

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
研究分担報告書

ROR γ 過剰発現による自己免疫性関節炎の制御機構に関する研究

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⁺ 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、T helper 17 細胞(Th-17)分化を決定する転写因子 ROR γ を T 細胞でのみ過剰発現した ROR γ トランスジェニックマウス(ROR γ 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 γ 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。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、ROR γ Tg マウスにおいてIL-17産生の有意な亢進およびROR γ の発現の亢進が認められた。ROR γ Tg マウスにおけるROR γ 発現亢進は、Foxp3⁺CD4⁺T細胞(Foxp3⁺制御性T細胞)においても認められ、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⁺制御性T細胞の細胞増殖抑制能は、WTとROR γ 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 γ 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 γ 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 γ 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ROR γ 発現によりTh-17分化が優位となった場合であっても関節炎発症が減弱すること、さらにROR γ Tg マウス内に関節炎発症に対して抑制的に働く細胞成分が存在し、ROR γ ⁺Foxp3⁺制御性T細胞が関与する可能性があること等が明らかになった。

A. 研究目的

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)の疾患モデルであるコラーゲン誘導関節炎(CIA)を用いて自己免疫疾患への関与が注目されているTh-17の分化に必須な転写因子ROR γ 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⁺ 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

1) ROR γ を T 細胞においてのみ過剰発現させた ROR

γ トランスジェニックマウス(ROR γ Tg)に対してCIAを誘導し、野生型C57BL/6(WT)と臨床像を比較検討した

- 2) CII投与42日後に後肢を摘出し、関節局所の炎症所見、骨破壊所見について病理組織学的に評価した。
- 3) 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 γ 発現の評価を行った。
- 4) 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。

- 5) WT Foxp3^{GFP} reporter マウスおよび ROR^γt Tg Foxp3^{GFP} reporter マウスから CD4⁺GFP⁺(=Foxp3⁺)細胞を sorting し、CD4⁺CD25⁻GFP⁻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。
- 6) CII 投与後の WT もしくは ROR^γt 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

- 1) ROR^γt 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 1)。
- 2) 関節局所の病理学的評価では、ROR^γt 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 2)。
- 3) in vitro で培養後の上清中 IL-17 濃度は、WT と比較して ROR^γt 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⁺細胞における ROR^γt の発現は、WT と比較して ROR^γt Tg マウスにおいて有意に亢進していた。
- 4) 所属リンパ節中 CD4⁺T 細胞における Foxp3 発現は、WT、ROR^γt Tg マウス間で有意な差は認めなかったが、ROR^γt Tg 由来の Foxp3⁺ CD4⁺ 細胞においては WT と比較して ROR^γt および CCR6 の発現が有意に亢進していた。
- 5) WT Foxp3^{GFP} reporter マウス、ROR^γt Tg Foxp3^{GFP} reporter マウスから分離した CD4⁺GFP⁺(=Foxp3⁺)細胞の effector T 細胞に対する細胞増殖抑制能は、WT、

ROR^γt Tg マウス間で有意な差は認められなかった。

- 6) ROR^γt 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

ROR^γt 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^γt 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^γt 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^γt Tg マウスでは、Foxp3⁺制御性 T 細胞において ROR^γt 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^γt Tg マウスの Foxp3⁺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

T 細胞における ROR^γt の過剰発現は自己免疫性関節炎の発症を抑制することが明らかとなり、細胞移入実験などの結果から関節炎発症を抑制する細胞の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gazal S, Sacre K, Allanore Y, Teruel M, Goodall AH, Tohma S, Alfredsson L, Okada Y, Xie G, Constantin A, Balsa A, Kawasaki A, Nicaise P, Amos C, Rodriguez-Rodriguez L, Chiocchia G, Boileau C, Zhang J, Vittecoq O, Barnetche T, Gonzalez-Gay MA,

- Furukawa H, Cantagrel A, Le Loet X, Sumida T, Hurtado-Nedelec M, Richez C, Chollet-Martin S, Schaeverbeke T, Combe B, Khoryati L, Coustet B, El-Benna J, Siminovitch K, Plenge R, Padyukov L, Martin J, Tsuchiya N, Dieud P.: Validation of EULAR primary Sjogren's Syndrome disease activity and patient indexes. Ann Rheum Dis (in press)
2. Yoon J, Sudo K, Han J, Chae M, Park S, Weinstein M, Nakae S, Yamashita T, Lee , Sumida T, Kuroda M, Mamura M.: Smad2 is the TGF- receptor-regulated Smad to suppress the immunogenicity of mouse and human dendritic cells. Eur J Immunol (in press)
3. Yoon JH, Jung SM, Park SH, Kato M, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK, Mamura M.: Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. EMBO Mol Med 5(11):1720-39,2013
4. 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
5. Suzuki T, Horikoshi M, Sugihara M, Hirota T, Ogishima H, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Hayashi T, Chino Y, Matsumoto I, Sumida T.: Therapeutic efficacy of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor inhibitors: One year follow-up by low-field extremity MRI. Mod Rheumatol 23(4):782-7,2013

2. 学会発表

1. 近藤裕也、住田孝之他：転写因子 ROR t 高発現による自己免疫性関節炎制御機構の解析 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2013 年
2. Kondo Y, Sumida T, et al. Overexpression of ROR t in T cells suppresses collagen induced arthritis The 5th 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1 コラーゲン誘導関節炎 (CIA)

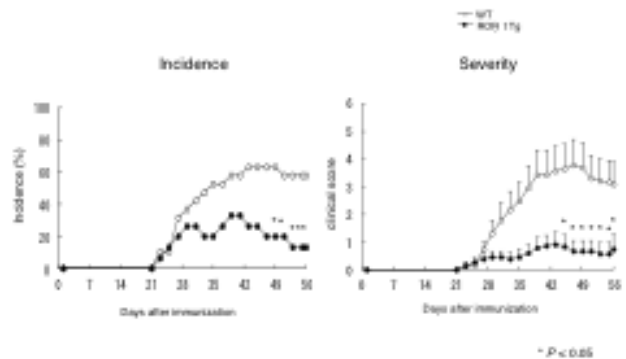


図2 関節の組織学的評価

