

令和元年5月31日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09917

研究課題名(和文) 自己免疫性関節炎に特異的なFoxp3+制御性T細胞サブセットとその制御機構の同定

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of Foxp3+ regulatory T cells supecific for the pathogenesis 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の動物モデルにおいては、関節炎を誘導後に関節炎原性のヘルパーT(Th)細胞サブセットであるTh17細胞分化のマスター転写因子ROR $\gamma$ tを発現したFoxp3+制御性T細胞がリンパ節内、および関節炎発症後の関節局所において増加しており、さらにこれらを欠損したFoxp3-cre・ROR $\gamma$ t flox/flox (cKO)マウスにおいてコントロールマウスと比較して関節炎が有意に増悪することを明らかにした。またRA患者末梢血でもこれらのサブセットの増加を確認した。以上の結果からROR $\gamma$ t+Foxp3+制御性T細胞は関節炎の発症制御において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチの病態制御においてFoxp3+制御性T細胞が重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細は明らかになっていない。本研究においてRAとRAの動物モデルを用いた解析から明らかにされた結果は、転写因子ROR $\gamma$ tを発現するFoxp3+制御性T細胞が自己免疫性関節炎の制御において特異的なFoxp3+制御性T細胞サブセットである可能性を示唆している。これらの知見は、関節リウマチ治療における新たな治療手段を開発する一助になる可能性があり、今後の更なる解析が望まれる。

研究成果の概要(英文)：In the analysis of animal model of rheumatoid arthritis (RA), we observed the increase in ROR gamma t-expressing Foxp3+ regulatory T (Treg) cells in lymph nodes and inflamed joints after the development of arthritis. ROR gamma t is master transcription factor in the differentiation of T helper 17 cells, which is one of the arthritogenic CD4+ T cell subsets in pathogenesis of autoimmune arthritis. Moreover, arthritis was significantly exacerbated in Foxp3-cre x ROR gamma t flox/flox mice, in which ROR gamma t was specifically depleted in Foxp3-expressing Treg cells, compared with control mice. In addition, we also observed the increase in ROR gamma t-expressing Th17 like Foxp3+ Treg cells in peripheral blood collected from patients with RA compared with healthy subjects. These results raised possibility that ROR gamma t-expressing Treg cells might have a essential role in the regulation of pathogenesis in autoimmune arthritis.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：関節リウマチ CD4+T細胞 制御性T細胞 Foxp3 ROR $\gamma$ t IL-17 IL-10

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis ; RA) の病態形成において CD4<sup>+</sup> T 細胞は中心的な役割を果たしており、特に免疫応答を誘導するヘルパー T (helper T ; Th) 細胞とその機能を抑制する制御性 T 細胞とのバランスが重要と考えられているが、その詳細は明らかにされていない。制御性 T 細胞に関する基礎的な解析において T 細胞サブセットの特異的転写因子を発現する Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が、各 T 細胞サブセットに特異的に免疫応答を抑制することが報告されている。我々が過去に実施した 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 (ROR $\gamma$ t Tg) における RA の動物モデルであるコラーゲン誘導関節炎 (collagen induced arthritis ; CIA) の解析では、ROR $\gamma$ t を発現した Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が IL-17 を産生し関節炎原性とされる Th-17 特異的に免疫応答を抑制することで関節炎の発症を抑制した可能性を示唆されたが、さらなる詳細な解析が必要な状況であった。

免疫応答の制御に関わる Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の RA をはじめとする自己免疫疾患への関与が注目されているが、上述の通り RA における制御性 T 細胞の関与についてはいまだ解析が十分とは言えず、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につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、制御性 T 細胞の代表的サブセットである Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞において T 細胞の分化に関わる転写因子を欠損した遺伝子改変マウスに自己免疫性関節炎を誘導して関節炎発症への影響を解析することや、ヒト末梢血中の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞における転写因子発現と RA との関連および疾患活動性との関連を解析することによって、RA の病態形成における特異的な制御性 T 細胞を明らかにし、新たな治療標的の可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス自己免疫性関節炎モデルの解析

#### CIA における Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞サブセットの機能と局在に関する検討

ROR $\gamma$ t Tg マウス由来の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が IL-10 を高産生し、関節局所に集積する結果をもとに、野生型マウスにおいても同様の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞サブセットが存在するかを検証した。すなわち、野生型マウスに CIA における抗原である Collagen type II (CII) を免疫し、鼠径リンパ節 (lymph node ; LN) 内の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞における転写因子発現、ケモカイン受容体を含む機能分子の発現に関して FCM 検討した。また、Foxp3-GFP レポーターマウスに対して CIA を誘導し、鼠径 LN から GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞 (=Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞) GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞をそれぞれ単離し、in vitro で抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で刺激したのち ROR $\gamma$ t および産生されたサイトカインについて細胞内染色を行ったうえで、FCM で解析した。関節炎発症後の関節局所に存在する Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞における転写因子発現を検討するために野生型マウスに CIA を誘導し、関節炎発症後である初回 CII 免疫後 35 日目に足関節の炎症局所に浸潤した炎症細胞を採取し、FCM で解析を行なった。

#### Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞特異的 ROR $\gamma$ t 欠損マウスにおける検討

Foxp3-cre マウスと ROR $\gamma$ t<sup>fllox/fllox</sup> マウスを交配することによって Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞特異的 ROR $\gamma$ t 欠損マウス (ROR $\gamma$ t conditional knock out マウス ; ROR $\gamma$ t-cKO マウス) を作成し、CIA を誘導し、関節炎の臨床像を評価した。CIA 誘導後の鼠径 LN 内の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞における ROR $\gamma$ t 発現について FCM で解析した。

### (2) ヒト RA における Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の評価

ヒトの RA において Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞に発現する ROR $\gamma$ t の発現について評価するため、FCM を用いて解析を行った。特にマルチカラー FCM を用いて発現する表面抗原により CD4<sup>+</sup> T 細胞サブセットを分類する方法 (Maecker HT, et al. *Nature Rev Immunol* 2012) を参考とし、Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞を CD4<sup>+</sup>T 細胞と同様に分類したうえで ROR $\gamma$ t 発現について解析を実施した。すなわち RA 患者、およびコントロールとして健康人 (healthy control ; HC)、変形性関節症 (osteoarthritis ; OA) 患者の末梢血単核球分画から CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し、CCR6 および CXCR3 発現により Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞を細分類し、各サブセットにおける ROR $\gamma$ t 発現を解析した。

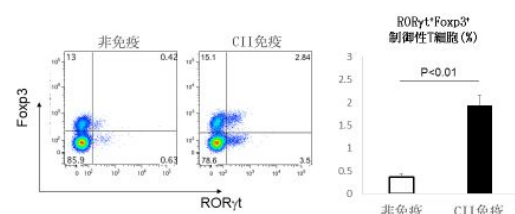
## 4. 研究成果

### (1) マウス自己免疫性関節炎モデルの解析

CIA における Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞サブセットの機能と局在に関する検討

- CIA 誘導後の鼠径 LN 由来の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞における ROR $\gamma$ t 発現を解析したところ、非免疫時と比較して ROR $\gamma$ t 発現が有意に亢進していた (図 1)。また ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞は ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞や ROR $\gamma$ t を発現した制御性

図 1. CIA 誘導後の LN 中 Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞における ROR $\gamma$ t 発現



T 細胞以外の細胞群と比較して関節局所への遊走に重要な CCR6 や Foxp3 の発現維持に必要な CD25 の発現が有意に亢進していた。

- CIA 誘導後の鼠径 LN 由来の ROR $\gamma$ t<sup>-</sup>制御性 T 細胞と比較して ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞による IL-10 産生が有意に増加し(図 2)、また Th-17 が主体と考えられる ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞と比較して ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞による IL-17 産生は低い傾向を認めた(図 2)。
- 関節局所への Tr17 の局在を明らかにするために、関節炎発症後に足関節の炎症局所に浸潤した炎症細胞を解析したところ、脾臓や LN と比較して関節局所で ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の有意な増加が認められた(図 3)。

Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞特異的 ROR $\gamma$ t 欠損マウスにおける検討

- ROR $\gamma$ t-cKO マウスに対して CIA を誘導したところコントロールである Foxp3<sup>wt</sup>ROR $\gamma$ t<sup>fl/fl</sup> マウスと比較して CIA が有意に増悪した(図 4)。
- ROR $\gamma$ t-cKO マウスおよびコントロールマウスに対して CII 免疫後に鼠径リンパ節を採取し、Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞における ROR $\gamma$ t 発現を FCM にて解析したところ、コントロールマウスと比較して ROR $\gamma$ t-cKO マウス由来の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞において ROR $\gamma$ t 発現は有意に低下していた。

以上のマウスモデルを用いた解析結果から、関節炎の発症過程において ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が誘導され、CD25 や IL-10 の高発現から制御性 T 細胞の機能を維持し、高い CCR6 発現によって関節局所に動員されて関節局所において炎症病態の抑制に関与している可能性が示唆された。この結果は、ROR $\gamma$ t-cKO マウスにおいて ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が除去された場合に、関節炎が増悪することと矛盾しないと考えられた。

本検討に類似した解析結果として多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimentally autoimmune encephalomyelitis; EAE)において ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が抗原特異的な Th17 応答を特異的に抑制する“Tr17”として報告され(Kim BS, et al. Cell Rep 2017) 非常に注目されている。我々の検討結果は、自己免疫性関節炎の発症制御においても EAE と同様に Tr17 が重要な役割を果たしていること示しており、関節炎における制御機構の詳細な解析が望まれる。

## (2) ヒト RA における Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の評価

ヒトの CD4<sup>+</sup>T 細胞において CXCR3 および CCR6 の発現から各 Th サブセットが定義されており、Th17 については CCR6 陽性 CXCR3 陰性とされている。これをもとに Th サブセットと同様に末梢血中の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞を細分類したうえで ROR $\gamma$ t 発現について評価した。RA 患者末梢血由来の CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>Th17 様の Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞(Th17-制御性 T 細胞)において、HC や OA 患者末梢血中の Th17-制御性 T 細胞と比較して ROR $\gamma$ t 発現が亢進している傾向を認めた。

この結果から、RA 患者においても ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が病態に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

RA の動物モデルおよび RA 患者末梢血の解析結果から得られた知見から、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞が自己免疫性関節炎の発症制御に関連するような特異的な Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞である可能性が示唆され、RA の新規治療標的として期待できる結果であると考えられた。さらなる検討により、その妥当性が明らかにされることが望まれる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Kondo Y, Yokosawa M, Kaneko S, Furuyama K, Segawa S, Tsuboi H, Matsumoto I, Sumida

図2. CIA誘導後のLN中Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞におけるサイトカイン産生

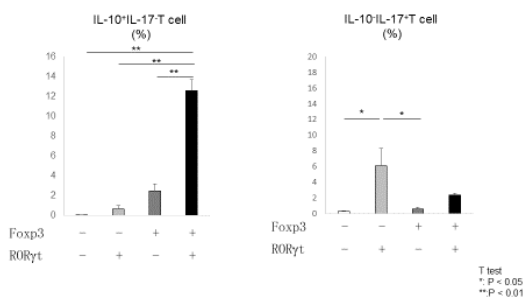


図3. 関節炎発症後の関節中のFoxp3<sup>+</sup>制御性T細胞

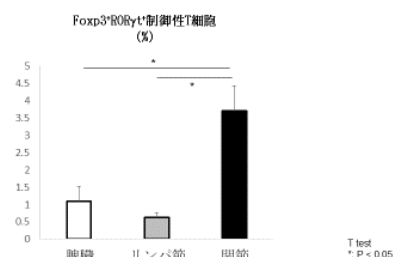
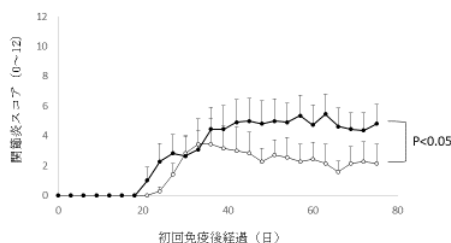


図4. ROR $\gamma$ t-cKOマウスにおけるCIAの重症度



T. Review: Transcriptional Regulation of CD4+ T Cell Differentiation in Experimentally Induced Arthritis and Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. (査読有) 70(5):653-661, 2018.

DOI : 10.1002/art.40398.

Kaneko S, Kondo Y, Yokosawa M, Furuyama K, Segawa S, Tsuboi H, Kanamori A, Matsumoto I, Yamazaki M, Sumida T. The ROR $\gamma$ t-CCR6-CCL20 axis augments Th17 cells invasion into the synovia of rheumatoid arthritis patients. Mod Rheumatol. (査読有) 28(5):814-825, 2018

DOI : 10.1080/14397595.2017.1416923.

Yokosawa M, Kondo Y, Tahara M, Iizuka M, Segawa S, Kaneko S, Tsuboi H, Yoh K, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T. T-bet overexpression regulates AHR-mediated Th-17 differentiation through an IFN $\gamma$ -independent pathway. Clin Exp Immunol. (査読有) 188:22-35, 2017

DOI : 10.1111/cei.12912

〔学会発表〕(計5件)

近藤裕也. 自己免疫性関節炎を制御する制御性T細胞サブセット - Tr17 と関節リウマチ -. 第46回日本臨床免疫学会総会(軽井沢). 2018年

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機構. 第5回日本リウマチ学会リサーチカンファレンス 次世代リーダーセッション(東京). 2018年

Furuyama K, Kondo Y, Shimizu M, Iizuka A, Yokosawa M, Segawa S, Tsuboi H, Matsumoto I, Sumida T. Analysis of the Role of ROR $\gamma$ t+Foxp3+ T regulatory 17 (Tr17) Cells in Murine Auto immune Arthritis Model. Annual meeting on American College of Rheumatology 2018(シカゴ). 2018年

古山琴菜、近藤裕也、横澤将宏、金子駿太、瀬川誠司、坪井洋人、松本功、住田孝之. マウス自己免疫性関節炎マウスにおける Foxp3+ROR $\gamma$ t+制御性T細胞の機能解析. 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会(東京). 2018年

近藤裕也、金子駿太、横澤将宏、古山琴菜、瀬川誠司、坪井洋人、松本功、住田孝之. 関節リウマチ患者における末梢血制御性T細胞サブセットの解析. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会(福岡). 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項無し

6. 研究組織

特記事項無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。