

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月18日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18263

研究課題名(和文)免疫寛容の誘導による関節リウマチに対する新たな治療戦略に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on new therapeutic strategy for rheumatoid arthritis to induction of immune tolerance

研究代表者

吉田 侑矢 (Yoshida, Yuya)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：50581435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フィンゴリモド(FTY720)と病因抗原の併用療法は、関節リウマチのモデル動物に対して、効果的に免疫寛容を導入できる。これまでの研究で、本併用治療で増加し、IL-10を高産生するGITR+ CD25- (or Foxp3-) CD4+ T細胞集団が免疫寛容の誘導に関与している可能性が示唆されていた。本申請課題では、このIL-10高産生性T細胞の特性について調べた。その結果、本細胞はCD45RA、CD62L等の発現が低く、CD44、CD279 (PD-1)等の発現が高いことから、エフェクターメモリーT細胞的要素およびアナジー要素を有する細胞集団であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ等の自己免疫疾患に対して、長期間の寛解状態を誘導するには、病因リンパ球に対する免疫不応答の誘導が必須である。FTY720と病因抗原の併用治療は、病因リンパ球に対して、特異的かつ効果的に免疫不応答を導入できる可能性を秘めている。本申請課題では、治療効果発現の一角を担うと考えられる細胞集団の特性に関する情報が集積できた。本研究成果は、本併用治療による効果的な免疫寛容誘導機構の解明につながる重要な知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Combination treatment with fingolimod (FTY720) and pathogenic antigen efficiently induced immune tolerance to a mouse model of rheumatoid arthritis. In previous study, it has been suggested that GITR+ CD25- (or Foxp3-) CD4+ T cell populations, which are induced by this combination treatment and highly produce IL-10, may be involved in the induction of immune tolerance. In this study, the characteristics of this IL-10-producing T cell were examined. The cells showed low expression of CD45RA, CD62L, etc. and high expression of CD44, CD279 (PD-1), etc. Thus, it was revealed that they are a cell population having elements of effector memory T cell and anergy.

研究分野：免疫学，病態生化学

キーワード：interleukin-10 FTY720 免疫寛容 病因抗原 関節リウマチ 寛解

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

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは、過剰な免疫応答を基盤とした慢性炎症性の自己免疫疾患である。以前は治療が困難な疾患であったが、診断技術の向上や生物学的製剤の進歩により、いまや治療の目標は臨床的寛解の導入となった。しかし、確固たる完全寛解導入方法は存在せず、休薬後に再燃する症例は多い。また、治療薬を長期的に服用することが多く、それに伴う医療費負担が大きい。従って、短期間で完全寛解を導入し、その寛解状態を長期間維持できる新規治療戦略の開発が望まれている。申請者は、本申請課題の実施当初、フィンゴリモド (FTY720) と病因抗原の併用治療が前文で示した要請を実現できる可能性を示唆する知見を得ていた。

FTY720 は、他の免疫抑制剤とは全く異なる作用機序を有する。一般的な免疫抑制剤は、免疫担当細胞の活性化を抑制し、免疫力を全般に低下させる。一方、FTY720 は、T 細胞、B 細胞等のリンパ球の活性化に直接的に影響することなく、免疫応答を調節する。即ち、それらリンパ球のリンパ節等からの移出を抑制し、体内循環を制御する。従って、自己免疫疾患等に FTY720 を用いた場合、病因リンパ球が免疫反応性を維持した状態でリンパ節等の二次リンパ組織に隔離され、かつ、その状況下で病因抗原を併用投与することで、二次リンパ組織内で効果的に免疫寛容が誘導できると着想した。このことを明らかとするために、glucose-6-phosphate isomerase (GPI) の部分ペプチドを感作して誘導した関節炎モデルに対して、FTY720 と病因抗原を併用投与した。その結果、鼠径リンパ節内で死細胞や免疫不応答に関連する分子の発現が上昇した T 細胞が増加することが明らかとなった。また、本併用治療個体で glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-family-related gene/protein (GITR)⁺ CD25⁻ (or fork head box P3 (Foxp3)⁻) CD4⁺ T 細胞集団が増加し、本細胞集団が抑制性サイトカインの interleukin (IL)-10 を高産生する特徴を有することが明らかとなった。

2. 研究の目的

本併用治療で増加する GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞集団が、T 細胞の増殖抑制能を有することを明らかとしているが、本細胞集団は IL-10 産生細胞以外に、エフェクター系の細胞を含むヘテロな細胞集団である可能性があり、真に増加する IL-10 高産生性 T 細胞の特徴や機能の解明には至っていなかった。本研究では、(1) 本併用療法で増加する GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞集団の中でも、真に増加している IL-10 高産生性 T 細胞の特性について明らかとする。また、(2) 本併用治療によって誘導される IL-10 高産生性 T 細胞の *in vivo* で炎症に及ぼす詳細な影響について調べる。これらにより、関節リウマチに対する画期的な治療戦略の構築につながる知見を集積することを目的とする。なお、(2) については、現在進行中である。

3. 研究の方法

以下に示す方法で実験を行った。なお、割合等の解析は、対象を GITR⁺ Foxp3⁻ CD4⁺ T 細胞とし、機能解析等、生きた状態で分取する必要がある際は、GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞を用いた。

(1) GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞集団のヘテロ性の確認

DBA/1J マウスを完全フロイントアジュバント存在下、hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 10 µg で感作し、感作当日および 2 日後に百日咳毒素 200 ng を腹腔内投与して、関節炎を惹起した。作製した GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎マウスに FTY720 (1 mg/kg, *p.o.*) と hGPI₃₂₅₋₃₃₉ (10 µg/mouse, *i.v.*) を 5 日間併用投与した。治療完了時に鼠径リンパ節を採取し、懸濁液とした後、GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞集団を fluorescence-activated cell sorting (FACS) で分取した。その後、IL-2 存在下、抗 CD3/CD28 抗体ビーズで刺激し、IL-10、interferon (IFN)- γ および IL-4 の mRNA 発現レベルについてリアルタイム PCR 法を用いて調べた。

(2) GITR⁺ CD25⁻ (or Foxp3⁻) CD4⁺ T 細胞集団の中で特に増加する細胞分画の探索およびサイトカイン産生の確認

先と同様の方法で、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎マウスを誘導し、FTY720 と hGPI₃₂₅₋₃₃₉ を 5 日間併用投与した。治療完了時に鼠径リンパ節を採取し、懸濁液とした後、T 細胞に発現していると考えられる表面分子に対する種々の蛍光標識抗体で染色してフローサイトメトリー解析した。解析結果を基に、併用治療個体と未治療個体間で差異が大きい分子を抽出した。次に、抽出した分子について、解析対象を併用治療個体と未治療個体以外に、FTY720 単独治療個体および GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独治療個体を加え、4 群で比較検討した。併用治療個体でより変動している細胞分画を特定、分取し、IL-2 存在下、抗 CD3/CD28 抗体ビーズで刺激後、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomycin 処理し、細胞内サイトカイン染色法により、サイトカイン産生レベルを調べた。

(3) GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞集団中の IL-10⁺細胞と IL-10⁻細胞間の発現変動遺伝子の探索

先と同様の方法で、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎マウスを誘導し、FTY720 と hGPI₃₂₅₋₃₃₉ を 5 日間併用投与した。治療完了時に鼠径リンパ節を採取し、懸濁液とした後、GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞集団を FACS で分取した。分取後、抗 CD3/CD28 抗体ビーズで刺激し、cytokine secretion assay 法を用いて IL-10⁺細胞および IL-10⁻細胞を染め分け、FACS で分取した。これら細胞の遺伝子情報について、次世代シーケンサーを用いて調べた。得られた fragments per kilobase of exon

per million reads mapped (FPKM) 値を基に、IL-10⁺ 細胞と IL-10⁻ 細胞間の発現変動遺伝子を抽出し、解析した。

4. 研究成果

(1) GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団のヘテロ性について

GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団のヘテロ性を確認するために、研究の方法(1)で示した手順で、GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団を刺激後、IL-10, Th1 や Th2 細胞に代表されるサイトカインの IFN- γ および IL-4 の mRNA 発現量を調べた。GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団は、GITR⁻ CD25⁻ CD4⁺ および GITR⁺ CD25⁺ CD4⁺ T細胞集団と比較して、IL-10 以外に IFN- γ および IL-4 の mRNA 発現レベルも高く(図1)、エフェクター系の細胞を含むヘテロな細胞集団である可能性が示された。

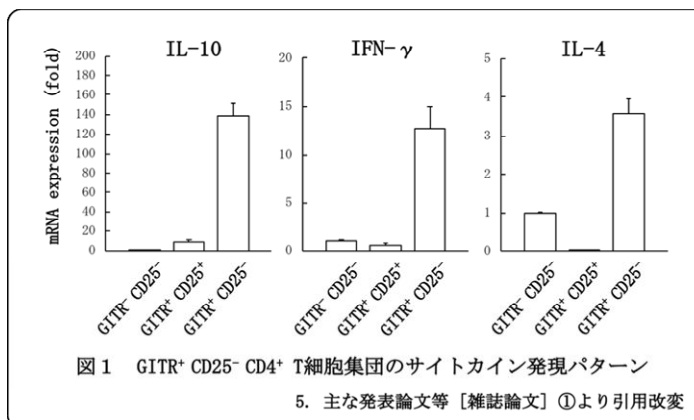


図1 GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団のサイトカイン発現パターン

5. 主な発表論文等 [雑誌論文] ①より引用改変

(2) GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団の中で特に増加する細胞分画の探索およびサイトカイン産生の確認

(1)より、GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団がヘテロな細胞集団である可能性が示唆されたため、本細胞集団の中でも本併用治療個体で増加する細胞について、研究の方法(2)で示した手順で、フローサイトメトリー解析により調べた。その結果、GITR⁺ Foxp3⁻ CD4⁺ T細胞集団の中でも、T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT)⁺ CD39⁺ 分画が併用治療個体で増加していることが明らかとなった(図2)。

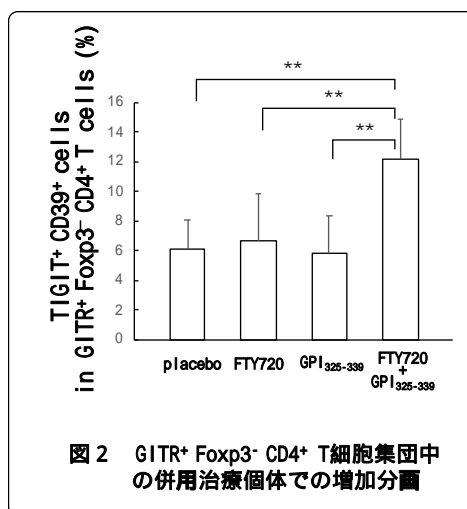


図2 GITR⁺ Foxp3⁻ CD4⁺ T細胞集団中の併用治療個体での増加分画

次に、GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団中の TIGIT⁺ CD39⁺, TIGIT⁺ CD39⁻, TIGIT⁻ CD39⁺ および TIGIT⁻ CD39⁻ 細胞を分取し、研究の方法(2)に示したように、各分画の細胞を刺激後、細胞内サイトカイン染色した。その結果、TIGIT⁺ 細胞分画 (TIGIT⁺ CD39⁺, TIGIT⁺ CD39⁻ 細胞) で IL-10 産生レベルが高かった。また、併用治療個体で増加していた TIGIT⁺ CD39⁺ 細胞は、IL-10 陽性、陰性問わず IFN- γ が高いことが明らかとなった(図3)。

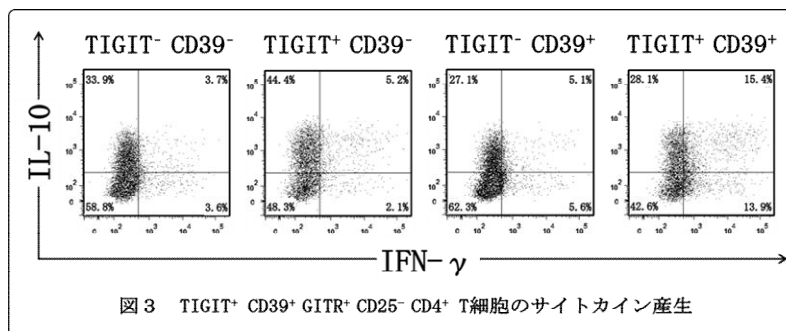


図3 TIGIT⁺ CD39⁺ GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞のサイトカイン産生

(3) GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団中の IL-10⁺ 細胞と IL-10⁻ 細胞間の発現変動遺伝子の探索

(2)の方法では、本併用治療で増加する IL-10 高産生性 T細胞に特化した特性を立証するまでには、至らなかったため、手法を遺伝子学的な網羅的解析に切り替えた。GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団中の IL-10⁺ 細胞を研究の方法(3)で示した手順で、生きた状態で分取し、IL-10⁺ 細胞と IL-10⁻ 細胞間との遺伝子情報の差異を比較した。その結果、本併用治療で増加する GITR⁺ CD25⁻ CD4⁺ T細胞集団中の IL-10⁺ 細胞は、発現変動遺伝子中の表面分子に着目すると、CD45RA, CD62L 等の発現が低く、CD44, CD279 (programmed cell death 1 (PD-1)) 等の発現が高かった。以上のことから、エフェクターメモリー T細胞的要素およびアナジー要素を有する細胞集団である可能性が示された。

(4) 今後の展望

FTY720 と病因抗原の併用治療は、GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎マウスに対して、効果的に免疫寛容

を誘導できる。本研究では、この免疫寛容に関与すると考えられる IL-10 高産生性 T 細胞の特性について、遺伝子学的な網羅的情報が得られ、エフェクターメモリー T 細胞的要素およびアナジ-要素を有することが明らかとなった。今後は、それら発現変動していた分子のタンパクレベルでの変化を確認するとともに、機能面の解析を *in vitro* および *in vivo* 条件下で確認し、免疫寛容構築機構の全貌解明につながる知見を集積したい。

<引用文献>

Yoshida Y, et al.: Functional mechanism(s) of the inhibition of disease progression by combination treatment with fingolimod plus pathogenic antigen in a glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis mouse model, *Biol. Pharm. Bull.*, **38**(8), 1120-1125 (2015).

Yoshida Y, et al.: Combination treatment with fingolimod and a pathogenic antigen prevents relapse of glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis, *Immun. Inflamm. Dis.*, **4**(3), 263-273 (2016).

Iwanami K, et al.: Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis, *Arthritis Res. Ther.*, **10**(6), R130 (2008).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

吉田侑矢, 河野武幸: 免疫抑制薬フィンゴリモド(FTY720)を用いた免疫寛容誘導, *臨床免疫・アレルギー科*, **71**(5), 508-514 (2019).

[学会発表](計6件)

長池新, 才本麻矢, 下野遥香, 吉田侑矢, 三上統久, 坂野理絵, 辻琢己, 河野武幸: Glucose-6-phosphate isomerase peptide (GPI₃₂₅₋₃₃₉) 誘導性関節炎に対する FTY720 と病因抗原併用療法の有用性とそのメカニズム -第七報-: IL-10 高産生性 T 細胞の RNA-seq 解析, 日本薬学会第 139 年会 (2019).

Yuya Yoshida, Norihisa Mikami, Rie Banno, Takumi Tsuji, Takeyuki Kohno: Induction of immune tolerance by combination treatment with fingolimod (FTY720) plus pathogenic antigen in a glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis mouse model: the fifth report, 第 47 回日本免疫学会学術集会 (2018).

吉田侑矢, 三上統久, 河野武幸: 関節リウマチに効果的に免疫寛容を導入できる治療戦略の探索, 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2018).

才本麻矢, 長池新, 吉田侑矢, 三上統久, 坂野理絵, 辻琢己, 河野武幸: Glucose-6-phosphate isomerase (GPI₃₂₅₋₃₃₉) 誘導性関節炎に対する FTY720 と病因抗原併用療法の有用性とそのメカニズム-第六報-, 日本薬学会第 138 年会 (2018).

Yuya Yoshida, Norihisa Mikami, Rie Banno, Takumi Tsuji, Takeyuki Kohno: Induction of immune tolerance by combination treatment with fingolimod (FTY720) plus pathogenic antigen in a glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis mouse model: the fourth report, 第 46 回日本免疫学会学術集会 (2017).

中西祐亮, 才本麻矢, 長池新, 吉田侑矢, 三上統久, 坂野理絵, 辻琢己, 河野武幸: FTY720 と病因抗原の併用療法が誘導する Tr1 様細胞の特性解析, 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2017).

[その他]

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-rinsho/>

6. 研究組織

(1)研究協力者

河野 武幸 (KOHNO, Takeyuki)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号: 5 0 1 7 8 2 2 4

辻 琢己 (TSUJI, Takumi)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号: 9 0 4 5 4 6 5 2

坂野 理絵 (BANNO, Rie)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号: 9 0 7 3 6 8 4 4

三上 統久 (MIKAMI, Norihisa)
大阪大学免疫学フロンティア研究センター・実験免疫学・招へい教員
研究者番号：20710388