

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08877

研究課題名(和文)自己免疫性関節炎を制御するFoxp3+制御性T細胞サブセットの調整機構の開発

研究課題名(英文)Control of the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells suppressing the development of autoimmune arthritis

研究代表者

近藤 裕也 (Kondo, Yuya)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40612487

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)：関節リウマチ(RA)におけるROR $\gamma$ t+制御性T細胞と定義されるTr17細胞の役割を明らかにすることを目的とした。Tr17細胞が欠損するマウスにコラーゲン誘導関節炎を誘導したところ、関節炎が有意に増悪した。野生型マウスでは関節炎発症後の関節局所にTr17細胞が集積していた。Tr17細胞によるIL-10産生の亢進とeffector CD4+T細胞に対する高い増殖抑制能が示唆される結果を得た。RA患者末梢血においてはeffector Tr17様細胞の減少とDAS28-ESRとの有意な負の相関を認めた。以上から、Tr17細胞はRAの病態を制御する特異的な制御性T細胞分画である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの様々な知見から、制御性T細胞(Treg)は関節リウマチ(RA)の疾患形成に本質的に関与していることが推測されるが、その詳細は明らかになっておらず、臨床応用に足るだけの研究成果が得られていない状況であった。本研究ではROR $\gamma$ tを発現したTregサブセットであるTr17細胞に注目し、マウスのRAモデル、さらにはRA患者検体を用いた解析を実施し、Tr17細胞がRAによってもたらされる関節炎を特異的に制御する可能性があることを見出した。本検討を契機として、TregによるRAの関節炎制御機構の詳細が明らかになれば、RAの病態を根本的に制御する新しい治療戦略の創生につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：ROR $\gamma$ t+Foxp3+ regulatory T cells (Tregs), known as Tr17 cells, have the potential to suppress Th17 cell mediated inflammation. The aim of this study is to elucidate the role of Tr17 cells in rheumatoid arthritis (RA). In murine model of RA, arthritis was found to be prolonged in Foxp3creROR $\gamma$ tfl/fl mice, in which Tr17 cells were deleted, compared with control mice. Tr17 cells significantly accumulated in inflamed joints after the onset of arthritis with up-regulation of CCR6. Tr17 cells also highly produced IL-10, and had the potential to suppress the proliferation of effector CD4+ T cells. In human peripheral blood, CXCR3-CCR6+ Th17-like Tregs had the highest ROR $\gamma$ t expression, suggesting a similarity between Th17-like Tregs and Tr17 cells. Effector Th17-like Tregs were the only subset significantly decreased in patients with RA, and negatively correlated with DAS28-ESR. Our results indicated the possibility that Tr17 cells might specifically regulate the pathogenesis of RA.

研究分野：リウマチ性疾患

キーワード：関節リウマチ 制御性T細胞 転写因子 サイトカイン ケモカイン Foxp3 ROR $\gamma$ t IL-10

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の病態形成において CD4<sup>+</sup>T 細胞は中心的な役割を果たしており、特に免疫応答を誘導するヘルパー T 細胞とその機能を抑制する制御性 T 細胞とのバランスが重要と考えられている。近年の RA における複数のゲノムワイド関連解析を基にしたメタ解析において、代表的な制御性 T 細胞である Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞に關与する遺伝子群と RA との關連が報告されているが (Okada Y, et al. Nature 2014)、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。また、マウスを用いた基礎的な解析結果から Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が CD4<sup>+</sup>T 細胞分化に關わる転写因子の発現によって複数のサブセットに細分類され、各 CD4<sup>+</sup>ヘルパー T (Th helper; Th) 細胞サブセットを特異的に抑制することが示されている。研究代表者が過去に実施した解析で、ROR $\gamma$ t を発現した Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が関節炎の発症抑制に關与していることを見出し (Kondo Y, et al. Arthritis Res Ther 2015)、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が Th17 細胞特異的に免疫応答を抑制することで関節炎の発症を抑制した可能性を示唆された。この報告と同様に、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞は Th17 細胞を介した炎症病態を特異的に抑制することにより実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) を制御したことが明らかにされ、T regulatory 17 (Tr17) 細胞と呼称され、注目されることとなった。以上の通り、特に Tr17 細胞のように関節炎原性の Th 細胞を抑制して関節炎の制御に關わる特異的な Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞サブセットの存在が示唆される知見が得られているが、関節炎の病態の抑制機序は、明らかになっていなかった根本的な「問い」であり、RA の病態を明らかにし、新たな治療戦略を構築する上で重要な課題であった。

## 2. 研究の目的

本研究は RA の動物モデル、および RA の患者検体を用いて、以下の 3 点を明らかにすることを目的として実施した。

- 1) RA を制御する Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞サブセットの同定
- 2) 特異的 Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞サブセットによる関節炎制御機構の解明
- 3) 特異的 Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞サブセットの分化制御機構の解明

本研究では Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞における ROR $\gamma$ t を中心とした転写因子発現に注目し、Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞サブセットによる RA 特異的な制御機構や、Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞自体の分化制御機構を明らかにし、RA の病態解明のみならず、病態を根本的に制御するような全く新しい治療戦略の可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス自己免疫性関節炎モデルによる解析

Tr17 細胞が欠損する、Foxp3<sup>cre</sup>ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> マウスに対して RA の動物モデルであるコラーゲン誘導関節炎 (Collagen induced arthritis; CIA) を誘導し、CIA の発症率と重症度スコアを評価し、コントロールマウスである Foxp3<sup>wt</sup>ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> マウスと比較した。また、関節炎の病理学的変化について、炎症スコア、骨びらんスコアをもとに評価した。

C57BL/6 野生型マウスに CIA を誘導後、足関節への Tr17 細胞の浸潤を蛍光免疫染色により評価した。また Tr17 細胞の CCR6 の発現を Flow cytometry (FCM) により評価し、ROR $\gamma$ t を発現していない Tr17 細胞以外の制御性 T 細胞、および主として Th17 細胞と考えられる ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞と比較した。関節炎誘導後の関節局所における CCR6 のリガンドである CCL20 の発現について定量 PCR 法にて評価した。

CIA を誘導する際の抗原である II 型コラーゲン (collagen type II; CII) を投与後の Foxp3-GFP レポーターマウスの鼠径リンパ節から、CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>(=Foxp3<sup>+</sup>)Treg 細胞または、CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>T 細胞を分離し、in vitro で PMA/Ionomycin 刺激を行ない、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>Tr17 細胞における IL-10 産生について FCM を用いて解析した。

ROR $\gamma$ t 発現が亢進している CCR6<sup>+</sup>Treg 細胞を Tr17-enriched Treg を細胞と定義した。CII 投与後の鼠径リンパ節から Tr17-enriched Treg 細胞を分離し、in vitro で conventional CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養することにより、細胞増殖抑制能力を評価した。またこの培養系において、IL-10 中和抗体の影響を評価した。

### (2) ヒト RA における Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の評価

ヒトにおいて Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞に発現する ROR $\gamma$ t の発現について評価するため、FCM を用いて解析を行った。特にマルチカラー FCM を用いて発現する表面抗原により CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセットを分類する方法 (Maecher HT, et al. Nature Rev Immunol 2012) を参考とし、Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞を CD4<sup>+</sup>T 細胞と同様に細分類したうえで ROR $\gamma$ t 発現について解析を実施した。

無治療の RA 患者 29 例、およびコントロールとして健康人 (healthy control; HC) 16 例について文書同意を得たうえで末梢血単核球分画を採取し、上記で定義した Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞サブセット、および抑制能の強い Foxp3<sup>hi</sup>CD45RA<sup>+</sup> effector 制御性 T 細胞に限定し、その差異

を解析した。

Foxp3<sup>high</sup>CD45RA<sup>+</sup> effector 制御性 T 細胞と RA の疾患活動性指標である DAS28-ESR の関連を評価した。

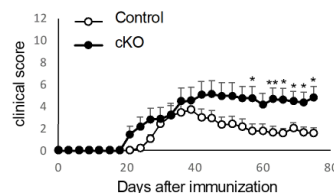
#### 4. 研究成果

##### (1) マウス自己免疫性関節炎モデルにおける解析

Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞特異的 ROR $\gamma$ t 欠損マウス (Foxp3<sup>cre</sup>ROR $\gamma$ t<sup>f1/f1</sup> マウス) における検討

Foxp3<sup>cre</sup>ROR $\gamma$ t<sup>f1/f1</sup> マウスに対して CIA を誘導したところ、コントロールである Foxp3<sup>wt</sup>ROR $\gamma$ t<sup>f1/f1</sup> マウスと比較し、発症率には差を認めなかったが、関節炎誘導後 56 日以降に関節炎の重症度が有意に増悪した (図 1)。また、関節の病理学的評価を実施したところ、コントロールマウスと比較して Foxp3<sup>cre</sup>ROR $\gamma$ t<sup>f1/f1</sup> マウスにおいて炎症スコア、骨びらんスコアの悪化傾向を認めた。

図 1: Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞特異的 ROR $\gamma$ t 欠損マウスにおける CIA の重症度



Tr17 細胞の関節局所への浸潤、および Tr17 細胞の CCR6 発現、関節炎局所の CCL20 発現

関節炎発症後の関節滑膜内には、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tr17 細胞が浸潤していることが明らかとなった (図 2)。また、関節炎誘導後の鼠径リンパ節から分離した Tr17 細胞は、ROR $\gamma$ t を発現しない Tr17 細胞以外の制御性 T 細胞と比較して CCR6 の発現が有意に亢進し、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞である Th17 細胞と考えられる分画と比較しても亢進していることが明らかとなった (図 3)。CCR6 のリガンドである CCL20 発現は、関節炎を誘導していないマウスの関節と比較して、関節炎が誘導された関節局所においてその発現の増加傾向が認められた。

図 2: 関節炎誘導後の関節局所への Tr17 細胞浸潤

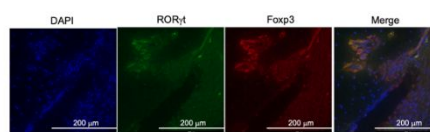
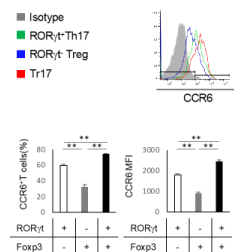


図 3: Tr17 細胞の CCR6 発現、関節局所の CCL20 発現



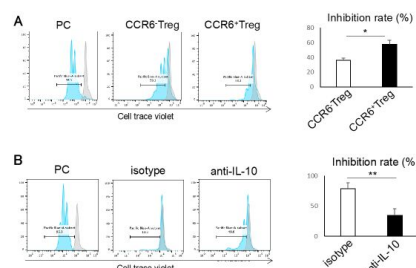
関節炎誘導後の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞からの IL-10 産生

CIA 誘導後の鼠径 LN 由来の ROR $\gamma$ t<sup>-</sup>制御性 T 細胞と比較して ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞による IL-10 産生が有意に増加していた。

Tr17-enriched 制御性 T 細胞の細胞増殖抑制能

CCR6<sup>+</sup>Tr17-enriched 制御性 T 細胞は、CCR6 陰性の ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Tr17 細胞を含まない制御性 T 細胞と比較して conventional CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖に対する高い抑制能力を持つことが明らかとなった (図 4A)。またこの作用は、IL-10 中和抗体によってキャンセルされることも見出され、抑制能は IL-10 依存性であることが明らかとなった (図 4B)。

図 4: Tr17 細胞の細胞増殖抑制能



##### (2) ヒト RA における Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の評価

Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞に発現する ROR $\gamma$ t の発現

ヒト末梢血から分離した CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> 制御性 T 細胞について、ケモカイン受容体である CXCR3 および CCR6 の発現によって、Th1 様、Th2 様、Th17 様制御性 T 細胞に細分類し、ROR $\gamma$ t 発現を評価したところ、Th17 様制御性 T 細胞において ROR $\gamma$ t 発現が有意に亢進していることが明らかとなり、この Th17 様制御性 T 細胞がヒトにおける Tr17 細胞に該当する分画であると考えられた。

RA 患者および HC から採取した末梢血制御性 T 細胞分画の比較

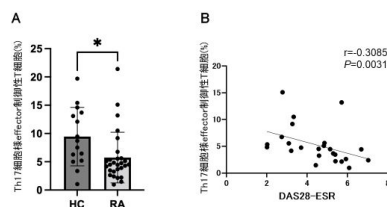
HC と比較して、RA 患者末梢血中においては抑制能が高い制御性 T 細胞分画である Foxp3<sup>high</sup>CD45RA<sup>-</sup> effector 制御性 T 細胞が有意に減少していた。特に Th17 様 effector 制御性 T 細胞

胞が、HC と比較して RA 患者末梢血において有意に減少していた (図 5A)。

Th17 様 effector 制御性 T 細胞と疾患活動性指標との比較

RA 患者末梢血中の Th17 細胞様 effector 制御性 T 細胞の比率と、RA の疾患活動性指標である DAS28-ESR を比較したところ、有意な負の相関を認めた (図 5B)。

図5: RA患者末梢血のTh17細胞様effector制御性T細胞



以上の RA の動物モデル、および RA 患者検体の解析から得られた結果から、Foxp3+制御性 T 細胞のなかで ROR $\gamma$ t を発現する Tr17 細胞とされる分画が、RA の病態を特異的に制御している可能性が示唆された。特に動物モデルの解析からは、ケモカイン受容体である CCR6 の発現によって関節炎の局所に集積し、IL-10 産生の亢進によって炎症原性 CD4+T 細胞を抑制することで関節炎制御に関連していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furuyama Kotona, Kondo Yuya, Shimizu Masaru, Yokosawa Masahiro, Segawa Seiji, Iizuka Akira, Tanimura Reona, Tsuboi Hiroto, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 207
2. 論文標題 ROR t+Foxp3+ regulatory T cells in the regulation of autoimmune arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 176 ~ 187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cei/uxab007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古山 琴菜、近藤 裕也、清水 優、谷村 玲央奈、坪井 洋人、松本 功、住田 孝之
2. 発表標題 ROR t+Foxp3+制御性T細胞による自己免疫性関節炎の制御
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotona Furuyama , Yuya Kondo, Masaru Shimizu, Hiroto Tsuboi , Isao Matsumoto, Takayuki Sumida
2. 発表標題 Analysis of the Role of ROR t+Foxp3+ T regulatory 17 (Tr 17 ) Cells in Murine Autoimmune Arthritis Model
3. 学会等名 EULAR Congress 2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古山 琴菜、近藤 裕也、清水 優、坪井 洋人、松本 功、住田 孝之
2. 発表標題 ROR t+Foxp3+制御性T細胞（Tr17）による自己免疫性関節炎の抑制機構
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------