

## CD4<sup>+</sup>T 細胞分化のマスター転写因子の自己免疫性関節炎発症に与える影響に関する研究

研究分担者 住田 孝之 (筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー))

研究協力者 近藤 裕也、田原 昌浩(筑波大学医学医療系内科(膠原病・リウマチ・アレルギー))

### 研究要旨

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)の病態形成における CD4<sup>+</sup> T 細胞の分化制御機構を明らかにすることを目的として、Th-1 分化を決定する転写因子 T-bet および T 細胞でのみ過剰発現した T-bet トランスジェニックマウス(T-bet Tg)に対してコラーゲン誘導関節炎(collagen induced arthritis; CIA)を誘導したところ、T-bet Tg では野生型(WT)と比較して関節炎の発症率、重症度の有意な減少が認められ、また病理組織学的に関節局所の炎症像および骨破壊像が減弱していた。抗原であるタイプ II コラーゲン(CII)反応性 T 細胞のサイトカイン産生、転写因子発現については、T-bet Tg において IL-17 産生の有意な抑制が認められ、T-bet の発現亢進と Th-17 分化に重要な転写因子である ROR $\gamma$ t の発現抑制が認められた。以上から T-bet は、ROR $\gamma$ t 発現を抑制することにより IL-17 産生が抑制したと考えられた。次に T helper 17 細胞(Th-17)分化を決定する転写因子 ROR $\gamma$ t を T 細胞でのみ過剰発現した ROR $\gamma$ t トランスジェニックマウス(ROR $\gamma$ t Tg)に対してコラーゲン誘導関節炎(collagen induced arthritis; CIA)を誘導したところ、ROR $\gamma$ t Tg マウスでは野生型(wild type; WT)と比較して関節炎の発症率、重症度の有意な減少が認められ、また病理組織学的に関節局所の炎症像および骨破壊像が減弱していた。ROR $\gamma$ t Tg マウスにおいて Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞(Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞)における ROR $\gamma$ t の発現亢進を認め、同時に関節炎局所への遊走に重要なケモカインレセプター CCR6 の発現亢進を認めた。また Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞の細胞増殖抑制能は、WT と ROR $\gamma$ t Tg マウス間に有意な差は認められなかった。WT に対して ROR $\gamma$ t Tg マウス由来のリンパ節細胞の経静脈的に移入し、CIA を誘導した場合の影響を解析したところ、ROR $\gamma$ t Tg マウス由来のリンパ節細胞の移入による関節炎の減弱が確認され、ROR $\gamma$ t Tg マウス内に関節炎に対する抑制性細胞分画が存在している可能性が示唆された。

以上から、CD4<sup>+</sup> T 細胞の分化を決定する各マスター転写因子の発現は、自己免疫性関節炎の発症とこれに伴う関節破壊に多大な影響を及ぼすこと等が明らかになった。

### A. 研究目的

RA の疾患モデルである CIA を用いて CD4<sup>+</sup> T 細胞の分化を決定するマスター転写因子が関節炎発症に与える影響を解析することによって、関節炎の病態形成における CD4<sup>+</sup> T 細胞の分化制御機構を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### T-bet Tg の検討

- 1) 野生型(WT)および T-bet Tg に対して CIA を誘導し、臨床像を比較検討した。
- 2) 抗原反応性 T 細胞のサイトカイン産生、転写因子発現を評価するために CII 投与後のマウスからリンパ節を採取し、in vitro で抗原である CII とともに培養し、ELISA による培養上清中のサイトカイン量の測定、培養後の細胞を回収して FACS によるサイトカイン、転写因子発

現の評価を行った。

- 3) 各マウスから分離した CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞の criss-cross co-culture によって抗原反応性 T 細胞のサイトカイン産生、転写因子発現を評価した。
- 4) T 細胞分化に対する T-bet 過剰発現の影響を解析するために、WT、T-bet Tg の脾臓 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を MACS を用いて分離し、in vitro で T 細胞分化を誘導して、サイトカイン産生パターン、転写因子発現について FACS により解析した。

#### ROR<sup>+</sup> t Tg の検討

- 1) WT および ROR<sup>+</sup> t Tg に対して CIA を誘導し、臨床像を比較検討した。
- 2) CII 投与後の所属リンパ節細胞を in vitro で抗原である CII とともに培養し、ELISA による培養上清中のサイトカイン量の測定および FACS によるサイトカイン産生、転写因子 ROR<sup>+</sup> t 発現の評価を行った。
- 3) CII 投与後に所属リンパ節細胞を採取して FACS により転写因子 Foxp3 発現およびケモカインレセプター発現との関連を解析した。
- 4) WT Foxp3<sup>GFP</sup> reporter マウスおよび ROR<sup>+</sup> t Tg Foxp3<sup>GFP</sup> reporter マウスから CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>(=Foxp3<sup>+</sup>) 細胞を sorting し、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>GFP<sup>-</sup>細胞を effector T 細胞に対する細胞増殖抑制能を in vitro で評価した。
- 5) CII 投与後の WT もしくは ROR<sup>+</sup> t Tg マウス由来の所属リンパ節細胞を CII 投与後の WT マウスに経静脈的に移入し、関節炎発症に与える影響を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、当施設の遺伝子組み換え実験安全委員会、動物実験委員会に実験計画書を提出して承認を得ており、研究の実施に当たっては筑波大学遺伝子組換え実験安全管理規定および筑波大学動物実験取扱規定に留意しながら行っている。

### **C. 研究結果**

#### T-bet Tg の検討

- 1) T-bet Tg では WT と比較して CIA の発症率、重症度について有意な減少が認められ(図 1)、関節の病理学的評価においても炎症、関節破壊は T-bet Tg で有意に抑制されていた。
- 2) CII 反応性 T 細胞のサイトカイン産生は、T-bet Tg において IL-17 産生の有意な抑制が認められたが、IFN $\gamma$  は WT と T-bet Tg の間で特に差は認められなかった。抗原反応性の転写因子発現については、T-bet Tg において T-bet の発現亢進と Th-17 分化に重要な転写因子である ROR<sup>+</sup> t の発現抑制が認められた。
- 3) criss-cross co-culture では、T-bet Tg 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞は WT、T-bet Tg のいずれの CD11c<sup>+</sup>樹状細胞を使用した場合であっても、WT 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた場合と比較して IL-17 産生および ROR<sup>+</sup> t 発現の有意な抑制が認められた(図 2)。
- 4) 脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた in vitro での Th-17 分化誘導実験においては、T-bet Tg 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞では WT と比較して IL-17<sup>+</sup> 細胞の減少と IFN $\gamma$ <sup>+</sup> 細胞の増加が認められた。また T-bet Tg 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞では Th-17 分化誘導条件においても T-bet<sup>+</sup> 細胞の増加と ROR<sup>+</sup> t<sup>+</sup> 細胞の減少が認められ、ROR<sup>+</sup> t<sup>+</sup> 細胞からの IL-17 産生の低下が認められた。

#### ROR<sup>+</sup> t Tg の検討

- 1) ROR<sup>+</sup> t Tg マウスでは WT と比較して CIA の発症率、重症度について有意な減少が認められた(図 3)。関節局所の病理学的評価では、ROR<sup>+</sup> t Tg マウスにおいて炎症像、関節破壊像は有意に抑制されていた(図 4)。
- 2) in vitro で培養後の上清中 IL-17 濃度は、WT と比較して ROR<sup>+</sup> t Tg マウス由来のリンパ節細胞を培養した場合に有意な増加が認められた。同条件下での CD4<sup>+</sup> 細胞における ROR<sup>+</sup> t の発現は、WT と比較して ROR<sup>+</sup> t Tg マウスにおいて有意に亢進していた。
- 3) 所属リンパ節中 CD4<sup>+</sup> T 細胞における Foxp3 発現は、WT、ROR<sup>+</sup> t Tg マウス間で有意な差は認めなかったが、ROR<sup>+</sup> t Tg 由来の Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 細胞においては

WTと比較して ROR $\gamma$ t および CCR6 の発現が有意に亢進していた。

- 4) WT Foxp3<sup>GFP</sup> reporter マウス、ROR $\gamma$ t Tg Foxp3<sup>GFP</sup> reporter マウスから分離した CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>(=Foxp3<sup>+</sup>)細胞の effector T 細胞に対する細胞増殖抑制能は、WT、ROR $\gamma$ t Tg マウス間で有意な差は認められなかった。
- 5) ROR $\gamma$ t Tg マウス由来の所属リンパ節細胞を WT マウスに移入した後に CIA を誘導した場合に、WT 由来の所属リンパ節細胞を移入した場合と比較して、関節炎の重症度が有意に低下した。

#### D. 考察

T-bet Tg に対して CIA を誘導した場合に WT と比較して関節炎の有意な抑制が認められた。in vitro での抗原反応性のサイトカイン産生、転写因子発現の評価および Th-17 細胞の分化誘導実験では、T-bet Tg において IL-17 産生の低下および ROR $\gamma$ t 発現の抑制が認められ、抗原特異的な Th-17 分化が抑制されていることが示された。T-bet による関節炎原生の Th-17 分化の抑制が関節炎の発症抑制に結び付いていると考えられた。

ROR $\gamma$ t Tg マウス由来の所属リンパ節細胞の in vitro における解析から Th-17 が増加していることが示唆されたが、関節炎の発症は抑制され、また ROR $\gamma$ t Tg マウスのリンパ節細胞の移入によって WT の関節炎が抑制されたことから、ROR $\gamma$ t Tg には関節炎に対する抑制性の細胞成分が存在すると考えられた。ROR $\gamma$ t Tg マウスでは、Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞において ROR $\gamma$ t の有意な亢進が認められたが、細胞増殖能は保たれていることが明らかになった。また ROR $\gamma$ t Tg マウスの Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞において CCR6 の発現亢進が認められたことから、これらが炎症局所における関節炎発症制御に関与している可能性が考えられた。

#### E. 結論

CD4<sup>+</sup>T 細胞の分化を決定する各マスター転写因子の発現は、自己免疫性関節炎の発症とこれに伴う関節破壊に

多大な影響を及ぼすこと等が明らかになった。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Umeda N, Matsumoto I, Ito I, Kawasaki A, Tanaka Y, Inoue A, Tanaka Y, Tsuboi H, Suzuki T, Hayashi T, Ito S, Tsuchiya N, Sumida T.: Anti-citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with HLA-DRB1 shared epitope alleles and disease activity. Clin Exp Immunol 172(1):44-53,2013
2. Horikoshi M, Goto D, Segawa S, Yoshiga Y, Iwanami K, Inoue A, Tanaka Y, Matsumoto I, Sumida T.: Activation of Invariant NKT cells with glycolipid ligand -galactosylceramide ameliorates glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis. PLoS One 7(12):e51215,2012
3. Inoue A, Matsumoto I, Tanaka Y, Umeda N, Tanaka Y, Mihara M, Takahashi S, Sumida T.: Murine tumor necrosis factor -induced adipose-related protein (tumor necrosis factor -induced protein 9) deficiency leads to arthritis via interleukin-6 overproduction with enhanced NF- $\kappa$ B, STAT-3 signaling, and dysregulated apoptosis of macrophages. Arthritis Rheum 64(12):3877-85,2012
4. Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T.: Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. Arthritis Rheum 64(1):162-72,2012
5. Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Horikoshi M, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Taniguchi S, Sumida T.: Activation

of natural killer T cells by  $\alpha$ -carba-GalCer (RCAI-56), a novel synthetic glycolipid ligand, suppresses murine collagen-induced arthritis. Clin Exp Immunol 164(2):236-47,2011

**2. 学会発表**

1. Kondo Y, Sumida T, et al. Overexpression of T-Bet Gene Regulates Collagen Induced Arthritis Via IFN Independent Suppression of IL-6 Signal Transduction. 2011 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the American College of Rheumatology, 2011
2. Kondo Y, Sumida T et al. CCR6<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells regulate the development of collagen induced arthritis in T cell specific ROR  $\gamma$  t transgenic mice. 2012 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the American College of Rheumatology, 2012
3. Kondo Y, Sumida T, et al. Overexpression of ROR  $\gamma$  t in T cells suppresses collagen induced arthritis The 5<sup>th</sup> East Asian Group of Rheumatology, 2013

**H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)**

**1. 特許取得**

なし

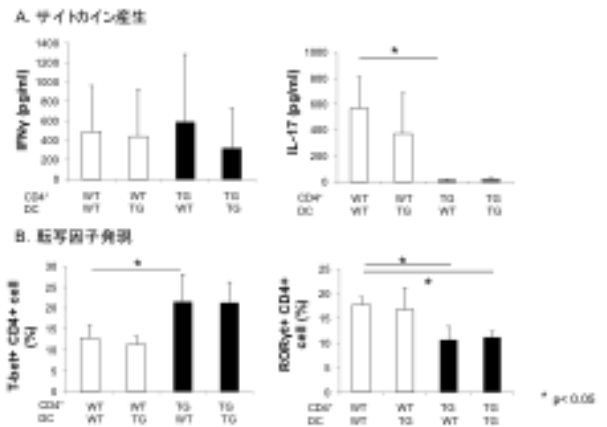
**2. 実用新案登録**

なし

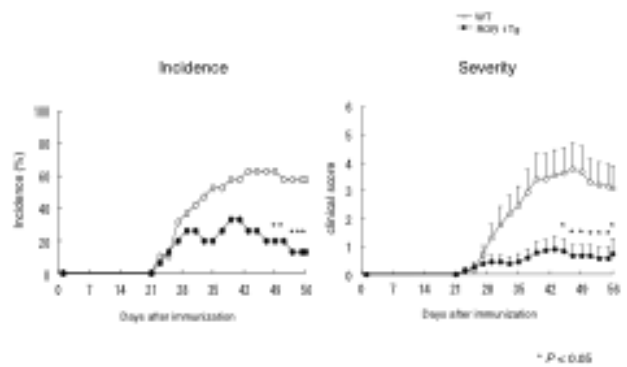
**3. その他**

特記事項なし

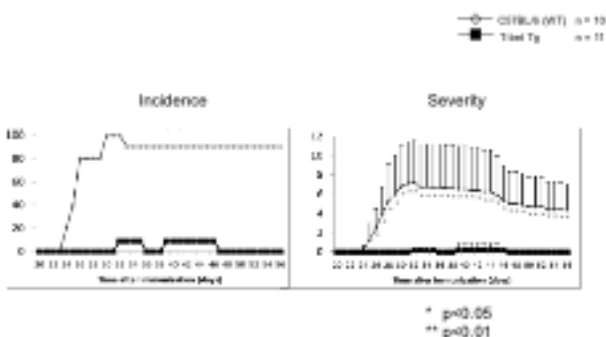
**図2. criss-cross co-culture**



**図3 ROR  $\gamma$  tにおけるCIA**



**図1  $\beta$ -bet TgにおけるCIA**



**図4 関節の組織学的評価**

