

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23870

研究課題名（和文）関節リウマチ発症予防戦略のための、Th17細胞の炎症性サイトカイン産生機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the inflammatory cytokine production mechanism of Th17 cells for the prevention strategy of rheumatoid arthritis

研究代表者

岡本 祐子 (Okamoto, Yuko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：30723043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ患者の予後は飛躍的に改善したが、一旦発症した関節炎は治癒できないため、研究の焦点はハイリスク患者の発症予防に移行しつつある。関節リウマチの発症を予防するには、発症予測因子の確立と、自己免疫的機序の解明が求められる。欧米では、既存抗リウマチ薬を前倒しして使用する介入試験が進行中であるが、発症機序に応じた、より特異的な予防方法の確立が求められている。Th17細胞は、T細胞中のサブセットで、関節リウマチの発症、関節炎増悪の主なエフェクターとして注目されている。本研究では、Th17細胞が産生する炎症性サイトカインを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、既に発症した関節炎/関節リウマチを治療するのではなく、関節炎の発症前に予防を試みる自己免疫疾患の分野では新たな試みである。Th17細胞を中心とした、T細胞サイトカイン制御機構を明らかにすることで、新たな治療ターゲットの同定に結び付く可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Although the prognosis of patients with rheumatoid arthritis has improved dramatically, the focus of research is shifting to prevention of development of arthritis because arthritis that has once developed cannot be cured. In order to prevent the onset of rheumatoid arthritis, it is necessary to establish predictors of the onset and elucidate the autoimmune mechanism. In Europe and the United States, intervention studies are underway using existing anti-rheumatic drugs, but there is a need to establish more specific preventive methods according to the pathogenic mechanisms. Th17 cells are a subset of T cells and are attracting attention as the main effectors for the onset of rheumatoid arthritis and exacerbation of arthritis. In this study, we revealed inflammatory cytokines produced by Th17 cells.

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 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は、主に関節滑膜が標的とされる自己免疫疾患で、遺伝要因、環境要因の複合要因で発症する。抗 CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体は、シトルリン化抗原を認識する自己抗体である。RA 患者の血清中に特異的に認められ、重症化の予測因子でもある。近年、関節炎発症前に、血中に抗 CCP 抗体が検出される前関節炎期を経て、関節炎が発症することが明らかにされた。抗 CCP 抗体とリウマトイド因子を組み合わせることで RA 発症予測や、ハイリスク者の同定がある程度可能となっている。欧米では、ハイリスク者を対象に、抗リウマチ薬を前倒して使用する方法で、RA 発症の予防を目的とした介入試験が行われている。しかしながら、抗 CCP 抗体が産生される過程と、血中の抗 CCP 抗体産生後に関節炎発症に至る過程では、免疫学的病態は異なると考えられており、前関節炎期の自己免疫異常の解明が求められる。

モデルマウスでは、Th17 細胞の活性化や制御性 T 細胞 (Treg) の減少、更に腸管マイクロバイオームと関節炎発症の関連が多数報告されている。Th17 細胞と Treg の制御は RA の予防戦略として注目されるが、ヒトの検体、特に関節炎発症前の検体を用いた研究は乏しい。

一方、PAD (protein arginine deiminase) は、蛋白のシトルリン化を触媒する酵素で、ヒト末梢血中 T 細胞では、Th17 細胞の分化を、PAD が制御していることを本研究代表者らは報告した。PAD 阻害薬は、マウスモデルの関節炎の発症を抑制できることも報告されている。これらの結果より、PAD 制御は、関節炎の予防戦略の有力な候補と期待される。

これらの知見より、Th17 細胞分化と PAD の機能制御が、RA 発症予防法開発のブレイクスルーとなる可能性があると考えられ、本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

RA 発症のリスク因子と前関節炎期の T 細胞の機能異常の関連を詳細に検討し、RA 発症を予測する血中バイオマーカー、および RA の予防的介入方法を開発することが本研究の目的である。

本研究代表者らは、RA 発症ハイリスク者の末梢血 T 細胞が T 細胞受容体刺激により、より多くの IL-17A を産生する Th17 細胞に分化することを報告した。しかしながら近年注目される、Th17 細胞による炎症性サイトカイン (GM-CSF、IFN- ) の産生、Treg への分化能については不明である。本研究代表者は、コロラド大学に研究留学し、

RA 発症ハイリスク者を対象とした前向きコホート研究に従事した。その際に採取した、関節炎発症前抗 CCP 抗体陽性の RA 発症ハイリスク者の末梢血を解析に用いる。RA 患者と、血中抗 CCP 抗体陽性 RA 発症ハイリスク者において、末梢血 T 細胞を T 細胞刺激した際の Th17 細胞への分化能、Th17 細胞の産生する炎症性サイトカインのプロファイルについて解析する。

### 3. 研究の方法

本研究は、RA 発症前の、Th17 細胞による炎症性サイトカイン産生と Treg 細胞への分化、その分子機構、および RA 発症を予測する血中バイオマーカーの同定を目的とする。臨床情報と、培養 T 細胞は、既にコロラド大学において採取、保存された情報・検体を用いた。血中抗 CCP 抗体陽性だが関節炎のない RA 発症ハイリスク者、早期 RA 患者、健常人の末梢血から分離直後に固定、および抗 CD3/CD28/CD2 抗体+IL-2 を用いて 3 日間刺激培養後に固定、凍結保存した単核球

#### 研究計画アウトライン

血中抗 CCP 抗体陽性関節リウマチ  
発症ハイリスク者 (n=30)

臨床情報      遺伝情報  
サイトカイン、 -3 脂肪酸濃度  
フローサイトメトリー解析 (Th17  
細胞、炎症性サイトカイン産生、  
Treg 細胞分化、IL-10 産生)

T 細胞分子メカニズムの解明

細胞（PBMC）を用いる。同時に取得された臨床情報、血清を下記の検討に用いる。

1. 固定細胞を細胞内染色し、T細胞分画、サイトカイン産生（IL-17A、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-10）転写因子（ROR $\gamma$ t、Foxp3）発現をフローサイトメトリーで解析する。
2. 1で得られたサイトカイン産生、転写因子発現と、臨床情報（年齢、性別、喫煙歴、 $\omega$ -3脂肪酸の摂取歴、遺伝情報、抗CCP抗体価、リウマトイド因子）の関連を統計学的に解析する。
3. 上記の患者の血清サイトカイン濃度、 $\omega$ -3脂肪酸濃度を測定し、サイトカイン産生、転写因子発現との関連を統計学的に解析する。
4. T細胞培養系にPAD阻害薬（PAD4阻害薬、PAD2阻害薬）、 $\omega$ -3脂肪酸を添加し、Th17細胞への分化、炎症性サイトカイン産生、Treg細胞分化に対する抑制効果を検討する。
5. RA発症ハイリスク者に特徴的に増加した炎症性サイトカイン産生Th17細胞をセルソータで分離、RNA Seqによる網羅的mRNA解析を行い、予防的介入治療の標的となる新規転写因子を探索する。

#### 4. 研究成果

本研究では、既にコロラド大学において採取、保存された情報・検体を用いた。血中抗CCP抗体陽性だが関節炎のないRA発症ハイリスク者、早期RA患者、健常人の末梢血から分離直後に固定、および抗CD3/CD28/CD2抗体+IL-2を用いて刺激培養後に固定したT細胞を用いた。

T細胞分画、サイトカイン産生（IL-17A、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-10）をフローサイトメトリーにより解析するパネルを作成し、患者検体の測定を実施した。結果、抗CCP抗体陽性RA発症ハイリスク者、早期RA患者では、IL-17産生細胞中に認められる、炎症性サイトカインである、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、GM-CSFの産生割合が高頻度であった。

また、T細胞培養系に、PAD阻害薬（PAD4阻害薬、PAD2阻害薬）を添加したところ、PAD4阻害薬の添加によって、IL-17産生T細胞への分化が有意に抑制された。 $\omega$ -3脂肪酸の培養条件検討を終了し、培養実験を行っている。

今後は測定結果の解析を進めるとともに、RA発症ハイリスク者に特徴的に増加した炎症性サイトカイン産生Th17細胞をセルソータで分離、網羅的mRNA解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------