

## 免疫疾患における樹状細胞-濾胞性ヘルパーT細胞-B細胞軸の異常の解明と治療法の開発に関する研究

研究分担者 田中良哉 産業医科大学医学部第1内科学講座 教授  
研究協力者 中山田真吾 産業医科大学医学部第1内科学講座 学内講師  
研究協力者 久保智史 産業医科大学医学部第1内科学講座 助教

**研究要旨** 全身性エリテマトーデス(SLE)の発症過程では、濾胞性ヘルパーT (Tfh)細胞および B 細胞の活性化による過剰な自己抗体産生を介した多臓器障害が生ずる。しかし、病態を形成するこれらのリンパ球サブセットの分化と機能の詳細は不明である。本年度は、SLE における活性化 Tfh 細胞、B 細胞サブセットの質的異常を明らかにすることを目的とした。その結果、SLE 患者も末梢血では活性化 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup> Tfh 細胞と CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> effector memory B 細胞の割合が増加し、免疫担当細胞の分化異常の存在が示された。また、CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>の新たな DC サブセットが増加し、CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>の Tfh/Th1 細胞可塑性を有する細胞、effector memory B 細胞の相互作用による病因的関与が考えられた。今後、DC/Tfh 細胞/B 細胞の分化異常を齎す細胞内外のシグナル伝達異常の同定とそのシグナル制御による新規治療法の開発が期待される。

### A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE)や関節リウマチ (RA)などの自己免疫疾患では、B 細胞による過剰な自己抗体産生とそれを誘導する濾胞性ヘルパーT (Tfh)細胞の活性化が重要な役割を担う。しかし、病態形成における Tfh 細胞の分化と機能の異常は不明である。本研究では、自己免疫疾患の病態形成において、樹状細胞 (DC) - Tfh 細胞 - B細胞軸を中心に、DC のシグナルがヘルパーT 細胞サブセットのバランス異常を介して、Tfh への偏向を誘導する過程を解明すると共に、シグナル伝達の JAK-STAT 系に焦点をあて、Tfh の機能異常と B 細胞の過剰活性化の制御を介する新規治療法の開発を目指す。

### B. 研究方法

本年度は、健常人、RA 患者、SLE 患者より末梢血を採取し、8 カラーフローサイトメトリー (FACSVerse) を用いて、DC、T 細胞、B 細胞のサブセットの細分類を試み、各サブセット間および患者背景との相関を検討した。さらに、ヒト末梢血ナイーブ T 細胞を TCR 架橋と各種サイトカイン (IL-6, IL-12, IL-21, IFN- $\gamma$  /  $\alpha$  など)で分化誘導させ、ケモカイン受容体、転写因子 Bcl-6、T-bet などの発現を検討した。

### (倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入力された書類が所属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

### C. 研究結果

(1) 健常人、RA 患者に比して SLE 患者では活性化 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup> Tfh 細胞と CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> effector memory B 細胞の割合が増加し、両者には有意な正の相関を認めた。(2) 活性化 Tfh 細胞と effector memory B 細胞の割合は、SLE の疾患活動性と相関せず、抗 Sm 抗体価と有意に相関した。(3) DC サブセットでは、plasmacytoid DC の割合に変化を認めず、myeloid DC が減少し、CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>の新たな DC サブセットが増加し、plasmablast の割合と自己抗体価に相関した。(4) SLE 患者では、Tfh 細胞と Th1 細胞の形質を重複する Tfh/Th1 (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>)細胞が増加した。(5)

末梢血由来のナイーブT細胞をIFN- またはIL-12で刺激すると、Bcl-6<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup>の Tfh/Th1 様の細胞が誘導され、IFN- とIL-12の共刺激がSTAT1/STAT4のリン酸化を亢進させ、IL-21の産生によるTfh細胞の機能を誘導した。

#### D. 考察

SLE患者の末梢血では、新規のCD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>DCサブセットが検出され、活性化したIL-21産生性Tfh細胞の増加、effector memory B細胞の増加を介して自己抗体産生による病態形成へ寄与する可能性が示唆された。さらに、SLE患者では可塑性を有するTfh/Th1細胞が存在しており、IFN- $\gamma$ -STAT1経路とIL-12-STAT4経路を介して分化誘導される事が示唆された。

#### E. 結論

SLE患者では末梢血免疫担当細胞の分化異常が存在し、新規DCサブセット、可塑性を有するTfh/Th1細胞、effector memory B細胞の相互作用による病因的関与が考えられた。今後、DC/Tfh細胞/B細胞の分化異常を齎す細胞内外のシグナル伝達異常の同定とそのシグナル制御による新規治療法の開発が期待される。

#### F. 健康危機情報 総括にて報告

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tanaka Y, Hirata S. Is it possible to withdraw biologics from therapy in rheumatoid arthritis? *Clinical Therapeutics* (in press)
2. Tanaka Y, Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K. Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study. *Ann Rheum Dis* (in press)
3. Kubo S, Yamaoka K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, Tanaka Y. The JAK inhibitor tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Ann Rheum Dis* (in press)
4. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Takei S, Tanaka Y, Sano Y, Yaguramaki H, Yamanaka H. Characteristics related with good effectiveness and safety with tocilizumab: Postmarketing surveillance of 7901 rheumatoid arthritis patients in Japan. *J Rheumatol* (in press)
5. Hirata S, Saito K, Kubo S, Fukuyo S, Mizuno Y, Iwata S, Nawata M, Sawamukai N, Nakano K, Yamaoka K, Tanaka Y. Discontinuation of adalimumab after attaining DAS28 (ESR) remission in patients with rheumatoid arthritis (HONOR study): and observational study. *Arthritis Res Ther* (in press)
6. Kondo M, Yamaoka K, Sonomoto K, Fukuyo S, Oshita K, Okada Y, Tanaka Y. IL-17 inhibits chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Plos ONE* (in press)
7. Yamanaka H, Ishiguro N, Takeuchi T, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida S, Akama H, Kupper H, Arora V, Tanaka Y. Recovery of clinical but not radiographic autocomes by the delayed addition of adalimumab to methotrexate-treated Japanese patients with early rheumatoid arthritis: 52 week results of the HOPEFIL-1 trial. *Rheumatology* (in press)
8. Fukuyo S, Yamaoka K, Sonomoto K, Oshita K, Okada Y, Saito K, Yoshida Y, Kanazawa T, Minami Y, Tanaka Y. IL-6-accelerated calcification by induction of ROR2 in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells is STAT3-dependent. *Rheumatology* (in press)
9. Yukawa S, Yamaoka K, Sawamukai N, Shimajiri S, Kubo S, Miyagawa I, Sonomoto K, Saito K, Tanaka Y. Dermal mast cell density in fingers reflects severity of skin sclerosis in systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* (in press)
10. Sonomoto K, Yamaoka K, Kubo S, Hirata S, Fukuyo S, Maeshima K, Suzuki K, Saito K, Tanaka Y. Effects of tofacitinib on lymphocytes in rheumatoid arthritis: Relation to efficacy and infectious adverse events. *Rheumatology* (in press)
11. Tanaka Y. Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal? *Ann Rheum Dis* (2013) 72, ii124-ii127
12. Smolen JS, Schoels MM, Nishimoto N,

- Breedveld FC, Burmester G, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Betteridge N, Bingham III C, Bykerk V, Choy E, Combe B, Cutolo M, Graninger W, Lanasa A, Martin-Mola E, Montecucco C, Ostergaard M, Pavelka K, Rubbert-Roth A, Sattar N, Scholte-Voshaar M, Tanaka Y, Trauner M, Valentini G, Winthrop K, de Wit M, van der Heijde D. Consensus statement on blocking the effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis* (2013) 72, 482-492
13. Tanaka Y, Yamaoka K A Jak inhibitor tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis from basic to clinic. *Mod Rheumatol* (2013) 23, 415-424
  14. O'Shea JJ, Kontzias A, Yamaoka K, Tanaka Y, Laurence A. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* (2013) 72, ii111-
  15. Tanaka Y, Hirata S, Saleem B, Emery P. Discontinuation of biologics in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* (2013) 31 (Suppl. 78): S22-S27
  16. Kameda H, Kanbe K, Sato e, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, Takeuchi T. A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. *Ann Rheum Dis* (2013) 72, 310-312
  17. Aoki T, Yamashita Y, Saito K, Tanaka Y, Korogi Y. Diagnosis of early-stage rheumatoid arthritis: usefulness of unenhanced and gadolinium-enhanced MR images at 3T. *Clin Imaging* (2013) 37, 348-353
  18. van der Heijde D, Tanaka Y, Fleischmann R, Keystone E, Kremer J, Zerbini C, Cardiel MH, Cohen S, Nash P, Song YW, Tegzová D, Wyman BT, Gruben D, Benda B, Wallenstein G, Krishnaswami S, Zwillich SH, Bradley JD, Connell CA and the ORAL Scan investigators. Tofacitinib (CP-690,550) in patients with rheumatoid arthritis on methotrexate: 12 month data from a 24 month Phase 3 randomized radiographic study. *Arthritis Rheum* (2013) 65: 559-570
  19. Toyota T, Akamatsu N, Tanaka A, Shouzaki T, Tsuji S, Saito K, Tanaka Y. Mesial temporal lobe epilepsy as a neuropsychiatric syndrome of systemic lupus erythematosus. *Epilepsia* (2013) 54, e33-e36
  20. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* (2013) 22, 538-540
  21. Aoki T, Yamashita Y, Oki H, Takahashi H, Hayashida Y, Saito K, Tanaka Y, Korogi Y. Iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation (IDEAL) of the wrist and finger at 3T: Comparison with chemical shift selective fat suppression images. *J Magn Reson Imaging* (2013) 37, 733-738
  22. Li X, Yamagata K, Nishita M, Endo M, Arfian N, Rikitake Y, Emoto N, Hirata K, Tanaka Y, Minami Y. Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Genes Cells* (2013) 18, 608-619
  23. Takeuchi T, Harigai M, Tanaka Y, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D, and the GO-MONO study group. Golimumab monotherapy in Japanese patients with active rheumatoid arthritis despite prior treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs: results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-MONO study through 24 weeks. *Ann Rheum Dis* (2013) 72, 1488-1495
  24. Mori T, Kabashima K, Fukamachi S, Kuroda E, Sakabe JI, Kobayashi M, Nakajima S, Nakano K, Tanaka Y, Matsushita S, Nakamura M, Tokura Y. D1-like dopamine receptors antagonist inhibits cutaneous immune reactions mediated by Th2 and mast cells. *J Dermatol Sci* (2013) 18, 608-619
  25. Hanami K, Nakano K, Saito K, Okada Y, Yamaoka K, Kubo S, Kondo M, Tanaka Y. Dopamine D2-like receptor signaling suppresses human osteoclastogenesis. *Bone* (2013) 56, 1-8

26. Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Hori H, Umene-Nakano W, Katsuki A, Saito K, Tanaka Y, Nakamura J. Plasma catecholamine metabolite levels and the activities of psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus. Hum Psychopharm Clin (2013) 28, 198-202
27. Hirata S, Driven L, Shen Y, Centola M, Cavet G, Lems WF, Tanaka Y, Huizinga TWJ, Allaart CF. A multi-biomarker score measures rheumatoid arthritis disease activity in the BeSt study. Rheumatology (2013) 52, 1202-1207
28. Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Miyasaka N, Mukai M, Matsubara T, Uchida s, Akama H, Kupper H, Aprora V, Tanaka Y. Adalimumab a human anti-TNF monoclonal antibody, outcome study for the prevention of joint damage in Japanese patients with early rheumatoid arthritis: the HOPEFUL 1 study. Ann Rheum Dis (2013) 72, 1488-1495

Autoimmunity. Granada, Spain. 平成 24 年 5 月 9 日 - 12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

2. 学会発表

1. Y. Tanaka. Treatment of SLE with biologics. The 15th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, APLAR 2012, Dead Sea, Jordan. 平成 24 年 9 月 10 日 - 14 日
2. Y Tanaka, S Hirata, S Fukuyo, M Nawata, S Kubo, K Yamaoka and K Saito. Discontinuation of Adalimumab without Functional and Radiographic Damage Progression After Achieving Sustained Remission in Patients with Rheumatoid Arthritis (the HONOR study): 1-Year Results. 第 78 回米国リウマチ学会 ACR 2012 (concurrent Workshop), Washington DC, USA, 平成 24 年 11 月 9 日から 11 月 14 日
3. Y. Tanaka. Next stage of RA treatment: Biologics-free remission will be a possible treatment goal?. Advances in Targeted Therapies 2012, Baveno, Italy. 平成 24 年 3 月 28 日 - 4 月 1 日
4. Y. Tanaka. Next stage of RA treatment: Biologics-free remission will be a possible treatment goal? T3 Medical Symposium, Seoul, "Achievement of ultimate treatment goal in RA". Seoul. 平成 24 年 5 月 3 日 - 4 日
5. Y. Tanaka. The Maximization of Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. The 8th International Congress on