

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12102  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791099  
 研究課題名（和文） インターロイキン - 21 の分子機構の解明とその制御による免疫疾患の新規治療法の検討  
 研究課題名（英文） Autoimmune diseases and the molecular mechanism of interleukin -21  
 研究代表者  
 林 太智（HAYASHI TAICHI）  
 筑波大学・医学医療系・准教授  
 研究者番号：00466674

### 研究成果の概要（和文）：

全身性エリテマトーデス (SLE) 患者末梢血ではインターロイキン (IL)-21、IL-21R の発現亢進があり、血清抗 DNA 抗体価や IgG 値など臨床指標と相関した。末梢血 IL-21 産生細胞は ICOS high、CXCR5+ の濾胞ヘルパー T 細胞様細胞であった。末梢血 IL-21 産生細胞のなかに IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 を共産生する細胞群があり、いずれも SLE 患者で増加している一方、BAFFR の発現とは負の相関があった。

研究成果の概要（英文）：Expression of interleukin (IL)-21, IL-21R has enhanced in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus (SLE), and correlated with serum IgG, and anti-DNA antibody titer. Peripheral blood IL-21 producing cells are follicular helper T-like cells with CXCR5 and ICOS high phenotype. IL-21 producing cells co-produce IFN- $\gamma$ , and IL-4, IL-17 was increased in peripheral blood of SLE patients, and negative correlation was observed in the expression of IL-21 and BAFFR.

### 交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：臨床免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：全身性エリテマトーデス、インターロイキン-21、T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 疾患感受性遺伝子としての IL-21

近年の Genome wide study により自己免疫疾患に関する多くの疾患感受性遺伝子が明らかとなり、その多くが様々な疾患で共通していることがわかってきた。

本研究のテーマである Interleukin (IL)-21 は T (Tfh) 細胞や活性化 T 細胞や NKT 細胞から産生され、B 細胞のクラススイッチと形質細胞への分化を促進し、自己抗体の産生を強く誘導するサイトカイン (J Immunol.2007; 179:5886-96) であり、その遺伝子もこの共通

した疾患感受性遺伝子とされている。

しかし、IL-21 がヒト自己免疫疾患にどのような関与しているかはほとんど知られておらず、その分子機構の解明は、全身性エリテマトーデス (SLE) をはじめとした自己免疫疾患の理解、ひいては新規治療につながるものと考えられた。

#### (2) 全身性エリテマトーデスと IL-21

SLE は関節リウマチ (RA) に次いで多い全身性自己免疫疾患であり、IL-21 に関する知見が最も多い疾患の一つである。

SLE のモデルマウスである Sanroque マウ

スでは SLE 様症状の原因として、inducible costimulator (ICOS) 発現亢進による IL-21 産生亢進が明らかとされている (Nature.2007;450:299-303)。また、他の SLE モデルマウスである BXSB-Yaa マウスでも血清 IL-21 濃度が上昇しており (J Immunol.2004;173:5361-71)、IL-21 receptor (IL-21R) を欠損させると SLE 様所見を抑制できることも報告されている (Proc Natl Acad Sci USA.2009;106:1518-23)。一方、IL-21R-Fc 融合蛋白での治療介入では、BXSB-Yaa、および、MRL/lpr において腎炎の発症と抗 DNA 抗体産生を抑制できたが、その効果は限定的であったと報告されている (Ann N Y Acad Sci.2007;1110:590-601、J Immunol.2007;178:3822-30)。

ヒトにおいては、IL-21 と IL-21R の一遺伝子多型 (SNP) がともに SLE 発症と関連 (Ann Rheum Dis.2008;67:458-61、Arthritis Rheum.2009;60:2402-7) し、SLE 患者において血清 IL-21 濃度が高値であること (J Clin Immunol.2010;30:45-52) が報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究はヒトにおける IL-21 と自己免疫疾患の関与を明らかとするため、はじめにマウスで報告がある SLE を対象に解析し、末梢血における産生細胞を特定することにより、IL-21 とその関連分子を制御する自己免疫疾患の新規分子標的治療の可能性の検討することを目的とする。

また、ヒトにおいて IL-21 関連分子を解析することは、新規治療を検討する基盤となるだけでなく、IL-21 産生に影響を及ぼすカルシニューリン阻害薬や IL-21 のシグナル伝達物質である Janus kinase (JAK) を阻害する薬剤、IL-21 と類似作用を有する B lymphocyte stimulator (BlyS: BAFF) 阻害薬など既存の分子標的薬の免疫系への影響を考察するうえでも有意義である。

### (1) 末梢血における IL-21 発現の解析

IL-21 に関する解析が末梢血で可能であることを確認するため、末梢血の PCR で IL-21、IL-21R の発現を確認し、自己免疫疾患患者と健常者での違いを解析するとともに、疾患の病態、活動性との比較によりその関連を解析する。

### (2) IL-21 産生細胞の解析

IL-21 産生細胞を同定し、その特徴を明らかとするとともに、その性質の理解を深めるため、in vitro 刺激による IL-21 産生細胞の

反応性を解析する。

### (3) 薬剤による治療介入

(可能であれば)、IL-21 のシグナルに関連する既存薬剤 (カルシニューリン阻害薬、JAK 阻害薬) や IL-21 を直接制御する薬剤 (IL-21 R-Fc、抗 IL-21R 抗体) に対する反応性の違いを解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 末梢血における IL-21 発現

① SLE 患者、RA 患者、シェーグレン症候群 (SS) 患者、健常者 (HC) の末梢血を採集、PBMC を分離して、mRNA を抽出、定量 PCR 法で IL-21、IL-21R の発現を調べる。

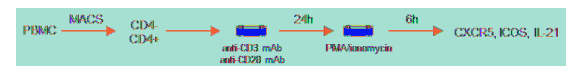
② 解析を行った SLE 患者末梢血における IL-21 の発現と抗 DNA 抗体や臨床症状など SLE の様々な臨床指標との相関を調べる。

### (2) IL-21 産生細胞の同定

既報 (Immunity.2009;31:158-69) をもとに細胞内 IL-21 染色の系を確立し、健常者、および SLE 患者から末梢血を採集、末梢血 IL-21 産生細胞を同定する。

同時に FACS で CXCR5、ICOS、PD-1、IL-21R の発現を、定量 PCR で Tbet、bcl-6、BLIMP-1 の発現を解析し、IL-21 産生細胞の特徴を示す表面マーカーを同定する。

① TCR 刺激など in vitro 刺激によって、SLE 患者と健常者で末梢血 IL-21 産生細胞の数や産生能の変化を解析する。



② FACS を用いて IL-21 産生細胞における IFN- $\gamma$ 、IL-17、および IL-4 の産生を確認し、健常者と SLE 患者でその割合を比較する。

③ SLE 患者と健常者を対象に FACS で末梢血 CD4 陽性 T 細胞における BAFF receptor (BAFFR) の発現を調べ、IL-21 産生との関連を調べる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 末梢血における IL-21、IL-21R 発現

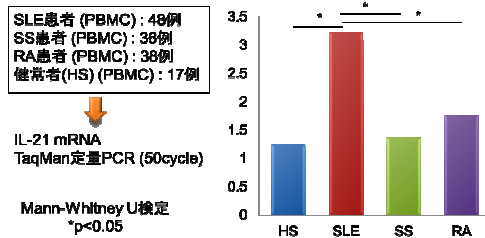
###### ① SLE 患者、RA 患者、SS 患者、健常者の末梢血における IL-21、IL-21R 発現

一般に IL-21 産生細胞は濾胞ヘルパーT細胞とされ、ヒトでの研究は難しいと考えられていたが、本研究で末梢血の IL-21、および IL-21R 発現、および SLE における発現亢進が確認された。

特に SLE 患者末梢血における IL-21 の発現亢進は RA 患者、SS 患者、健常者と比べて有意であり、全身性自己免疫疾患のなかでも SLE に特異的な現象と考えられた。

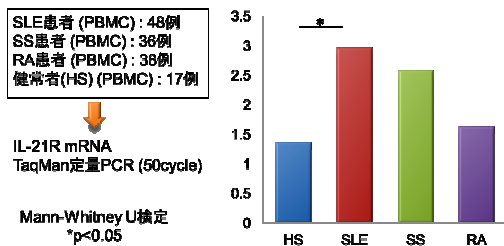
また、このことは SLE において末梢血で IL-21 に関連した解析が可能であることを示す重要な知見と考えられた。

##### PBMCにおけるIL-21 mRNAの発現



末梢血単核球におけるIL-21 mRNA発現は、SLE患者で有意に高かった

##### PBMCにおけるIL-21R mRNAの発現



末梢血単核球におけるIL-21R mRNA発現は、健常者と比較するとSLE患者で有意に高かった

##### ② IL-21 発現と SLE の臨床指標との関連

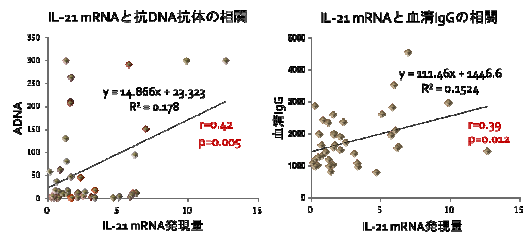
末梢血における IL-21mRNA の発現は、抗 DNA 抗体価や血清 IgG 値などの SLE の活動性と関連した臨床指標と関連した。

一方で、腎炎の有無や中枢神経障害の有無など臓器障害とは特定の関係はみられず病態特異性はないと考えられた。

このことから、末梢血において産生され

る IL-21 は SLE の活動性に関与している可能性が示唆された。

##### IL-21 mRNAと臨床指標の相関



SLE患者ではIL-21mRNAの発現と抗DNA抗体(ADNA)、血清IgG濃度に有意な相関があった

##### (2) IL-21 産生細胞の同定

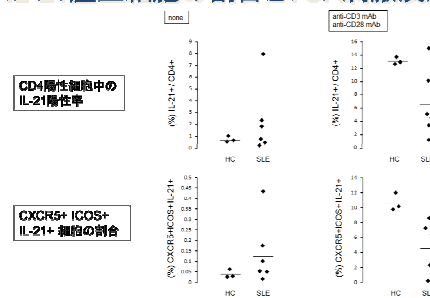
###### ① 末梢血 IL-21 産生 T 細胞の同定

末梢血における IL-21 産生細胞は ICOS high、CXCR5+の濾胞ヘルパーT細胞様細胞が中心であり、SLE 患者で増加していた。

また、この細胞集団は、健常者では CD3 + CD28 刺激で増加するのに対し、SLE 患者では著明に減少した。

この TCR 刺激に対する反応性の低下、IL-21 産生の低下は SLE の病態を考えるうえで意義深く、また、今後の解析において TCR 刺激によるアーチファクトに十分な注意が必要であることが確認された。

##### IL-21産生細胞の割合とTCR刺激反応性



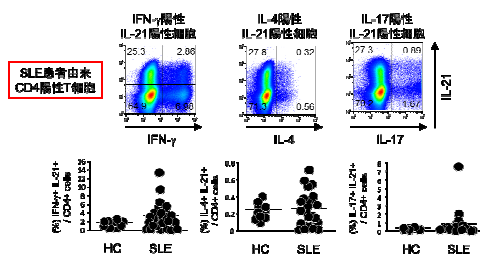
SLE患者ではCXCR5(+) ICOS(+) IL-21(+)細胞が増加していたがCD3+CD28刺激では著明に減少した

##### ② IL-21 産生 T 細胞サブセット

一方、末梢血 IL-21 産生 T 細胞には、IFN- $\gamma$ 、IL-4、および IL-17 をそれぞれ共産生する細胞が存在し、これらの細胞群はいずれも SLE 患者で増加していた。

しかし、その割合に特定のパターンはみられず、SLE の病態における意義は低いと考えられた。

## IL-21産生細胞サブセットの解析

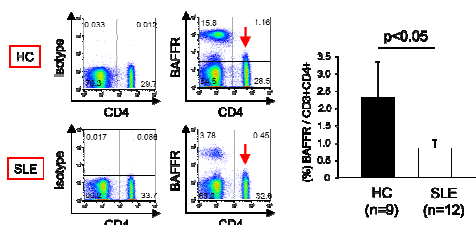


各サブセット別IL-21産生細胞はSLEで増加しているが、その割合に有意な違いは認められなかった。

### ③T細胞におけるBAFFRの発現

SLE患者では末梢血でIL-21Rの発現が亢進しているのに対して、BAFF receptor (BAFFR)の発現は低下していた。

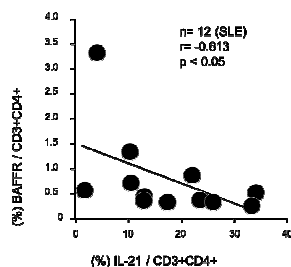
#### CD4陽性T細胞におけるBAFF receptor (BAFFR)の発現



SLE患者ではCD4陽性細胞上のBAFFR発現はHCに比べて有意に低下していた

このBAFFRの発現低下はIL-21の発現と負の相関を示し、IL-21とBAFFは独立に病態に関与していると考えられた。

#### CD4陽性T細胞におけるIL-21とBAFFR発現との相関



SLE患者CD4陽性T細胞でのBAFFR発現とIL-21産生割合は有意な負の相関関係を示した

本研究で、末梢血存在するIL-21産生T細胞は胚中心における濾胞ヘルパーT細胞様の表面マーカーをもった細胞が中心であり、それがSLEの活動性と関連していることが明らかとなった。

この末梢血IL-21産生細胞はTCR刺激で減少し、BAFFRの発現とも負の相関を示したことから、IL-21がautocrine的にT細胞を活性化している可能性が示唆された。

この点を含めた追加の解析を進め、ヒトのin vitroにおいてIL-21の制御を行い、最終的にその制御がSLEの活動性を抑制することを証明することが今後の課題である。

この末梢血IL-21産生細胞に関する知見は、カルシニューリン阻害薬やJAK阻害薬、BlyS阻害薬などIL-21に関連した既存薬の免疫系への影響を考察するうえでも意義深く今後併せて検討して行けるとよいと考えている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計3件)

- 林 太智、全身性エリテマトーデスにおける末梢血インターロイキン-21産生細胞の解析、第57回日本リウマチ学会総会・学術集会、2013年4月19日、京都国際会館、京都
- 林 太智、全身性エリテマトーデスにおける末梢血インターロイキン-21産生細胞の特徴とその意義、第56回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012年4月27日、グランドプリンスホテル新高輪、東京
- 林 太智、全身性エリテマトーデス患者末梢血におけるインターロイキン-21の産生と病態との関連、第108回日本内科学会総会・学術集会、2012年4月15日、みやこメッセ、京都

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

林 太智 (HAYASHI TAICHI)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：00446674