

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790988

研究課題名(和文) 転写因子発現による自己免疫性関節炎の制御機構に関する解析

研究課題名(英文) Evaluation of the expression of transcription factors in pathogenesis 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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は自己免疫性関節炎の発症において中心的な役割を果たすCD4陽性T細胞の分化を決定する転写因子に注目して検討を行ってきた。動物モデルでの検討においては、Th-17分化におけるマスター転写因子であるROR $\gamma$ tを発現したFoxp3陽性制御性T細胞が関節炎の発症制御に関与している可能性を見出している。またヒトの末梢血から分離したCD4陽性T細胞の検討から、関節リウマチ患者では健康人と比較してCD4陽性T細胞におけるROR $\gamma$ t発現が亢進していることが確認された。

これらの結果はT細胞における転写因子の発現制御が、自己免疫性関節炎の新たな治療標的となりうる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have examined the role of transcription factors controlling the differentiation of CD4+ T cells in the development of autoimmune arthritis. In the analyses in mouse model of autoimmune arthritis, we showed that Th-17 specific master transcription factor ROR $\gamma$ t expressing Foxp3+ regulatory T cells might inhibit the development of autoimmune arthritis. In human studies, we observed that ROR $\gamma$ t highly express in CD4+ T cells isolated from peripheral blood in patients with rheumatoid arthritis compared with that in healthy controls.

Our results suggested the possibility that control of the expression of transcription factors in CD4+ T cells might be a novel therapeutic strategy in autoimmune arthritis.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

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：関節リウマチ IL-17 ROR $\gamma$ t Foxp3 ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は、自己免疫的機序による関節滑膜への炎症細胞浸潤や進行性の骨・軟骨破壊を特徴とする慢性炎症性疾患であり、その発症および持続には CD4 陽性 T 細胞が必須であると考えられている。カルシニューリン阻害薬タクロリムスや CTLA4-ヒト免疫グロブリン Fc 融合蛋白アバセプトが T 細胞を標的とした RA の治療薬として臨床で用いられており、高い臨床効果が示されているが、いずれも活性化 T 細胞を非特異的に抑制する薬剤であることから正常の免疫応答に対する影響が懸念されている。

CD4 陽性 T 細胞はその機能によって複数のサブセットに分類され、従来 RA においてはインターフェロン (IFN $\gamma$ ) を産生する Th-1 が重要と考えられてきたが、近年は他の自己免疫疾患において関与が示唆されているインターロイキン-17 (IL-17) を産生する Th-17 の病原性が注目されている。各 CD4 陽性 T 細胞サブセットの分化においてはそれぞれに特異的な転写因子の発現が重要であり、Th-1 においては T-bet、Th-17 においては ROR $\gamma$ t がこれにあたる。T 細胞の分化過程において、転写因子同士の制御機構が存在していることが明らかにされており、T-bet は ROR $\gamma$ t の発現を制御することによって Th-17 分化を抑制することが報告されている (Lazarevic V et al. *Nat Immunol.* 2011)。我々は T-bet を T 細胞においてのみ過剰発現するトランスジェニックマウス (T-bet Tg) を用いて自己免疫性関節炎モデルであるコラーゲン誘導性関節炎に関する検討を行い、野生型と比較して T-bet Tg で関節炎が著明に抑制される点、T-bet 発現が ROR $\gamma$ t 発現を抑制することによって抗原特異的な Th-17 が減少する点について報告した (Kondo Y et al. *Arthritis Rheum* 2012)。また新たにヒト RA においても、末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞における ROR $\gamma$ t 発現の亢進について報告がなされている (Leipe J et al. *Arthritis Rheum.* 2010)。

以上から、T 細胞分化の制御機構の詳細を明らかにすることによって RA に病態制御に対する特異性の高い治療法の開発につながる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、RA の病態形成における CD4 陽性 T 細胞の分化制御機構を明らかにし、新たな治療標的の可能性を検討するために、以下の点を明らかにすることを目的とした。

### (1) マウス自己免疫性関節炎モデルにおける転写因子 ROR $\gamma$ t の役割

T-bet Tg を用いた過去の検討からは、関節炎発症において ROR $\gamma$ t 発現が重要な役割を果たしていることが示唆された。新たに作成した T 細胞において ROR $\gamma$ t を過剰発現する ROR $\gamma$ t トラスジェニックマウス (ROR $\gamma$ t Tg) に対してコラーゲン誘導関節炎を誘導し、臨床像、抗原に対するサイトカイン産生などについて野生型マウスと比較することにより、ROR $\gamma$ t 発現が関節炎発症に与える影響の詳細を明らかにする。

### (2) ヒト RA における転写因子発現の評価

ヒトにおいても Th-1、Th-17 分化において T-bet、ROR $\gamma$ t が中心的な役割を果たしていることから、RA 患者末梢血中の CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカインおよび転写因子発現を評価し、健常人コントロールとの比較検討、RA の疾患活動性および治療経過との関連を解析し、RA の病態形成におけるこれらの転写因子の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 自己免疫性関節炎モデルの解析

ROR $\gamma$ t の発現が自己免疫性関節炎に与える影響を評価するために、WT および ROR $\gamma$ t Tg に対して抗原である II 型コラーゲン (CII) とアジュバント (complete Freund's adjuvant) を混合して作成したエマルジョンを 21 日間隔で 2 回皮内投与することによりコラーゲン誘導関節炎を誘導し、臨床像の比較検討を行った。

抗原特異的なサイトカイン産生、転写因子発現を評価するために CII 投与後のマウスからリンパ節を採取し、試験管内で CII とともに培養し、ELISA による培養上清中のサイトカイン量を測定する。また培養後の細胞を回収してフローサイトメーターや定量 PCR によるサイトカイン、転写因子発現の評価を行った。

T 細胞の関節炎原性を評価するために、炎症局所への遊走に関わるケモカインレセプターの解析、関節炎の局所に浸潤した T 細胞サブセットについてフローサイトメーターを用いて解析を行う。また細胞移入実験による関節炎発症への影響も評価した。

### (2) ヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞の解析

ヒトの CD4 陽性 T 細胞サイトカイン産生パターンと転写因子発現との関連を明らかにするために、分離した末梢血中 CD4 陽性 T 細胞を T 細胞受容体刺激により試験管内で活性化させてサイトカイン産生能を評価し、転写因子発現との関連について解析した。

末梢血単核球分画から CD4 陽性 T 細胞を分離しフローサイトメーターおよび定量 PCR により T-bet、ROR $\gamma$ t の発現量について評価し、健常人コントロール群と比較検討した。

RA 患者末梢血中の CD4 陽性 T 細胞における解析結果をもとに、RA の疾患活動性指標である disease activity score-28 (DAS-28) と CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカイン産生および転写因子発現との関連について評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 自己免疫性関節炎モデルの解析

コラーゲン誘導関節炎は野生型と比較して ROR $\gamma$ t Tg において抑制されることが確認された。関節局所の病理学的検討においては、炎症および骨破壊が ROR $\gamma$ t Tg では軽度であった。

抗原皮内投与後の所属リンパ節から採取したリンパ球を試験管内で抗原刺激した際のサイトカイン産生、転写因子発現の評価においては、ROR $\gamma$ t Tg では IL-17 産生の有意な増加、ROR $\gamma$ t 発現の亢進が確認されたが、一方で Foxp3 陽性制御性 T 細胞においても ROR $\gamma$ t の発現が亢進していた。ROR $\gamma$ t Tg で認められた ROR $\gamma$ t 陽性 Foxp3 陽性 T 細胞は、試験管内での T 細胞増殖抑制能、および抑制性サイトカインである IL-10 の産生能は保たれており、制御性 T 細胞としての特徴は維持されていた。

関節炎の炎症局所への細胞浸潤に重要とされるケモカイン受容体 CCR6 の発現が ROR $\gamma$ t Tg 由来の CD4 陽性 T 細胞において有意に上昇しており、Foxp3 陽性 T 細胞においても同様であった。ROR $\gamma$ t Tg において制御性 T 細胞分画が存在している可能性を考慮し、ROR $\gamma$ t Tg 由来のリンパ球を野生型マウスに移入した上でコラーゲン誘導関節炎を誘導したところ、細胞移入によって関節炎の発症が抑制される結果を得た。

ROR $\gamma$ t Tg マウスにおけるコラーゲン誘導関節炎の抑制メカニズムについて更なる解析を継続しているが、これまでの解析結果からは、ROR $\gamma$ t 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞が、Th-17 によって誘導される自己免疫性関節炎に対する重要な抑制性因子である可能性が示唆された。

##### (2) ヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞の解析

ヒト末梢血中の CD4 陽性 T 細胞を試験管内で活性化させた際の IL-17 産生細胞、IFN $\gamma$  産生細胞における転写因子発現を評価したところ、健常人および RA 患

者ともに IL-17 産生細胞における ROR $\gamma$ t 発現の亢進が確認された。

RA 患者末梢血中の CD4 陽性 T 細胞においては、健常人と比較して ROR $\gamma$ t 発現の有意な亢進 (図 1) と IL-17 産生細胞の有意な増加 (図 2) が確認された。

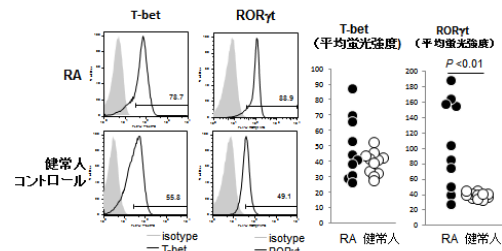


図 1: CD4 陽性 T 細胞における転写因子発現強度の RA・健常人間の比較

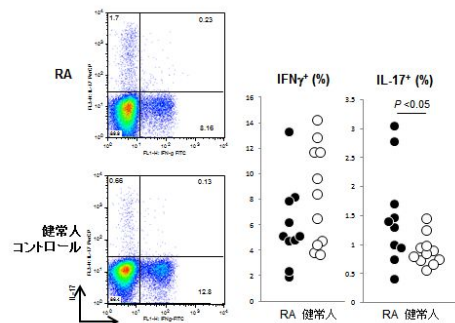


図 2: CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカイン産生の RA・健常人間の比較

RA の疾患活動性指標である DAS28 と CD4 陽性 T 細胞における IL-17 産生細胞の比率との間に有意な正の相関関係が確認された (図 3)。

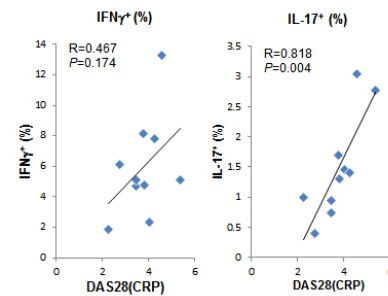


図 3: RA 疾患活動性 (DAS28) と CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカイン産生との関連

ヒトの末梢血中の CD4 陽性 T 細胞を用いた解析からは、健常人コントロールと比較して RA 患者においては末梢血 CD4 陽性 T 細胞に占める IL-17 産生細胞 (Th-17) が有意に増加しており、また IL-17 産生細胞の比率と疾患活動性との間に有意な正の相関関係が示されていることから、Th-17 が RA の疾患形

成に重要であると考えられた。さらに IL-17 産生細胞においては ROR t の発現が亢進しており、また健常人との比較において RA 末梢血 CD4 陽性 T 細胞における ROR t 発現の有意な亢進が確認されることから、ROR t 発現が Th-17 の分化誘導を介して RA の発症に影響を与えている可能性が示唆された。

### (3) 本研究の意義および今後の展望

本研究において自己免疫性関節炎の動物モデルおよび RA 患者検体の解析結果から得られた知見については、CD4 陽性 T 細胞の分化を決定する各種転写因子が自己免疫性関節炎の疾患形成に大きな影響を及ぼしていることを示すものである。今後、自己免疫性関節炎におけるこれらの転写因子の制御機序の詳細が明らかにされることは、転写因子を標的としてその活性を制御する低分子化合物など自己免疫性関節炎の新たな治療戦略の開発を進める上で重要であると考えている。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

近藤裕也、T 細胞分化を決定する転写因子による自己免疫性関節炎の制御、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 25 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京

近藤裕也、ROR t overexpression regulates collagen induced arthritis via the inhibition of antigen specific antibody production、第 42 回日本免疫学会総会・学術集会、2013 年 12 月 12 日、幕張メッセ、千葉市

近藤裕也、免疫疾患と動物モデルの臨床的接点「RA」、第 41 回日本臨床免疫学会、2013 年 11 月 29 日、海峡メッセ下関、下関市

近藤裕也、Overexpression of ROR t in T cells suppresses collagen induced arthritis、The 5th East Asian Group of Rheumatology、2013 年 6 月 1 日、The Plaza、Seoul、Korea

近藤裕也、新しい T 細胞サブセット T-bet+ROR t+CD4 陽性 T 細胞の関節リウマチにおける機能解析、第 110 回日本内科学会総会・講演会、2013 年 4 月 14 日、東京国際フォーラム、東京都

近藤裕也、CCR6+Foxp3+ regulatory T cells regulate the development of collagen induced arthritis in T cell specific ROR t transgenic mice、ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the American College of Rheumatology、2012 年 11 月 13 日、Walter E. Washington Convention Center、Washington DC、USA

## 6 . 研究組織

### (1) 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