

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08815

研究課題名（和文）ヘルパーT細胞におけるエピゲノム記憶の人為的修復によるSLE新規治療戦略の創出

研究課題名（英文）Development of a new treatment strategy for SLE by artificially restoring epigenomic memory in helper T cells

研究代表者

中山田 真吾（Nakayamada, Shingo）

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60389426

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：SLE患者では、IL-2の減少によりTfh細胞の増加とTfr細胞の減少が生じる。SLE患者のIL-2減少は、疾患感受性遺伝子IL21-AS1によるIL-2の遺伝子制御と関連した。IL-2はSTAT3/STAT5の活性化を介したエピゲノム制御によりメモリーTfh細胞から機能的Tfr細胞への変換を誘導した。一方、SLEではTph細胞が増加し、その分化はTfh細胞と異なり、組織マクロファージから産生されるTGF- β 3で誘導され、B細胞分化と抗体産生を促進した。以上、SLEの病的T細胞の分化にかかわるIL-2やTGF- β 3はエピゲノム修復を介した新たな治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、SLEの病態においてT細胞の分化や機能の異常がゲノム異常により規定されるSLE特異的なエピゲノム記憶に基づく可能性を示唆する。これらを標的とした創薬はSLEの治療抵抗性難治性病態への新たな治療戦略に有望である。本研究は、免疫難病であるSLEへの疾患特異的治療の開発に重要な示唆を与え、医療および社会の発展に資するものである。

研究成果の概要（英文）：In SLE patients, decreased IL-2 resulted in increased Tfh cells and decreased Tfr cells. IL-2 reduction in SLE patients was associated with genetic regulation of IL-2 by the disease susceptibility gene IL21-AS1. IL-2 induced the conversion of memory Tfh cells to functional Tfr cells by epigenetic regulation via activation of STAT3/STAT5. On the other hand, Tph cells increased in SLE, and their differentiation was induced by TGF- β 3 produced from tissue macrophages, unlike Tfh cells, and promoted B cell differentiation and antibody production. These results suggest that IL-2 and TGF- β 3, which are involved in the differentiation of pathological T cells in SLE, are novel therapeutic targets mediated by epigenome repair.

研究分野：膠原病・リウマチ学

キーワード：全身性エリテマトーデス 濾胞性ヘルパーT細胞 濾胞制御性ヘルパーT細胞 末梢性ヘルパーT細胞 エピジェネティクス サイトカイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身性エリテマトーデス(SLE)は自己応答性T細胞とB細胞との相互活性化で特徴付けられる自己免疫疾患である。しかし、SLEの治療はステロイドなどの非特異的な免疫抑制療法に依存し、治療抵抗性、副作用等により患者QOLは著しく障害される。したがって、本疾患に対する病態特異的な新たな治療戦略の確立が急務である。

(2) ヘルパーT細胞は機能の異なるサブセットに分化することで多彩な免疫応答を誘導する。なかでも濾胞性ヘルパーT (Tfh)細胞は可塑性と多様性に富むサブセットであり、様々な自己抗原に対応してB細胞からの多彩な自己抗体産生を誘導し、SLEの発症や遷延化に重要な役割を担う(文献1, 2)。近年、Tfh細胞を介したB細胞活性化を抑制する濾胞性制御性ヘルパーT (Tfr)細胞の存在が報告され、Tfh細胞とTfr細胞のバランス異常が自己免疫の誘導に関与する可能性が示唆されている。申請者は、SLE患者143例を対象とした免疫フェノタイプ解析によりTfh細胞の活性化が既存治療への抵抗性をもたらすことを明らかとし(文献3)、病原性Tfh細胞の分化や機能にはエピゲノム機序が関わることを報告した(文献4)。近年のGWAS解析により、SLE疾患感受性遺伝子にはTfh細胞の分化に関わるサイトカイン、転写因子などの遺伝子が複数報告されている。さらに単一の遺伝子発現調節領域のエンハンサーが複数にまたがり集積し、超強力な転写活性化を担う領域であるスーパーエンハンサー(SE)がT細胞あるいは疾患特異的なエピゲノム制御に密接に関与することが示唆されている。

(3) 以上の背景から、申請者はゲノム異常により規定されるTfh細胞特異的なSE形成によるエピゲノム記憶が特定の誘導因子により誘導され、Tfh細胞の可塑性・多様性からなるSLEの免疫異常を惹起するとの仮説を立てた。これらの根拠に基づき、本研究では、Tfh細胞の可塑性/多様性の誘導因子の同定とともにその人為的なエピゲノム制御によるTfh細胞とTfr細胞の可塑性の制御やTfh細胞との類似性をもつ新たなヘルパーT細胞を標的とした新たな治療戦略への基盤構築を目的とした。

<引用文献>

1. Nakayama S, Takahashi H, Kanno Y, et al. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol.* 24:297-302, 2012.
2. Nakayama S, Kanno Y, Takahashi H, et al. Early Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell-like Transition. *Immunity.* 35: 919-31, 2011.
3. Kubo S, Nakayama S, Yoshikawa M, Miyazaki Y, Sakata K, Nakano K, Iwata S, Miyagawa I, Saito K, Tanaka Y. Peripheral immunophenotyping identifies three subgroups based on T cell heterogeneity in lupus patients. *Arthritis Rheumatol.* 69: 2029-37, 2017.
4. Ma X, Nakayama S, Kubo S, Sakata K, Yamagata K, Miyazaki Y, Yoshikawa M, Kitanaga Y, Zhang M, Tanaka Y. Expansion of T follicular helper-T helper 1 like cells through epigenetic regulation by signal transducer and activator of transcription factors. *Ann Rheum Dis.* 77: 1354-61, 2018.

2. 研究の目的

(1) SLE患者を対象に末梢血免疫フェノタイプ解析を実施し、Tfh細胞とTfr細胞の臨床像や治療反応性との関連性を検討する。さらに、Tfh細胞のエピゲノム制御によるTfr細胞への形質転換の検証によって、Tfh細胞の人為的なエピゲノム制御によるT細胞の機能修復の可能性を探索する。

(2) SLE患者にみられるTfh細胞とTfr細胞との可塑性に関わるゲノム異常とエピゲノム修飾との関連を大規模in silico解析で検索し、Tfh細胞に特異的なSE・エピゲノム修飾とその誘導因子を同定し、SLEの臨床像との関連を検証する。

(3) Tfh細胞と機能が類似する新たなサブセットである末梢性ヘルパーT (Tph)細胞の分化機序とSLE病態との関連を解析することで、Tfh細胞との可塑性の有無および治療標的としての妥当性を検証し、Tph細胞の分化を標的とした新たな治療標的を探索する。

3. 研究の方法

(1) SLE患者41名と健常者26名の血清サイトカインをELISA、末梢血単核細胞をフローサイトメトリーで解析した。末梢血からメモリーTfh細胞をソーティングして様々な条件下で培養し、Tfh細胞とTfr細胞の機能分子、ヒストン修飾、STATのリン酸化などをフローサイトメトリー、クロマチン免疫沈降法、定量PCRにより解析した。

(2) ヒトデータベースを用いた大規模in silico解析により、(a)~(c)の条件を満たす一塩基

多型 (SNP) を同定した。(a) SLE の疾患感受性遺伝子に含まれ、(b) CD4 陽性 T 細胞で高発現し、(c) SE により制御を受ける遺伝子を検索。大規模 *in silico* 解析により同定したリスクアレルの有無を SLE 患者で検討した。さらに、SLE 患者末梢血における上記の遺伝子発現を qPCR 法で検出し、IL-2 を含むサイトカイン、Tfh 細胞、Tfr 細胞、SLE の臨床像との関連性を検証した。

(3) SLE 患者 40 名と健常者 11 名から精製したヒト CD4 陽性 T 細胞における Tph 細胞関連マーカーの表現型と B 細胞への機能をフローサイトメトリーと定量 PCR で解析した。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を抽出し、T 細胞受容体刺激に加えて、様々なサイトカインを添加して培養し、Tph 細胞への分化を評価した。活動性のループス腎炎患者の腎生検標本をマルチカラー免疫蛍光染色で解析した。

4. 研究成果

(1) SLE 患者 41 名と健常者 26 名の末梢血単核細胞をフローサイトメトリーで解析した。SLE 患者末梢血では、CD4⁺CXCR5⁺Foxp3⁺PD-1^{hi}Tfh 細胞の増加と CD4⁺CXCR5⁺CD45RA⁺Foxp3^{hi} 活性化 Tfr 細胞の減少がみられ、これらは IL-2 の減少により生ずることを見出した。さらに、*in vitro* の検討により、IL-2 を介した STAT3 と STAT5 の活性化が FOXP3 及び BCL6 遺伝子座における抑制型ヒストンマーカー H3K27me3 の抑制を誘導することでメモリー Tfh 細胞から機能的 Tfr 細胞への変換を誘導することを明らかにした。

(2) これらの起点となる IL-2 の発現低下の機序をゲノム異常の観点から探求した。その結果、IL21 antisense RNA 1 (IL21-AS1) に存在する SNP である rs62324212 は、SLE に関連する遺伝子リスクバリエーションとして同定され、Ensembl Genome Browser の解析により、rs62324212 (C>A) は IL21-AS1 の予測エンハンサー領域に位置することが判明した。IL21-AS1 は CD4⁺T および B 細胞の核内に発現していたが、SLE 患者ではその発現が低下していた。興味深いことに、IL21-AS1 の発現は IL-21 ではなく IL-2 の mRNA レベルと正の相関があり、活性化 Tfr 細胞の割合と関連していた。さらに、SLE 患者において、IL21-AS1 発現と疾患活動性の間に有意な負の相関が認められた。以上より、IL21-AS1 は SLE において IL-2 を介した Tfr 細胞の活性化に関与し、疾患活動性に影響を及ぼすものと考えられた。

(3) Tfh 細胞と機能が類似する新たなサブセットである Tph 細胞の分化機序を検討した。その結果、(1) TGF- β 3 は Tph 細胞の分化誘導とそれに引き続く B 細胞の形質細胞、抗体産生に重要を担うこと、(2) SLE 患者末梢血では、疾患活動性と相関しながら Tph 細胞が増加していること、(3) 活動性ループス腎炎の病変部位への Tph 細胞の浸潤は、マクロファージから産生される TGF- β 3 と相関してみられることが明らかとなった。さらに、従来 Tph 細胞を誘導すると報告された TGF- β 1 と比し、TGF- β 3 は Tph 細胞の誘導能が高く、炎症組織への浸潤が確認されたことから、SLE における疾患活動性、臓器病変の進展に寄与する可能性が示唆された。

以上、本研究では、(1) IL-2 は活性化した Tfr 細胞を増殖させるとともに、STAT3 と STAT5 のリン酸化を誘導し、両者が Foxp3 と Bcl-6 の遺伝子座に直接結合することでヒストン修飾を変化させて、Tfh 細胞から Tfr 細胞への分化転換を誘導するが、SLE 患者では IL-2 が減少しており、Tfh 増加・Tfr 低下が生じていること(令和 2 年度)、(2) SLE の SNP で影響を受ける IL21-AS1 がこれらの IL-2 を介した Tfr 細胞の活性化に関与し、疾患活動性に影響を及ぼすことを明らかにした(令和 3 年度)。(3) さらに、Tfh 細胞との類似性をもつ Tph 細胞は Tfh 細胞とは異なる分化機序を有し、主に組織マクロファージから産生される TGF- β 3 によって誘導され、SLE 患者の B 細胞分化と抗体産生を促進することにより、活動性ループス腎炎の病態形成に重要な役割を担い、SLE に対する有力な治療標的となる可能性が示唆された(令和 4 年度)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hao H, Nakayamada S, Tanaka Y.	4. 巻 41
2. 論文標題 Differentiation, functions, and roles of T follicular regulatory cells in autoimmune diseases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-021-00164-9	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 該当する
1. 著者名 Nakayamada S, Tanaka Y.	4. 巻 17
2. 論文標題 Clinical relevance of T follicular helper cells in systemic lupus erythematosus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Expert Rev Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1143-1150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1744666X.2021.1976146.	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 -
1. 著者名 Hao H, Nakayamada S, Ohkubo N, Yamagata K, Zhang M, Shan Y, Iwata S, Zhang T, Tanaka Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Involvement of lncRNA IL21-AS1 in interleukin-2 and T follicular regulatory cell activation in systemic lupus erythematosus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther.	6. 最初と最後の頁 302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-021-02682-w.	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 該当する
1. 著者名 Hao H, Nakayamada S, Yamagata K, Ohkubo N, Iwata S, Inoue Y, Zhang M, Zhang T, Satoh Kanda Y, Shan Y, Otsuka T, Tanaka Y	4. 巻 73
2. 論文標題 Conversion of T Follicular Helper Cells to T Follicular Regulatory Cells by Interleukin-2 Through Transcriptional Regulation in Systemic Lupus Erythematosus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis and Rheumatology	6. 最初と最後の頁 132, 142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.41457	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 該当する

1. 著者名 Ma X*, Nakayamada S* (* equal contribution), Wang J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Multi-source pathways of T follicular helper cell differentiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 621105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.690815.	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 該当する

1. 著者名 中山田真吾, 田中良哉	4. 巻 277:
2. 論文標題 全身性エリテマトーデスの病態と新規治療戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 717-723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 中山田真吾, 田中良哉	4. 巻 78
2. 論文標題 Tfh細胞/Tfr細胞と自己免疫疾患	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 477-484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中山田真吾, 田中良哉
2. 発表標題 免疫フェノタイピングによる自己免疫疾患研究
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 Nakayamada S, Tanaka Y
2. 発表標題 Targeting the JAK in the treatment of SLE
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 Nakayamada S, Tanaka Y
2. 発表標題 Immunophenotyping in Systemic Lupus Erythematosus
3. 学会等名 APLAR 2021 23th Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakayamada S, Tanaka Y
2. 発表標題 Precision medicine using immunophenotypic analysis
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山田真吾, 田中良哉
2. 発表標題 自己免疫疾患における濾胞性ヘルパーT細胞
3. 学会等名 第7回日本骨免疫学会
4. 発表年 2022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
研究協力者	郭 賀 (HAO He)	産業医科大学・医学部・大学院生 (37116)	
研究協力者	単 宇 (SHAN Yu)	産業医科大学・医学部・大学院生 (37116)	
研究協力者	山形 薫 (YAMAGATA Kaoru)	産業医科大学・医学部・講師 (37116)	

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
---------	---------