

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670459

研究課題名(和文) ヒト自己免疫疾患における抗原特異的免疫応答の解析系の構築

研究課題名(英文) Construction of an analysis system for antigen-specific immune response in human autoimmunity

研究代表者

藤尾 圭志 (FUJIO, KEISHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70401114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではT細胞レセプター(TCR)を手掛かりとした自己抗原特異的なT細胞免疫応答の解析を目的とした。方法としては、次世代シーケンスを用いたRA患者末梢血と滑膜のCD4陽性T細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析とTCRの配列解析により、増殖傾向の強いCD4陽性T細胞の表現型を解析した。その結果、RAの病勢と関連のある細胞集団がCXCR4陽性のメモリーT細胞であり、CXCR3陰性CCR6陰性CXCR5陰性細胞に属するCD4陽性T細胞クローンが、関節でCXCR4陽性で老化した表現型を取ることを明らかとした。本研究によりRAの病態に關与するT細胞クローンの動態の知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to analyze the kinetics of autoreactive T cells in autoimmunity using T cell receptor. We performed single-cell transcriptome analysis and TCR repertoire analysis using next-generation sequence in peripheral blood and synovium CD4+ T cells in rheumatoid arthritis (RA). Expanded clones in the joint belonged to CXCR3-CCR6-CXCR5- fraction in the peripheral blood, and they acquired CXCR4 expression and senescent phenotype in the synovium. In the multicolor flowcytometry-based clinical database revealed that CXCR4+ memory T cells are closely associated with disease activity in RA. This research clarified the previously unknown kinetics of pathogenic CD4+ T cell clone in RA.

研究分野：アレルギー・リウマチ学

キーワード：自己抗原 T細胞レセプター 次世代シーケンス 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

ヒトの自己免疫疾患の解析は容易ではない。その理由としては発症様式の多様さ、遺伝的・環境的要因の不均一さ、侵襲を伴う詳細な解析がしにくいこと、等が挙げられる。そこで従来は主にマウスモデルを用いた解析が試みられてきた。関節リウマチ (RA) に対する II 型コラーゲン誘発性関節炎 (CIA)、多発性硬化症 (MS) に対する実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、全身性エリテマトーデス (SLE) に対する MRL/lpr マウス、1 型糖尿病 (T1D) に対する NOD マウスなどである。近年明らかとなった問題は、これまでマウスモデルで報告された数多くの治療法の中でヒト疾患に応用できるものはごく一部しかないということである。その主な理由の一つは、ヒト疾患とモデルマウスの免疫学的発症機構の差異である。この 2 つは最終的な障害臓器の病理像はかなり類似しているが、そこに至る免疫学的経路は異なる。RA と CIA は滑膜増殖と骨破壊は高い類似性を示すが、CIA で重要な免疫抗原 II 型コラーゲンに対する免疫応答は RA ではごく一部の症例にしか見られず、さらに CIA で関節に集積する IL-17 産生細胞は $\gamma\delta$ T 細胞だが、この細胞は RA 関節では認められない。またヒト T1D ではインスリン、glutamic-acid decarboxylase (GAD) に対する自己抗体が出現するが、これらの抗体は NOD マウスでは検出されない。ミエリン塩基性タンパク (MBP) はマウス EAE を誘導する抗原だが、MBP 特異的 T 細胞の数は MS 患者と健常人で差がみられない。これらの事実から、ヒト自己免疫疾患の発症機構を解明し、より病態に即した治療を開発するためには、ヒト自己免疫疾患そのものの抗原特異的免疫応答に迫る必要があると考えられる。これまで、ヒト自己免疫疾患における抗原特異的免疫応答は B 細胞レベルつまり自己抗体のレベルでは解明されてきた。しかし自己抗体を産生する自己反応性 B 細胞の分化を誘導していると考えられる自己反応性 T 細胞については、解析の困難さからあまり分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、その困難さからあまり手がつけられていないヒト自己免疫疾患における自己抗原特異的 T 細胞に着目して、疾患発症に至る適応免疫応答を解明することである。

3. 研究の方法

本研究では RA の抗原特異的免疫応答に着目した。研究代表者は RA における自己抗原 BiP に特異的な CD4 の増殖を同定しており、まず自己抗原 BiP に着目して HLA-DRB*10405 テトラマーによる解析を行った。RA の末梢血 CD4 陽性 T 細胞をシングルセルソーティングにより回収し、cDNA 合成後に TCR α/β 鎖遺伝子を同定した。同定した TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターにより末梢血 CD4 陽性 T 細胞に遺伝子導入し、サイミジン取り込みにより特異性を検討した。

また RA の末梢血および関節の CD4 陽性 T 細胞の TCR レパトアを次世代シーケンサー Ion PGM によるシーケンスにより解析した。解析データは公開されているソフトウェア MiTCR により解析した。また単一細胞の遺伝子発現についても、同様に次世代シーケンサーにより解析した。解析データは統計解析ソフト R を基盤とする BioConductor を中心に用いて解析した。

4. 研究成果

BiP テトラマーによるシングルセルソーティングにより 2 種類の TCR を同定した。同定した TCR を CD4 陽性 T 細胞に遺伝子導入し、BiP エピトープに対する増殖を検討したが、有意な増殖応答が見られず、抗原特異性を確認できなかった。これは用いた TCR テトラマーの抗原特異性に問題がある可能性が考えられた。コントロールのテトラマーは非特異的染色を示さなかったことから、BiP エピトープの何らかの性質が非特異的染色につながった可能性が考えられた。

そこで次に TCR 配列を手掛かりとした、抗原特異的 T 細胞の動態解析を試みた。ナイーブおよびメモリー T 細胞分画を対象に TCR 解析を実施したその結果、RA ではナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞双方とも健常人よりも増殖したクローンの集積が認められた。さらに滑膜では末梢血で増殖を認めたクローンが、さらに濃縮されていた。さらにシングルセルソーティング後の次世代シーケンスにより単一 T 細胞の発現遺伝子を評価すると、関節への遊走に必要な CXCR4 や Th1 細胞に特徴的な遺伝子発現を認めた。さらに CD28 の発現低下など、分裂を繰り返し老化した T 細胞に特徴的な遺伝子の発現パターンも認められた。

次に増殖した T 細胞クローンの末梢血での表現型を調べるため、ケモカインレセプターを用いて末梢血のナイーブ T 細胞、Th1 細胞

(CXCR3 陽性 CCR6 陰性 CXCR5 陰性) Th17 細胞 (CXCR3 陰性 CCR6 陽性 CXCR5 陰性) TFH 細胞 (CXCR3 陰性 CCR6 陰性 CXCR5 陽性) 非 Th1/Th17 細胞 (CXCR3 陰性 CCR6 陰性 CXCR5 陰性) を分類し、ソーティング後に TCR レパートアを解析した。すると関節で増殖しているクローンの多くは非 Th1/Th17 細胞 (CXCR3 陰性 CCR6 陰性 CXCR5 陰性) に属していた。

次に CD4 陽性 T 細胞サブセットと RA の病勢の関連を検討するために、RA91 例、健常人 110 例でマルチカラー解析を行った。すると通常の Th1, Th17, TFH, 非 Th1/Th17 細胞の割合は病勢との関連を示さなかった。そこで関節の CD4 陽性細胞が発現するとされ、今回関節で増殖しているクローンが発現している CXCR4 について検討した。するとメモリー T 細胞中の CXCR4 の陽性率は疾患活動性と相関を示した。このことは今回同定した増殖しているクローンの病態への関与を示唆している。

今後さらなる増殖クローンの動態の検討、TCR の多様性と疾患活動性との関連、抗原特異性の検討、を行うことにより RA の病態、ひいては自己免疫疾患の病態の解明につながる事が期待される。

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)

[雑誌論文](計 10 件)

Shibuya M, Fujio K, Shoda H, Okamura T, Okamoto A, Sumitomo S, Yamamoto K. A new T-cell activation mode for suboptimal doses of antigen under the full activation of T cells with different specificity. Eur J Immunol. 2015 in press.

Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, Inoue M, Nakachi S, Komai T, Shoda H, Miyazaki JI, Fujio K, Yamamoto K. TGF-beta3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. Nat Communications. 2015;6:6329..

Shoda H, Fujio K, Sakurai K, Ishigaki K, Nagafuchi Y, Shibuya M, Okamura T, Yamamoto K. Autoantigen BiP-derived HLA-DR4 epitopes differentially recognized by effector and regulatory T cells in rheumatoid arthritis. Arthritis

& Rheumatology. 2015 in press.

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Morita K, Ishigaki K, Suzukawa K, Kanaya K, Kondo K, Yamasoba T, Furukawa A, Kitahara N, Shoda H, Shibuya M, Okamoto A, Yamamoto K. Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF- 1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo. J Immunol. 2013;191:2351-9.

Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity. JAKSTAT. 2013;2(2):e23952.

Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1 mediated IL-10 production in IL-27 stimulated CD4(+) T cells. Eur J Immunol. 2013;43:1063-73.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. Ann Rheum Dis. 2013 Apr;72 Suppl 2:i185-9.

Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. Ann Rheum Dis. 71 Suppl 2:i96-100, 2012.

Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory T cell-mediated control of autoantibody-induced inflammation. Front Immunol. 3:28, 2012.

Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. Kidney Int. 82:969-79, 2012.

〔学会発表〕(計 3 件)

石垣和慶、庄田宏文、高地雄太、藤尾圭志、
安井哲郎、門野夕峰、田中栄、山本一彦. 関節
リウマチの病態に關与する CD4 陽性 T 細胞ク
ローンの候補の同定. 第 58 回日本リウマチ
学会總會 ワークショップ 平成 26 年 4 月
24 日

永淵泰雄、庄田宏文、住友秀次、仲地真一郎、
加藤里佳、土田優美、駒井俊彦、山口健介、
立石晶子、神田浩子、藤尾圭志、山本一彦 関
節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析
の試み 第 58 回日本リウマチ学会總會 ワ
ークショップ 平成 26 年 4 月 24 日

石垣和慶、庄田宏文、高地雄太、安井哲郎、
門野夕峰、田中栄、藤尾圭志、山本一彦. 関節
リウマチの病態に關与する CD4 陽性 T 細胞ク
ローンの同定. 第 42 回日本臨床免疫学会總
会 ワークショップ 平成 26 年 9 月 25 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/areri18/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤尾圭志 (FUJIO KEISHI)

東京大学医学部・アレルギー・リウマチ内
科・講師

研究者番号：70401114

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：