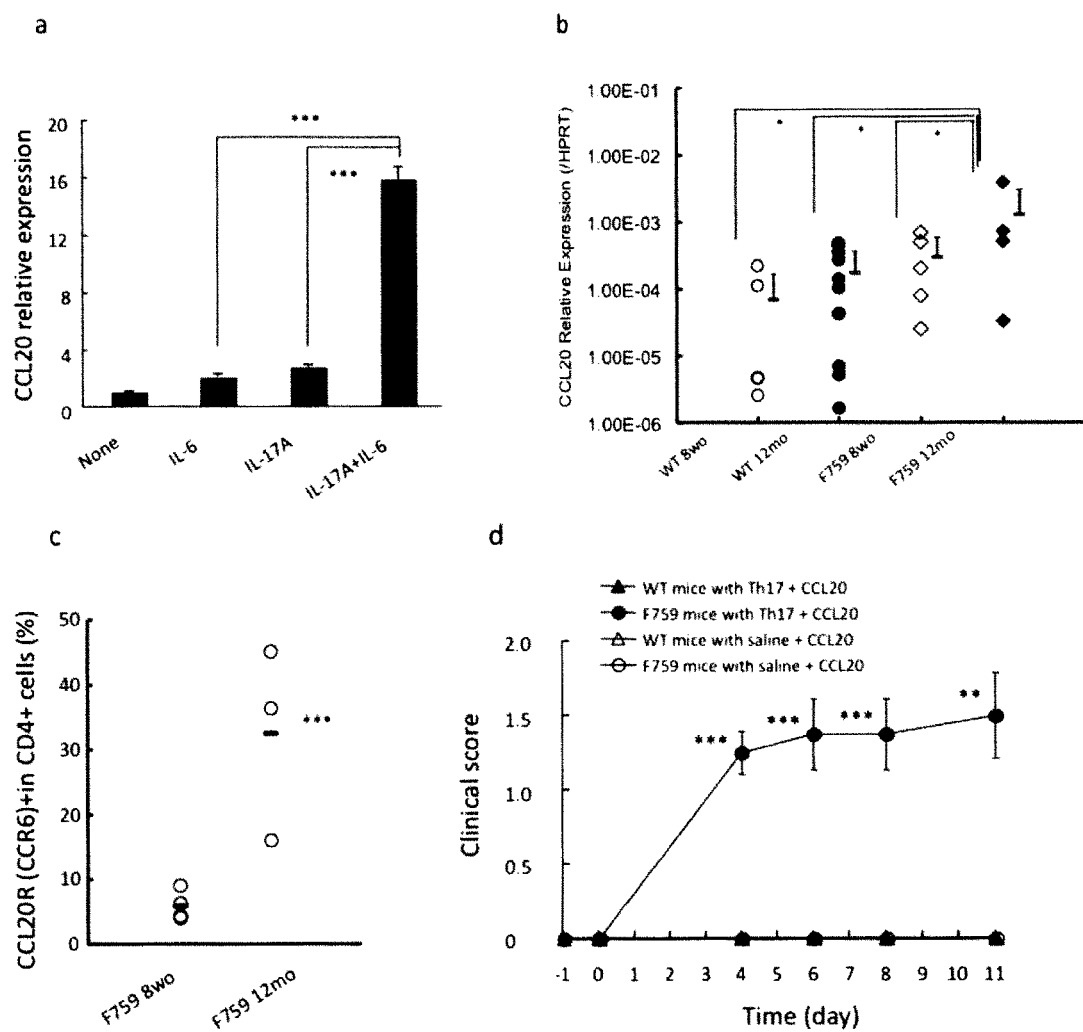


図. 4. a-d CCL20 は F759 マウス関節炎発症に寄与する

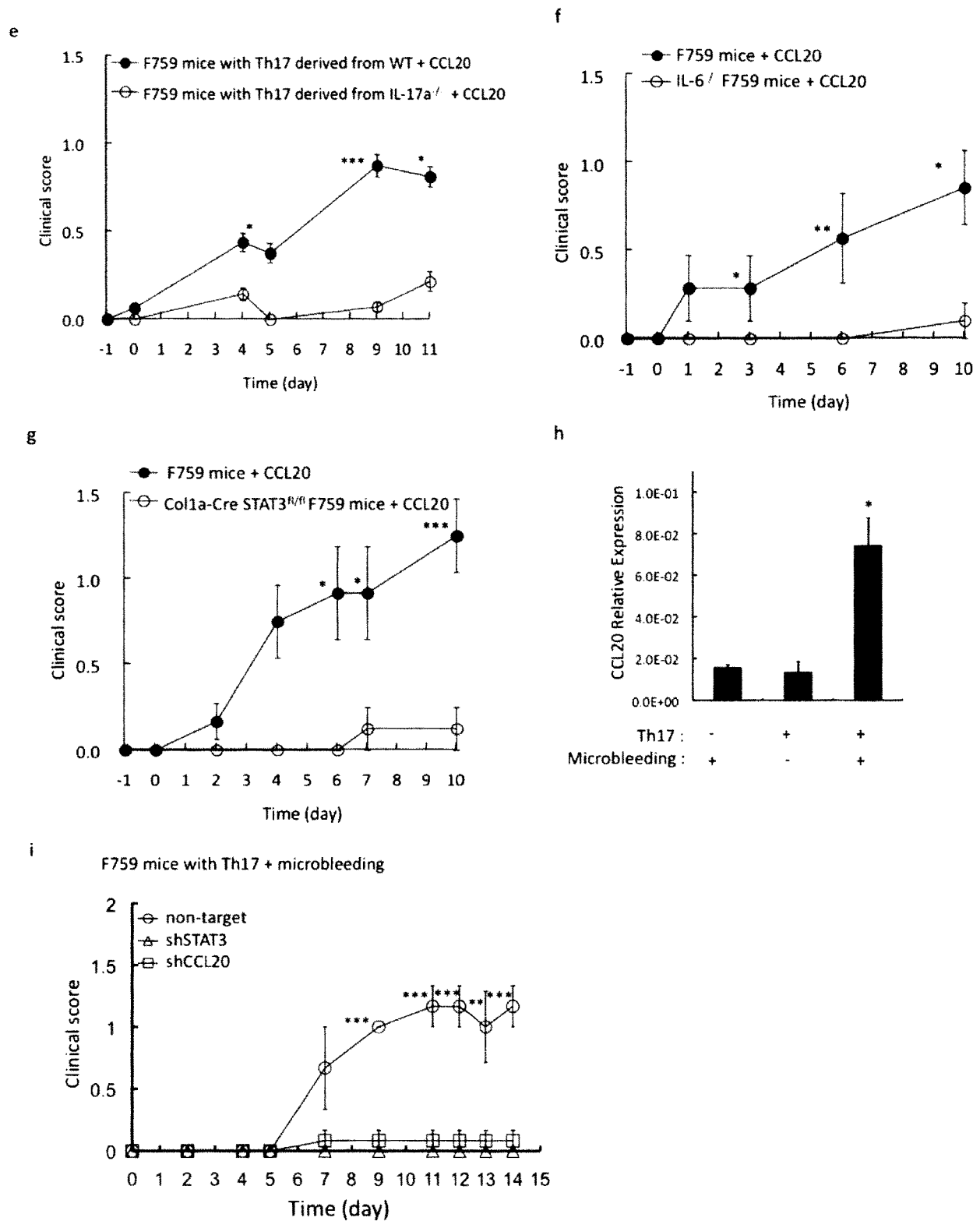


図.4. e-i CCL20 は F759 マウス関節炎発症に寄与する

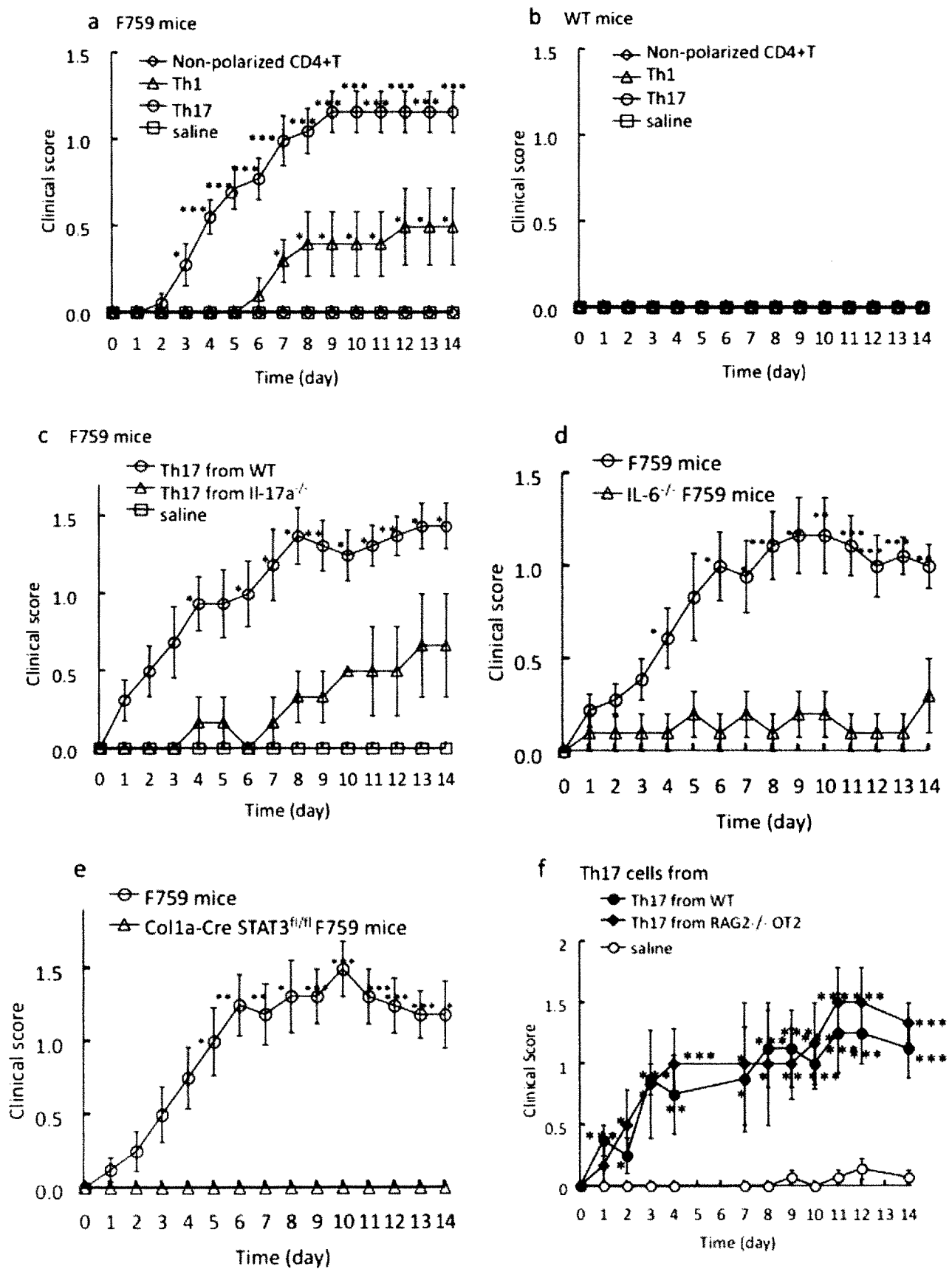


図.5 Th17細胞を介したIL-6 Amp活性化亢進はF759 マウス関節炎発症に必須である

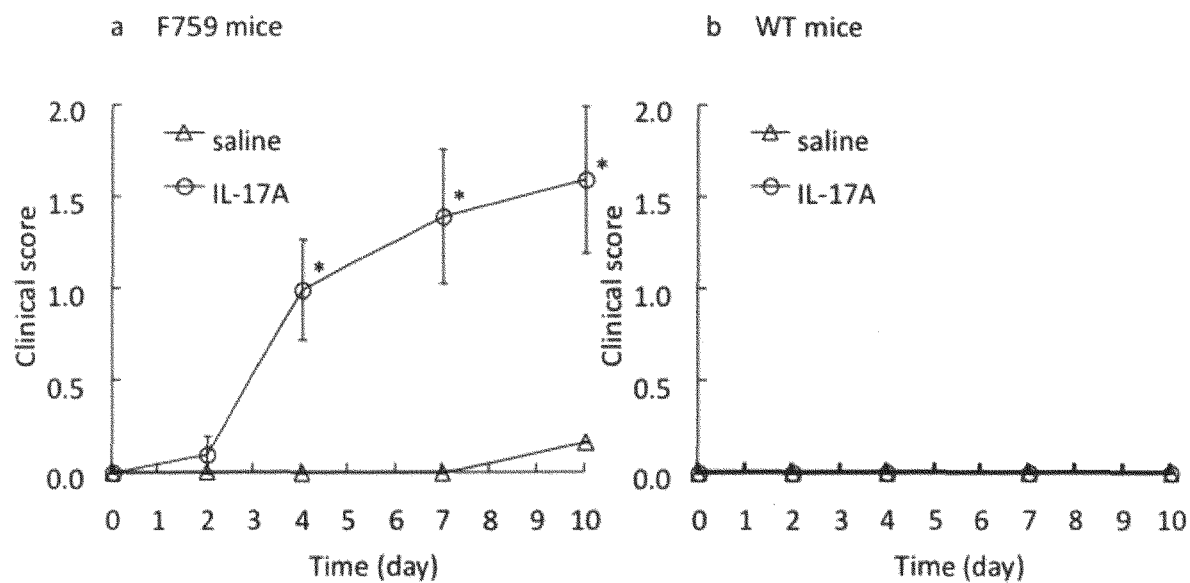


図. 6 F759 マウスにおいて IL-17A 関節腔内投与により関節炎が誘導される

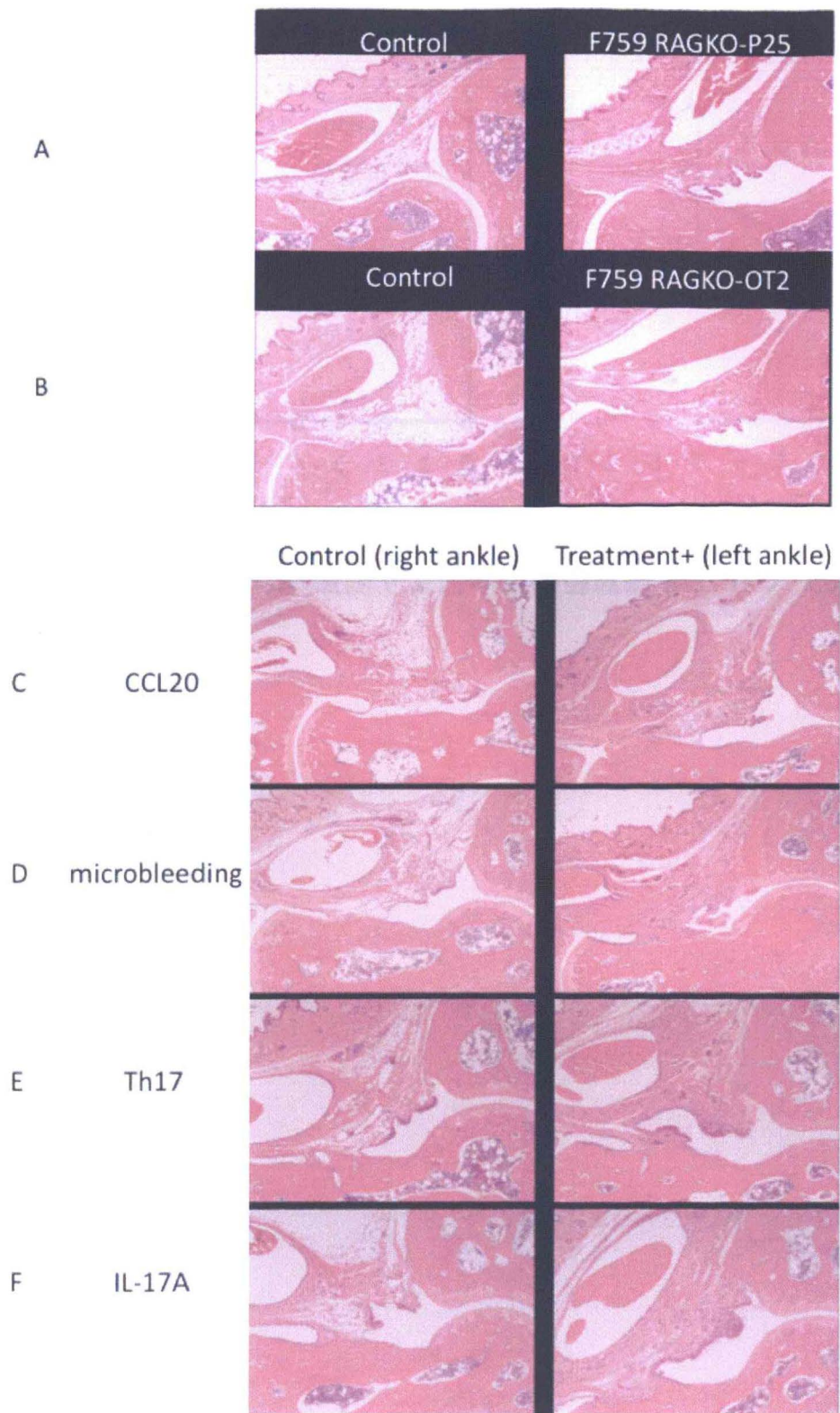
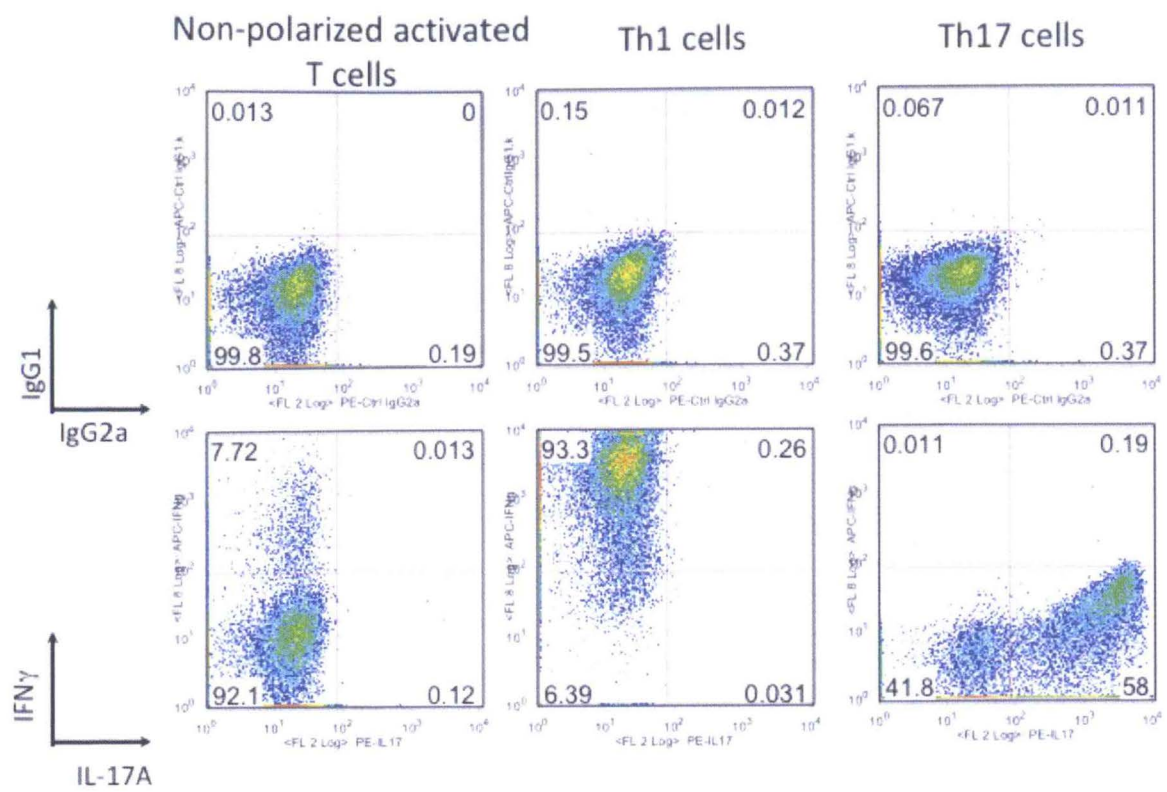


图.S1



☒.S2

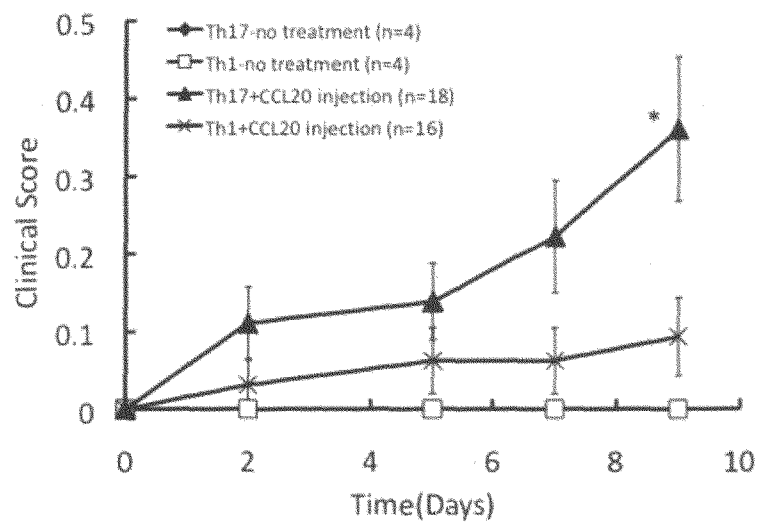
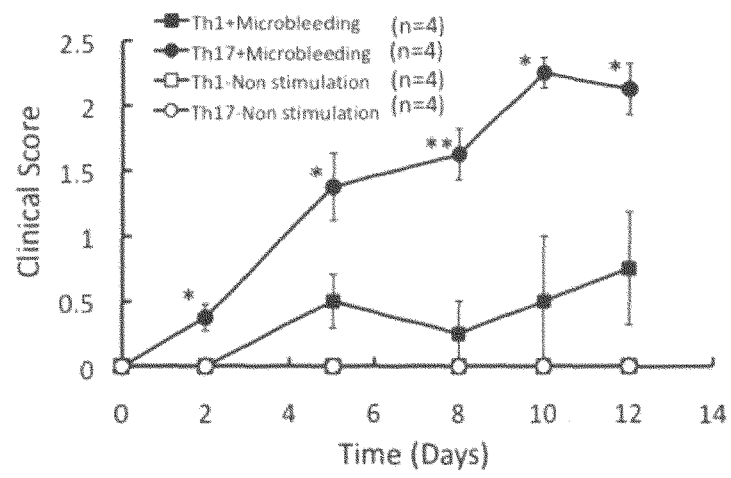


图.S3

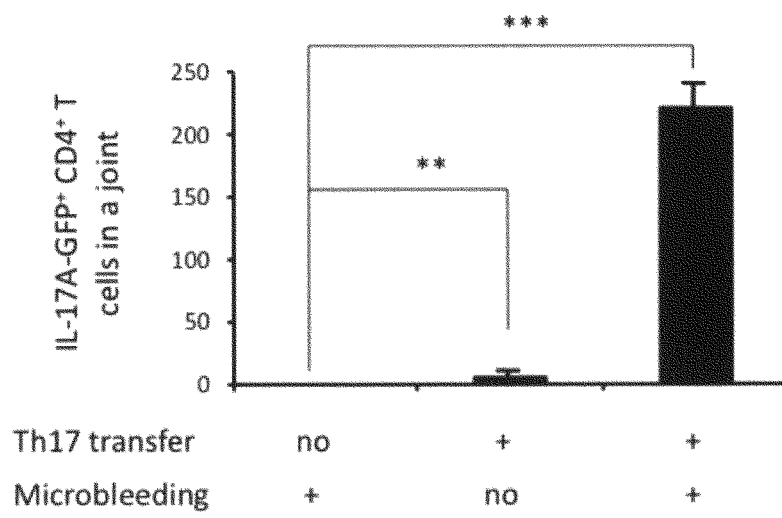


图.S4

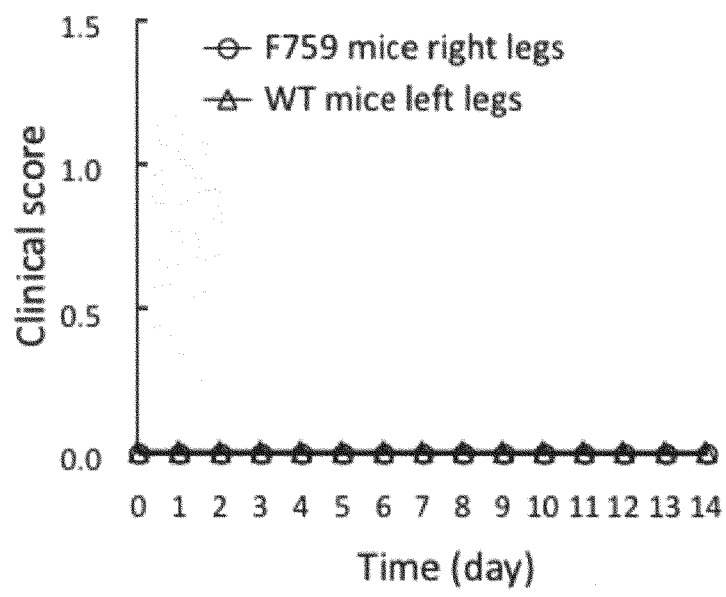


图.S5

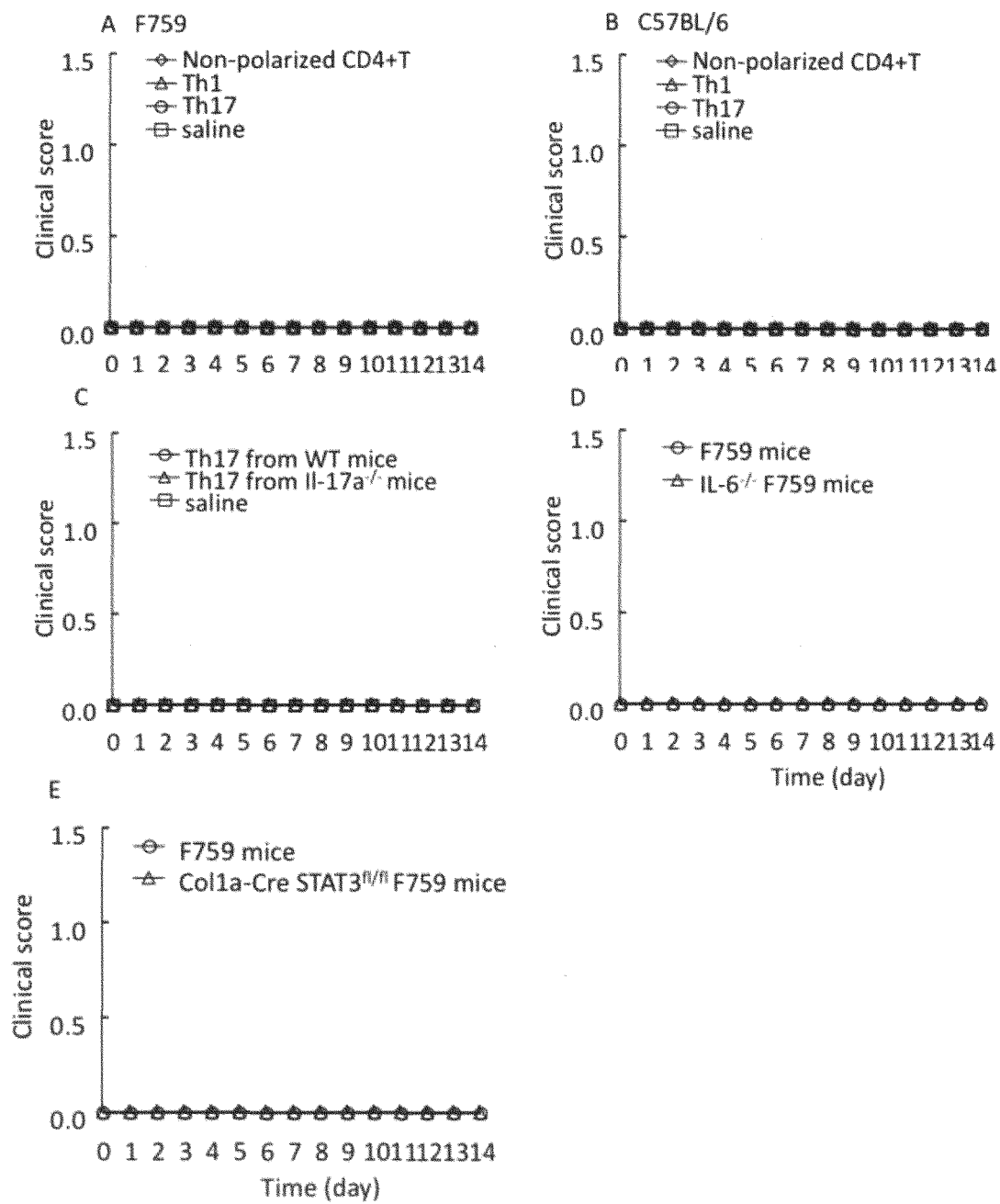


图.S6

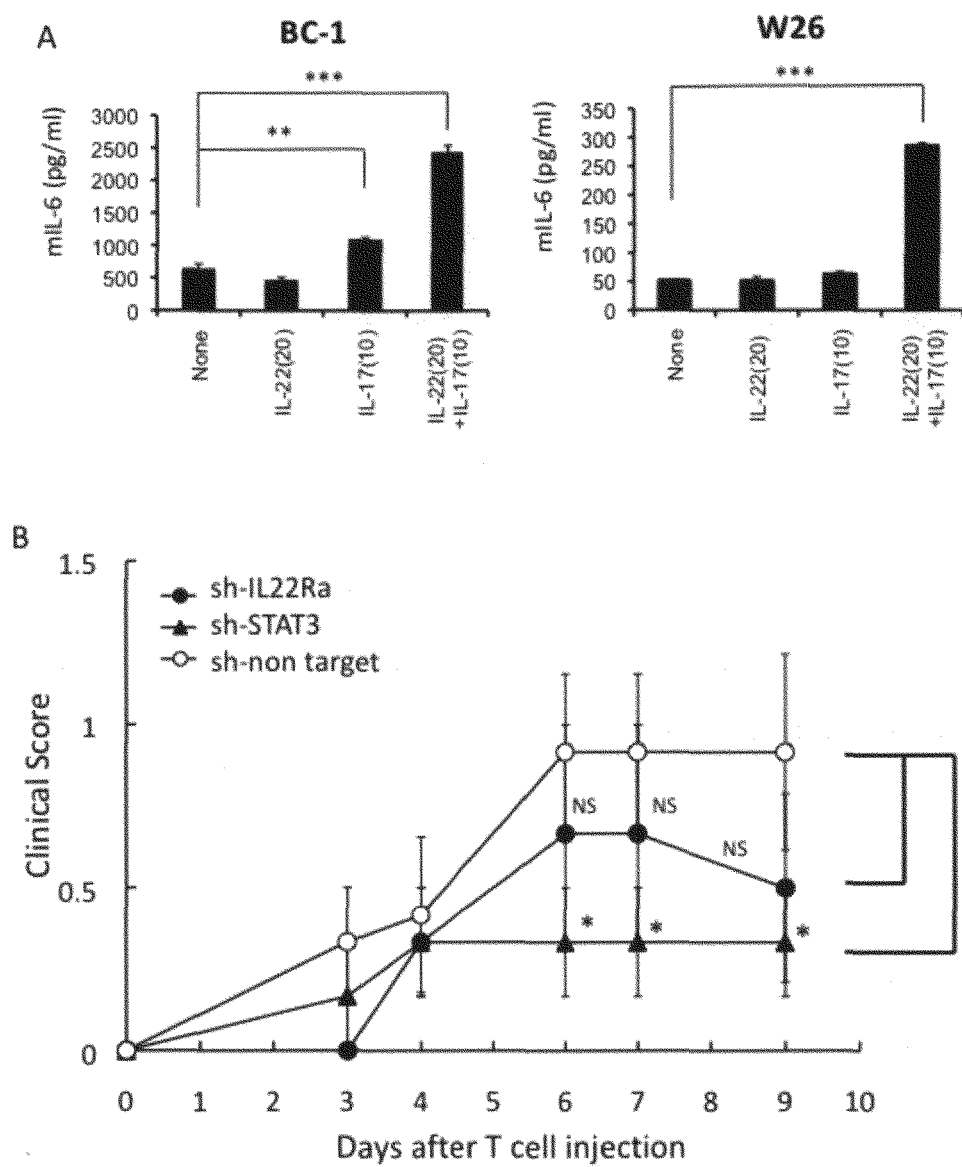


图.S7

謝辞

IL-6 ノックアウトマウスを提供してくださった M. Kopf 氏 (Max-Planck-Institute of Immunobiology, Germany) 、Type I collagen Cre マウス を提供してくださった G. Karsenty 氏(Baylor College of Medicine, Houston, TX) STAT3^{flox/flox} マウスを提供してくださった 審良静男氏(Osaka University, Japan) 、C57BL/6 OT2 TCR トランスジェニックマウス を提供してくださった W. R. Heath 氏 (University of Melbourne, Australia)、関節微小出血につき重要な議論をしてくださった Jordan 氏 (Cincinnati Children's Hospital, Cincinnati, OH) に深く感謝致します。

本研究の実験補佐に従事された優秀な技術補佐員の皆さん、池谷さん、林さん、Deng さん、蔣菁菁さん、奥山梓さん、熊井乃里子さん、秘書の増田涼子さん、TCRTg-RAG2⁺-F759 マウス系統の樹立に尽力された澤新一郎さん、西原三佳さん、Jin さんに深く感謝致します。

本研究の実施および論文執筆にあたって暖かく貴重なご指導をくださった平野俊夫教授、村上正晃准教授、助教の上村大輔先生、ポスドクの澤幸久先生、熱海徹先生をはじめ、生命機能研究科免疫発生学研究室、医学系研究科腫瘍病理学教室の皆様、理研 RCAI サイトカイン制御研究グループの皆様に深謝致します。

また本研究において、実際の実験および解析に携わり共同で研究を進めてきた助教の小椋英樹先生、大学院生の浅野省吾さん、金本實さん、原田誠也さん、有馬康伸さんに心より感謝致します。

参考文献

- Aledort, L.M., R.H. Haschmeyer, and H. Pettersson. 1994. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. *J Intern Med.* 236:391-399.
- Andersson, I.E., T. Batsalova, B. Dzhambazov, L. Edvinsson, R. Holmdahl, J. Kihlberg, and A. Linusson. 2010. Oxazole-modified glycopeptides that target arthritis-associated class II MHC A(q) and DR4 proteins. *Org Biomol Chem.* 8:2931-2940.
- Atsumi, T., K. Ishihara, D. Kamimura, H. Ikushima, T. Ohtani, S. Hirota, H. Kobayashi, S. Park, Y. Saeki, Y. Kitamura, and T. Hirano. 2002. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med.* 196:979-90.
- Awasthi, A., and V.K. Kuchroo. 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol.* 21:489-498.
- Bettelli, E., M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.*:345-350.
- Bianchi, M.E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 81:1-5.
- Chapuy-Regaud, S., M. Sebbag, D. Baeten, C. Clavel, C. Foulquier, F. De Keyser, and G. Serre. 2005. Fibrin deimination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitides. *J Immunol.* . 174:5057-5064.
- Cherwinski, H.M., J.H. Schumacher, K.D. Brown, and T.R. Mosmann. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med.* . 166:1229-1244.
- Compagno, M., W.K. Lim, A. Grunn, S.V. Nandula, M. Brahmachary, Q. Shen, F. Bertoni, M. Ponzoni, M. Scandurra, A. Califano, G. Bhagat, A. Chadburn, R. Dalla-Favera, and i.L. Pasqualucc. 2009. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 459:717-721.
- Constant, S.L., and K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol.* . 166:297-322.
- Cua, D.J., J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S.A. Lira, D. Gorman, R.A. Kastelein, and J.D. Sedgwick. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 421:744-748.

- Elsaid, K.A., and C.O. Chichester. 2006. Collagen markers in early arthritic diseases. *Clin Chim Acta*. . 365:68-77.
- Falgarone, G., L. Semerano, S. Rullé, and M.C. Boissier. 2009. Targeting lymphocyte activation to treat rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. Epub ahead of print.
- Feldmann, M., and R.N. Maini. 2001. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*. . 19:163-196.
- Glimcher, L.H., and K.M. Murphy. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*. 14:1693-1711.
- Gudmundsdottir, H., and L.A. Turka. 2001. A Closer Look at Homeostatic Proliferation of CD4+ T Cells: Costimulatory Requirements and Role in Memory Formation. *J Immunol*. 167:3699-3707.
- Hakobyan, N., C. Enockson, A.A. Cole, D.R. Sumner, and L.A. Valentino. 2008. Experimental haemophilic arthropathy in a mouse model of a massive haemarthrosis: gross, radiological and histological changes. *Haemophilia*. 14:804-809.
- Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. . 6:1123-1132.
- Hasler, P., and M. Zouali. 2005. Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol*. 233:102-108.
- Hirano, T. 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol*. 16:249-84.
- Hirano, T. 2010. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*. . 86:717-730.
- Hirota, K., H. Yoshitomi, M. Hashimoto, S. Maeda, S. Teradaira, N. Sugimoto, T. Yamaguchi, T. Nomura, H. Ito, T. Nakamura, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 2007. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*. . 204:2803-2812.
- Imboden, J.B. 2009. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol*. 4:417-434.
- Ishihara, K., S. Sawa, H. Ikushima, S. Hirota, T. Atsumi, D. Kamimura, S. Park, M. Murakami, Y. Kitamura, Y. Iwakura, and T. Hirano. 2004. The point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor gp130 synergizes with HTLV-1 pX in promoting rheumatoid arthritis-like arthritis. *Int Immunol*. 16:455-65.
- Iwakura, Y., and H. Ishigame. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*. 116:1218-1222.
- Iwakura, Y., M. Tosu, E. Yoshida, M. Takiguchi, K. Sato, I. Kitajima, K. Nishioka, K.

- Yamamoto, T. Takeda, M. Hatanaka, H. Yamamoto, and T. Sekiguchi. 1991. Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-I. *Science*. 253:1026-1028.
- Jang, E., H.R. Kim, S.H. Cho, D.J. Paik, J.M. Kim, S.G. Lee, and J. Youn. 2006. Prevention of spontaneous arthritis by inhibiting homeostatic expansion of autoreactive CD4⁺ T cells in K/BxN mouse model. *Arthritis Rheum*. 54:492-498.
- Khiong, K., M. Murakami, C. Kitabayashi, N. Ueda, S. Sawa, A. Sakamoto, B.L. Kotzin, S.J. Rozzo, K. Ishihara, M. Verella-Garcia, J. Kappler, P. Marrack, and T. Hirano. 2007. Homeostatically proliferating CD4 T cells are involved in the pathogenesis of an Omenn syndrome murine model. *J Clin Invest*. . 117:1270-1281.
- King, C., A. Ilic, K. Koelsch, and N. Sarvetnick. 2004. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell*. 117:265-77.
- Kivity, S., N. Agmon-Levin, M. Blank, and Y. Shoenfeld. 2009. Infections and autoimmunity--friends or foes? *Trends Immunol*. . 30:409-414.
- Larbi, A., T. Fülöp, and G. Pawelec. 2008. Immune receptor signaling, aging and autoimmunity. *Adv Exp Med Biol*. 640:312-324.
- Lenz, G., R.E. Davis, V.N. Ngo, L. Lam, T.C. George, G.W. Wright, S.S. Dave, H. Zhao, W. Xu, A. Rosenwald, G. Ott, H.K. Muller-Hermelink, R.D. Gascoyne, J.M. Connors, L.M. Rimsza, E. Campo, E.S. Jaffe, J. Delabie, E.B. Smeland, R.I. Fisher, W.C. Chan, and L.M. Staudt. 2008. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 319:1676-1679.
- Maffia, P., J.M. Brewer, J.A. Gracie, A. Ianaro, B.P. Leung, P.J. Mitchell, K.M. Smith, I.B. McInnes, and P. Garside. 2004. Inducing experimental arthritis and breaking self-tolerance to joint-specific antigens with trackable, ovalbumin-specific T cells. *J Immunol*. 173:151-156.
- Manco-Johnson, M.J., T.C. Abshire, A.D. Shapiro, B. Riske, M.R. Hacker, R. Kilcoyne, J.D. Ingram, M.L. Manco-Johnson, S. Funk, L. Jacobson, L.A. Valentino, W.K. Hoots, G.R. Buchanan, D. DiMichele, M. Recht, D. Brown, C. Leissinger, S. Bleak, A. Cohen, P. Mathew, A. Matsunaga, D. Medeiros, D. Nugent, G.A. Thomas, A.A. Thompson, K. McRedmond, J.M. Soucie, H. Austin, and B.L. Evatt. 2007. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med*. 357:535-544.
- Marrack, P., J. Kappler, and B. Kotzin. 2001. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med*. 7:899-905.
- Mathis, D., and C. Benoist. 2004. Back to central tolerance. *Immunity*. 20:509-516.
- Matsumoto, I., A. Staub, C. Benoist, and D. Mathis. 1999. Arthritis Provoked by Linked T and B Cell Recognition of a Glycolytic Enzyme. *Science*. 286:1732-1735.
- Minegishi, Y., M. Saito, S. Tsuchiya, I. Tsuge, H. Takada, T. Hara, N. Kawamura, T.

- Ariga, S. Pasic, O. Stojkovic, A. Metin, and H. Karasuyama. 2007. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*. 448:1058-1062.
- Mocci, S., K. Lafferty, and M. Howard. 2000. The role of autoantigens in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*. 12:725-730.
- Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol*. 7:145-173.
- Münz, C., J.D. Lünemann, M.T. Getts, and S.D. Miller. 2009. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol*. . 9:246-258.
- Muromoto, R., O. Ikeda, K. Okabe, S. Togi, S. Kamitani, M. Fujimuro, S. Harada, K. Oritani, and T. Matsuda. 2009. Epstein-Barr virus-derived EBNA2 regulates STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. . 378:439-443.
- Nakagawa, T., M. Tsuruoka, H. Ogura, Y. Okuyama, Y. Arima, T. Hirano, and M. Murakami. 2010. IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo. *Int Immunol*. 22:129-139.
- Nickdel, M.B., P. Conigliaro, G. Valesini, S. Hutchison, R. Benson, R.V. Bundick, A.J. Leishman, I.B. McInnes, J.M. Brewer, and P. Garside. 2009. Dissecting the contribution of innate and antigen-specific pathways to the breach of self-tolerance observed in a murine model of arthritis. *Ann Rheum Dis*. 68:1059-1066.
- Nishihara, M., H. Ogura, N. Ueda, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, F. Tsuji, H. Aono, K. Ishihara, E. Huseby, U.A. Betz, M. Murakami, and T. Hirano. 2007. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol*. 19:695-702.
- Nishimoto, N., and T. Kishimoto. 2004. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 4:386-391.
- O'Shea, J.J., A. Ma, and P. Lipsky. 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2:37-45.
- Ogura, H., M. Murakami, Y. Okuyama, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, M. Kanamoto, M. Nishihara, Y. Iwakura, and T. Hirano. 2008. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. 29:628-636.
- Ohtani, T., K. Ishihara, T. Atsumi, K. Nishida, Y. Kaneko, T. Miyata, S. Itoh, M. Narimatsu, H. Maeda, T. Fukada, M. Itoh, H. Okano, M. Hibi and T. Hirano. 2000. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: Reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity*. 12:95-105.
- Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z.

- Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 6:1133-1141.
- Polgár, A., A. Falus, E. Koó, I. Ujfalussy, M. Seszták, I. Szuts, K. Konrád, L. Hodinka, E. Bene, G. Mészáros, Z. Ortutay, E. Farkas, A. Paksy, and E.I. Buzás. 2003. Elevated levels of synovial fluid antibodies reactive with the small proteoglycans biglycan and decorin in patients with rheumatoid arthritis or other joint diseases. *Rheumatology (Oxford).* . 42:522-527.
- Rebouissou, S., M. Amessou, G. Couchy, K. Poussin, S. Imbeaud, C. Pilati, T. Izard, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage, and J. Zucman-Rossi. 2009. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature.* 457:200-204.
- Sakaguchi, S., and N. Sakaguchi. 2005. Animal model of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 17:589-594.
- Sawa, S., D. Kamimura, G.H. Jin, H. Morikawa, H. Kamon, M. Nishihara, K. Ishihara, M. Murakami, and T. Hirano. 2006. Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. *J Exp Med.* . 12:1459-1470.
- Sims, G.P., D.C. Rowe, S.T. Rietdijk, R. Herbst, and A.J. Coyle. 2010. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol.* 24:267-388.
- Skapenko, A., J. Leipe, P.E. Lipsky, and H. Schulze-Koops. 2005. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther.* 7:S4-14.
- Steinman, L. 2001. Multiple sclerosis: A two-stage disease. *Nat Immunol.* . 2:762-765.
- Surh, C.D., and J. Sprent. 2000. Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? *J Exp Med.* . 192:F9-F14.
- Takeda, K., T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto, and S. Akira. 1998. Stat3 Activation Is Responsible for IL-6-Dependent T Cell Proliferation Through Preventing Apoptosis: Generation and Characterization of T Cell-Specific Stat3-Deficient Mice. *The Journal of Immunology.* 161:4652-4660.
- Takizawa, Y., A. Suzuki, T. Sawada, M. Ohsaka, T. Inoue, R. Yamada, and K. Yamamoto. 2006. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 65:1013-1020.
- Tamura, T., H. Ariga, T. Kinashi, S. Uehara, T. Kikuchi, M. Nakada, T. Tokunaga, W. Xu, A. Kariyone, T. Saito, T. Kitamura, G. Maxwell, S. Takaki, and K. Takatsu. 2004. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int Immunol* 16:1691-1699.
- Uchiyama, T. 1997. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu Rev Immunol.* 15:15-37.
- Van Steendam, K., K. Tilleman, M. De Ceuleneer, F. De Keyser, D. Elewaut, and D. Deforce. 2010. Citrullinated vimentin as an important antigen in immune

- complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins. *Arthritis Res Ther.* . 12:R132.
- Veldhoen, M., R. Hocking, C. Atkins, R. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGF in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 24:179-189.
- Williams, I.R. 2006. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* . 1072:52-61.
- Williams, M.A., E.V. Ravkov, and M.J. Bevan. 2008. Rapid Culling of the CD4+ T Cell Repertoire in the Transition from Effector to Memory. *Immunity.* . 28:533-545.
- Yoshida, T., T. Hanada, T. Tokuhisa, K. Kosai, M. Sata, M. Kohara, and A. Yoshimura. 2002. Activation of STAT3 by the Hepatitis C Virus Core Protein Leads to Cellular Transformation. *J Exp Med.* 196:641-653.
- Zhang, L., M. Nakayama, and G.S. Eisenbarth. 2008. Insulin as an autoantigen in NOD/human diabetes. *Curr Opin Immunol.* 20:111-118.
- Zhang, Q., M. Raoof, Y. Chen, Y. Sumi, T. Sursal, W. Junger, K. Brohi, K. Itagaki, and C.J. Hauser. 2010. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 464:104-107.
- Zhu, J., H. Yamane, J. Cote-Sierra, L. Guo, and W.E. Paul. 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 16:3-10.

業績一覧

(1) 学術雑誌

・ *Immunity* 2008 29(4) pp. 628 – 636.

#Hideki Ogura¹, #Masaaki Murakami¹, Yuko Okuyama¹, Mineko Tsuruoka, Chika Kitabayashi, Minoru Kanamoto, Mika Nishihara, Yoichiro Iwakura, Toshio Hirano. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback via Interleukin-6 Induction.

・ *Int Immunol.* 2010 Feb;22(2):129-39.

Takayuki Nakagawa , Mineko Tsuruoka , Hideki Ogura , Yuko Okuyama , Yasunobu Arima, Toshio Hirano, Masaaki Murakami.
IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells *in vivo*.

・ *The Journal of Experimental Medicine.* 2011 Jan 17;208(1):103-14.

Masaaki Murakami*, Yuko Okuyama*, Hideki Ogura*, Shogo Asano, Yasunobu Arima, Mineko Tsuruoka, Masaya Harada, Minoru Kanamoto, Yukihiisa Sawa, Yoichiro Iwakura, Kiyoshi Takatsu, Daisuke Kamimura, Toshio Hirano (*equal contribution)
Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells.

(2) 国内雑誌

・ 奥山祐子, 村上正晃. Th17 細胞の分化とサイトカインシグナル. 臨床免疫・アレルギー科 (化学評論社), 48(4) : 347-353, 2007

・ MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW (MINOPHAGEN PHARMACEUTICAL CO.LTD.), 52(3):24-26, MAY 2007 Yuko Okuyama, CD4⁺記憶T細胞生存維持の分子機構 -FOXO3a リン酸化の重要性

(3) 国内学会

・ Hideki Ogura, Yuko Okuyama, Minoru Kanamoto, Masaaki Murakami, Toshio Hirano
Antigen independent induction of a CD4⁺ T cell-dependent arthritis.

The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Work shop 2-B-W19-8-O/P.
2007.Tokyo, Japan

• Masaaki Murakami , Hideki Ogura, Yuko Okuyama, Minoru Kanamoto, , Yoichiro Iwakura , Toshio Hirano.

IL-17 derived from homeostatic proliferating memory/activated CD4+ Tcells develops arthritis in F759 mice.

The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Symposium S9-3. 2007.Tokyo, Japan

• Hideki Ogura, Masaaki Murakami, Yuko Okuyama, Mineko Tsuruoka, Chika Kitabayashi, Minoru Kanamoto, Mika Nishihara, Yoichiro Iwakura, Toshio Hirano.

IL-6 as a down stream target of IL-17 developed an autoimmune arthritis.

The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Work shop 2-G-W29-2-O/P.2008.Kyoto,Japan.

• Masaaki Murakami , Hideki Ogura, Yuko Okuyama, Mineko Tsuruoka , Mika Nishihara, Yoichiro Iwakura, Toshio Hirano.

An IL-17-triggerd positive feedback loop of IL-6 signaling in autoimmune diseases.

The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Symposium S8-5. 2008.Kyoto,Japan.

• Masaaki Murakami , Hideki Ogura, Yuko Okuyama, Mineko Tsuruoka , Mika Nishihara, Yoichiro Iwakura, Toshio Hirano.

An IL-17-triggerd positive feedback loop of IL-6 signaling in autoimmune diseases.

The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Symposium S8-5. 2009.Osaka,Japan.

• Hideki Ogura, Yuko Okuyama, Minoru Kanamoto, Yasunobu Arima , Mineko Tsuruoka , Shogo Asano , Daisuke Kamimura , Yoichiro Iwakura, Masaaki Murakami, Toshio Hirano. Specific antigen recognitions by activated CD4+T cells are not necessary for the development of a MHC class II-associated arthritis.

The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Work shop 2-H-W36-8-O/P.2009.Osaka,Japan.

• Shogo Asano , Yuko Okuyama, Yasunobu Arima , Mineko Tsuruoka, Masaya Harada , Yoichiro Iwakura, Hideki Ogura, Masaaki Murakami, Toshio Hirano.

Activation of “IL-6 amplify loop” at ankle joint is important for the development of F759-Arthritis.

The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Work shop

2-H-W36-7-O/P.2009.Osaka,Japan.

- Mineko Tsuruoka , Takayuki Nakagawa , Daisuke Kamimura , Hideki Ogura, Yuko Okuyama, Yasunobu Arima ,, Toshio Hirano , Masaaki Murakami.

FoxP3+CD8+Tcells inhibit the development of F759 arthritis.

The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Work shop

2-C-W25-3-O/P.2009.Osaka,Japan.