

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月9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：16K10907

研究課題名(和文) 関節リウマチのCD4T細胞を中心とした炎症病態解析

研究課題名(英文) Elucidating the pathogenic roles of CD4T cells in rheumatoid arthritis

研究代表者

山田 久方 (Hisakata, Yamada)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20363369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では関節リウマチ病態におけるCD4T細胞の機能について解析を行った。臨床検体を用いた多重染色フローサイトメーター解析では、関節リウマチ関節内にIFN- γ 、IL-21、さらに近年注目されているGM-CSFを共産生する多機能エフェクターCD4T細胞が浸潤していることが明らかになった。これらは末梢血などにはほとんど存在せず、関節炎の病原性CD4T細胞である可能性が考えられた。また、マウス関節炎モデルの解析からは、自己軟骨コラーゲンに反応するCD4T細胞の、胸腺での免疫寛容機構が明らかになった。よって、人でもこの免疫寛容機構の破綻が関節炎発症を引き起こしている可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD4T細胞は関節リウマチの炎症病態において中心的な役割を果たすと考えられる。従来の研究からCD4T細胞には機能的に異なる幾つかのサブセットが存在することが知られていたが、このいずれも多彩な関節炎病態を十分に説明できなかった。本研究課題を通じて、関節リウマチ患者の関節局所には、多種の炎症性サイトカインを共産生する特殊なサブセットのCD4T細胞が存在していることが明らかになり、これらの関節炎病態への関与が疑われた。またマウスモデルの解析からは、関節炎病原性T細胞の分化機構の一端が解明された。これらの知見は関節リウマチの疾患特異的な新規治療法の開発を目指す上で重要な情報と思われる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we examined the functions of CD4 T cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. From the multi-color flow cytometric analysis on clinical samples, we found an infiltration of polyfunctional effector CD4 T cells that co-produce IFN- γ , IL-21, and GM-CSF, an emerging target of rheumatoid arthritis. These cells were hardly detected in the peripheral blood, suggesting their pathogenic roles in the arthritis. From the analysis of animal models, we elucidated the self tolerance mechanism that operates on cartilage collagen-specific CD4 T cells in the thymus. We assume that breach of the tolerance mechanism may induce arthritis in the human.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は全身の関節に進行性の機能障害をもたらす、慢性炎症性疾患である。近年の RA に対する TNF- α や、IL-6 などのサイトカインの阻害療法は、疾患予後の劇的な改善をもたらしたが、無効例も一定の割合で存在する。また有効例においても完全に治療が不要になる、すなわち治癒にまで至ることは稀である。また上記のようないわゆる自然免疫系サイトカインの阻害療法では、種々の病原体への易感染性も大きな問題となっている。そのため、より病因に近く、疾患特異性を高めた治療法の開発が求められる。

RA は何らかの関節内抗原に対する自己免疫疾患で、特に CD4T 細胞がその病態に重要な働きをすると考えられている。よって自己反応性 CD4T 細胞は RA の理想的な治療標的と考えられ、それらの制御機構を理解することは重要である。しかし、実際に RA 炎症関節に浸潤する多数の CD4T 細胞の中から、自己反応性の CD4T 細胞を同定するのは容易ではない。そこでどの CD4T 細胞サブセット、すなわちどのようなサイトカインを産生する CD4T 細胞が RA の病態に関わっているか解析されている。炎症性 CD4T 細胞サブセットとしては、IFN- γ を産生する Th1 細胞や、IL-17 を産生する Th17 細胞がよく知られているが、これらでは RA の炎症病態を十分に説明できないことが明らかになった。しかし最近、いくつかの新規 CD4T 細胞サブセットも同定されており、これらが RA 病態への関与する可能性が考えられるが、現在のところほとんど解析されていない。

一方、ヒトでは困難な自己反応性 T 細胞の解析手法として、マウスなどの関節炎動物モデルが有用である。中でも II 型コラーゲン (CII) でマウスやラットを免疫することによって誘導される、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) は、その関節炎症病態が RA に類似することから薬効評価などにも広く用いられている。しかし、このモデルにおいても自己 CII 特異的 CD4T 細胞の免疫寛容やその破綻する機構は十分に解析されていない。その理由の一つとして他の疾患モデルでは解析に汎用される抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子導入マウスが作成されていないことがあげられる。

2. 研究の目的

本研究ではまず RA 患者臨床検体を用いた解析から、炎症関節内局所において、どのような CD4T 細胞サブセットが選択的に増加しているかを明らかにする。ここでは近年同定された GM-CSF 産生 CD4T 細胞などにも注目して解析をすすめるとともに、多種のサイトカインを同時に検出することで新たな T 細胞サブセットの同定も視野に入れる。関節内浸潤 CD4T 細胞のサイトカイン産生以外の機能やその制御機構などについても理解を深め、可能な範囲でこれらの自己反応性についても検討する。このような臨床研究と並行して、マウス関節炎モデルを利用して、関節内自己抗原に特異的な CD4T 細胞の分化、機能制御機構について明らかにしてゆく。ここでは特に申請者が以前スウェーデンカロリンスカ研究所で作成した、CII 特異的 T 細胞抗原受容体遺伝子導入マウスを利用して解析を進める。

3. 研究の方法

1) 多重染色フローサイトメーター法による、RA 患者 CD4T 細胞サブセットの包括的機能解析
末梢血、滑膜、関節液よりリンパ球を密度遠心法にて分離し解析に供する。リンパ球をゴルジ装置阻害剤の存在下で、無刺激、あるいはマイトジェン刺激を加えて 4 時間培養する。その間に産生される IFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-21、GM-CSF 等のサイトカインを、それぞれ異なる蛍光色素で標識された抗体で細胞内染色し、最大 8 種類の蛍光色素を検出可能な米ベクトンディッキンソン社製 FACSVerse フローサイトメーターを用いて解析する。以下の項目について検討を行う。

- 末梢血と関節内リンパ球の間での、各サイトカイン CD4T 数の比較
- 各サイトカインの産生細胞の重複状態の解析と、それに基づいた各ヘルパー CD4T 細胞サブセット数の比較
- ケモカインレセプターの発現パターンとサイトカイン産生パターンの関係
- 各種活性化マーカーの発現と、サイトカイン産生パターンとの関係

2) CII 特異的 T 細胞抗原受容体遺伝子導入マウスを用いた CIA 病態解析

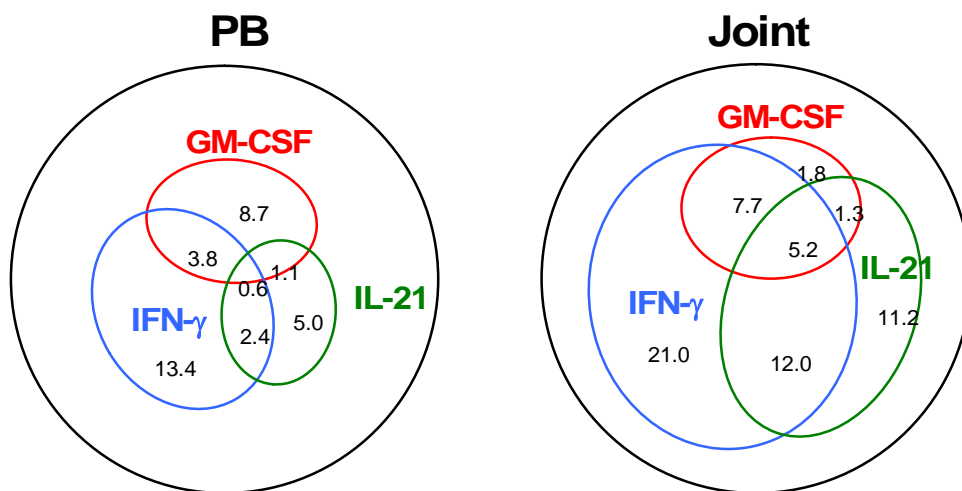
申請者が作成した異種 CII 特異的 TCR 遺伝子導入マウス (HCQ3 Tg マウス) と、研究協力者が以前に作製した異種 CII 自体を発現する遺伝子導入マウス (MMC Tg マウス \times Malmstrom V, 1996, *Proc Natl Acad Sci USA*) と交配することで、自己 CII 特異的な T 細胞の生体内での分化や機能をクローンレベルで解析する。以下の項目について検討を行う。

- MMC Tg マウスと野生型マウスでの関節炎発症
- MMC Tg マウスと野生型マウスでの末梢リンパ組織 CD4T 細胞の CII 反応性
- HCQ3Tg マウス胸腺での CII 特異的 T 細胞分化のフローサイトメーター解析
- 正常マウス胸腺における CII 発現解析
- 胸腺移植キメラマウスにおける CII 特異的 T 細胞分化
- 樹状細胞移入による胸腺 T 細胞の分化への影響

4. 研究成果

1) 多重染色フローサイトメーター法による、RA 患者 CD4T 細胞サブセットの包括的機能解析
関節リウマチ患者の関節液、関節滑膜組織、末梢血より採取したリンパ球中の CD4T 細胞のサイトカイン産生プロファイルを比較したところ、末梢血に比べて関節内では IFN- γ 、IL-21 を産生する CD4T 細胞が有意差を持って増加していることが明らかになった。関節内 CD4T 細胞における割合は IFN- γ 産生細胞が約 50%、IL-21 が約 30%に達していた。GM-CSF 産生細胞も比較的多く認められたが、末梢血と関節内ではその数に有意な差を認めず、CD4T 細胞中の約 20%程度であった。一方、IL-4、IL-17、IL-22 などの産生細胞は特に関節内では少なく、いずれも 5%未満であった。

注目すべきことに、末梢血中の GM-CSF 産生細胞の多くは他のサイトカインは産生していなかったが、関節内に存在する GM-CSF 産生細胞はそのほとんどが IFN- γ も産生しており、半数近くが IL-21 も産生していた。すなわち GM-CSF 産生細胞のほとんどが IFN- γ 産生細胞に、その半分が IL-21 産生細胞に含まれるような状況であった(下図参照)。



PB: 末梢血

すなわち関節内にはこれらのサイトカインを共産生する、いわば多機能エフェクターCD4T 細胞が多く存在していることが本研究から明らかになった。これらのケモカインレセプターの発現パターンは CXCR3 陽性、CCR6 陰性の、Th1 タイプが多かったが、画一的ではなかった。一方 CD69 などの活性化マーカーの発現レベルは高いことがわかった。

本研究遂行中に米国の研究室から関節リウマチ患者の関節内で T 細胞活性化抑制分子 PD-1 を発現する CD4T 細胞が IL-21 を産生し、抗体産生に寄与していることが報告された (Rao DA, Nature, 542:110-114, 2017)。これは我々が同定した細胞群と重複するものと思われ、実際 PD-1 の発現も確認できた。抗原受容体レパトワ解析から、PD-1 発現の機序として、自己抗原による慢性刺激が関与している可能性が考えられた。

2) CII 特異的 T 細胞抗原受容体遺伝子導入マウスを用いた CIA 病態解析

異種 CII を自己抗原として発現する、MMC Tg マウスでは、通常異種 CII 免疫で誘導される関節炎の発症が抑制されていた。実際 MMC Tg マウスでは関節炎惹起能をもった異種 CII に対する CD4T 細胞の反応性が低下しており、何らかの自己免疫寛容機構が働いていることが伺われた。その詳細を明らかにするため、今回新たに作製した異種 CII 特異的 T 細胞抗原受容体遺伝子導入マウス (HCQ3 Tg) と MMC Tg マウスを交配し、胸腺での T 細胞分化を解析した結果、MMC Tg マウスでは胸腺での CII 特異的 CD4T 細胞の分化が軽度障害されていることが明らかとなった。そこで MMC Tg あるいは正常マウスからの胸腺移植、あるいは樹状細胞の移入実験を行ったところ、胸腺ではなく末梢由来の樹状細胞が免疫寛容に関与していることが示された。同様の免疫寛容機構の働きがヒトでも想定され、その破綻が関節炎誘導性 CD4T 細胞の分化につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Raposo B, Merky P, Lundqvist C, Yamada H, Urbonaviciute V, Niaudet C, Viljanen J, Kihlberg J, Kyewski B, Ekwall O, Holmdahl R, Backlund J.

T cells specific for post-translational modifications escape intrathymic tolerance induction.

Nat Commun. (査読あり) 24;9(1):353. 2018

doi: 10.1038/s41467-017-02763-y.

Yamada H, Haraguchi A, Sakuraba K, Okazaki K, Fukushi JI, Mizu-Uchi H, Akasaki Y, Esaki Y, Kamura S, Fujimura K, Kondo M, Miyahara H, Nakashima Y, Yoshikai Y.

Th1 is the predominant helper T cell subset that produces GM-CSF in the joint of rheumatoid arthritis.

RMD Open. (査読あり) 13;3(1):e000487. 2017

doi: 10.1136/rmdopen-2017-000487.

〔学会発表〕(計 1件)

山田久方 他

関節リウマチにおける GM-CSF 産生 CD4 T 細胞サブセットの同定

第 45 回日本臨床免疫学会総会 (東京都 平成 29 年 9 月 28-30 日)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。