

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08182

研究課題名(和文) TFH細胞機能制御を利用した自己免疫性間質性肺炎の治療法開発に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy based on the functional regulation of TFH cells for interstitial pneumonia associated with autoimmune diseases

研究代表者

新井 聡子 (Arai, Satoko)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：70458363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、c-Mybの自己免疫疾患の病態における役割を明らかにするために、活性化T細胞特異的にc-Mybを欠損させたマウスについて関節リウマチ(RA)モデルの解析を行った。その結果、T細胞におけるc-Mybの欠損はRAの病態(関節炎、間質性肺炎、胚中心形成とTfh細胞分化)に影響した。c-MybはGC-Tfh細胞とTreg細胞で重要な機能が見出され、獲得免疫に関与することが明らかになった。GC-Tfh細胞とTreg細胞におけるc-Mybの病的な異常機能によるGC-Tfh細胞およびTreg細胞間の機能的なバランスの異常はRAなど自己免疫疾患の発症や病態の維持に繋がる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫応答のリンパ球の機能におけるダイナミックな遺伝子発現の詳細な制御メカニズムは未だ明らかでない。また、自己免疫疾患における疾患特異的獲得免疫機能の詳細も不明のままである。我々は、本研究により獲得免疫におけるTfh細胞およびTreg細胞について機能が不明であるc-Mybが、自己免疫疾患における獲得免疫機構に関与することを見出した。また、T細胞におけるc-Mybの機能調節機能の解明が、今後の自己免疫疾患の病態研究に繋がる可能性を示した。本研究成果は、免疫システムの解明研究の発展に貢献する点に意義がある。またRAなど難治性自己免疫疾患に対する新規治療薬の開発へとつながる点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of the transcriptional factor c-Myb in the pathology of autoimmune diseases, we analyzed the Rheumatoid arthritis (RA) model in SKG mice that specifically lack c-Myb in activated T cells. Mice lacking c-Myb specifically in activated T cells had modified RA like pathologies (arthritis, Interstitial pneumonia, Rheumatoid factor titers, germinal center formation and Tfh cell differentiation in lymphoid tissues). These results revealed that c-Myb functions in especially GC-Tfh cells and Treg cells and is involved in adaptive immunity. It is considered that the abnormal functional balance between GC-Tfh cells and Treg cells due to the pathological abnormal function of c-Myb may lead to the to the development of autoimmune diseases such as RA.

研究分野：膠原病学

キーワード：自己免疫疾患 c-Myb 関節リウマチ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

獲得免疫および自然免疫の複雑な共同連携による免疫機構において、正常な免疫系が持つ自己抗原に対する T 細胞と B 細胞の免疫トレランスの破綻が自己免疫疾患の病態に深く関わると考えられるが、その発症機構は十分に理解されていない。膠原病の中でもっとも罹患頻度の高い関節リウマチ (RA) の治療は生物製剤などの導入により大きく進歩したが、その発症機構は未だ不明である。近年、獲得免疫系における濾胞ヘルパー T (Tfh) 細胞による高親和性自己抗体産生 B 細胞の誘導が膠原病の発症に関与する可能性が報告されている。RA 患者では末梢血中に Th2 タイプ (Th2-Tfh) および Th17 (Th17-Tfh) タイプの Tfh 細胞の比率が健常人と比べて増加し、病状悪化に伴い Th17 と Th1 タイプの機能を併せ持つ Th17/Th1-Tfh 細胞の増加が報告されていることから、他の自己免疫疾患と同様に Tfh 細胞の RA の病態における役割が注目されている。しかし、RA に対して Tfh 細胞の各サブセットが免疫機構において、どのように機能するか詳細は不明である。また、その存在自体の意義についても十分理解されていない。RA 関連呼吸器疾患、特に間質性肺炎は生命予後という点において最も重要な合併症であるが、我々は最近、RA 患者に合併した間質性肺炎など非感染性肺病変に対して生物製剤による有意な改善が見られなかったことを報告している。また自己免疫疾患の診断基準は満たさないものの、リウマトイド因子 (RF) など自己抗体陽性の間質性肺炎も存在することから関節炎と異なる肺特異的自己免疫機構の存在が考えられる。今後、RA 関節炎とともに RA 関連間質性肺炎の病態の解明と新規の根治的治療の開発が必要とされている。

### 2. 研究の目的

転写抑制因子である Bcl6 は Tfh 細胞のマスター分化因子として同定されている。その制御機構は不明であったが、最近、我々は Bcl6 による Tfh 細胞の分化誘導機構において転写因子である c-Myb が深く関与することを見出している。そこで本研究は、c-Myb の機能的カスケードによる Tfh 細胞の分化・機能制御機構の RA 病態における役割を明らかにする。そして Tfh 細胞に対する機能制御の治療的意義を明らかにし、関節炎と RA 関連呼吸器疾患 (特に間質性肺炎) に対する包括的かつ根治的な新規治療法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

c-Myb の CD4T 細胞に対する機能的役割を明らかにするために、c-Myb flox/flox マウスと OX40 遺伝子プロモーターを利用して Cre リコンビナーゼを発現させたマウスを交配して、活性化 T 細胞特異的 c-Myb コンディショナル (c) ノックアウト (KO) マウスを作製 (OX40-Cre-c-Myb-cKO) した。本研究では野生型マウスと cKO マウスを用いて以下の解析を行った。

#### (1) c-Myb の Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、Tfh 細胞、Treg 細胞の分化誘導に対する役割

各マウスに対して、各 Th 細胞に対する分化誘導に対する役割について解析するために、ナイーブ CD4T 細胞に対して Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、Tfh 細胞、Treg 細胞誘導条件下で抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体による刺激を行い、培養開始 5 日後に PMA およびイオノマイシンによる再刺激後の細胞内サイトカイン産生についてフローサイトメトリー法で解析を行った。また、分化誘導および再刺激後の細胞増殖について MTT アッセイを行い、アポトーシスについて annexinV 陽性 FAS 陽性細胞を解析した。

## (2) c-Myb の獲得免疫機構に対する役割

野生型マウスおよび OX40-Cre-c-Myb-cK0 マウスに対して DNP-OVA/alum ( ip ) で免疫 ( day0 ) 後に DNP-OVA ( ip ) でチャレンジ ( day42 ) を行い、以下の解析を行った。 Day14、48、56 の血清中の抗 DNP 抗体価を ELISA 法で測定。 day56 に脾臓細胞について Tfh 細胞、GC-Tfh 細胞、GC-B cell、抗原特異的産生細胞、形質細胞についてフローサイトメトリー法で解析。 Tfh 細胞、GC-Tfh 細胞をセルソーターで分取してリアルタイム qRT-PCR 法で種々のサイトカインや転写因子の mRNA の発現について解析を行った。

## (3) SKG-RA モデルにおける c-Myb の役割

SKG マウスは、T 細胞受容体刺激伝達分子 ZAP-70 の点変異により、潜在的に自己反応性 T 細胞を有する。無菌環境下では正常であるが、真菌成分である  $\alpha$ -グルカンの投与により関節炎が惹起される。すなわち、関節炎の発症には自然免疫系の活性化により、関節炎惹起性 T 細胞が誘導される。また、関節炎を発症した後に間質性肺炎を来す。その病態に GM-CSF が重要な役割を果たしていることが報告されており、病態の成因が異なることが示唆されているが、まだ不明な点も多い。一方、自己抗体を介する液性免疫の間質性肺炎発症に対する関与は明らかでない。

本研究では、c-Myb の遺伝子型が野生型の SKG マウスに対して  $\alpha$ -D グルカンの 1 つであるザイモサンの腹腔内投与後 12 週まで関節炎および間質性肺炎について以下の解析を行った。

関節炎の臨床的評価は関節炎スコアで定量化。足関節の病理学的解析は炎症スコアで定量化。肺の病理学的解析は炎症スコアと線維化スコアで評価。脾臓において GC 形成、GC-Tfh 細胞、GC-B 細胞の出現について免疫組織化学的検討。脾臓における Tfh 細胞と Treg 細胞をセルソーターで分取後に qRT-PCR で mRNA 動態を解析。RF を ELISA により測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ヘルパー T 細胞の分化誘導における c-Myb の機能

野生型、OX40-Cre-c-Myb-cK、CD4-Cre-c-Myb-cK0 マウスのナイーブ CD4T 細胞の Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、Tfh 細胞、Treg 細胞の誘導後の細胞内サイトカイン陽性細胞の出現頻度についてフローサイトメトリーで解析を行った結果、野生型および各 cK0 の各細胞間において有意な差を認めなかった。また分化誘導後および再刺激後の細胞増殖について MTT アッセイの結果およびアポトーシス細胞 ( annexinV 陽性 FAS 陽性細胞 ) についてフローサイトメトリー法で解析を行った結果についても野生型および各 cK0 の各細胞間において有意な差を認めなかった。以上より、in vitro における解析では、Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、Tfh 細胞、Treg 細胞の分化、増殖およびアポトーシスに対して明らかな c-Myb の機能的役割を認めなかった。

### (2) c-Myb の獲得免疫機構に対する役割

DNP-OVA/alum ( ip ) で免疫 ( day0 ) 後に DNP-OVA ( ip ) でチャレンジ後までの血清中抗 DNP 抗体について IgM、IgG1、IgG2、および IgE のサブクラスの抗体価について検討した。その結果、免疫後早期の Day14 では野生型と OX40-Cre-c-Myb-cK0 マウスにおいていずれも抗体価に有意差を認めなかったが、その後の抗体価は cK0 マウスで有意な低下を認めた。また、チャレンジ 2 週後の脾臓中 CD4T 細胞と B 細胞数は野生型と cK0 マウスで有意差を認めなかったが、GC-B 細胞と抗 DNP 抗陽性 B 細胞の出現頻度と細胞数は cK0 マウスで有意に減少した。GC-Tfh の比率および細胞数は、予想に反して cK0 マウスにおいて野生型と比べ、約 3 ~ 4 倍に増加した。チャレンジ 2 週後の脾臓よりセルソート後の Tfh 細胞および GC-Tfh 細胞における遺伝子発現動態を検討した結果、IL-4、IL-10 と IL-13 の mRNA 発現量は野生型と比べ cK0 マウスの Tfh 細胞および

GC-Tfh 細胞いずれにおいても増加した。一方、GATA3、T-Bet や IFN $\gamma$ 、IL-5、IL-21、Bcl6、BATF、および SAP の mRNA 発現量は野生型と cK0 マウス間に有意差を認めなかった。以上より、OX40-Cre-c-Myb-cK0 マウスでは DNP 抗原に対する GC 形成が低下し、獲得免疫応答が抑制されたが、GC-Tfh 細胞の出現頻度および IL-4 や IL-13 の産生は GATA3 非依存的に増強したことから、c-Myb は獲得免疫において Type2 の Tfh 細胞/GC-Tfh 細胞および制御性 Tfh 細胞細胞の機能に対して抑制的に制御することが推測された。

### (3) SKG-RA モデルにおける c-Myb の役割

SKG バックグラウンドの c-Myb 野生型と OX40-Cre-c-Myb-cK0 マウスに、それぞれザイモサン投与後の関節炎について解析したところ、cK0 マウスにおいて関節炎スコア（関節の腫脹）および足関節の病理学的炎症スコア（リンパ球浸潤、軟骨傷害）は減少した。一方、間質性肺炎の発症は野生型マウスと比べて cK0 マウスでは早期から出現したが、その後 1 2 週までに出現する間質性肺炎の炎症スコアと線維化スコアは野生型マウスと比較して cK0 マウスで軽減を認めた。また、cK0 マウスの脾臓において GC-Tfh 細胞の増加を認めたが、野生型マウスと比べて GC 形成の低下を認めた。脾臓における Tfh 細胞および Treg 細胞の mRNA 動態解析では、cK0 マウスにおいて、関節炎発症早期の GC-Tfh 細胞の IL-4 および IL-13 の発現増強と IL-10 の発現低下、関節炎発症中期以降の Treg 細胞の IL-10 発現増加を認めた。一方、IL-17 や GM-CSF の発現は cK0 マウスと野生型マウスで有意差を認めなかった。血清中 RF は関節炎発症早期では野生型マウスに比べて cK0 マウスで増加傾向を認めたが、関節炎発症中期以降より野生型マウスと比べて減少した。以上より、c-Myb は GC-Tfh 細胞および Treg 細胞いずれにおいても抑制性に関与することが考えられた。また、c-Myb は獲得免疫において T 細胞間ネットワークの制御を行っていると考えられた。その時空間的制御機構の異常は自己免疫疾患の発症に繋がり、RA においては関節炎や間質性肺炎の病態構築に深く関与することが示唆された。

### (まとめ)

本研究より c-Myb は GC-Tfh 細胞および Treg 細胞いずれにおいても機能しており、獲得免疫に関与することが明らかになった。獲得免疫系において c-Myb は GC-Tfh 細胞の維持や IL-4 および IL-13 の産生を抑制する一方、Treg 細胞機能を増強することにより免疫応答に働くことが示された。両細胞間の c-Myb 機能のバランスは獲得免疫系機能に影響を与えられ、c-Myb の病的な異常機能による各 T 細胞間ネットワークの恒常性破綻は RA など自己免疫疾患の発症や病態調節に繋がる可能性が考えられた。また、本研究で RA モデルにおける自己免疫応答と共に、関節炎と間質性肺炎の発症に GC-Tfh 細胞および Treg 細胞いずれもが深く関与することが示されたことから、自己免疫疾患の病態コントロールに獲得免疫機能制御の重要性が確認された。c-Myb は、GC-Tfh 細胞および Treg 細胞のクロストークによる転写調節因子として重要な役割を果たしている可能性があると考えられることから、本研究の成果は将来、免疫系細胞の機能制御機構の解明と新規の治療開発へとつながる点に意義があると思われる。今後、自己免疫疾患における疾患特異的免疫ネットワーク形成メカニズムの解明を目指し、更に c-Myb の研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kurasawa K, Arai S, Namiki Y, Tanaka A, Takamura Y, Owada T, Arima M, Maezawa R.   | 4. 巻<br>57              |
| 2. 論文標題<br>Tofacitinib for refractory interstitial lung diseases in anti-melanoma differentiation-associated 5 gene antibody-positive dermatomyositis. | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Rheumatology (Oxford)  | 6. 最初と最後の頁<br>2114-2119 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/rheumatology/key188.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tanaka A, Owada T, Hasegawa A, Hiyama T, Takamura Y, Miyao T, Yamazaki R, Arai S, Maezawa R, Arima M, Kurasawa K. |
| 2. 発表標題<br>TCZ might be a risk factor for worsening of ILD, particularly of chronic ILD.                                     |
| 3. 学会等名<br>EULAR (European League Against Rheumatism) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>新井聡子 檜山知佳 長谷川杏奈 高村雄太 宮尾智之 山崎龍太郎 田中彩絵 大和田高義 前澤玲華 有馬雅史 倉沢和宏 |
| 2. 発表標題<br>膠原病および類縁疾患の多彩な病態 トシリズマブ投与で増悪を示した成人still病の2例               |
| 3. 学会等名<br>64回日本リウマチ学会総会・学術集会（国際学会）                                  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中彩絵 倉沢和宏 長谷川杏奈 檜山知佳 高村雄太 宮尾智之 山崎龍太郎 新井聡子 大和田高義 前澤玲華 有馬雅史 |
| 2. 発表標題<br>関節リウマチの関節外病変(肺疾患) 生物学的製剤使用中関節リウマチに合併する間質性肺炎の増悪因子の検討       |
| 3. 学会等名<br>64回日本リウマチ学会総会・学術集会（国際学会）                                  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Arima M, Tanaka A, Takamura Y, Miyao T, Hasegawa A, Hiyama T, Yamazaki R, Arai S, Maezawa R, Arima M, Owada T, Hirata H, Fukushima Y, Kurasawa K |
| 2. 発表標題<br>Perturbation of macrophage functions results in severe bronchial asthma with altered phenotypes.   |
| 3. 学会等名<br>Congress of Interasma Japan / North Asia (国際学会) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 有馬 雅史<br><br>(Arima Masafumi)<br><br>(00202763)    | 獨協医科大学・医学部・教授<br><br><br>(32203) |    |
| 研究分担者 | 倉沢 和宏<br><br>(Kurasawa Kazuhiro)<br><br>(30282479) | 獨協医科大学・医学部・教授<br><br><br>(32203) |    |
| 研究分担者 | 大和田 高義<br><br>(Owada Takayoshi)<br><br>(30456016)  | 獨協医科大学・医学部・講師<br><br><br>(32203) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|