

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17879

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける濾胞性ヘルパーT細胞による自己抗体糖鎖修飾の制御

研究課題名(英文) Regulation of autoantibody glycosylation by follicular helper T cells in rheumatoid arthritis

研究代表者

藏田 泉 (Kurata, Izumi)

筑波大学・医学医療系・非常勤研究員

研究者番号：80830108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)は全身の関節炎を主病態とする自己免疫疾患だが、その治療において免疫抑制治療による重篤な感染症は未だ残る問題点である。我々は、RAモデルマウスおよび患者血液を用いて、汎免疫抑制によらない自己抗体特異的な治療の開発を目的とした。関節炎発症早期にはリンパ節内で濾胞性ヘルパーT細胞が増加し、その細胞表面にOX40を高発現していた。そしてこのOX40を介した刺激によって、自己抗体の糖鎖修飾を調節しその病原性を制御してい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

本研究によって、糖鎖修飾、すなわち自己抗体の「質」を制御するという全く新たなRA治療の可能性が示唆された。糖鎖修飾の変化は自己抗体特異的な現象であり、同治療は汎免疫抑制に依らず自己免疫のみを標的としたものとなり得る。

また、抗体の糖鎖修飾変化は全身性エリテマトーデス等他の自己免疫疾患でも報告されている。本研究で見出されたOX40による制御はそれらに対しても共通している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by systemic arthritis, and severe infections caused by immunosuppressive therapy remain a problem in its treatment. We aimed to develop an autoantibody-specific therapy that does not require pan-immunosuppression using RA model mice and patient blood. We clarified that in the early stage of arthritis, the number of follicular helper T cells increased in the lymph nodes, and they highly expressed OX40 on their cell surface. Moreover, they could regulate glycosylation of autoantibodies and control their pathogenicity via OX40.

研究分野：膠原病リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 自己抗体 糖鎖 濾胞性ヘルパーT細胞 OX40

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ治療の現状と濾胞性ヘルパーT細胞

関節リウマチ (RA) は、多発関節滑膜炎を特徴とする進行性の自己免疫疾患である。その免疫学的病因は不詳であるが、RA の発症および進展には自己抗体の産生が関与していることが知られている。抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (ACPA) は RA 患者で検出され、疾患特異性の高い自己抗体である。ACPA は関節症状に先立って出現し、高力価 ACPA の存在は予後不良因子として同定されている。これらから、B 細胞性の自己免疫系および自己抗体が RA 発症に重要であることが示唆されている。

濾胞性ヘルパーT (Tfh) 細胞は B 細胞の成熟・活性化、抗体産生に寄与するとされるヘルパーT 細胞サブセットである。RA 患者では活動期・慢性期ともに末梢血中で Tfh 細胞が増加し、その割合が ACPA 抗体価および疾患活動性と相関していることが報告されている。またマウスモデルでは二次リンパ組織への Tfh 細胞の集積が認められている。これらの報告から、RA において Tfh 細胞がなんらかの病因的役割を担っていることが推察されるが、その詳細は未解明である。また健康人・自己免疫疾患患者両者において、そのサイトカイン産生によって Tfh 細胞内にサブセットがあることが示唆されているが、関節リウマチにおいては解析がなされていない。

(2) 自己抗体の糖鎖修飾

抗原の認識に加え、抗体は Fc 部分を介しエフェクター細胞を活性化させる働きをもつ。抗体には糖鎖と呼ばれる 1 から数個の糖質が付加されており、IgG Fc 部分の Asn297 部位に付加されている糖鎖は Fc γ 受容体への結合能を制御している。この IgG Fc 部分の糖鎖構成、特に末端のシアル酸の有無がエフェクター細胞の活性化の程度、すなわち抗体の炎症惹起能を制御している。具体的には、Asn297 におけるシアル酸脱離 (低シアル化) は抗体による炎症惹起を亢進させることが知られている。RA においては、RA 患者の ACPA は低シアル化しており、また抗原特異的抗体の低シアル化が関節炎に影響することが複数の動物モデルで示されている。

2. 研究の目的

本研究は、関節リウマチにおける濾胞性ヘルパーT 細胞による自己抗体の低シアル化制御機構の解明、およびその阻害による新規治療戦略構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 関節炎モデルマウスを用いた解析

自己免疫性関節炎モデルである Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 誘導関節炎 (GPI induced arthritis: GIA) マウス鼠経リンパ節中の濾胞性ヘルパーT 細胞 (follicular helper T 細胞: Tfh 細胞) の経時的変化、Tfh 細胞からのサイトカイン産生及び表面分子発現を検討した。

GIA マウス鼠経リンパ節中の plasmablast の経時的変化を検討した。Tfh 細胞とナイーブ B 細胞の共培養を行い、Tfh 細胞の B 細胞分化、抗 GPI 抗体産生への影響を検討した。

関節炎発症期と改善期の抗 GPI 抗体のシアル酸含有量を質量分析で検討した。両抗体で樹状細胞 (dendritic cell: DC) を刺激し、DC からの炎症性サイトカイン、ケモカイン産生を比較した。

Tfh 細胞との共培養による plasmablast 中シアル酸付加酵素 (St6gal1) の発現変化を検討した。また関節炎発症期の Tfh 細胞で高発現している共刺激分子を *in vivo*、*in vitro* で阻害し抗体のシアル酸量、関節炎への影響を検討した。

(2) 関節リウマチ患者末梢血を用いた解析

Tfh 細胞と抗 CCP 抗体価、plasmablast 中 St6gal1 発現の相関を検討した。

4. 研究成果

(1) 関節炎モデルマウスを用いた解析

GIA の誘導と鼠経リンパ節における Tfh 細胞の増加、局在

CD4+CXCR5+ICOS+ の Tfh 細胞は関節炎発症期で最も増加していた。またそのサイトカイン産生を検討したところ、IL-17 を産生する Tfh (Tfh17) 細胞が同時期に最も増加していた。次に、Tfh17 細胞の局在および集積を検討する目的で、GIA 鼠経リンパ節の蛍光免疫染色を行った。CD4+CXCR5+ の Tfh 細胞は関節炎発症期の鼠経リンパ節胚中心で増加し、関節炎改善気では減少していた。

Tfh17 細胞が胚中心内で増加していることからその表面分子発現を検討したところ、OX40 が Tfh 細胞、特に Tfh17 細胞で高発現していることが明らかとなった。コントロールマウスでは OX40 の高発現は認められず、関節炎に特異的な変化と考えられた。

Tfh 細胞による B 細胞分化の促進

関節炎発症期の Tfh 細胞とナイーブ B 細胞を共培養したところ、Tfh 細胞非存在下と

比較してナイーブ B 細胞は高率に plasmablast へ分化した。さらに、培養上清中の抗 GPI 抗体価を ELISA で検討した。その結果、Tfh 細胞および GPI 存在下に plasmablast からの抗 GPI 抗体産生の亢進が認められた。これらの結果から、我々は Tfh 細胞が B 細胞分化および自己抗体産生亢進を介して GIA 発症に寄与していると考えた。しかしながら、Tfh 細胞による抗体産生促進は関節炎特異的現象ではなかった。また GIA 血清中の抗 GPI 抗体価は関節炎が軽快し、Tfh 細胞・plasmablast が減少する改善期になっても経時的に増加を続けていたことから、Tfh 細胞の関節炎への関与の説明としては不十分であった。

関節炎経過における自己抗体の変化

関節炎の経過と抗 GPI 抗体の挙動の不一致を説明する要因として、抗体の炎症惹起能が変化している可能性を検討した。関節炎発症期、極期、改善期のマウス血清からアフィニティークロマトグラフィーで抗 GPI 抗体を精製した。これらで CD11c 陽性の樹状細胞を *in vitro* で刺激し、培養上清中のサイトカインおよびケモカイン濃度を測定した。発症期由来の抗体で刺激した樹状細胞からは、高レベルの TNF α および CXCL1 産生が認められたが、改善期抗体では認められなかった。これらのサイトカイン、ケモカイン産生は Fc γ 受容体のブロッキングにより著明に減弱した。以上から、抗 GPI 抗体の炎症惹起能は GIA の経過中に変化していることが示唆された。

この変化の原因として抗 GPI 抗体のシアル酸含有量を検討した。IgG にシアル酸を付加する責任酵素は β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (St6gal1) であるが、GIA 鼠径リンパ節の plasmablast における St6gal1 発現は関節炎発症期と極期で著明に低下していた。抗体のシアル酸含有量をレクチンプロットングおよび質量分析を用いて定量したところ、発症期抗体は改善期抗体と比較して低シアル化していることが明らかとなった。抗 GPI 抗体の Asn297 におけるシアル酸付加糖鎖は 3 種類検出されたが、そのうち最も多い分画である Hex(4)HexNAc(4)dHex(1)NeuGC(1)において day 7 抗 GPI 抗体の有意な低シアル化がみられた。

以上から自己抗体のシアル酸含有量変化が抗体の炎症惹起能の変化に寄与している可能性が考えられたため、*in vitro* および *in vivo* でその影響を検討した。ノイラミニダーゼ処理により人為的にシアル酸を脱離させた抗体を作成し樹状細胞刺激を行ったところ、改善期抗体刺激による TNF α 、CXCL1 産生は発症期抗体刺激時と同等まで回復した。またシアル酸の前駆体である ManNAc を経口的に補充したマウスでは抗 GPI 抗体のシアル酸含有量が改善し、GIA が減弱した(図 1)。

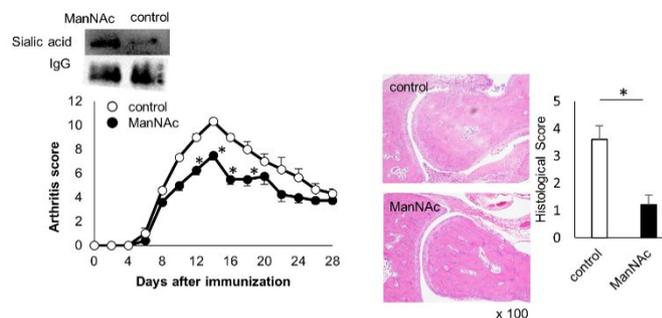


図 1. シアル酸前駆体 ManNAc の経口補充による関節炎の改善
関節炎スコアの経時的变化(左)と関節炎極期(day 14)での足関節 H&E 染色像(右)

自己抗体低シアル化の OX40 を介した Tfh 細胞による制御

抗 GPI 抗体低シアル化への Tfh 細胞の影響を共培養系で検証した。B 細胞単独、もしくは CD4+CXCR5-細胞との共培養と比較し、Tfh 細胞との共培養により分化した plasmablast における St6gal1 発現は低下していた(図 2)。この Tfh 細胞による St6gal1 発現制御に關与する機構として、細胞表面分子の関与を検討した。共培養系においてモノクローナル抗体を用いて OX40-OX40 ligand (OX40L) 経路を阻害したところ、Tfh 細胞の生存、plasmablast の分化は抑制されその St6gal1 発現は回復した。さらに、抗 OX40L 抗体をマウスに投与し *in vivo* に OX40-OX40L 経路を阻害すると GIA は減弱し、plasmablast における St6gal1 発現および抗 GPI 抗体のシアル酸含有量は回復していた。同マウスから精製された発症期抗体による刺激では、樹状細胞による TNF α 、CXCL1 産生は低下していた。また同マウスでは Tfh 細胞、特に Tfh17 細胞の数が減少しており、抗 GPI 抗体価や胚中心の形成も減弱していた。

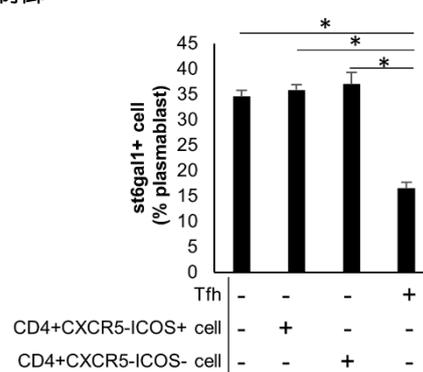


図 2. Tfh 細胞による低シアル化制御
T-B 細胞共培養系における plasmablast 中 St6gal1 陽性細胞の割合。

(2) 関節リウマチ患者末梢血を用いた解析

RA 患者における Tfh17 細胞と St6gal1 発現の相関

治療ナイーブな RA 患者と変形性関節症患者の末梢血単核球を解析したところ、RA 患者では Tfh 細胞および Tfh17 細胞が有意に増加していた。さらに、RA 患者において Tfh17 細胞の割合と血清中 ACPA 抗体価に有意な正の相関が認められた。また末梢血中

plasmablast の St6gal1 発現解析から、Tfh17 細胞の割合と St6gal1 発現に強い負の相関があることが明らかとなった。他の Tfh サブセットと比較して、GIA 同様 RA 患者においても Tfh17 細胞は OX40 を高発現していた。

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 0件）

1. 著者名 Izumi Kurata, Isao Matsumoto, Ayako Ohyama, Atsumu Osada, Hiroshi Ebe, Hoshimi Kawaguchi, Shunta Kaneko, Yuya Kondo, Hiroto Tsuboi, Azusa Tomioka, Hiroyuki Kaji, Takayuki Sumida	4. 巻 78
2. 論文標題 Potential involvement of OX40 in the regulation of autoantibody sialylation in arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1488 ~ 1496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/annrheumdis-2019-215195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 Kurata I, Matsumoto I, Ohyama A, Osada A, Kondo Y, Tsuboi H, Sumida T
2. 発表標題 Follicular Helper T 17 Cell Regulates Autoantibody Hyposialylation via OX40-OX40 Ligand Axis in Experimental Arthritis
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurata I, Matsumoto I, Mikami N, Ohyama A, Osada A, Kondo Y, Tsuboi H, Sumida T
2. 発表標題 Potential involvement of OX40 expressing Tfh cells on the regulation of autoantibody sialylation in experimental and rheumatoid arthritis
3. 学会等名 Annual Meeting of the American College of Rheumatology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurata I, Matsumoto I, Ohyama A, Osada A, Kondo Y, Tsuboi H, Sumida T
2. 発表標題 Potential involvement of OX40 expressing Tfh cells on the regulation of autoantibody sialylation in experimental and rheumatoid arthritis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------