

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09970

研究課題名(和文) 自己免疫性関節炎におけるIL-33-自然リンパ球経路の役割の解明

研究課題名(英文) The role of IL-33-ILCs axis in the development of autoimmune arthritis

研究代表者

高取 宏昌 (Takatori, Hiroaki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：30568225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)は滑膜炎と関節破壊を主徴とする自己免疫疾患だが、その病因は未だ不明である。近年、自己免疫疾患においてIL-33/IL-33受容体(ST2)シグナルの亢進や末梢血自然リンパ球(ILCs)の増加と病態増悪との関連が示された。本研究では、RA患者の末梢血単核球(PBMCs)において疾患活動性と発現が相関する遺伝子と、IL-33刺激によりマウスILCsにおいて発現誘導される遺伝子で共通するものを網羅的に探索し、その中からILCsの分化や機能を制御することにより、自己免疫性関節炎の発症や増悪に関わる分子を同定することを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、関節リウマチや脊椎関節炎などの自己免疫性関節炎の発症における自然リンパ球(innate lymphoid cells; ILCs)の役割が明らかになり、自己免疫性関節炎の新規疾患活動性指標、新規治療標的が同定され、通常治療に抵抗性を示す自己免疫性関節炎のIL-33/ST2/ILCs軸の制御による新規治療戦略基盤が構築されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that is characterized by the inflammation of synovial joints. It has been shown that IL-33/ST2 axis or the increase in innate lymphoid cells (ILCs) are involved in the exacerbation of autoimmune diseases. However, the roles of IL-33/ST2 axis and ILCs in the development of autoimmune arthritis such as RA and spondyloarthritis (SpA) remain largely unknown. In this study, we identified the two genes in which expression levels are correlated with disease activity score 28-ESR (DAS28-ESR) and induced in murine ILCs in the presence of IL-33. We also examined the correlation between the number of ILCs and the ultrasound scores of joints in the patients with RA and SpA. Our data indicate that selective targeting of the IL-33-ST2 axis in ILCs would be a promising strategy in treating autoimmune arthritis.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 自己免疫性関節炎 自然リンパ球 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦で約70万人の患者が存在すると報告されている関節リウマチ (RA) は、滑膜炎と関節破壊を特徴とする自己免疫疾患であり、その身体機能予後は不良である。ヘルパーT細胞を中心とする獲得免疫の異常、ならびにサイトカインの過剰産生により、滑膜に慢性炎症が生じ、その結果、骨・軟骨が破壊されると考えられている。近年、生物学的製剤を主とした分子標的薬の臨床応用によりその予後は著明に改善されたが、依然無効例も多数存在する。したがって、さらなる治療成績の向上のために病態のより詳細な解明が望まれる。

一方、近年、リンパ球様の形態を示すが、既存の系列マーカーが陰性で、特定のサイトカインを大量に産生する自然免疫細胞がマウスとともにヒトにおいて同定され、innate lymphoid cells (ILCs)と総称されている。転写因子T-betを発現し、IFN- γ を産生するものはILC1と定義され、ウイルスの排除に重要な役割を果たしている。また、転写因子GATA3を発現し、IL-5/IL-13などのTh2サイトカインを産生する細胞群はILC2と定義され、IL-25/IL-33に応答し気管支喘息やアトピー性皮膚炎などにおけるアレルギー性炎症の誘導や寄生虫排除に関与している。一方、IL-17A/IL-22などの炎症性サイトカインを産生するROR γ t陽性の自然免疫細胞はILC3と定義され、二次リンパ組織の形成誘導や消化管粘膜における生体防御に関与している。興味深いことに、ヒト自己免疫疾患においても、RA症例の末梢血単核球 (PBMC) 中にCD4⁺CD3⁻IL-7R α ⁺ ILCsが増加し、TNFやLT α/β を産生していること、強直性脊椎炎や乾癬性関節炎症例のPBMCsや関節滑液中でIL-17AやIL-22を産生するNKp44陽性ILCsが増加していることが示され、自己免疫性関節炎の病態におけるILCsの役割が示唆されている。さらにRA症例の血清中や滑膜組織でIL-33濃度が高いこと、抗ST2抗体を投与されたマウスやST2欠損マウスではIL-33/ST2経路の遮断によりコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) の重症度が低下することが報告されている。したがって、ILCsにおけるIL-33/ST2シグナルの増強が自己免疫性関節炎の発症や増悪に何らかの役割を果たしていることが推測されるが、その詳細は依然不明である。

2. 研究の目的

そこで本申請研究ではRA症例のPBMCsにおける網羅的遺伝子発現解析に基づき、IL-33刺激によりILCsで発現し、RAの疾患活動性と相関する遺伝子を見出し、そのILCsの分化やサイトカイン産生における役割と自己免疫性関節炎の発症における役割を明らかにすることで、IL-33/ST2/ILCs軸の制御によるRAの新規治療戦略基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

1) RAの疾患活動性と関連するIL-33誘導性ILC機能分子候補の抽出:

野生型 (WT) マウスのリンパ節や脾臓などの二次リンパ組織よりLin⁻(CD3 ϵ ⁻CD4⁻CD8 α ⁻CD19⁻CD5⁻B220⁻CD11b⁻CD11c⁻CD49b⁻Fc ϵ R1⁻TER119⁻TCR $\alpha\beta$ ⁻TCR $\gamma\delta$ ⁻GR-1⁻) IL-7R α ⁺ ILCsをFACSソーティングを用いて単離した。その後、ILCsをIL-2+IL-7あるいはIL-2+IL-7+IL-33の存在下で48時間培養し、次世代シーケンサーによるRNAシークエ

ンスを行い、IL-33刺激によりマウスILCsで有意に発現誘導される遺伝子を同定した。一方で、当科外来通院中のRA患者79例の末梢血から末梢血単核球(PBMCs)を単離し、同細胞における網羅的な遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより解析し、RAの疾患活動性(DAS28-ESR)と発現が相関する遺伝子を同定した。次に、IL-33刺激によりマウスILCsで有意に発現された遺伝子と、RAの疾患活動性と発現が相関する遺伝子を網羅的に比較解析し、両データベースで共通する遺伝子を抽出した。そして、これらの遺伝子よりIL-33シグナルがRAの病態形成に関与していることが推測される候補分子を選択した。

2) ヒト自己免疫性関節炎における ILCs の役割の解明：

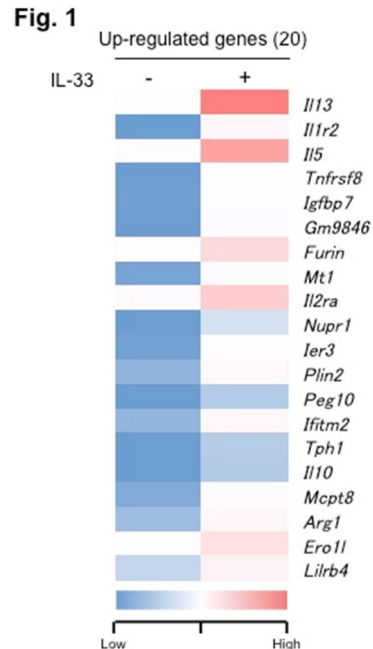
当科外来通院中 RA 症例、末梢性脊椎関節炎 (SpA) 症例の末梢血 30ml より PBMCs を単離し、CD3ε⁻ CD19⁻ CD14⁻ CD123⁻ CD11c⁻ FcεR1α⁻ CD34⁻ CD94⁻ (Lin)⁻ IL-7Rα⁺ ILCs 分画とともに、Lin⁻ IL-7Rα⁺ cKit⁻ NKp44⁻ ILC1s 分画、Lin⁻ IL-7Rα⁺ CRTH2⁺ ILC2s 分画、Lin⁻ IL-7Rα⁺ cKit⁺ NKp44^{-/+} ILC3s 分画の絶対数を解析した。さらに、末梢血 ILCs 数と関節炎の活動性との関連を明らかにするためRA症例とSpA症例について治療前に関節超音波検査を施行し、末梢血中の ILCs 数と超音波スコア(総滑膜炎スコア、総腱鞘滑膜炎スコア、総付着部炎スコア)との相関を解析した。

4 . 研究成果

1) RA の疾患活動性と関連する IL-33 誘導性 ILC 機能分子候補の抽出

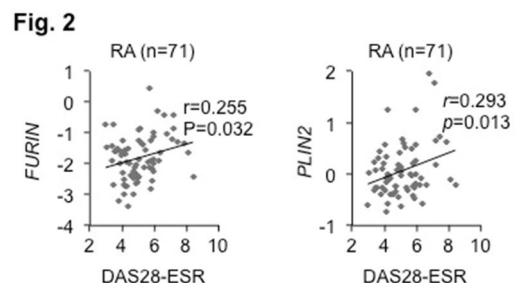
(a) IL-33刺激により ILCsにおいて誘導される遺伝子の同定：

WT マウスより単離した ILCs を IL-33 の非存在下あるいは存在下で培養し、RNA-seq により網羅的に遺伝子発現を解析した。そのデータベースより IL-33 非存在下 FPKM 値 > 0、 IL-33 存在化 FPKM 値/IL-33 非存在下値 2 の 2 つの条件に含まれる発現変動因子を抽出したところ、876 種類が選択された。その結果を Weight Average Difference (WAD)法により発現変動順によりランキングし上位 20 位までの因子によりヒートマップを作製した (Fig.1)。

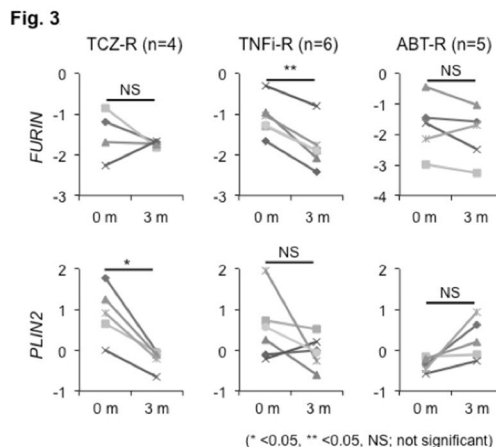


(b) RA の PBMCs に発現し、疾患活動性と相関する IL-33 誘導性遺伝子の同定：

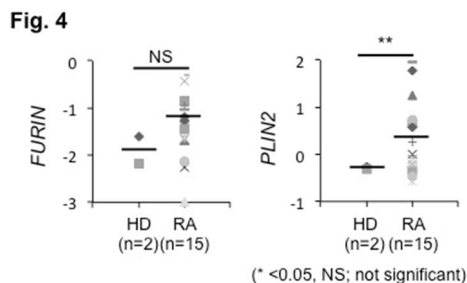
RA79 例の PBMCs における遺伝子発現を網羅的に解析したところ 3507 個の因子が選



択され、そのうち研究成果 1) で抽出された因子と共通するものを抽出したところ、*FURIN* と *PLIN2* の存在が判明した (Fig. 2)。さらに、生物学的製剤の投与が有効性を示した RA 症例の治療前後の *FURIN* と *PLIN2* の遺伝子発現量を解析したところ、TNF 阻害薬有効例 (TNFi-R) において治療前 (0 m) と比べて治療後 3 ヶ月 (3 m) で *FURIN* の発現が有意に減少していたが、トシリズマブ有効例 (TCZ-R) やアバタセプト有効例 (ABT-R) においては、治療後にその発現に変化が認められなかった (Fig. 3 上段)。一方、*PLIN2* の発現に関しては TCZ-R において治療後 3 ヶ月 (3 m) でその遺伝子発現量が有意に減少していたが、TNFi-R や ABT-R ではその発現に変化は認められなかった (Fig. 3 下段)。これらの結果から、*FURIN* は TNFi に対する治療反応性に、一方、*PLIN2* は TCZ に対する治療反応性に関与する因子である可能性が示唆された。



次に、治療タイプの RA 症例の PBMCs における *FURIN* と *PLIN2* の遺伝子発現量を健常人 (HD) のものと比較解析したところ、*FURIN* の発現量は両群間で差が認められなかったが、*PLIN2* の発現は RA 症例において有意に増加していた (Fig. 4)。これらの結果から *PLIN2* の発現は RA の発症に関与する因子である可能性が示唆された。



2) ヒト自己免疫性関節炎における ILCs の役割の解明

現時点で RA 66 例と SpA 34 例の登録、及び末梢血総 ILCs 数と ILC1s, ILC2s, ILC3s 数の解析、関節超音波の解析が終了している。現在、これらパラメーターの関連性を解析するとともに、バリデーションコホートの症例を登録している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Saku Aiko, Furuta Shunsuke, Kato Manami, Furuya Hiroki, Suzuki Kotaro, Fukuta Masashi, Suehiro Kenichi, Makita Sohei, Tamachi Tomohiro, Ikeda Kei, Takatori Hiroaki, Maezawa Yuko, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Hirose Koichi, Nakajima Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Experience of musculoskeletal ultrasound scanning improves physicians' physical examination skills in assessment of synovitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Rheumatol	6. 最初と最後の頁 1091 ~ 1099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-020-04960-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoshima Misaki, Nagayama Koji, Takeshita Kei, Ajima Hiroshi, Orikasa Sakurako, Iwazaki Ayana, Takatori Hiroaki, Oki Yutaka	4. 巻 2019
2. 論文標題 Methotrexate-associated lymphoproliferative disorder with hypopituitarism and central diabetes insipidus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinol Diabetes Metab Case Rep	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/EDM-19-0082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takatori Hiroaki, Makita Sohei, Ito Takashi, Matsuki Ayako, Nakajima Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulatory Mechanisms of IL-33-ST2-Mediated Allergic Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 2004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.02004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Shigeru, Suto Akira, Iwamoto Taro, Kageyama Takahiro, Tamachi Tomohiro, Takatori Hiroaki, Suzuki Kotaro, Hirose Koichi, Ohara Osamu, Lefebvre Veronique, Nakajima Hiroshi	4. 巻 215
2. 論文標題 Sox12 promotes T reg differentiation in the periphery during colitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2509 ~ 2519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20172082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mitamura Yasutaka, Nunomura Satoshi, Nanri Yasuhiro, Arima Kazuhiko, Yoshihara Tomohito, Komiya Kosaku, Fukuda Shogo, Takatori Hiroaki, Nakajima Hiroshi, Furue Masutaka, Izuhara Kenji	4. 巻 293
2. 論文標題 Hierarchical control of interleukin 13 (IL-13) signals in lung fibroblasts by STAT6 and SOX11	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14646 ~ 14658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA117.001364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makita Sohei, Takatori Hiroaki, Tamachi Tomohiro, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Nakajima Hiroshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Analyses of dermal innate lymphoid cells in mice lacking T-bet and STAT6	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 S51 ~ S53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2018.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuki Ayako, Takatori Hiroaki, Makita Sohei, Yokota Masaya, Tamachi Tomohiro, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Hirose Koichi, Nakajima Hiroshi	4. 巻 4
2. 論文標題 T-bet inhibits innate lymphoid cell-mediated eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-9 production.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 1355 ~ 1367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2016.08.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Takashi, Hirose Koichi, Norimoto Ayako, Tamachi Tomohiro, Yokota Masaya, Saku Aiko, Takatori Hiroaki, Saijo Shinobu, Iwakura Yoichiro, Nakajima Hiroshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Dectin-1 Plays an Important Role in House Dust Mite-Induced Allergic Airway Inflammation through the Activation of CD11b+ Dendritic Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Immunol	6. 最初と最後の頁 61 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1502393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Takashi, Hirose Koichi, Saku Aiko, Kono Kenta, Takatori Hiroaki, Tamachi Tomohiro, Goto Yoshiyuki, Renauld Jean-Christophe, Kiyono Hiroshi, Nakajima Hiroshi	4. 巻 214
2. 論文標題 IL-22 induces Reg3 and inhibits allergic inflammation in house dust mite-induced asthma models	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Exp Med	6. 最初と最後の頁 3037 ~ 3050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20162108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Makita Sohei, Takatori Hiroaki, Iwata Arifumi, Tanaka Shigeru, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Nakajima Hiroshi
2. 発表標題 ZFP36L2 suppresses the function of regulatory T cells by downregulating Helios expression
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 策愛子、田原大悟、高取宏昌
2. 発表標題 抗CCP抗体陽性症例の関節病変鑑別における関節エコーの有用性について
3. 学会等名 第45回静岡リウマチ懇話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川秀己、高取宏昌、策愛子、田原大悟
2. 発表標題 多彩な血管病変や臓器病変を呈したANCA関連血管炎の1例
3. 学会等名 膠原病懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高取宏昌
2. 発表標題 関節リウマチの治療感受性に関わる新規因子の同定
3. 学会等名 膠原病Expert Meeting (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高取宏昌
2. 発表標題 関節リウマチの早期発見・早期治療のために
3. 学会等名 静岡リウマチネットワーク令和元年度第2回市民公開講座 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高取宏昌
2. 発表標題 関節リウマチの病態における制御性T細胞の役割
3. 学会等名 静岡リウマチ治療学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高取宏昌
2. 発表標題 炎症性疾患や自己免疫疾患の発症機序における自然免疫と獲得免疫の役割
3. 学会等名 第7回一般内科医を目指す若手医師のための膠原病セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高取宏昌、田原大悟
2. 発表標題 右動眼神経麻痺、汎下垂体機能低下性、多発皮下結節で発症したメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患 (MTX-LPD) の一例
3. 学会等名 日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧田荘平、高取宏昌、中島裕史
2. 発表標題 T-bet/Stat6二重欠損マウスに自然発症する皮膚炎の発症機構の解明
3. 学会等名 アレルギー・好酸球研究会2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院 アレルギー・臨床免疫学ホームページ http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	廣瀬 晃一 (Hirose Koichi) (90400887)	千葉大学・大学院医学研究院・特任教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鈴木 浩太郎 (Suzuki Kotaro) (90554634)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	