

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 2 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15663

研究課題名(和文) iPS細胞技術を用いた血清反応陰性脊椎関節炎の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis elucidation of seronegative spondyloarthritis using patient-derived iPSCs

研究代表者

吉富 啓之 (Yoshitomi, Hiroyuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：50402920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHLA B27陽性の強直性脊椎炎患者3名からのiPS細胞の樹立に成功した。さらにHLA B27の病的意義を解析するため、CRISPR-Cas9を用いて遺伝子編集を行い、2例の疾患特異的iPS細胞からHLA B27の発現を欠くiPS細胞の樹立に成功した。現在HLA B27が骨・軟骨分化維持機構を修飾する機構について投稿準備中である。さらにT細胞が慢性炎症病態に及ぼす影響を解析し、血清反応陰性関節炎の対照疾患としての血清反応陽性関節炎である関節リウマチ検体においてCD4陽性T細胞からCXCL13産生を誘導する新たな転写因子としてSox4が病態に関わることを示した。

研究成果の概要(英文)：During this project, we established iPSCs from three patients with ankylosing spondylitis, a seronegative spondyloarthritis. To address pathogenic function of HLA B27, we also successfully established HLA B27 deficient iPSCs from two patients using CRISPR/Cas9 genome-editing. Furthermore, we investigated the role of T cells in human chronic inflammatory diseases, because HLA is most contributing factor to human autoimmune arthritis; and showed that in synovium of rheumatoid arthritis a contrast disease of seronegative spondyloarthritis, transcription factor Sox4 contributes to the pathogenesis of chronic inflammation by CXCL13 production from CD4+ T cells.

研究分野：リウマチ学、遺伝子編集

キーワード：iPS細胞 血清反応陰性脊椎関節炎 HLA B27 遺伝子編集 CRISPR-Cas9 CXCL13

10 ポイント明朝体、Word 2.5 ~ 5 頁

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性関節炎には、リウマチ因子が陽性の関節リウマチを始めとする血清反応陽性関節炎とリウマチ因子が陰性の血清反応陰性脊椎関節炎が存在する。血清反応陰性脊椎関節炎は強直性脊椎炎をはじめとした乾癬性関節炎、腸疾患関連関節炎などを含む関節炎疾患群で、脊椎や体幹に近い関節に骨髄の炎症や腱附着部炎を生じ骨新生に至る疾患である。生物学的製剤の登場は関節リウマチの治療を劇的に改善し大部分の患者で良好な治療効果が得られているが、生物学的製剤不応患者もいまだ一定数存在し、また血清反応陰性脊椎関節炎に対しては、抗 TNF 療法は病状の進行を防止せず、さらなる病態解明が求められている (Arthritis Rheum. 2005;52 (2) :582-591)。強直性脊椎炎の発症は遺伝因子が 90%を説明するとされ、その中でも最も病態に関与する HLA-B27 によるいくつかの病態が提唱されている (Nature Rev Rheum, 2010;6: 399-405) が明らかにすべき点が多く残されている。この不十分な解析の原因の一つは患者由来の細胞を十分に用いた解析が困難であること、さらには病因に関連する遺伝子を欠損する細胞等を用いた研究がヒトの場合には難しいことが挙げられる。

また、血清反応陽性関節炎ならびに血清反応陰性脊椎関節炎には HLA が関連することから T 細胞の病態への関与が想定されているがその病態機構の詳細に関しても不明な点が多く残されている。

2006 年に確立されたヒトでの iPS 細胞樹立技術はヒト疾患研究を大きく前進させた。すなわち、無限の増殖能と人体を構成するすべての細胞への分化能を利用することで、これまで十分に病態解析に使用することが困難であった患者由来の疾患に関連する細胞を用いることができるようになった。さらに、遺伝子編集技術の進歩により任意の遺伝子を欠損させることも可能になった。この意味において、強直性脊椎炎患者からの iPS 細胞の樹立、ならびに最も疾患に関連する遺伝子である HLA-B27 を欠損した疾患特異的 iPS 細胞の樹立は強直性脊椎炎研究において重要な意義を持つ。

さらに、申請者はヒト CD4 陽性 T 細胞が炎症環境下において PD-1^{hi}CXCR5⁺CD4 陽性 T (peripheral helper T: Tph) 細胞の病態機構の発現に重要な転写因子 Sox4 を同定していたが、自己免疫性関節炎である血清反応陰性関節炎や対照疾患である血清反応陽性の関節リウマチなどにおける関与についての解析が望まれていた。

2. 研究の目的

血清反応陰性脊椎関節炎は、リウマチ因子が陰性で HLA-B27 に関連を持つ靭帯附着部炎での骨新生を主体とした関節炎疾患群で、治療法は確立されておらず病態機序のさら

なる解明が求められる。本課題では、「特定の個人由来の様々な分化細胞を解析できる」iPS 細胞技術を応用して、血清反応陰性脊椎関節炎を in vitro で再現するために、血清反応陽性関節炎より iPS 細胞を樹立すること、

樹立した強直性脊椎炎患者 iPS 細胞から、疾患に最も関与する遺伝子である HLA-B27 を欠損させた強直性 iPS 細胞を作成することを目的とした。さらに、ヒト T 細胞の炎症病態に関与する可能性のある転写因子 Sox4 が、血清反応陰性脊椎関節炎やその対照疾患である血清反応陽性関節炎などヒトの自己免疫性関節炎に実際に関与するかの解析を行った。

3. 研究の方法

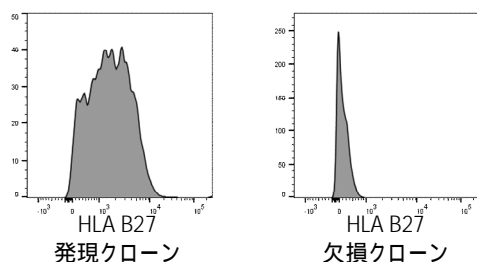
京都大学整形外科外来にて血清反応陰性脊椎関節炎に罹患する患者に対して研究の説明を行い、同意を得られた患者より末梢血を採取する。末梢血より分離した単核球に対して、山中 4 因子をエピソード法にて導入し iPS 細胞を樹立し、各初期化マーカーなどの発現を確認する。また各 iPS 細胞の HLA 型をフローサイトメトリー法にて解析し、HLA B27 を有する細胞に対しては遺伝子編集技術を用いて HLA B27 の発現欠損株の作成を行い、HLA B27 の欠損をフローサイトメトリー法にて確認する。さらに血清反応陽性関節炎または血清反応陰性脊椎関節炎患者より関節液穿刺や炎症部位の整形外科手術など診療の過程で炎症局所検体を得る機会がある場合に、同意を得て解析を行った。

4. 研究成果

京都大学整形外科外来に通院する強直性脊椎炎患者 3 名より同意を得て末梢血を取得し、iPS 細胞を樹立し、初期化マーカーなどの発現より iPS 細胞の品質を確認した。3 名の強直性脊椎炎患者はすべてが HLA B27 を有していたため、これらの疾患特異的 iPS 細胞に対して遺伝子編集による HLA B27 の発現欠損株の取得を試みた。

遺伝子編集には CRISPR/Cas9 とともに Puromycin 耐性遺伝子を発現する px459 ベクターを使用した。HLA B27 を遺伝子編集するために必要な CRISPR/Cas9 の標的となる HLA-B27 特異的な標的配列を 3 箇所設計した。各 HLA は共通する配列を共有することから、遺伝子編集を行う iPS 細胞の HLA A, B, C, DR, DQ の型を確認し、その HLA 型には HLA B27 の遺伝子編集に用いる標的配列と同一の配列が存在しないことを確認した。その結果、HLA B27 の Exon2 に 1 箇所 Exon3 に 2 箇所の特異的な CRISPR/Cas9 標的配列をデザイン可能であった。また、健常 iPS 細胞として使用している iPS 細胞にも HLA B27 を有するものが合ったため、実験対照として HLA B27 陽性健常 iPS 細胞に対しても遺伝子編集を行った。iPS 細胞に対してエレクトロポレーション法にて CRISPR/Cas9 ベクターを導入した。ま

たエレクトロポレーション直後に Puromycin を短時間加えることでベクターの導入効率が良い細胞を選択肢高い遺伝子編集効率を得ることができた。iPS 細胞は HLA Class I を発現していないため、IFN- γ を培地に加え、HLA Class I の発現を誘導する。この HLA Class I の発現を誘導した iPS 細胞に対して臨床グレードの HLA B27 抗体を用いてフローサイトメトリーを行い、HLA B27 陰性分画をソートすることで HLA B27 の発現を欠く iPS 細胞を濃縮した。ソート後の細胞をシングルセルクローニングを行い、再度 HLA B27 の発現を解析することで、HLA B27 欠損を確認した(下図)。



その結果、強直性脊椎症患者 2 名の iPS 細胞からはそれぞれ 2 クローン、健常 iPS 細胞からは 4 クローンの HLA B27 欠損株が樹立可能であった。

次に自己免疫性関節炎における T 細胞の炎症病態の解析を行った。強直性脊椎炎を始めとする血清反応陰性脊椎関節炎患者の炎症局所検体を臨床上得る機会がなかったが、血清反応陽性関節炎である関節リウマチ患者からは、関節液や滑膜の採取が可能であった。これらの炎症局所の CD4 陽性 T 細胞と同一患者の末梢血中の CD4 陽性 T 細胞を採取し比較したところ、炎症局所に存在する CD4 陽性 T 細胞においてリンパ濾胞の誘導に重要なケモカイン CXCL13 と、in vitro の解析から慢性炎症病態への関与が予想された転写因子 Sox4 の有意に高い発現を認めた。また滑膜組織の免疫多重染色においても滑膜に形成されているリンパ濾胞中の T 細胞が CXCL13 と転写因子 Sox4 を高度に発現しており、また滑膜組織におけるリンパ濾胞形成と Sox4 の発現が有意に相関していたことから、実際の疾患において Sox4 が Tph 細胞の慢性炎症病態に関与していることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

Yoshitomi, H., Kobayashi, S., Miyagawa-Hayashino, A., Okahata, A., Doi, K., Nishitani, K., Murata, K., Ito, H., Tsuruyama, T., Haga, H., Matsuda, S., Toguchida, J. Human Sox4 facilitates the development of CXCL13-producing helper T cells in inflammatory

environments. Nat Commun. 査読あり, 9, 2018 3762. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06187-0>

Ikeguchi, R., Aoyama, T., Kakinoki, R., Ueda, M., Kasai, Y., Maekawa, T., Tada, H., Yamamoto, M., Matsuda, S., Nakamura, T., Toguchida, J. A clinical trial for Kienböck disease by cultured autologous multipotent mesenchymal stromal cells augmented with vascularized bone grafts: A report of five cases. J Orthop Sci. 査読あり, 17, 2017 30032-30035. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jos.2017.02.002>

Hino, K., Horigome, K., Nishio, M., Komura, S., Nagata, S., Zhao, C., Jin, Y., Kawakami, K., Yamada, Y., Ohta, A., Toguchida, J., Ikeya, M. Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. J Clin Invest. 査読あり, 127, 2017, 3339-3352. <https://dx.doi.org/10.1172/JCI93521>

Konishi, E., Nakashima, Y., Mano, M., Tomita, Y., Kubo, T., Araki, N., Morii, E., Yoshikawa, H., Haga, H., Toguchida, J., Ueda, T., Osawa, M., Hoshi, M., Inoue, T., Aono, M., Yanagisawa, A. Chondroblastoma of extra-craniofacial bones: Clinicopathological analyses of 103 cases. Pathol Int. 査読あり, 67, 2017, 495-502. <https://dx.doi.org/10.1111/pin.12586>

Nakahara, Y., Kitoh, H., Nakashima, Y., Toguchida, J., Haga, N. Longitudinal study of the activities of daily living and quality of life in Japanese patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. Disabil Rehabil. 査読あり, 16, 2017, 1-6. <https://dx.doi.org/10.1080/09638288.2017.1405083>

Kitani-Morii, F., Imamura, K., Kondo, T., Ohara, R., Enami, T., Shibukawa, R., Yamamoto, T., Sekiguchi, K., Toguchida, J., Mizuno, T., Nakagawa, M., Inoue, H. Analysis of neural crest cells from Charcot-Marie-Tooth disease patients demonstrates disease-relevant molecular signature. Neuroreport. 査読あり, 28, 2017, 814-821. <https://dx.doi.org/10.1097/WNR.0000000000000831>

Ikeguchi, R., Kakinoki, R., Ohta, S., Oda, H., Yurie, H., Kaizawa, Y., Mitsui, H., Aoyama, T., Toguchida, J., Matsuda, S. (2017). Recipient bone marrow-derived stromal cells prolong graft survival in a rat hind limb allotransplantation model. *Microsurgery*.37, 632-640. <https://dx.doi.org/10.1002/micr.30128>

Iwata, T., Ito, H., Furu, M., Ishikawa, M., Azukizawa, M., Yoshitomi, H., Fujii, T., Akiyama, H., Matsuda, S. Subsidence of total ankle component associated with deterioration of an ankle scale in non-inflammatory arthritis but not in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 査読あり, 27, 2017, 417-424. <https://doi.org/10.1080/14397595.2016.1220049>

Mori, M., Hashimoto, M., Matsuo, T., Fujii, T., Furu, M., Ito, H., Yoshitomi, H., Hirose, J., Ito, Y., Akizuki, S., Nakashima, R., Imura, Y., Yukawa, N., Yoshifuji, H., Ohmura, K., Mimori, T. Cell-contact-dependent activation of CD4+ T cells by adhesion molecules on synovial fibroblasts. *Mod Rheumatol*. 査読あり, 27, 2017, 448-456. <https://doi.org/10.1080/14397595.2016.1220353>

Fujii, T., Nishi, E., Ito, H., Yoshitomi, H., Furu, M., Okabe, N., Ohno, M., Nishi, K., Morita, Y., Morita, Y., Azukizawa, M., Okahata, A., Tomizawa, T., Kimura, T., Matsuda, S. Nardilysin is involved in autoimmune arthritis via the regulation of tumour necrosis factor alpha secretion. *RMD Open*. 査読あり, 3, 2017, e000436. <https://dx.doi.org/10.1136/rmdopen-2017-000436>

Emori, T., Hirose, J., Ise, K., Yomoda, J.I., Kasahara, M., Shinkuma, T., Yoshitomi, H., Ito, H., Hashimoto, M., Sugahara, S., Fujita, H., Yamamoto, N., Morita, Y., Narumiya, S., Aramori, I. Constitutive Activation of Integrin $\alpha 9$ Augments Self-Directed Hyperplastic and Proinflammatory Properties of Fibroblast-like Synoviocytes of Rheumatoid Arthritis. *J Immunol*. 査読あり, 199, 2017, 3427-3436. <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1700941>

Kobayashi, S., Watanabe, T., Suzuki, R., Furu, M., Ito, H., Ito, J., Matsuda, S., and Yoshitomi, H. TGF- β induces the differentiation of human CXCL13-producing CD4(+) T cells. *Eur. J. Immunol*. 査読あり, 46, 2016, 360-371. <https://dx.doi.org/10.1002/eji.201546043>

[学会発表](計 13件)

吉富啓之 関節リウマチの病態に迫る - 臨床検体から学んだこと- 医工学フォーラム - 2016年度特別学術講演会 -、京都、2017年2月8日

吉富啓之 関節リウマチ滑膜炎の炎症病態 -臨床サンプルの解析から- 第16回関西膠原病フォーラム、京都、2017年3月25日

Yoshitomi, H., Kawai, S., Maekawa, H., Deguchi, N., Sekiguchi, K., Takarada, T., Toguchida, J. Efficient gene editing of human iPSCs using drug selection cassette-free homology arm. ISSCR 2017 Annual Meeting, Boston, June 14-17, 2017

吉富啓之 iPS細胞を用いた難病研究とFOP JPTSA 中国支部大会、広島、2017年9月16日

吉富啓之、小林志緒、土井浩平、岡島章憲、伊藤宣、松田秀一、戸口田淳也 炎症環境下ヒトCD4陽性T細胞の転写制御解析 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、東京、2017年10月13-14日

吉富啓之、土井浩平、伊藤宣、松田秀一、戸口田淳也 Transcriptional regulation of PD-1+CD4+ T cells under inflammatory conditions 第46回日本免疫学会学術集会、仙台、2017年12月12-14日

Yoshitomi, H., Kobayashi, S., Watanabe, T. TGF- β induces the differentiation of human CXCL13-producing CD4+ T cells. Keystone Symposia, Monterey, February 26-March 1, 2016

吉富啓之、小林志緒、岡島章憲、布留守敏、伊藤宣、松田秀一、戸口田淳也 Transcriptional regulation of human CXCL13-producing CD4 T cell 第45回日本免疫学会学術集会、沖縄、2016年12月5-7日

吉富啓之、小林志緒、布留守敏、伊藤宣、戸口田淳也、松田秀一 TGF- β は FoxP3

非依存的に CXCL13 産生 CD4 陽性を誘導する 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016 年 10 月 13-14 日

吉富 啓之、小林 志緒、岡島 章憲、布留 守敏、伊藤 宣、松田 秀一、戸口田 淳也 CXCL13 産生 CD4 T 細胞の転写制御解析 第 3 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、沖縄、2016 年 10 月 14 日

吉富 啓之、小林 志緒、布留 守敏、伊藤 宣、松田 秀一 TGF- induces non-Tfh CXCL13-producing CD4+ T cells 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、横浜、2016 年 4 月 21 日

吉富 啓之、小林 志緒、布留 守敏、伊藤 宣、松田 秀一、戸口田 淳也 TGF- は IL-2 に乏しい環境下で CXCL13 産生ヒト CD4 陽性細胞を誘導する 第 2 回骨免疫学会、沖縄、2016 年 7 月 7 日

吉富 啓之 関節リウマチにおける滑膜炎と T 細胞 -滑膜解析から見てきた病態- 第 5 回 Nagoya Central Meeting、名古屋、2016 年 2 月 18 日

〔図書〕(計 4 件)

吉富啓之、戸口田淳也、【骨免疫学の進歩が変える骨関節疾患アプローチ】骨免疫学と新たな治療への展望 iPS 細胞を用いた骨格系難病研究 THE BONE 2017, 31, 217-221

戸口田淳也、iPS 細胞の医療応用 現状と展望 日本赤十字リハビリテーション協会誌 2017, 31, 6-9

戸口田淳也、新しい医療技術 進行性骨化性線維異形成症(FOP)に対する新規治療法の開発 整形・災害外科 2017, 59, 1525-1531

戸口田淳也、新しい医療技術 進行性骨化性線維異形成症(FOP)に対する新規治療法の開発 整形・災害外科 2016, 59, 1525-1531.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉富 啓之 (YOSHITOMI, Hiroyuki)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・

准教授

研究者番号： 5 0 4 0 2 9 2 0

(2)研究分担者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA, Junya)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・
教授
研究者番号： 4 0 2 7 3 5 0 2

(3) 研究分担者

金 永輝 (JIN, Yonghui)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号： 9 0 6 2 0 3 4 4

(4)連携研究者

河本 宏 (KAWAMOTO, Hiroshi)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・
教授
研究者番号： 0 0 3 4 3 2 2 8

(5)連携研究者

増田 喬子 (MASUDA, Kyoko)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・
助教
研究者番号： 4 0 5 6 5 7 7 7