

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：37116
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：17K10010
研究課題名（和文）全身性エリテマトーデスにおけるヘルパーT細胞ダイナミズムの解明と新規治療への応用

研究課題名（英文）Dynamism of T helper cells in systemic lupus erythematosus

研究代表者
中山田 真吾（Nakayamada, Shingo）

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：60389426
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）：SLE患者にはT細胞フェノタイプの差異による3群の免疫学的亜集団が存在し、Tfh細胞がドミナントに活性化する群が既存の免疫抑制療法に抵抗性であった。SLE患者で活性化しているTfh/Th1細胞の分化はIL-12によるSTAT1とSTAT4の活性化がヒストン蛋白修飾を介して誘導され、それらの表現型は選択的TYK2阻害薬によって阻害された。以上から、IL-12-TYK2-STAT経路がSLEに対する新たな治療標的の候補であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果により、SLEの病態においてT細胞ダイナミズムによるheterogeneityが存在することが明らかとなった。SLEの病態に関与するTfh細胞への分化偏向はJAK-STAT経路を介したエピジェネティクス機序で制御されており、これらを標的とした創薬はSLEの治療抵抗性難治性病態への新たな治療戦略に有望である。本研究は、免疫難病であるSLEへの疾患特異的治療の開発に重要な示唆を与え、医療および社会の発展に資するものである。

研究成果の概要（英文）：We have used an immunophenotyping approach to categorize patients with SLE into distinct subgroups by comprehensive multicolor flow cytometric analysis. We identified three distinct subgroups based on T cell heterogeneity, including a T cell-independent group, a T follicular helper (Tfh) cell-dominant group and a T regulatory (Treg) cell-dominant group. The percentage of patients who were resistant to immunosuppressive treatment was highest among the Tfh cell-dominant group. In vitro analysis demonstrated that IL-12-mediated co-activation of STAT1 and STAT4 alters histone modification, resulting in development of pathogenic Tfh-Th1-like cells. Finally, Tfh/Th1 differentiation was inhibited by selective TYK2 inhibitors. Collectively, our data indicated that the IL-12-TYK2-STAT pathway is a candidate for new therapeutic target for SLE.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：全身性エリテマトーデス 濾胞性ヘルパーT細胞 免疫フェノタイプ エピジェネティクス JAK阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身性エリテマトーデス (SLE)は自己応答性T細胞とB細胞との機能連関による自己抗体産生で特徴付けられる自己免疫疾患である。近年、複数の分子標的薬が関節リウマチ (RA)の治療で画期的な成功を収めており、SLEでの開発に期待が寄せられている。しかし、SLEにおける臨床試験では分子標的薬の臨床効果が限定的との結果が相次ぎ、創薬には高いハードルが未だ存在する。このことはSLEでは疾患のheterogeneityが高く、病態が多様であることに起因する可能性がある。したがって、SLEでは症例ごとの病態に応じて適切な治療標的を選択する個別化医療が重要と考えられる。

(2) Tfh細胞はB細胞の機能と抗体反応を制御する液性免疫に特化した機能をもつ新規ヘルパーT細胞である。申請者らは、ヘルパーT細胞の分化が他のサブセットと相互に形質転換が可能であり、可塑性・多様性をもった細胞であることを見出した(文献1-5)。興味深いことに、Tfh細胞はTh1細胞、Th17細胞、Treg細胞等との可塑性を有し、免疫系に多様な修飾を与える。さらに、RAやSLE患者末梢血ではTfh細胞が有意に増加し、その活性化が疾患活動性や自己抗体と相関することを報告した(文献6,7)。

(3) 以上の背景から、申請者はSLEの臨床的異質性がTfh細胞を中心とする免疫フェノタイプの相違に起因することを想定した。これらの根拠に基づき、本研究ではSLEにおけるTfh細胞を中心とする免疫ダイナミズムの解明と免疫学的亜集団の同定による個別化医療への展開、それらの人為的制御による免疫修復療法への基盤構築を目的とした。

<引用文献>

1. Nakayamada S, Kanno Y, Takahashi H, Jankovic D, Lu KT, Johnson TA, Sun HW, Vahedi G, Hakim O, Handon R, Schwartzberg PL, Hager GL, O'Shea JJ. Early Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell-like Transition. *Immunity*. 2011; 35: 919-31.
2. Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol*. 2012; 24:297-302.
3. Vahedi G, Takahashi H, Nakayamada S, Sun HW, Sartorelli V, Kanno Y, O'Shea JJ. STATs Shape the Active Enhancer Landscape of T Cell Populations. *Cell*. 2012; 151: 981-993.
4. Takahashi H, Kanno T, Nakayamada S, Hirahara K, Sciumè G, Muljo SA, Kuchen S, Casellas R, Wei L, Kanno Y, O'Shea JJ. TGF-beta and retinoic acid induce miR-10a which targets Bcl-6 and constrains helper T cell plasticity. *Nat Immunol*. 2012; 13:587-95.
5. Nakayamada S, Poholek AC, Lu KT, Takahashi H, Kato M, Iwata S, Hirahara K, Cannons JL, Schwartzberg PL, Vahedi G, Sun HW, Kanno Y, O'Shea JJ. Type I interferon induces binding of STAT1 to *Bcl6*: Divergent roles of STAT-family transcription factors in the T_{FH} cell genetic program. *J Immunol*. 2014; 192: 2156-66
6. Iwata S, Nakayamada S, Fukuyo S, Kubo S, Yunoue N, Wang S-P, Yoshikawa M, Saito K, Tanaka Y. Activation of Syk in peripheral blood B cells in patients with rheumatoid arthritis: A potential target for abatacept therapy. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67: 63-73.
7. 好川 真以子, 中山田 真吾, 岩田 慈, 久保 智史, 湯之上 直樹, Sheau-Pey WANG, 田中 良哉. 全身性エリテマトーデス (SLE)患者B細胞におけるケモカイン受容体発現異常. 日本臨床免疫学会会誌 2015; 38: 65-68.

2. 研究の目的

(1) SLE患者を対象に網羅的免疫フェノタイプピングによる免疫ダイナミクス解析を実施し、臨床像や治療に影響する免疫学的亜集団の同定を試みる。

(2) 健常人からCD4陽性T細胞を抽出して、試験管内で分化培養をさせてTfh細胞を誘導する制御因子を明らかにする。その際、Tfh細胞への分化偏向を齎す細胞内シグナル及び主要転写因子を同定する。さらに、主要転写因子の遺伝子発現領域におけるヒストン修飾評価によりエピゲノム機構を解析する。

(3) 上記で見出した制御因子による細胞内シグナル分子を阻害してTfh細胞の表現型に与える影響を検討する。特に、新規治療薬によるTfh細胞フェノタイプの変化を解析することで、シグナル分子の治療標的としての妥当性を検証する。

3. 研究の方法

(1) SLE 143 名および健常人 49 名より末梢血を採取し、末梢血免疫フェノタイピングを NIH/FOCIS が Human Immunology Project として提唱した抗体セット、及び、ケモカイン受容体抗体を含む独自の抗体セットを用いて 8 カラーフローサイトメトリーで実施した。さらに、免疫サブセットのクラスター解析により、疾患活動性、臓器病変、治療反応性に関わる免疫フェノタイプおよび患者集団の細分化を試みた。

(2) ヒトでの Tfh 細胞を誘導する因子を明らかにするため、健常人末梢血ナイーブ T 細胞を TCR 架橋と各種サイトカイン (IL-6, IL-12, IL-21, IFN- γ / γ など) で分化誘導させ、STAT のリン酸化、転写因子 Bcl-6、T-bet などの発現を検討した。さらに、Tfh 細胞分化のエピゲノム制御を明らかにするため、ヒトヘルパー T 細胞を抽出し、TCR 架橋とサイトカイン刺激を行ったうえで Tfh 細胞の分化を規定する Bcl-6 遺伝子ヘプロモータ領域への STAT 蛋白の結合、ヒストン蛋白の修飾をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) にて検討した。

(3) 上記の検討により Tfh 細胞を誘導するサイトカイン刺激条件を設定した。かかる細胞内シグナル (JAK, BTK, SYK など) の阻害薬を上記培養系に添加して Tfh 細胞の細胞表面機能分子やマスター転写因子で規定される細胞表現型に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) SLE 末梢血では、Th1 細胞および Th17 細胞の割合は健常人と同等であったが Treg 細胞および Tfh 細胞の割合は健常人に比較して上昇していた。特に Plasmablast は健常人に比して著明な増加を認めた。クラスター解析を実施したところ、共通する B 細胞の分化異常に加えて、T 細胞フェノタイプの差異により 3 群に分けることが可能であり、T 細胞の分化と活性化の異常が乏しい群、Tfh 細胞と plasmablast の増加がドミナントとなる群、メモリー Treg 細胞の活性化がドミナントとなる群に分けられた。このなかで、Tfh dominant group では既存治療に抵抗性であった。さらに、SLE 患者末梢血には Tfh 細胞のなかでも CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺ 活性化 Tfh/Th1 様細胞が増加していた。

(2) In vitro の検討により、IL-12 刺激で誘導される STAT1 と STAT4 が BCL6 と TBX21 遺伝子座へ直接結合することで同遺伝子座における抑制型ヒストンマーカー H3K4me27 を抑制して Tfh/Th1 様細胞が誘導されることを見出した。さらに、SLE 患者では血清 IL-12 レベルおよびメモリー T 細胞上の IL-12 受容体の発現が増加し、リン酸化 STAT1、リン酸化 STAT4 および T-bet の発現は非 Tfh/Th1 様細胞より活性化 Tfh/Th1 様細胞で有意に高かった。

(3) IL-12 は IL-12 受容体に結合する JAK2、TYK2 の活性化を誘導することから、in vitro での JAK 阻害薬の影響に着目して検討を行った。その結果、IL-12 で誘導される Tfh/Th1 細胞様の細胞形質が TYK2 阻害薬の添加により強く抑制され、TYK2 阻害薬が Tfh 細胞に対する特異的な阻害作用を示す可能性が示唆された。

以上、本研究より、(1) SLE 患者には T 細胞フェノタイプの差異による 3 群の免疫学的亜集団が存在し、Tfh 細胞がドミナントに活性化する群が既存の免疫抑制療法に抵抗性であること (平成 29 年度)、(2) SLE 患者で活性化している Tfh/Th1 細胞の表現型が IL-12 による STAT1 と STAT4 の活性化がヒストン蛋白修飾を介して誘導されること (平成 30 年度)、(3) IL-12-JAK (特に Tyk2)-STAT 経路が SLE に対する新たな治療標的の候補であることが明らかとなった (令和元年度)。現在、SLE に対して JAK2 阻害薬バリシチニブの第 2 相臨床試験が進行中であるが、TYK2 阻害薬をはじめとする Tfh 細胞の分化、活性化を標的とした薬剤が SLE の治療抵抗性難治性病態に対する新たな治療戦略に有望であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ma X, Nakayamada S, Kubo S, Sakata K, Yamagata K, Miyazaki Y, Yoshikawa M, Kitanaga Y, Zhang M, Tanaka Y.	4. 巻 88
2. 論文標題 Expansion of T follicular helper-T helper 1 like cells through epigenetic regulation by signal transducer and activator of transcription factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1354-1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2017-212652	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 Kubo S, Nakayamada S, Yoshikawa M, Miyazaki Y, Sakata K, Nakano K, Hanami K, Iwata S, Miyagawa I, Saito K, Tanaka Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 Peripheral Immunophenotyping Identifies Three Subgroups Based on T Cell Heterogeneity in Lupus Patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis and Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2029-2037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.40180	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 Yoshikawa M, Nakayamada S, Kubo S, Nawata A, Kitanaga Y, Iwata S, Sakata K, Ma X, Wang SP, Nakano K, Saito K, Tanaka Y.	4. 巻 200
2. 論文標題 Type I and II interferons commit to abnormal expression of chemokine receptor on B cells in patients with systemic lupus erythematosus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2018.12.017	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 Kubo S, Nakayamada S, Tanaka Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Baricitinib for the treatment of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a 2019 update.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Expert Review of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 693-700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1744666X.2019.1608821	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 中山田 真吾, 田中 良哉.	4. 巻 25
2. 論文標題 全身性エリテマトーデスにおける免疫異常のオーバービュー.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 120-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 中山田真吾, 田中良哉	4. 巻 35
2. 論文標題 膠原病に対する新規分子標的療法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Practice	6. 最初と最後の頁 955-959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 中山田真吾, 田中良哉	4. 巻 2
2. 論文標題 全身性エリテマトーデスのprecision medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 22-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 中山田真吾, 田中良哉	4. 巻 70
2. 論文標題 JAK阻害薬	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 薬局	6. 最初と最後の頁 1143-1149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 中山田真吾, 田中良哉	4. 巻 27
2. 論文標題 全身性エリテマトーデス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 305-309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 佐藤 友梨恵, 中山田真吾, 田中良哉	4. 巻 62
2. 論文標題 SLEに対するJAK阻害療法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 リウマチ科	6. 最初と最後の頁 266-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Nakayamada S, Kubo S, Yoshikawa M, Miyazaki Y, Iwata S, Miyagawa I, Nakano K, Saito K, Tanaka Y.
2. 発表標題 Association between T follicular helper cell and plasmablast correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 European League Against Rheumatism (EULAR) Annual Scientific Meeting (欧州リウマチ学会 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakayamada S, Kubo S, Yoshikawa M, Miyazaki Y, Iwata S, Miyagawa I, Fukuyo S, Nakano K, Tanaka Y.
2. 発表標題 Pathological relevance of T follicular helper cell and plasmablast in patients with systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 The 82th American College of Rheumatology / Association of Rheumatology Health Professionals Annual Scientific Meeting (第82回アメリカリウマチ学会) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakayamada S, Ma X, Kubo S, Miyazaki Y, Yamagata K, Nakano K, Tanaka Y.
2. 発表標題 Activation of T follicular helper cells through epigenetic regulation by STAT1 and STAT4 in lupus patients
3. 学会等名 The 83th American College of Rheumatology / Association of Rheumatology Health Professionals Annual Scientific Meeting (第83回アメリカリウマチ学会) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakayamada S, Tanaka Y.
2. 発表標題 T Follicular Helper Cells as a Therapeutic Target in Systemic Lupus Erythematosus
3. 学会等名 EAGOR 2019 (東アジアリウマチ学会) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中山田真吾	4. 発行年 2018年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 248
3. 書名 リウマチ・膠原病治療薬ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	久保 智史 (KUBO Satoshi)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	

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
研究協力者	山形 薫 (YAMAGATA Kaoru)	産業医科大学・医学部・学内講師 (37116)	
研究協力者	神田 友梨恵 (KANDA Yurie)	産業医科大学・医学部・大学院生 (37116)	