

令和元年5月22日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09897

研究課題名(和文) 新規細胞系列 ILCs の関節リウマチ発症・進展における役割の解明

研究課題名(英文) The role of ILCs in the development of rheumatoid arthritis

研究代表者

有信 洋二郎 (Arinobu, Yojiro)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：90467928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：自然リンパ球(ILC)は、慢性炎症の惹起や自己免疫疾患の発症において機能することが明らかになりつつある。しかし、関節リウマチの発症進展における役割は不明である。本研究において我々は、関節炎モデルマウスの関節において、CCR6+ILC3が増加しており、このCCR6+ILC3ではIL-17A及びIL-22の発現が亢進していることを見出した。ヒト関節リウマチ患者においては、滑液中のCCR6+ILC3の割合と疼痛関節、腫脹関節に正の相関を認めた。これらの結果から、CCR6+ILC3は、IL-17、IL-22の産生を介して、関節リウマチの発症進展に関与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、関節リウマチの治療成績は飛躍的に改善したが、未だ臨床的寛解に到達できず、関節破壊が進行する症例が少なからず存在する。この理由の一つに、未だ解明できていない病態があり、その制御が不十分な可能性がある。今回我々は、新規細胞系列であるILCに着目した。この細胞系列は、ヘルパーT細胞に非常に類似した機能を有している。本研究にて、関節炎発症においてCCR6+ILC3が関与している可能性が新たに示唆された。これにより、関節リウマチの病態の理解が進むだけでなく、関節リウマチの新たな治療戦略構築にも役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies show that Innate Lymphoid Cells (ILCs) contribute to development of chronic inflammation and autoimmune disease. In this study, we assessed ILC function in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). In the mouse of collagen-induced arthritis (CIA), the proportion of CCR6+ ILC3s to total ILCs in joints with active inflammation significantly increased relative to non-arthritic joints (median 29.6% vs 16.7%,  $p=0.035$ ). CCR6+ ILC3s from mice with arthritis expressed significantly higher levels of IL-17A and IL-22 mRNA than did comparable cells from control mice ( $p < 0.0001$  and  $p=0.015$ ). In RA patients, relatively high levels of CCR6+ ILC3s in SF were positively correlated with tender joint count (TJC) and swollen joint count (SJC) ( $r=0.689$ ,  $p=0.0032$  and  $r=0.644$ ,  $p=0.0071$  respectively). These data suggest that CCR6+ ILC3s are positively associated with RA development through production of IL-17 and IL-22.

研究分野：リウマチ膠原病学、臨床免疫学

キーワード：関節リウマチ 自然リンパ球 Th17サイトカイン CCR6

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、リンパ球系細胞であるにもかかわらず、T・B細胞受容体を発現していない細胞集団として自然リンパ球 (innate lymphoid cell; ILC) が同定され、ILC1,2,3に分類された。これらの細胞はヘルパーT細胞に類似した高いサイトカイン産生能を有し、ILC1とクローン病、ILC2と気管支喘息、ILC3と乾癬や脊椎関節炎というように、様々な炎症性疾患の病態形成に関与することが報告された。しかし、自己免疫疾患の代表である関節リウマチにおけるILCの役割については、未だ不明のままである。

2. 研究の目的

今回我々は、関節リウマチの病態形成におけるILCの役割の解明を目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

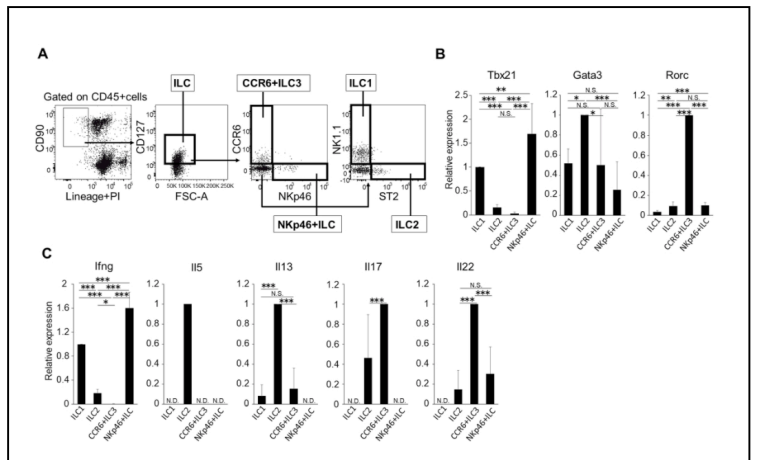
- ・野生型マウスにおけるILCの同定・単離法の確立
- ・コラーゲン誘導性関節炎 (collagen-induced arthritis; CIA)モデルマウスにおけるILCの量的、質的検討 (局在、細胞数、サイトカイン産生能)
- ・関節リウマチ患者の滑液におけるILCの検討
- ・関節リウマチ患者ILCと臨床パラメーターの相関の検討

4. 研究成果

(1) 野生型マウスにおけるILC1,2,3の同定・単離法の確立

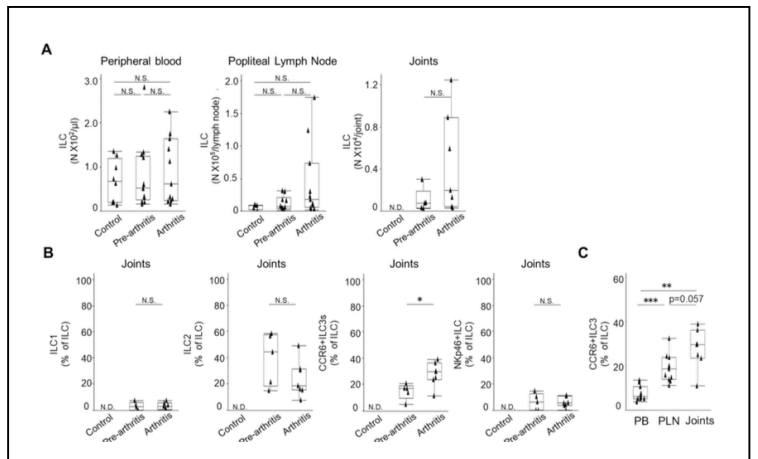
C57BL/6マウスの脾臓細胞を用い、表面マーカーを用いたILC1,2,3の同定・単離を試みた (右図A)。同定・単離した各分画は、それぞれに特異的なマスター転写因子

(ILC1:Tbx21, ILC2:Gata3, ILC3:Rorc) (右図B)、及びそれぞれに特異的なサイトカイン (ILC1:IFN- $\gamma$ , ILC2:IL-5, 13, ILC3:IL-17, 22) (右図C)を発現していることから、マウスにおいてILC分画が正しく単離できていると考えた。



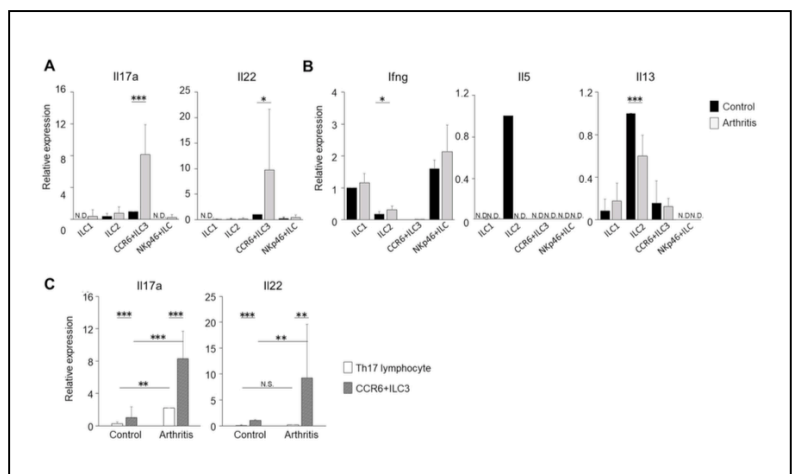
(2) CIAモデルマウスの関節局所では、CCR6+ILC3が増加している

関節炎発症過程におけるILCの役割を明らかにするために、(1)で確立した単離法を用いて、CIAモデルマウスの末梢血、膝窩リンパ節、関節におけるILCの細胞数、及び割合を検討した。関節炎モデルマウスの膝窩リンパ節、関節においてILCの絶対数が増加する傾向にあった (右図A)。ILCサブセットの検討にて、関節局所ではCCR6+ILC3の割合が有意に増加していた (右図B)。このCCR6+ILC3の割合の増加は、末梢血、膝窩リンパ節では認めないことから、関節に特異的な現象であった (右図C)。



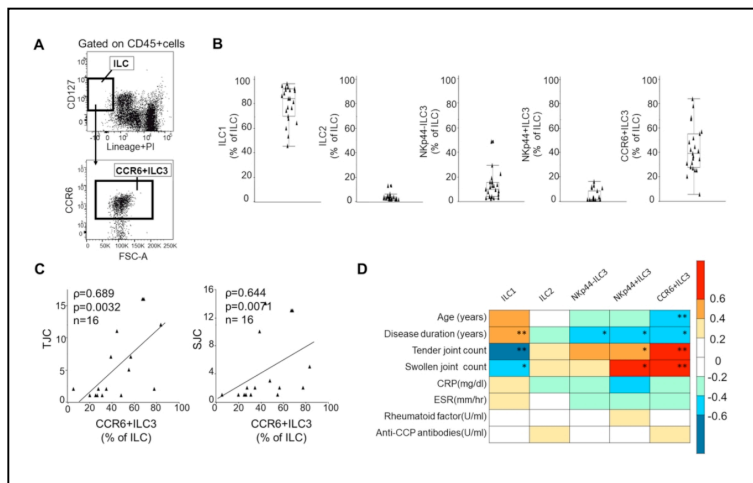
(3) CIAモデルマウスにおけるCCR6+ILC3は、IL-17A及びIL-22を高発現している

(2)で増加を認めたCCR6+ILC3に、何らかの機能変化が起きているのかを検討する為に、サイトカイン産生能を検討した。CCR6+ILC3はIL-17A及びIL-22を産生するが、この産性能は関節炎惹起により強く増強された (右図A)。このような増強は、ILC1のIFN- $\gamma$ 産生、ILC2のIL-5, 13産生には認めず (右図B)、関節炎惹起によるCCR6+ILC3のサイトカイン産生能の増強は、この分画に特異的な現象と考えた。CCR6+ILC3からのIL-17A産生能は、その代表的な産生源であるTh17リンパ球より優っていた (右図C)。



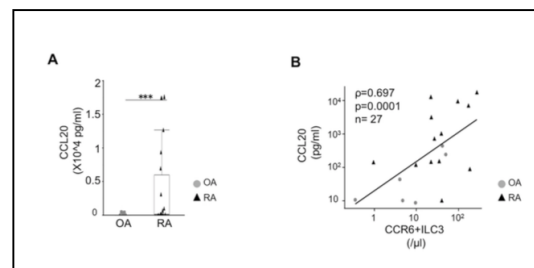
(4) 活動性の高い関節リウマチ患者滑液中の CCR6+ILC3 の割合は増加している

ヒト関節リウマチ患者においても、マウスで認めたような ILC の変化が認められかどうかを検討した。ヒト関節リウマチ患者滑液中の CCR6+ILC3 の割合は患者により大きく異なっていた(右図 B)。この滑液中の CCR6+ILC3 の割合と臨床パラメーターの相関を検討したところ、疼痛関節数と腫脹関節数に正の相関を認めた(右図 C, D)。



(5) 滑液中の CCL20 の濃度と CCR6+ILC3 数に相関を認める

CCR6 陽性細胞は、そのリガンドである CCL20 に導かれて局所に遊走する。関節液中の CCL20 濃度は、関節リウマチ患者では上昇していたが、変形性関節症患者では上昇していなかった(右図 A)。関節液中の CCL20 濃度との CCR6+ILC3 細胞数には正の相関を認めることから(右図 B)、これらの細胞は能動的に局所に集簇していると考えられた。



(6) 終わりに

今回我々は関節炎モデルマウスにおいて、ILC の中の一つの分画である CCR6+ILC3 が、関節局所に増加していることを明らかにした。この CCR6+ILC3 の IL-17A や IL-22 産性能は、関節炎惹起により増強されており、その産性能は IL-17 の主たる産生細胞である Th17 リンパ球よりも強かった。ヒト関節リウマチ患者では、一部の患者の滑液中に CCR6+ILC3 の増加を認め、この増加は疼痛関節、腫脹関節と正の相関を示した。これらの結果より、CCR6+ILC3 は関節リウマチの病態形成に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- (1). Fukui S, Kuwahara-Takaki A, Ono N, Sato S, Koga T, Kawashiri SY, Iwanaga N, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Migita K, Arinobu Y, Niino H, Tada Y, Akashi K, Maeda T, Kawakami A. Serum levels of fibroblast growth factor-2 distinguish Takayasu arteritis from giant cell arteritis independent of age at diagnosis. *Sci Rep.* 9; 688, 2019
- (2). Tada Y, Inokuchi S, Maruyama A, Suematsu R, Sakai M, Sadanaga Y, Ono N, Arinobu Y, Koarada S. Are the 2016 EULAR/ACR/PRINTO classification criteria for macrophage activation syndrome applicable to patients with adult-onset Still's disease? *Rheumatol Int.* 39; 97, 2019
- (3) Ayano M, Tsukamoto H, Mitoma H, Kimoto Y, Akahoshi M, Arinobu Y, Miyamoto T, Horiuchi T, Niino H, Nagafuji K, Harada M, Akashi K. CD34-selected versus unmanipulated autologous haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe systemic sclerosis: a post hoc analysis of a phase I/II clinical trial conducted in Japan. *Arthritis Res Ther.* 21; 30, 2019
- (4) Ueda S, Akahoshi M, Takeda A, Inoue Y, Omoto A, Ayano M, Kimoto Y, Mitoma H, Arinobu Y, Niino H, Tsukamoto H, Horiuchi T, Hikita SI, Fukuhara T, Ishibashi T, Sonoda KH, Akashi K. Long-term efficacy of infliximab treatment and the predictors of treatment outcomes in patients with refractory uveitis associated with Behçet's disease. *Eur J Rheumatol* 5; 9, 2018
- (5) Otsuka Y, Kiyohara C, Kashiwado Y, Sawabe T, Nagano S, Kimoto Y, Ayano M, Mitoma H, Akahoshi M, Arinobu Y, Niino H, Akashi K, Horiuchi T. Effects of tumor necrosis factor inhibitors and tocilizumab on the glycosylated hemoglobin levels in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 13; e0196368, 2018

(6) Nishino A, Kawashiri SY, Koga T, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Yoshitama T, Eiraku N, Matsuoka N, Okada A, Fujiwaka K, Hamada H, Tsuru T, Nagano S, Arinobu Y, Hidaka T, Kawakami A. Ultrasonographic efficacy of biologic and targeted synthetic DMARDs therapy in RA from multicenter RA ultrasound prospective cohort in Japan. *Arthritis Care Res.* 70; 1719, 2018

(7) Mizuno S, Iino T, Ozawa H, Arinobu Y, Chong Y, Akashi K. Notch1 expression is regulated at the post-transcriptional level by the 3' untranslated region in hematopoietic stem cell development. *Int J Hematol.* 107; 311, 2018

(8) Miyawaki K, Iwasaki H, Jiromaru T, Kusumoto H, Yurino A, Sugio T, Uehara Y, Odawara J, Daitoku S, Kunisaki Y, Mori Y, Arinobu Y, Tsuzuki H, Kikushige Y, Iino T, Kato K, Takenaka K, Miyamoto T, Maeda T, Akashi K. Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood* 129; 3332, 2017

(9) Tsuzuki H, Arinobu Y\*, Miyawaki K, Takaki A, Ota SI, Ota Y, Mitoma H, Akahoshi M, Mori Y, Iwasaki H, Niino H, Tsukamoto H, Akashi K. Functional interleukin-33 receptors are expressed in early progenitor stages of allergy-related granulocytes. *Immunology* 150; 64, 2017 (\* corresponding author)

[学会発表] (計 7 件)

(1) 桑原綾子、有信洋二郎、山田久方、大塚恭子、入野健佑、綾野雅宏、木本泰孝、三苫弘喜、赤星光輝、塚本浩、赤司浩一、堀内孝彦、新納宏昭。コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスの末梢組織における自然リンパ球の量的・機能的変化についての検討。第62回日本リウマチ学会総会・学術集会、2018年。

(2) 有信洋二郎、柏戸佑介、宮脇恒太、中山剛志、綾野雅宏、木本泰孝、三苫弘喜、赤星光輝、宮本敏浩、赤司浩一、堀内孝彦、新納宏昭。骨髄異形成症候群にみられる自己免疫疾患様症状の検討。第62回日本リウマチ学会総会・学術集会、2018年。

(3) 大塚恭子、桑原綾子、入野健佑、有信洋二郎、綾野雅宏、木本泰孝、三苫弘喜、赤星光輝、塚本浩、赤司浩一、堀内孝彦、新納宏昭。脊椎関節炎の診断における画像評価の有用性についての検討。第55回九州リウマチ学会、2018年。

(4) 高木綾子、有信洋二郎、大塚恭子、入野健佑、押領司大助、大田友里、久本仁美、綾野雅宏、木本泰孝、三苫弘喜、赤星光輝、塚本浩、赤司浩一、堀内孝彦、新納宏昭。コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスにおける自然リンパ球の分化と機能に関する検討。第61回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017年。

(5) 入野健佑、有信洋二郎、綾野雅宏、吾郷哲朗、芝原友也、河野正太郎、高木綾子、澤部琢哉、木本泰孝、三苫弘喜、赤星光輝、赤司浩一、堀内孝彦、新納宏昭。全身性エリテマトーデスにおける脳梗塞病変の臨床的検討。第61回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017年。

(6) Takaki A, Arinobu Y, Irino K, Tsuzuki H, Ota Y, Oryoji S, Ayano M, Kimoto Y, Mitoma H, Akahoshi M, Niino H, Tsukamoto H, Horiuchi T, Akashi K. Functional and Quantitative Changes of CCR6+ type3 Innate Lymphoid Cells in Murine Collagen-Induced Arthritis. *American College of Rheumatology 2016 Annual Meeting*, 2016.

(7) 高木綾子、有信洋二郎、入野健佑、猪口翔一郎、押領司大助、大田友里、久本仁美、綾野雅宏、木本泰孝、三苫弘喜、赤星光輝、新納宏昭、塚本浩、赤司浩一、堀内孝彦。コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスにおける自然リンパ球の検討。第44回日本臨床免疫学会、2016年。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。