

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870081

研究課題名(和文)自己免疫性関節炎における病原性T細胞の分化制御機構の解析

研究課題名(英文)Regulation of the differentiation of pathogenic T cells in 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は関節リウマチにおいて病態に関連するCD4+T細胞サブセットに注目して検討を行ってきた。自己免疫性関節炎の動物モデルにおける検討では、関節炎の病原性細胞とされるTヘルパー17細胞の分化を決定する転写因子ROR $\gamma$ tを過剰発現したROR $\gamma$ tトランスジェニックマウスにおいて、Foxp3+制御性T細胞でROR $\gamma$ tの発現が亢進することによってTh-17細胞特異的に免疫応答を抑制し、関節炎の発症を制御する可能性を見出した(Kondo Y, et al. Arthritis Res Ther 2015)。これらの結果は、T細胞分化制御が自己免疫性関節炎の新たな治療戦略となり得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 regulating the differentiation of CD4+ T cells in the development of autoimmune arthritis. In the analyses of animal model of autoimmune arthritis, we showed the possibility that Th-17 specific master transcription factor ROR $\gamma$ t-expressing Foxp3+ regulatory T cells might regulate the development of autoimmune arthritis via the suppression of arthritogenic Th-17 cells in ROR $\gamma$ t transgenic mice (Kondo Y et al. Arthritis Res Ther 2015). Our results suggested possibility that control of the differentiation of CD4+ T cells might be a novel therapeutic strategy in autoimmune arthritis.

研究分野：膠原病・リウマチ学

キーワード：自己免疫性関節炎 T細胞 分化 転写因子 サイトカイン

## 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る。RA においては、疾患感受性と MHC class II との関連が指摘されている点、関節の炎症性滑膜中に多量の CD4<sup>+</sup> T 細胞の浸潤が認められる点などから、RA の発症およびその持続に CD4<sup>+</sup> T 細胞が必須であると考えられている。

CD4<sup>+</sup> T 細胞はその機能によって複数の subset に分類され、自己免疫性関節炎との関連に関する RA の動物モデルを用いた解析では、コラーゲン誘導関節炎が IL-17 欠損マウスで減弱し (Nakae S et al. *J Immunol.* 2003) 逆に IFN 欠損マウスで IL-17 を産生する Th-17 の増加を介して増悪することが報告されており (Chu CQ et al. *Arthritis Rheum.* 2007) 当研究室においても GPI 誘導関節炎において抗 IL-17 抗体が治療効果を有することを報告している (Iwanami K et al. *Arthritis Rheum.* 2008) 以上から自己免疫性関節炎の動物モデルにおいては Th-17 が関節炎を促進し、IFN を産生する Th-1 が抑制的に作用することが示唆されている。RA においても関節滑膜中や末梢血中に IL-17 陽性の CD4<sup>+</sup> T 細胞が認められることが報告され、当研究室からも RA 患者末梢血単核球における IL-17 発現がコントロールと比較して有意に高いことを報告している (Kohno M et al. *Mod Rheumatol.* 2008) さらに抗 IL-17 抗体の治療有効性も示されつつあり (Patel DD et al. *Ann Rheum Dis.* 2013) RA における Th-17 の病原性のみならず治療標的としての重要性が注目されている。

各 CD4<sup>+</sup> T 細胞 subset 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。RA においては、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おり (Leipe J et al. *Arthritis Rheum.* 2010) 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) が、一方で新たに作出した ROR $\gamma$ t トランスジェニックマウス (ROR $\gamma$ t Tg) においてもコラーゲン誘導関節炎の抑制が認められており、自己免疫性関節炎における詳細な解析が必要と考えられた。

RA における T 細胞を標的とした治療薬として、カルシニューリン阻害薬 tacrolimus や CTLA4-ヒト免疫グロブリン Fc 融合蛋白 abatacept が用いられており、高い臨床効果を示しているが、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る。上述の通り RA における転写因子の発現制御を含む T 細胞の分化・機能についてはいまだ十分な解析がなされておらず、これら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が可能となると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、RA の病態形成における CD4<sup>+</sup> 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) 転写因子の相互制御機構の解析

CD4<sup>+</sup> T 細胞の分化に關与する転写因子は、相互に発現制御機構を有していることが報告されており、各種トランスジェニックマウス、および retrovirus vector を用いた CD4<sup>+</sup> T 細胞への T-bet のトランスフェクションによって分化制御機構のより詳細な解析を行う。

### (3) ヒト RA における転写因子発現の評価

ヒトの RA においては、T 細胞の分化を決定する T-bet、ROR $\gamma$ t などの転写因子に関する十分な知見は得られていない。RA 患者末梢血 CD4<sup>+</sup> 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、健康人コントロールと比較することによって RA の病態形成におけるこれらの転写因子レベルでの制御機構を明らかにする。

## 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 を過剰発現した ROR $\gamma$ t トランスジェニック (ROR $\gamma$ t Tg) マウスに対してコラーゲン誘導関節炎を誘導し、臨床像および抗原特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞におけるサイトカイン産生、転写因子発現について比較検討を行った。

T 細胞の関節炎局所への移行性を評価するために、炎症局所への遊走に関わる CCR6 などのケモカインレセプターを解析した。また in vitro で transwell を用

いた CCR6 の ligand である CCL20 に対する遊走能の解析、関節炎の局所に浸潤した T 細胞 subset について FACS による解析を行った。

ROR<sup>t</sup>+Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 細胞 T 細胞の抑制能について in vitro において細胞増殖能に対する抑制能、抑制性のサイトカイン産生能などについて FACS、ELISA にて解析した。本検討は、Foxp3-GFP reporter マウスを用い、GFP<sup>+</sup>(=Foxp3<sup>+</sup>) 細胞を sorting により分離して解析に使用した。

WT または ROR<sup>t</sup> Tg マウス由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞を WT に経静脈的に細胞移入し、コラーゲン誘導関節炎を誘導した場合の臨床像について比較検討した。さらに上記細胞移入実験において、IL-10 中和抗体を投与した場合の関節炎抑制に対する影響を解析した。

#### (2) T 細胞分化制御機構の解析

T 細胞分化に対する転写因子発現の影響についてより詳細な解析を行うために、WT、T-bet Tg の脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞を MACS を用いて分離し、in vitro で T 細胞分化を誘導して、FACS や定量 PCR によりサイトカイン産生・転写因子発現パターンを評価した。

retrovirus vector を用いた CD4<sup>+</sup> T 細胞への T-bet のトランスフェクションによってトランスジェニックマウスで行った解析と同様に、in vitro で T 細胞分化を誘導して、FACS や定量 PCR によりサイトカイン産生・転写因子発現パターンを評価した。

#### (3) ヒト末梢血、関節液中の CD4 陽性 T 細胞の解析

末梢血単核球分画および関節液から MACS により CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し、各種転写因子発現について FACS を用いて解析した。以上について RA と健常人のコントロール群との比較検討を行った。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<sup>t</sup> Tg において抑制されることが確認された。ま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<sup>t</sup> Tg では IL-17 産生の有意な増加、ROR<sup>t</sup> 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<sup>t</sup> の発現が亢進していた。

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<sup>t</sup> Tg 由来の CD4 陽性 T 細胞において有意に上昇しており、Foxp3<sup>+</sup> T 細胞において顕著であった。In vitro での transwell を用いた CCL20 に対する遊走能は、ROR<sup>t</sup> Tg 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞において更新しており、Foxp3<sup>+</sup> T 細胞においても同様であった。関節炎誘導後の関節局所に浸潤した T 細胞分画の解析では、ROR<sup>t</sup> Tg において関節局所の Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の増加を認め、ROR<sup>t</sup> Tg で認められた ROR<sup>t</sup>+Foxp3<sup>+</sup> T 細胞を、in vitro での effector T 細胞に対する増殖抑制能は保たれ、抑制性サイトカインである IL-10 の産生能は WT の Foxp3<sup>+</sup> T 細胞と比較してむしろ増加しており、制御性 T 細胞としての特徴は維持・亢進していた。

ROR<sup>t</sup> Tg のリンパ球において制御性 T 細胞分画が存在している可能性を考慮し、ROR<sup>t</sup> 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<sup>t</sup> Tg 由来のリンパ球移入による関節炎抑制は、IL-10 中和抗体の投与によりキャンセルされた。

当初、ROR<sup>t</sup> Tg においては、ROR<sup>t</sup> 過剰発現によって関節炎原性の Th-17 分化が亢進し、関節炎発症が促進されることを予想していたが、関節炎の抑制が確認され、細胞移入実験の結果から ROR<sup>t</sup> Tg において関節炎発症抑制に関わるリンパ球分画が存在することが示唆された。詳細な解析の結果から、ROR<sup>t</sup> Tg においては ROR<sup>t</sup> 発現が Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞において亢進することによって関節炎局所への細胞遊走に関わる CCR6 の発現が亢進し、Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞の関節炎局所への遊走が亢進し、関節炎発症が制御されやすくなっている可能性が示された。また IL-10 中和抗体を用いた解析結果から、関節炎発症抑制には IL-10 が強く関与していることが示された。

以上の結果は、転写因子の発現が特定の CD4<sup>+</sup> T 細胞の分化や機能に限定されるわけではなく、病態形成に複雑に関与している可能性を示しており、非常に興味深い結果であると言える。

本検討結果に関する発表は国内外でも注目され、第 43 回日本免疫学会において best presentation 賞に選ばれ、また研究論文は当該分野のトップジャーナルの一つである Arthritis Research & Therapy に掲載された。

#### (2) T 細胞分化制御機構の解析

WT、T-bet Tg 由来の脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞を in vitro で Th-17 分化誘導条件で培養した場合に、T-bet Tg 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞において IL-17 産生、および ROR $\gamma$ t 発現が抑制された。T-bet の過剰発現による ROR $\gamma$ t 発現抑制による Th-17 分化抑制機構の存在が確認された。T-bet Tg 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞では、IL-6 受容体の発現低下、IL-6 刺激に対する STAT3 リン酸化の抑制が確認され、T-bet による IL-6-STAT3 シグナル経路の抑制機構の存在が示唆された。

マウス CD4<sup>+</sup> T 細胞に対して retrovirus vector を用いて T-bet をトランスフェクションしたうえで、in vitro で Th-17 分化誘導条件にて培養した場合に、empty vector と比較して、IL-17 産生および ROR $\gamma$ t 発現が抑制された。ただし、T-bet Tg で確認された IL-6 受容体の発現抑制や IL-6 刺激による STAT3 リン酸化抑制は確認されず、T-bet による IL-6-STAT3 シグナルを介さない Th-17 分化抑制機構が存在していることが示唆された。

上記の結果から、T-bet による ROR $\gamma$ t 発現抑制を介した Th-17 分化抑制機構の存在が示唆されたが、T-bet Tg で見出した IL-6-STAT3 シグナル抑制については、retrovirus による実験系で再現されなかった。IL-6-STAT3 シグナルとは異なる抑制機構による分化制御機構の存在が示唆され、いくつかの候補分子の同定に至っており、今後その詳細を明らかにしていく予定である。

### (3) ヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞の解析

末梢血単核球分画から MACS により CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し、ケモカイン受容体の発現パターンによって Th-1、Th-2、Th-17 を分類したうえで、各 Th サブセットの割合およびその転写因子発現を比較したところ、健康人と比較して RA 患者由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞において Th-17 分画の減少と ROR $\gamma$ t 発現の亢進が確認された。少数例における RA 症例の関節液中の CD4<sup>+</sup> T 細胞分画の評価では、むしろ Th-17 分画が増加している可能性が示唆された。

RA 患者末梢血中の CD4 陽性 T 細胞における解析結果と RA の疾患活動性指標である disease activity score-28 (DAS-28) の相関関係に関して解析を行ったが、明確な関連性を見出すに至らなかった。

本検討は未だ十分な解析ができていないが、RA 患者においては Th-17 細胞における ROR $\gamma$ t 発現の亢進を認め、さらに Th-17 の末梢血単核球分画における減少、関節液中の増加から、関節局所に Th-17 が集積している可能性が示唆され、今後さらなる解析が必要と考

えられる。

### (4) 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り、また転写因子発現が T 細胞分化に与える影響に関する基礎的解析からは非常に複雑な制御機構が存在していることを示唆している。

今後、自己免疫性関節炎におけるこれらの転写因子による T 細胞分化制御機構と病態との関連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

(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 1 件)

1. Kondo Y, Yao Z, Tahara M, Iizuka M, Yokosawa M, Kaneko S, Segawa S, Tsuboi H, Yoh K, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T. Involvement of ROR $\gamma$ t overexpressing T cells in the development of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Res Ther.* 17:105, 2015 (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Yokosawa M, Kondo Y, Tahara M, Kaneko S, Segawa S, Tsuboi H, Matsumoto I, Sumida T: Helper T cells: Transcription factor network and metabolism T-bet regulates Th-17 differentiation independently of IFN $\gamma$ . 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会、2015.11.18、札幌コンベンションセンター(札幌)
2. Kaneko S, Kondo Y, Tahara M, Yokosawa M, Segawa S, Tsuboi H, Matsumoto I, Sumida T: The analysis of CD4<sup>+</sup> T cell subsets by the cell surface markers in patients with rheumatoid arthritis. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会、2015.11.20、札幌コンベンションセンター(札幌)
3. 近藤裕也、田原昌浩、飯塚麻菜、横澤将宏、金子駿太、瀬川誠司、坪井洋人、高橋智、松本功、住田孝之: ROR $\gamma$ t トランスジェニックマウスにおける CD4<sup>+</sup> T 細胞による自己免疫性関節炎の抑制機構 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015.4.24、名古屋国際会議場(名古屋)

4. Kondo Y, Tahara M, Iizuka M, Yokosawa M, Kaneko S, Tsuboi H, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T: ROR  $\gamma$ 1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells regulates the development of autoimmune arthritis in mice. 第43回日本免疫学会総会・学術集会、2014.12.11、国立京都国際会館(京都)
5. Kondo Y, Tahara M, Iizuka M, Yokosawa M, Kaneko S, Tsuboi H, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T: ROR  $\gamma$ 1 expressing Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells regulates the development of autoimmune arthritis in mice. Annual Meeting on American College of Rheumatology, 2014.11.18, Boston Convention and Exhibition Center (Boston)
6. 近藤裕也, 田原昌浩, 横澤将宏, 飯塚麻菜, 坪井洋人, 高橋智, 松本功, 住田孝之: 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 (シンポジウム8「リウマチ性疾患におけるトランスレーショナルリサーチ」) 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014.4.25、グランドプリンスホテル新高輪(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

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

取得状況(計 0 件)

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

〔その他〕  
ホームページ等

#### 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