

令和 5 年 4 月 4 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16297

研究課題名(和文) 関節リウマチの病態形成におけるFGFR1陽性CD4陽性T細胞の役割の解明

研究課題名(英文) The roles of FGFR1-expressing helper T cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

研究代表者

田中 繁 (Tanaka, Shigeru)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30822051

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)：関節リウマチの病態にCD4陽性T細胞が関与しているがその詳細は不明である。我々は未治療関節リウマチ患者の末梢血CD4陽性T細胞にFibroblast growth factor receptor 1(FGFR1)が発現しており、治療により低下することを見出していた。そこで本研究は関節リウマチの病態形成におけるFGFR1陽性CD4陽性T細胞の役割を解析することを目的とした。滑膜組織の1細胞 RNA-seq解析によりFGFR1陽性細胞は炎症を惹起する機能を有することが示唆された。末梢血においても同細胞は強く活性化しており、サイトカイン産生能も高いことが明らかとなった。今後の治療法開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチは多数の関節に炎症が生じて、痛みや動きに支障が生じる疾患である。近年、薬物治療の進歩によって症状が改善する患者が増えているが、依然として症状の残る人もおり、新たな治療戦略が求められている。本研究ではFGFR1を発現するヘルパーT細胞に着目し、その機能を解析した。FGFR1陽性ヘルパーT細胞は活性化している形質を持っており、特に炎症物質を多く産生する機能があることが明らかとなった。今後、FGFR1陽性ヘルパーT細胞を標的とした治療法が確立されることで、既存の治療で改善しない関節リウマチ患者に新たな治療法を提案できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is well known that CD4+ T cells have roles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. However, the precise mechanisms are not well understood. We previously discovered that FGFR1 is a characteristic feature of CD4+ T cells from treatment-naive rheumatoid arthritis patient, and interestingly, the signal is diminished after the treatment. This study aimed to explore the characteristics of FGFR1-expressing CD4+ T cells in the patients with rheumatoid arthritis.

We performed single cell RNA-seq analysis and found FGFR1-expressing cells have activated phenotype. Consistent with this, flow cytometric analyses revealed that FGFR1-expressing CD4+ T cells have terminally differentiated phenotype with high production of inflammatory cytokines. These results suggest that FGFR1-expressing CD4+ T cells have a potential to deteriorate the joint inflammation. Also, FGFR1+ CD4+ T cells may be a candidate for the novel therapeutic target.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ FGFR1

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (以下 RA) は慢性破壊性の多関節炎である。RA の罹患率はおよそ 0.5% であり、日本には約 100 万人の患者がいると推計されている。以前から RA の病態形成に CD4 陽性 T 細胞が関与すると考えられているが、病原性を持つ CD4 陽性 T 細胞の特徴などは明らかではなく、議論が残る点である。RA の薬物治療はこの 20 年で飛躍的に進歩したが、未だに寛解に至らない患者が多数存在するため、現在とは異なる治療戦略の構築が求められている。

我々は未治療 RA 患者 28 例から末梢血 CD4 陽性 T 細胞を分取し、アンカードラッグであるメトトレキサートの治療前後で有意に発現が変動する遺伝子を複数同定し (Shoda et al., Arthritis Res Ther. 2022)、Fibroblast growth factor receptor 1 (以下 FGFR1) に着目した。FGFR1 はおもに間葉系細胞に発現しており、FGF ファミリーの刺激により増殖生存に関わるシグナルを伝達すると考えられている。リンパ球における FGFR の発現の報告は少なく、その機能はほとんどわかっていない。RA 患者における FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の報告は 1990 年代に 2 論文で報告されたが、その後詳細な解析は行われていない。今回 FGFR1 がメトトレキサートの治療後に変動する遺伝子として同定されたことから、RA の新規治療ターゲットとしての可能性が高いと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では RA の病態形成における FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の機能を患者由来の末梢血や滑膜組織を用いて解析し、新規治療基盤の構築を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 末梢血における FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞と疾患活動性の相関

フローサイトメトリー法を用いて末梢血における FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合を健常人および RA 患者で評価した。

RA 患者の FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合と疾患活動性 (DAS28CRP) の相関を検討した。

### (2) 滑膜組織における FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の評価

RA 患者滑膜における FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の存在を免疫化学組織染色を用いて評価した。

RA および OA 患者滑膜における FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメトリー法を用いて評価した。

### (3) 滑膜浸潤 CD4 陽性 T 細胞の 1 細胞 RNA-seq 解析

RA 患者滑膜に浸潤する CD4 陽性 T 細胞を分取し、1 細胞 RNA-seq 解析を実施した。

上記結果から FGFR1 を発現する滑膜 CD4 陽性 T 細胞の表現系について詳細解析を実施した。

### (4) フローサイトメトリーを用いた末梢血 FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の詳細解析

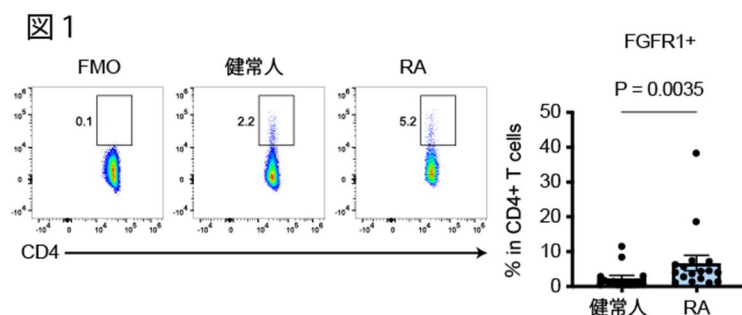
RA 患者末梢血中の FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の活性化状態をフローサイトメトリー法を用いて解析した。

RA 患者末梢血中の FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞のヘルパー T 細胞サブセット分類およびサイトカイン産生能についてフローサイトメトリー法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) RA 患者において FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞は増加しているが、病勢とは相関しない

RA 患者における FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞の増加を再検証するため、健常および RA 患者由来



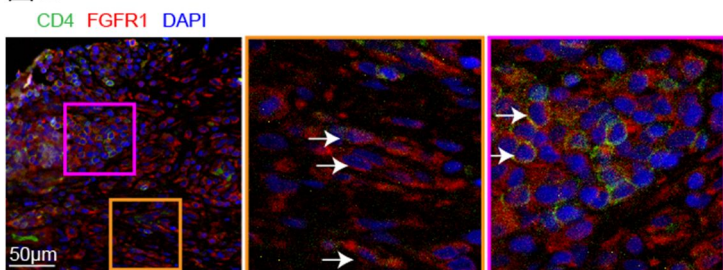
の検体をフローサイトメトリー法を用いて解析した。DNA マイクロアレイ結果と同様に、RA 患者の CD4 陽性 T 細胞における FGFR1 陽性細胞の割合は健常人と比べて有意に上昇していた。同サンプルを用いて、疾患活動性指標である DAS28 との相関を検証したが、両者に相

連は見られなかった(図1)。また、FGFR1以外のFGFR発現について定量的PCR法を用いて検討したが、末梢血CD4陽性T細胞に発現するFGFRファミリー遺伝子のなかでFGFR1がドミナントな発現形式を示した。

(2) RA滑膜にはFGFR1陽性T細胞が存在する

RAは滑膜の炎症を主体とする自己免疫性疾患である。FGFR1陽性CD4陽性T細胞が炎症局所に存在するか検証するため、患者由来滑膜組織の免疫化学組織染色を施行した。興味深いことに

図2



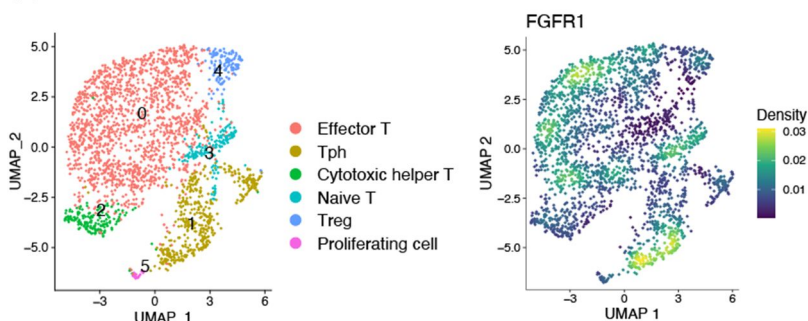
FGFR1とCD4をともに発現する細胞が滑膜組織に散見され、多くはSubliningエリアに存在した(図2)。さらに滑膜組織をフローサイトメトリー法を用いて検証したところ、FGFR1陽性CD4陽性T細胞の割合は末梢血のそれよりも多い傾向が見られた。疾患コントロールである変形性関節症(OA)でもFGFR1陽性CD4陽性T細胞は

見られ、関節滑膜に由来する何らかの刺激がFGFR1陽性CD4陽性T細胞に関連している可能性も示唆された。

(3) 滑膜FGFR1陽性CD4陽性T細胞はTh1-likeな表現型を持つTerminal effector細胞形質を示す

次にRA患者の滑膜組織に浸潤するCD4陽性T細胞をフローサイトメトリー法を用いて分取し、1細胞RNA-Seq解析に供した。既報に矛盾しないT細胞の各状態が観察され、FGFR1は主にPeripheral helper T cell (Tph細胞)やエフェクターT細胞分画に多く発現していた(図3)。

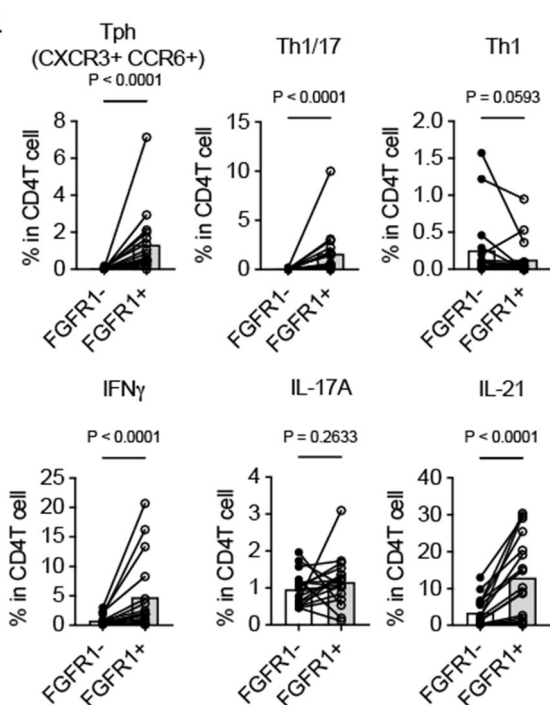
図3



興味深いことにFGFR1の発現はTh1シグネチャーやTerminal effectorシグネチャーと関連しており、FGFR1発現は活性化したTh1-likeな細胞である可能性が示唆された。

(4) 末梢FGFR1陽性CD4陽性T細胞は活性化したTh1/17あるいはTph様細胞形質を示す

図4



最後にRA患者の末梢血中のFGFR1陽性CD4陽性T細胞の形質をフローサイトメトリー法を用いて評価した。滑膜の1細胞RNA-seqのデータと同様に、FGFR1陽性CD4陽性T細胞は活性化マーカーを強く発現していた。滑膜組織とは異なり、Th1よりはTh1/17と関連する表面抗原を呈している他、Th1/17形質をもつTph細胞(CXCR3+ CCR6+ CXCR5- PD-1+)が多く見られた(図4)。

#### (5) 結語

以上から、FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞は炎症を惹起する能力をもつ、特殊な細胞サブセットである可能性が示唆された。今後、FGFR1 陽性 CD4 陽性 T 細胞をターゲットとした治療の開発を検討する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shoda Jumpei, Tanaka Shigeru, Etori Keishi, Hattori Koto, Kasuya Tadamichi, Ikeda Kei, Maezawa Yuko, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Nakamura Junichi, Maezawa Yoshiro, Takemoto Minoru, Betsholtz Christer, Yokote Koutaro, Ohtori Seiji, Nakajima Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Semaphorin 3G exacerbates joint inflammation through the accumulation and proliferation of macrophages in the synovium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-022-02817-7	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 Kageyama Takahiro, Tanaka Shigeru, Etori Keishi, Hattori Koto, Miyachi Kazusa, Kasuya Tadamichi, Iwamoto Taro, Ikeda Kei, Igari Hidetoshi, Yokote Koutaro, Nakajima Hiroshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Immunological features that associate with the strength of antibody responses to BNT162b2 mRNA vaccine against SARS-CoV-2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 2129 ~ 2133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2022.02.045	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 Kageyama Takahiro, Ikeda Kei, Tanaka Shigeru, Taniguchi Toshibumi, Igari Hidetoshi, Onouchi Yoshihiro, Kaneda Atsushi, Matsushita Kazuyuki, Hanaoka Hideki, Nakada Taka-Aki, Ohtori Seiji, Yoshino Ichiro, Matsubara Hisahiro, Nakayama Toshinori, Yokote Koutaro, Nakajima Hiroshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Antibody responses to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine and their predictors among healthcare workers in a tertiary referral hospital in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Microbiology and Infection	6. 最初と最後の頁 1861.e1 ~ 1861.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmi.2021.07.042	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 Cook Laura, Reid Kyle T, H?kkinen Elmeri, Bie Brett, Tanaka Shigeru, Smyth Danielle J, White Madeleine PJ, Wong May Q, Huang Qing, Gillies Jana K, Ziegler Steven F., Maizels Rick M, Levings Megan K	4. 巻 99
2. 論文標題 Induction of stable human FOXP3 Tregs by a parasite derived TGF mimic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunology & Cell Biology	6. 最初と最後の頁 833 ~ 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imcb.12475	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 該当する

1. 著者名 Kato Manami, Ikeda Kei, Sugiyama Takahiro, Tanaka Shigeru, Iida Kazuma, Suga Kensuke, Nishimura Nozomi, Mimura Norihiro, Kasuya Tadamichi, Kumagai Takashi, Furuya Hiroki, Iwamoto Taro, Iwata Arifumi, Furuta Shunsuke, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Kawakami Eiryō, Nakajima Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Associations of ultrasound-based inflammation patterns with peripheral innate lymphoid cell populations, serum cytokines/chemokines, and treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0252116	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 Fukuta Masashi, Suzuki Kotaro, Kojima Shotaro, Yabe Yoko, Suzuki Kazumasa, Iida Kazuma, Yamada Hiroyuki, Makino Shinichi, Iwata Arifumi, Tanaka Shigeru, Iwamoto Taro, Suto Akira, Nakagomi Daiki, Wakashin Hidefumi, Maezawa Yuko, Maezawa Yoshiro, Takemoto Minoru, Asanuma Katsuhiko, Nakajima Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) expressed in podocytes attenuates glomerulonephritis and suppresses autoantibody production in an imiquimod-induced lupus model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lupus Science & Medicine	6. 最初と最後の頁 e000426 ~ e000426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/lupus-2020-000426	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 Miyachi Kazusa, Iwamoto Taro, Kojima Shotaro, Ida Tomoaki, Suzuki Junya, Yamamoto Takuya, Mimura Norihiro, Sugiyama Takahiro, Tanaka Shigeru, Furuta Shunsuke, Ikeda Kei, Suzuki Kotaro, Niewold Timothy B., Nakajima Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Relationship of systemic type I interferon activity with clinical phenotypes, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus in treatment-naive patients: a retrospective longitudinal analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-023-03010-0	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 Kasuya Tadamichi, Tanaka Shigeru, Tamura Jun, Etori Keishi, Shoda Jumpei, Hattori Koto, Endo Yusuke, Kitajima Masayuki, Kageyama Takahiro, Iwamoto Taro, Yokota Masaya, Iwata Arifumi, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Suzuki Harumi, Ziegler Steven F., Nakajima Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Epithelial cell-derived cytokine TSLP activates regulatory T cells by enhancing fatty acid uptake	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28987-1	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 Mashimo Yoichi, Yamazaki Keiko, Kageyama Takahiro, Tanaka Shigeru, Taniguchi Toshibumi, Matsushita Kazuyuki, Igari Hidetoshi, Hanaoka Hideki, Yokote Koutaro, Nakajima Hiroshi, Onouchi Yoshihiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Germline variants ofIGHV3-53 / V3-66 are determinants of antibody responses to the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection	6. 最初と最後の頁 702 ~ 769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinf.2022.10.015	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 Ikeda Kei, Nakada Taka-Aki, Kageyama Takahiro, Tanaka Shigeru, Yoshida Naoki, Ishikawa Tetsuo, Goshima Yuki, Otaki Natsuko, Iwami Shingo, Shimamura Teppei, Taniguchi Toshibumi, Igari Hidetoshi, Hanaoka Hideki, Yokote Koutaro, Tsuyuzaki Koki, Nakajima Hiroshi, Kawakami Eiryo	4. 巻 25
2. 論文標題 Detecting time-evolving phenotypic components of adverse reactions against BNT162b2 SARS-CoV-2 vaccine via non-negative tensor factorization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105237 ~ 105237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105237	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 正田純平 田中繁 餌取慶史 服部古都 粕谷忠道 中村順一 中島裕史
2. 発表標題 セマフォリン3Gは実験的関節炎を悪化させる
3. 学会等名 第8回 日本リウマチ学会 ベーシックリサーチカンファランス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中繁 餌取慶史 田村潤 服部古都 加々美新一郎 中島裕史
2. 発表標題 関節リウマチ患者におけるFGFR1陽性CD4陽性T細胞の解析
3. 学会等名 第9回 日本リウマチ学会 ベーシックリサーチカンファランス
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------