

## 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一内科学講座 教授  
研究協力者 中山田真吾 産業医科大学医学部第一内科学講座 講師  
研究協力者 久保智史 産業医科大学医学部第一内科学講座 助教

研究要旨 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、これらの自己免疫疾患の病態形成におけるTfh細胞の分化と機能の異常は不詳である。本研究では、健康人、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を用いて、T細胞、B細胞、樹状細胞の表現型、及び患者背景との関連性を検討した。疾患活動性の高いRA、特に無治療およびACPA陽性症例では、Th1/Th17/Tfhに関連する全てのマーカーを中等度発現する細胞集団(CXCR3<sup>int</sup>CCR6<sup>int</sup>CXCR5<sup>int</sup>)の割合が増加し、その細胞集団ではCD69などの活性化マーカーが特徴的に高発現していた。一方、SLE患者末梢血において、可塑性を有するTfh/Th1細胞とCXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> memory B細胞が相関して検出され、両者はIFN- $\gamma$ /T-betシグナルを介して、その分化と機能を共有する事が示唆された。また、CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>の新たな樹状細胞様の亜集団が存在し、B細胞分化と疾患活動性に関与していた。以上、疾患活動性の高いRA患者末梢血CD4<sup>+</sup>T細胞では、可塑性を有するTfh様メモリー細胞のエフェクター亜集団が存在し、その亜集団の活性化と増加による病態形成への関与が考えられた。また、SLEでは、新規樹状細胞サブセット、可塑性を有するTfh/Th1細胞、ケモカイン受容体発現異常を伴うeffector memory B細胞の相互作用による病因的関与が考えられた。

### 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。本研究では、自己免疫疾患の病態形成において、樹状細胞-Tfh細胞-B細胞軸を中心に、樹状細胞のシグナルがT細胞サブセットのバランス異常を介して、Tfh細胞への分化の偏向を誘導する過程を解明する。その際、患者末梢血リンパ球の細胞表現型をNIH/FOCISがHuman Immunology Projectとして提唱した抗体セット、及び、ケモカイン受容体抗体を含む独自の抗体セットを用いて8カラーフローサイトメトリーで解析する。さらに、疾患活動性や治療抵抗性に関わる細胞群が明らかにし、多様な免疫病態に応じたオーダーメイド治

療の開発を目指す。

### B. 研究方法

健康人、関節リウマチ(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、T細胞、B細胞、DCの表現型、及び患者背景との関連性を検討し、疾患活動性や治療抵抗性に関わる細胞群を検討した。その際、患者末梢血リンパ球の細胞表現型をNIH/FOCISがHuman Immunology Projectとして提唱した抗体セット、及び、ケモカイン受容体抗体を含む独自の抗体セットを用いて解析した。さらに、ヒト末梢血T細胞およびB細胞におけるケモカイン受容体、転写因子Bcl-6、T-betなどの誘導機構を解析した。

(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) 健常人末梢血では、Th1 細胞(CXCR3<sup>hi</sup> CXCR5<sup>neg</sup>)、Th17 細胞(CCR6<sup>hi</sup> CXCR5<sup>neg</sup>)、Tfh 細胞(CXCR3<sup>neg</sup> CCR6<sup>neg</sup> CXCR5<sup>hi</sup>)で構成される CD4<sup>+</sup> T 細胞サブセットが検出された。

(2) 疾患活動性の高い RA、特に無治療および ACPA 陽性症例では、各サブセットの比率に変化を認めないが、全てのマーカーを中等度発現する細胞集団(CXCR3<sup>int</sup> CCR6<sup>int</sup> CXCR5<sup>int</sup>)の割合が増加し、その細胞集団では、CD69 などの活性化マーカーが特徴的に高発現していた。MTX 等への治療抵抗症例では、Th1 細胞(CXCR3<sup>hi</sup> CXCR5<sup>neg</sup>)、Th17 細胞(CCR6<sup>hi</sup> CXCR5<sup>neg</sup>)の相対的な増加を認めた。

(3) 健常人、RA 患者に比して SLE 患者では、CD4<sup>+</sup>T 細胞における CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> Tfh 細胞の割合、及び、CD19<sup>+</sup> B 細胞中の CXCR5 発現を欠く CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> memory B 細胞の割合が増加し、両者に正の相関を認めた。

(4) 活性化 Tfh 細胞と CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup> memory B 細胞の割合は、SLE の疾患活動性と相関せず、抗 Sm 抗体価と相関した。免疫抑制療法により疾患活動性が改善された後も、CXCR5<sup>-</sup> memory B 細胞は残存した。

(5) 末梢血由来のナイーブ T 細胞を IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  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

(6) SLE 患者では可塑性をもつ Tfh/Th1 (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>)様細胞が増加し、この亜集団は IFN- $\gamma$  の産生を介して T-bet を発現する CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> memory B 細胞を誘導した。

(7) 樹状細胞サブセットでは、CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>の新たな樹状細胞様の亜集団が疾患活動性と相関して増加し、クラスター解析では memory B 細胞や plasmablast と正の相関を示した。

### D. 考察

健常人では CD4<sup>+</sup> T 細胞分画のバランスが維持されるのに対して、活動期の RA では可塑性を有する Tfh 様の活性化したエフェクター亜集団が出現し、病態形成に寄与する可能性が示唆された。今後、このようなヘルパー T 細胞サブセットのバランス破綻と機能異常を齎す細胞内外のシグナル伝達異常が特定されることで、そのシグナル制御による T 細胞サブセットのバランス異常の修復を介した新規治療法の開発が期待される。

一方、SLE 患者の末梢血では、CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>の新たな DC 様の亜集団が存在し、B 細胞分化と疾患活動性に関与していた。さらに、SLE 患者では可塑性を有する Tfh/Th1 細胞と CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> memory B 細胞が相関して検出され、両者は IFN- $\gamma$  /T-bet シグナルを介して、その分化と機能を共有する事が示唆された。さらに、これらの可塑性をもつメモリーサブセットは、既存治療では根治困難な SLE の病因に関与する可能性が示唆された。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。

### E. 結論

RA 患者末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞では、可塑性を有する Tfh 様メモリー細胞の活性化と増加による病態形成への関与、及び、とエフェクター細胞バランスの異常による治療抵抗性への関与が考えられた。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、ケモカイン受容体発現異常を伴う effector memory B 細胞の相互作用による病因的関与が考えられた。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Iwata S, Nakayamada S, Fukuyo S, Kubo S, Yunoue N, Wang S-P, Yoshikawa M, Saito K, Tanaka Y. Activation of Syk in peripheral blood B cells in patients with rheumatoid arthritis: A potential target for abatacept therapy. *Arthritis Rheum* [Epub ahead of print]
2. Kondo M, Yamaoka K, Sakata K, Sonomoto K, Lin L, Nakano K, Tanaka Y. IL-6/STAT3 signaling pathway contributes to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* [Epub ahead of print]
3. 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* [Epub ahead of print]
4. Ishizaki J, Saito K, Nawata M, Mizuno Y, Tokunaga M, Sawamukai N, Tamura M, Hirata S, Yamaoka K, Hasegawa H, Tanaka Y. Low complements and high titer of anti-Sm antibody as predictors of histopathologically proven silent lupus nephritis without abnormal urinalysis in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (in press)
5. Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Wang S-P, Kondo M, Yoshikawa M, Akashi K, Tanaka Y. Increased Syk phosphorylation leads to overexpression of TRAF6 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* (in press)
6. Tanaka Y, Martin Mola E. Can IL-6-targeting catch up TNF-targeting in rheumatoid arthritis: from studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 1395-1397
7. 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* (2014) 73, 2192-2198
8. Wang S-P, Iwata S, Nakayamada S, Sakata K, Yamaoka K, Tanaka Y. Tofacitinib, a Jak inhibitor, inhibits human B cell activation in vitro. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 2213-2215
9. 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* (2014) 53:1282-90
10. Tanaka Y. Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal? *Ann Rheum Dis* (2013) 72, ii124-ii127
11. 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

12. van der Heijde D, Tanaka Y, Fleischmann R, et al. 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
13. 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
14. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. B-cell or T-cell-dominant recurrence after rituximab therapy in patients with SLE. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 1749-55
15. Tanaka Y, Maeshima Y, Yamaoaka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, i70-i74
16. Maeshima K, Yamaoaka K, Kubo S, Nakano K, Iwata S, Saito K, Ohishi M, Miyahara H, Tanaka S, Ishi K, Yoshimatsu H, Tanaka Y. A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN- $\gamma$  and IL-17 production by human CD4+ T cells. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 1790-98
17. Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. IL-1 induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt5a/Ror2 pathway. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 3353-63
18. Tanaka Y. Intensive treatment and treatment holiday of TNF-inhibitors in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* (2012) 24, 319-326
19. Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Mitasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D and the GO-FORTH study group. Golimumab, a human anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody, injected subcutaneously every 4 weeks in Japanese patients with active rheumatoid arthritis in combination with methotrexate. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 817-824
20. Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129, 1594-1601

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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