

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591441

研究課題名(和文) CD4陽性T細胞の網羅的遺伝子発現解析による関節リウマチの新規治療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of novel therapeutic targets for rheumatoid arthritis by genome-wide analysis of gene expression in peripheral CD4 positive T cells

研究代表者

池田 啓 (Ikeda, Kei)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10456014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：IL-6を標的とした生物学的製剤トシリズマブ(TCZ)(ヒト化抗IL-6抗体)が著効した関節リウマチ(RA)患者の、TCZ投与前後の末梢血CD4陽性ヘルパーT細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した。治療前後で発現が有意に低下した、ARID5A、Helios、ならびにBcl-3に注目し解析した。その結果、ARID5AはTh17細胞分化の新規抑制分子であることが示され、その機序としてROR γ tへの直接結合による阻害が示唆された。また、HeliosがFoxP3と協調して働き、抑制性T細胞の機能を増強することが示された。さらにBcl-3が濾胞性ヘルパーT細胞分化とRA病態に関わっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the comprehensive gene expression in peripheral CD4 positive T cells from patients with rheumatoid arthritis (RA) who achieved a good response after treatment with tocilizumab. We focused on ARID5A, Helios, and Bcl-3, the expression of which significantly decreased after treatment and further investigated the mechanisms. We demonstrated that ARID5A is a novel molecule which inhibits Th17 differentiation probably through direct binding to ROR γ t. We also demonstrated that Helios potentiates the function of regulatory T cells cooperatively with FoxP3. We also demonstrated that Bcl-3 is involved in follicular helper T cell differentiation and the pathophysiology of RA.

研究分野：リウマチ性疾患、膠原病、臨床免疫

キーワード：関節リウマチ IL-6 ヘルパーT細胞 ARID5A Helios Bcl-3

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は、本邦で約 70 万人の患者が存在する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。TNF- α 、IL-6 等を標的とする生物学的製剤が臨床応用され治療の選択肢は増えたが、無効例および有害事象を来す症例が少なからず存在するため、個々の症例の病態に即した特異性の高い治療戦略が必要であり、新規治療標的の同定とそれを反映するバイオマーカーの確立が急務である。

RA の病態には、これまで Th1 細胞が中心的な役割を果たすと考えられてきたが、近年 IL-17 産生ヘルパー T 細胞 (Th17 細胞) の重要性が示された。IL-21 を産生し自己抗体の産生誘導に關与する濾胞ヘルパー T 細胞 (T_{fh} 細胞) の関与も示唆されている。Th17 細胞と T_{fh} 細胞の分化に重要な役割を果たす IL-6 を標的とした生物学的製剤トシリズマブ (TCZ) (ヒト化抗 IL-6 受容体抗体) が RA に対し高い有効性を示すことも RA の病態に Th17 細胞、或は T_{fh} 細胞が深く關与している事を示唆している。

他方、本研究者らは、TCZ の個別化治療の開発を目的に、RA 患者 20 症例の TCZ 投与前の末梢血単核球 (PBMC) の遺伝子発現プロファイルを用いて網羅的に解析し、17 遺伝子プローブによる TCZ の薬効予測モデルを確立した (図 1、特願 2011-156921)。これにより TCZ 導入の個別化に一定の進捗が見られたが、RA 治療における TCZ の作用機構、特に Th17 細胞と T_{fh} 細胞に対する作用の詳細は依然不明である。TCZ の治療効果を反映するバイオマーカーも同定されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、TCZ 著効 RA 患者の TCZ 投与前、および投与 3 ヶ月後の末梢血 CD4 陽性 T 細胞に発現する遺伝子を網羅的に

解析することにより TCZ 治療により発現が変化する遺伝子を抽出し、抽出した遺伝子のヘルパー T 細胞分化および関節炎モデルにおける役割を解析し、TCZ の作用機構を解明することを目的とした。さらに抽出した遺伝子の RA の新規治療標的、あるいはバイオマーカーとしての有用性も検証する。

3. 研究の方法

本研究では、TCZ 著効 RA 患者の TCZ 投与前と投与 3 ヶ月後の末梢血 CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現プロファイルを用いて網羅的に解析した。その結果により IL-6 シグナル下流でヘルパー T 細胞の分化に關与する可能性のある候補遺伝子を抽出した。さらにヒト末梢血およびマウス脾細胞由来の CD4 陽性 T 細胞を用い、候補遺伝子のヘルパー T 細胞分化における役割を明らかとした。

4. 研究成果

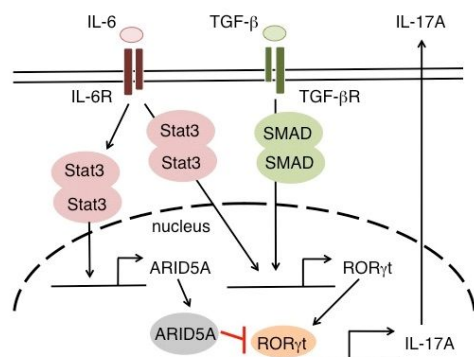
(1) DNA マイクロアレイ解析による候補遺伝子の抽出

TCZ 投与にて著効の得られた症例で、特異的に発現が低下している遺伝子を抽出した。その中で、従来ヘルパー T 細胞分化に關する知見のない ARID5A、制御性 T 細胞 (T_{reg}) における役割の明らかでない Helios、ならびに濾胞性ヘルパー T 細胞 (T_{fh}) における役割の明らかでない Bcl-3 に注目した。

(2) Th17 細胞分化における ARID5A の役割

ヒト末梢血およびマウス脾細胞由来の CD4 陽性 T 細胞における、mRNA 発現解析、レトロウイルスベクターによる ARID5A の強制発現、レポーター解析、およびウエスタンブロット解析により、ARID5A が Th17 細胞分化の新規抑制分子であることが示され、その機序として ROR γ t への直接結合による阻害が示唆された (図 1) (Arthritis Rheumatol 2014;66:1185)。

図1 ARID5AによるTh17細胞分化の抑制機構



(3) 抑制性 T 細胞における Helios の役割

CD4 陽性 T 細胞における Helios の発現が IL-6 により制御されているのか否かを健常者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いて検討した。その結果、Helios 発現 Foxp3 陽性 CD4 陽性 T 細胞は TGF-β 刺激により誘導され、IL-6 刺激により抑制されることが明らかとなった。マウスにおいても Helios 発現 Foxp3 陽性 CD4 陽性 T 細胞は TGF-β 刺激により誘導され、IL-6 刺激により抑制されることが確認された。さらに Stat3 欠損 CD4 陽性 T 細胞を用いた解析により IL-6 による Helios 発現 Foxp3 陽性 CD4 陽性 T 細胞の分化抑制は Stat3 依存的事であることも明らかとなった。

次に Helios 発現の Treg 細胞機能に対する影響をレトロウイルスを用いた Helios 過剰発現実験により検討した。Foxp3 遺伝子座の制御下でヒト CD2 を発現するレポーターマウスの CD4 陽性細胞を用いて、コントロールレトロウイルスを感染させた Treg 細胞(Cont iTregs)と Helios 発現レトロウイルスを感染させた Treg 細胞(Helios iTregs)における Treg 関連遺伝子の発現を検討したところ、Helios iTregs においては CD103、GITR 等の Treg 関連遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。Helios iTregs は単細胞当たりの抑制能も Cont iTregs に比して強かった。以上より、Helios は Treg 細胞に発現し、一部の機能分子の発現を上げることにより、Treg 細胞の抑制能に参与していることが明らかとなった

(Arthritis Rheumatol 2015 [Epub ahead of print])

(4) 濾胞性ヘルパー T 細胞分化に対する Bcl-3 の役割

RA 患者 CD4 陽性 T 細胞内の Bcl3 発現について、a) 健常者との比較、b) 血清 IL-6 濃度との相関、c) TCZ 投与前後での変化量と病勢改善度との相関、d) 濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞) 関連遺伝子発現との相関を解析した。また、マウス CD4 陽性 T 細胞において、a) IL-6 刺激による Bcl3 の発現誘導、b) Bcl3 遺伝子導入により発現誘導される遺伝子の網羅的解析、c) Bcl3 遺伝子を導入した際の Tfh 細胞分化への影響、d) Bcl3 shRNA 発現の in vitro Tfh 様細胞分化への影響を解析した。その結果、1) RA 患者の CD4 陽性 T 細胞における Bcl-3 発現は、a) 健常者に比して高値であり、b) 血清 IL-6 濃度と正の相関を認め、c) TCZ による疾患活動性スコアの低下は Bcl3 の発現低下と正の相関を示し、d) Bcl3 発現は、ICOS、CXCR5、ASCL2 などの Tfh 関連遺伝子と正の相関を認めた。2) マウス CD4 陽性 T 細胞において、a) Bcl3 は IL-6-STAT3 シグナルにより発現誘導され、b) Bcl3 は Tfh 細胞分化に重要な Bcl6 の発現を誘導し、c) Bcl3 遺伝子導入は Tfh 細胞への分化を促進し、d) Bcl3 shRNA 発現は in vitro Tfh 様細胞への分化を抑制した。以上より、Bcl3 は IL-6 により誘導され、Bcl6 の発現上昇を介して Tfh 細胞への分化を促進させることにより RA の病態形成に参与している可能性が示唆された (論文投稿中)。

(5) 研究成果の意義

これらの結果により、RA 病態に対する TCZ 効果の分子機構の一部が明らかとなった。更なる解析により、新規バイオマーカーおよび新規治療標的の同定に寄与することが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Takatori H, Kawashima H, Matsuki A, Meguro K, Tanaka S, Iwamoto T, Sanayama Y, Nishikawa N, Tamachi T, Ikeda K, Suto A, Suzuki K, Kagami SI, Hirose K, Kubo M, Hori S, Nakajima H. Helios enhances regulatory T cell function in cooperation with Foxp3. *Arthritis Rheumatol* 2015 [Epub ahead of print] (DOI 10.1002/art.39091). 査読有

Sanayama Y, Ikeda K, Yamagata M, Furuta S, Ohara O, Nakajima H. The quest to search for biomarkers in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:3524-5 (DOI 10.1002/art.38858). 査読有

Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. AT-rich interactive domain-containing protein 5a functions as a negative regulator of ROR γ t-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1185-94 (DOI 10.1002/art.38324). 査読有

Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis – biomarkers identified by analyses of gene expression in peripheral blood mononuclear cells using genome-wide DNA microarray. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1421-31 (DOI 10.1002/art.38400). 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D,

Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H.

Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis using biomarkers identified by genome-wide DNA microarray analysis in peripheral blood mononuclear cells. **2014 European Colleague Against Rheumatism Congress**, Jun 13th 2014, Paris (France).

齊藤ゆかり、加々美新一郎、眞山快枝、池田啓、岩本逸夫、小原収、中島裕史 . AT-rich interactive domain-containing protein 5a functions as a negative regulator of ROR γ t-induced Th17 cell differentiation. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 . 2013 年 12 月 12 日 , 幕張メッセ(千葉県千葉市) .

Sanayama Y, Ikeda K, Kagami S, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Nawata Y, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. Prediction of clinical response to tocilizumab therapy with comprehensive gene expression analysis of peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. **2012 European Colleague Against Rheumatism Congress**, Jun 8th 2012, Berlin (Germany).

古田俊介, 山形美絵子, 松浦功, 柏熊大輔, 岩本逸夫, 吉田象二, 鈴木快枝, 池田啓, 加々美新一郎, 中島裕史. トシリズマブ DNA アレイ解析によるトシリズマブの関節リウマチに対する薬効予測. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 . 2011 年 7 月 19 日. 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

池田 啓 (IKEDA, Kei)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 10456014

(2) 研究分担者

中島 裕史 (NAKAJIMA, Hiroshi)

千葉大学・医学部附属病院・教授

研究者番号 : 00322024

高取 宏昌 (TAKATORI, Hiroaki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 30568225