

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09527

研究課題名(和文) 強皮症の病態形成におけるCD226陽性CD8陽性T細胞の役割の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Investigation of the role of CD226+CD8+T cells in the pathogenesis of systemic sclerosis and an application to therapy

研究代表者

塚本 浩 (Tsukamoto, Hiroshi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：70304772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症患者においてCD226高発現CD8陽性T細胞が有意に増加し、その割合は皮膚硬化および間質性肺病変の重症度に相関していた。またCD226陽性CD8陽性T細胞はCD226陰性CD8陽性T細胞と比較して各種サイトカインの産生が多く、全身性強皮症患者では健常者と比較してIL-13の産生およびヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対する細胞傷害活性が亢進していた。細胞傷害活性はCD226高発現CD8陽性T細胞の割合と正の相関を示し、CD8陽性T細胞においてCD226を介したシグナルを阻害すると、共刺激、サイトカイン産生およびHUVECに対する細胞傷害活性は低下した。

研究成果の概要(英文)：CD226highCD8+ T cells were increased in SSc patients compared with healthy controls and were appreciably associated with the severity of skin sclerosis and interstitial lung disease. Further, CD226highCD8+ T cells from SSc patients showed upregulated cytokine production including IL-13 and positive correlation with the cytotoxic capacity of CD8+ T cells against HUVECs. Finally, the neutralization of CD226 in CD8+ T cells impaired co-stimulation, cytokine productions, and cytotoxicity against HUVECs. These findings indicate that upregulated CD226 expression on CD8+ T cells reflects disease severity and are involved in SSc pathogenesis via the production of various cytokines including profibrotic IL-13 and endothelial cell injury, and that CD226 may be a useful target in the treatment of SSc.

研究分野：医歯薬学

キーワード：CD226 全身性強皮症 サイトカイン 細胞傷害活性 CD8陽性T細胞 IL-13

### 1. 研究開始当初の背景

強皮症は皮膚硬化と血管病変を特徴とする全身性結合織疾患で、病変は皮膚、肺、心臓、腎臓、消化管、関節等、広範囲に及び、トポイソメラーゼ I やセントロメアに対する自己抗体を認め、これらが病型とも関連している事より、その発症や病態形成に自己免疫学的機序が関与し、また、病態形成にはサイトカイン産生異常、血管内皮障害、組織の修復異常が関与すると推定されている。しかしながら、分子レベルでの病態形成のメカニズムについては未解明のままである。疾患の病態解析において、マイクロアレイを用いて末梢血リンパ球の遺伝子発現プロファイルを解析する事は有用であるが、リンパ球全体の解析ではいろいろなリンパ球亜分画の影響を受ける為、各リンパ球亜分画において遺伝子発現プロファイルの解析を行う事が望ましい。

先行研究において健常人 5 名と強皮症患者 9 名の末梢血リンパ球をソーティングにより 8 分画に分けて回収し、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルと比較した所、各々のリンパ球亜分画において、発現レベルの異なる複数の遺伝子を認めた。一方、強皮症では皮膚や肺の病変部に CD8 陽性 T 細胞が浸潤し、その程度が活動性と相関する事より、病的 CD8 陽性 T 細胞の存在が示唆されている。この観点からまず CD8 陽性 T 細胞に焦点を絞り、エフェクターメモリー CD8 陽性 T 細胞のマイクロアレイにおいて健常人と強皮症患者間で異なる発現を示した遺伝子のうち、ゲノムワイド関連解析で疾患関連遺伝子として抽出された *CD226* に着目した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、強皮症の病態形成における *CD226* 分子の役割を明らかにし、強皮症の新規治療法開発へ応用する事である。具体的には *CD226* 陽性 CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生異常や血管内皮傷害作用を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 強皮症患者において *CD226* が高発現しているリンパ球亜分画の同定

九州大学病院で加療中の全身性强皮症患者 41 名および健常人 26 名を対象とした。強皮症患者と健常人についてフローサイトメトリーを用いて末梢血リンパ球を 8 分画に分け、それぞれの亜分画( ナイーブおよびメモリー CD4 陽性 T 細胞、ナイーブおよびエフェクターメモリー、セントラルメモリー CD8 陽性 T 細胞、ナイーブおよびメモリー CD19 陽性細胞、プラズマブラスト)上の *CD226* の発現を比較した。

(2) CD8 陽性 T 細胞における *CD226* の発現レベルと皮膚硬化や間質性肺炎の指標との相関

CD8 陽性 T 細胞における *CD226* の発現レベルと皮膚硬化や間質性肺炎の指標との相関の有無を調べた。

(3) *CD226* 陽性 CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生プロファイルの検討

*CD226* 陽性 CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産

生プロファイルを明らかにするため、健常人末梢血単核球を PMA + Ionomycin で刺激後、*CD226* 陽性および陰性 CD8 陽性 T 細胞における各種サイトカインの産生をフローサイトメトリーにて網羅的に比較した。次に強皮症患者末梢血単核球についても同様の検討を行い、健常人との比較を行った。

(4) CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害活性における *CD226* の役割の検討

CD8 陽性 T 細胞の内皮細胞傷害における *CD226* の役割を明らかにするため、健常人および強皮症患者末梢血から分離した CD8 陽性 T 細胞をヒト臍帯静脈内皮細胞と共に、抗 *CD226* 中和抗体存在下または非存在下にて共培養し細胞傷害活性を測定した。細胞傷害におけるグランザイムの役割を明らかにするため、上清中グランザイム濃度や CD8 陽性 T 細胞上 *CD107a* (脱顆粒マーカー)の発現を比較した。

### 4. 研究成果

*CD226* はリンパ球や NK 細胞、マクロファージの表面に発現し、接着分子として働く。リガンドは *CD155* および *CD112* で血管内皮細胞や上皮細胞に発現しており、リガンドとの結合により *CD226* 発現細胞内でシグナル伝達が起こる(図)。

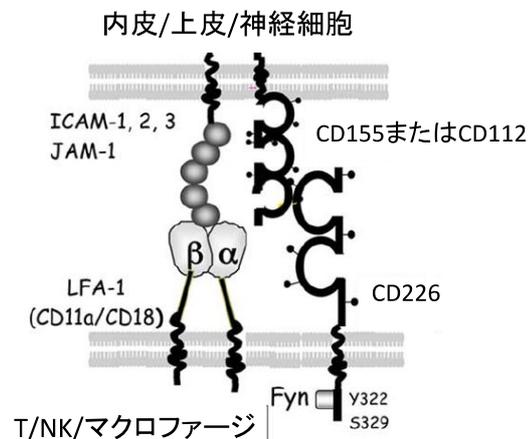


図. *CD226* および *LFA-1* を介した細胞間相互作用

まず、フローサイトメトリーを用いて強皮症患者 CD8 陽性 T 細胞において健常人に比し、*CD226* 陽性細胞割合が増加している事を確認し、以下の検討を行った。

(1) 強皮症患者において *CD226* が高発現しているリンパ球亜分画の同定

強皮症患者と健常人についてフローサイトメトリーを用いて末梢血リンパ球を 8 分画に分け、*CD226* の発現を比較した。*CD226* 陽性 CD8 陽性 T 細胞は全身性强皮症患者で有意に増加していたが、CD4 陽性 T 細胞、CD19 陽性 B 細胞、NK 細胞においては、全身性强皮症患者と健常人で *CD226* の発現に差は認めなかった。

(2) CD8 陽性 T 細胞における *CD226* の発現レベルと皮膚硬化や間質性肺炎の指標との相関

全身性强皮症患者 CD8 陽性 T 細胞上で発現が亢進している *CD226* の役割を調べるために、

全身性強皮症患者の臨床所見との関連を評価した。CD226 高発現 CD8 陽性 T 細胞の割合と罹病期間に関連は認めなかった。

病型では、びまん皮膚硬化型で限局皮膚硬化型と比較して CD226 高発現 CD8 陽性 T 細胞が有意に増加していた。自己抗体では、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例で抗セントロメア抗体陽性例と比較して CD226 高発現 CD8 陽性 T 細胞が有意に増加していた。皮膚硬化では、スキンスコアの高い例で CD226 高発現 CD8 陽性 T 細胞が有意に増加していた。全身性強皮症の主要な臓器障害の一つである間質性肺病変では、extensive な間質性肺病変合併例で CD226 高発現 CD8 陽性 T 細胞が最も増加していた。

(3) CD226 陽性 CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生プロファイルの検討

CD226陽性CD8陽性T細胞では各種サイトカイン( IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5、IL-13)の産生が高かったが、興味深いことに、タイプ2サイトカイン( IL-4、IL-5、IL-13)のほとんどすべてがCD226陽性CD8陽性T細胞から産生されていた。

これらのタイプ2サイトカインの中で最も産生量が多く、向線維化サイトカインとして報告されている IL-13 に関して詳細な解析を行った。細胞内染色によるフローサイトメトリー解析の結果、IL-13 は主に CD226 高発現 CD8 陽性 T 細胞から産生されており、IL-13 産生 CD226 高発現 CD8 陽性 T 細胞は強皮症患者で健常人と比較して有意に増加していた。次に CD226 を介した共刺激シグナルの重要性を明らかにするために CD226 のリガンドである CD155 を高発現したヒト臍帯静脈内皮細胞と CD8 陽性 T 細胞の共培養を行ったところ、CD226 阻害抗体により共刺激シグナルを阻害すると CD8 陽性 T 細胞のエフェクター機能が抑制され IL-13 や IFN- $\gamma$  産生が有意に低下した。

以上より、IL-13産生CD226高発現CD8陽性T細胞は強皮症患者で健常人と比較して有意に増加していること、CD226高発現CD8陽性T細胞はCD226/CD155共刺激シグナルを介してサイトカインを産生することが明らかになった。

(4)CD8陽性T細胞の細胞傷害活性におけるCD226の役割の検討

PMA + イオノマイシン刺激後のグランザイムB産生を解析した。CD226陽性CD8陽性T細胞はCD226陰性CD8陽性T細胞と比較してグランザイムB産生が高く、細胞傷害活性のより強い細胞集団と考えられた。

この結果を確認するためにCD8陽性T細胞の細胞傷害活性を評価することとした。血管内皮傷害が全身性強皮症の初期に見られるイベントであり、ターゲットとしてヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた。CD8陽性T細胞のヒト臍帯静脈内皮細胞に対する細胞傷害活性を、フローサイトメトリーを用いて評価したところ、CD8陽性T細胞の細胞傷害活性は全身性強皮症患者で健常人と比較して有意に亢進しており、その細胞傷害活性はCD226高発現CD8陽性T細胞の割合に相関していた。このCD8陽性T細胞の細胞傷害活性はCD226阻害抗体存在下で有意に低下した。

以上よりCD226は全身性強皮症患者の亢進した細胞傷害活性に関与していることが示された。(総括) CD8 陽性 T 細胞における CD226 の発現亢進は全身性強皮症の臓器障害の程度を反映し、向線維化サイトカイン IL-13 を含めた各種サイトカインの産生および血管内皮細胞傷害を介して全身性強皮症の病態形成に関与していると考えられ、さらには CD226 をターゲットとした治療は全身性強皮症に対する有用な治療となり得る。

## 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12件)

Nakagawa J, Koyama Y, Kawakami A, Ueki Y, Tsukamoto H, Horiuchi T, Nagano S, Uchino A, Ota T, Akahoshi M, Akashi K. A novel scoring system based on common laboratory tests predicts the efficacy of TNF-inhibitor and IL-6 targeted therapy in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective, multicenter observational study. *Arthritis Res Ther* 査読有 2017, 19:185. DOI: 10.1186/s13075-017-1387-9

Oryoji K, Yoshida K, Kashiwado Y, Tanaka K, Mizuki SI, Tsukamoto H, Kamada K, Akashi K. Shared epitope positivity is related to efficacy of abatacept in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 査読有 2017. (in press) DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-211430

Nakano M, Kiyohara C, Tsukamoto H, Sawabe T, Nishizaka H, Horiuchi T. Smoking history, alcohol consumption, sports activity and the risk of developing systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Int Med J* 査読有 2017, 24: 366-370.

Kirino Y, Kawaguchi Y, Tada Y, Tsukamoto H, Ota T, Iwamoto M, Takahashi H, Nagasawa K, Takei S, Horiuchi T, Ichida H, Minota S, Ueda A, Ohta A, Ishigatsubo Y. Beneficial use of serum ferritin and hemoxygenase-1 as biomarkers in adult-onset Still's disease: A multicenter retrospective study. *Mod Rheumatol* 査読有 2018, (in press) DOI: 10.1080/14397595.2017.1422231:1-7.

Tsuzuki H, Arinobu Y, Miyawaki K, Takaki A, Ota SI, Ota Y, Mitoma H, Akahoshi M, Mori Y, Iwasaki H, Niuro H, Tsukamoto H, Akashi K. Functional interleukin-33 receptors are expressed in early progenitor stages of allergy-related granulocytes. *Immunology* 査読有 2017, 150:64-73. DOI: 10.1111/imm.12667

Ueda N, Ida H, Washio M, Miyahara H, Tokunaga S, Tanaka F, Takahashi H,

Kusuhara K, Ohmura K, Nakayama M, Ohara O, Nishikomori R, Minota S, Takei S, Fujii T, Ishigatsubo Y, Tsukamoto H, Tahira T, Horiuchi T. Clinical and Genetic Features of Patients With TNFRSF1A Variants in Japan: Findings of a Nationwide Survey. *Arthritis Rheumatol* 査読有 2016, 68:2760-2771. DOI: 10.1002/art.39793

Ota Y, Niuro H, Ota S, Ueki N, Tsuzuki H, Nakayama T, Mishima K, Higashioka K, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Mitoma H, Akahoshi M, Arinobu Y, Kukita A, Yamada H, Tsukamoto H, Akashi K. Generation mechanism of RANKL(+) effector memory B cells: relevance to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 査読有 2016, 18:67. DOI:10.1186/s13075-016-0957-6

Furukawa M, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Mitoma H, Kimoto Y, Uchino A, Nakagawa M, Oryoji K, Shimoda T, Akashi K. Quality of life in Japanese female patients with systemic lupus erythematosus: Evaluation using the Short Form 36 Health Survey. *Mod Rheumatol* 査読有 2016, 26:240-247. DOI:10.3109/14397595.2015.1060668

Ono N, Niuro H, Ueda A, Sawabe T, Nishizaka H, Furugo I, Yoshizawa S, Yoshizawa S, Tsukamoto H, Kiyohara C, Tada Y, Horiuchi T. Characteristics of MPO-ANCA-positive granulomatosis with polyangiitis: a retrospective multi-center study in Japan. *Rheumatol Int* 査読有 2015, 35:555-559. DOI:10.1007/s00296-014-3106-z

Ayano M, Tsukamoto H, Kohno K, Ueda N, Tanaka A, Mitoma H, Akahoshi M, Arinobu Y, Niuro H, Horiuchi T, Akashi K. Increased CD226 Expression on CD8+ T Cells Is Associated with Upregulated Cytokine Production and Endothelial Cell Injury in Patients with Systemic Sclerosis. *J Immunol* 査読有 2015, 195:892-900. DOI:10.4049/jimmunol.1403046

Ogata A, Amano K, Dobashi H, Inoo M, Ishii T, Kasama T, Kawai S, Kawakami A, Koike T, Miyahara H, Miyamoto T, Munakata Y, Murasawa A, Nishimoto N, Ogawa N, Ojima T, Sano H, Shi K, Shono E, Suematsu E, Takahashi H, Tanaka Y, Tsukamoto H, Nomura A, Investigators MS. Longterm Safety and Efficacy of Subcutaneous Tocilizumab Monotherapy: Results from the 2-year Open-label Extension of the MUSASHI Study. *J Rheumatol* 査読有 2015, 42:799-809. DOI:10.3899/jrheum.140665

Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, Kiyohara C, Ueda N, Ayano M, Ohta S,

Kimoto Y, Akahoshi M, Arinobu Y, Niuro H, Tada Y, Horiuchi T, Akashi K. Serum progranulin levels are elevated in dermatomyositis patients with acute interstitial lung disease, predicting prognosis. *Arthritis Res Ther* 査読有 2015, 17:27. DOI:10.1186/s13075-015-0547-z

〔学会発表〕(計 6 件)

三嶋 耕司, 大田 俊一郎, 井上 靖, 吉澤 誠司, 吉澤 滋, 永野 修司, 西坂 浩明, 澤部 琢哉, 押領司 健介, 多田 芳史, 小山 芳伸, 綾野 雅宏, 木本 泰孝, 三苫 弘喜, 赤星 光輝, 有信 洋二郎, 大塚 毅, 上田 章, 大田 俊行, 中島 衡, 塚本 浩, 赤司 浩一, 堀内 孝彦, 新納 宏昭. 関節リウマチ患者のリンパ球サブセットに対するアバタセプトの経時的作用. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2017年4月, 福岡

高木 綾子, 有信 洋二郎, 大塚 恭子, 入野 健佑, 押領司 大助, 大田 友里, 久本 仁美, 綾野 雅宏, 木本 泰孝, 三苫 弘喜, 赤星 光輝, 塚本 浩, 赤司 浩一, 堀内 孝彦, 新納 宏昭. リウマチ性疾患の動物モデル コラーゲン誘導関節炎モデルマウスにおける自然リンパ球の分化と機能に関する検討. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2017年4月, 福岡

中川 仁, 小山 芳伸, 川上 純, 植木 幸孝, 塚本 浩, 永野 修司, 内野 愛弓, 大田 俊行, 赤星 光輝, 綾野 雅宏, 三苫 弘喜, 木本 泰孝, 有信 洋二郎, 赤司 浩一, 堀内 孝彦, 新納 宏昭. 関節リウマチの治療 病理・病態・バイオマーカー 一般血液検査値による関節リウマチに対する生物製剤治療効果予測の可能性. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2017年4月, 福岡

塚本 浩. 膠原病の難治性病態 びまん皮膚硬化型全身性強皮症に対する造血幹細胞移植療法の理論的根拠と実際. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2016年4月, 横浜

塚本 浩. 膠原病・リウマチ治療の最新の進歩. 第65回共済医学会, 2016年10月, 横浜

塚本 浩, 綾野 雅宏, 新納 宏昭, 有信 洋二郎, 赤星 光輝, 三苫 弘喜, 田中 淳, 大田 俊一郎, 植木 尚子, 久本 仁美, 上田 彰, 廣崎 友里, 押領司 大助, 赤司 浩一. 難治性皮膚筋炎に対する自己造血幹細胞移植の長期成績. 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2015年4月, 名古屋

〔図書〕(計 1 件)

神田善信, 塚本 浩, 他: 医薬ジャーナル社, みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床. 2016, 808.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

塚本 浩 (TSUKAMOTO HIROSHI)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：70304722

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし