

## 論文の内容の要旨

論文題目 関節リウマチにおけるエフェクターメモリーCD4陽性T細胞の機能解析

氏名 吉田 良知

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) は関節滑膜組織を病変の主座とする全身性自己免疫疾患であり、関節に生じる持続的な炎症は関節腫脹や疼痛、軟骨・骨破壊をもたらし、時に関節変形から Quality of Life の著しい低下を招く。RA の罹患頻度は全人口の約 0.6-1%と自己免疫疾患の中で最も高く、国内の推定患者数も約 80 万人に達する。従来型の抗リウマチ薬に加えて近年は生物学的製剤が積極的に使用されるようになり、寛解達成率も約 60%程度に達するなど疾患活動性の制御が格段に向上したものの、残りの症例では生物学的製剤導入後も中等度以上の疾患活動性が持続し、少なくとも全体の約 1 割弱は複数の生物学的製剤使用にも関わらず寛解に至らず治療抵抗性を示す。また仮に DAS28 (Disease Activity Score 28) を用いた臨床的寛解基準を達成した症例であっても、その 40%以上で MRI 上、潜行性に骨破壊が進行するとの報告もあり、病態機序の解明は喫緊の課題となっている。

RA 患者の関節局所においては多彩な免疫細胞の浸潤、集簇が認められるが、滑膜浸潤 T 細胞に関しては、主に CD4 陽性のヘルパー T (Th) 細胞が主体である。近年のゲノムワイド関連解析により RA と最も強く関連する疾患感受性遺伝子として HLA-DR が同定され、またその他の RA の疾患感受性遺伝子にも Th 細胞の活性化に関わる遺伝子が多数含まれることから、特定の HLA-DR によって抗原提示を受け活性化した、自己抗原特異的な Th 細胞が、RA の病態形成において重要であると考えられている。特に Th 細胞の中でも、Th1 細胞や Th17 細胞などは関節局所での増加が認められ、病原性に関与するサブセットとしてこれまで検討がなされてきたが、Th1 細胞の産生する炎症性サイトカインの IFN- $\gamma$  の阻害抗体である Fontolizumab や、Th17 細胞の産生する IL-17A に対する阻害抗体である Secukinumab などの薬剤の効果は、RA において限定的であった。また、RA では抗環状シトルリン化ペプチド (Cyclic citrullinated peptide: CCP) 抗体やリウマトイド因子 (Rheumatoid factor: RF) などの自己抗体が特徴的に認められ、液性免疫の亢進が想定されている。B 細胞を補助し抗体産生を引き起こす T follicular helper (Tfh) 細胞が RA の末梢血で増加し、疾患活動性と相関するとの報告がある一方で、関節滑膜局所では Tfh 細胞の特徴的表面マーカーである CXCR5 の陽性細胞が乏しいとの報告もあり、Th1 細胞や Th17 細胞、Tfh 細胞以外の Th サブセットの存在と RA 病態への関与が示唆されているものの、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

本研究では、RA 患者および健常人 (HC) の末梢血のフローサイトメトリーデータの詳細な解析を通じて、エフェクターメモリーCD4<sup>+</sup>T 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞) の中において、既報の Th1/Th2/Th17/Tfh 細胞といった細胞とは異なる、ケモカイン

受容体 CXCR3 を中等度 (CXCR3<sup>mid</sup>) 発現する新規細胞サブセットである” ThA 細胞 : Autoimmune-associated helper T cell”を同定した。ThA 細胞は、健常人 (HC) に比して RA 末梢血において著しい増加を認めた。

次に、ThA 細胞を Flowcytometry を用いて分取し、次世代シーケンサーにより RNA レベルでの網羅的遺伝子発現解 (RNA sequencing: RNA-seq) を行った。先ず始めに、UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) 法を用いて遺伝子発現データの次元圧縮を行ったところ、ThA 細胞は、Th1/Th2/Th17/Tfh 細胞を含む既知の Th サブセットとは明確に区別されるクラスターとして描出され、ThA 細胞が従来の Th サブセットとは異なる遺伝子プロファイルを有することが示唆された。続いて RA 由来の ThA 細胞と HC 由来の ThA 細胞との間で発現変動遺伝子解析を行ったところ、発現変動の上位 20 遺伝子の中に CXCL13 や IL-21 といった、RA の ThA 細胞において液性免疫応答を正に制御する特徴的な遺伝子の発現増加を認めた。CXCL13 はケモカインの一種であり、ケモカイン受容体 CXCR5 のリガンドである。CXCL13 はリンパ濾胞の胚中心において豊富に発現しており、CXCR5 を発現する B 細胞や Tfh 細胞のケモアトラクタントとして作用する。IL-21 は B 細胞に作用し増殖や plasma cell 分化を促し抗体産生を誘導し、CXCL13 とともに液性免疫誘導において中心的な役割を果たすことが広く知られている。一方で ThA 細胞は Tfh 細胞の特異的細胞表面マーカーである CXCR5 を発現しないことより、ThA 細胞が Tfh 細胞とは異なる、液性免疫応答を促進する独自のサブセットであることが想定された。

臨床情報と ThA 細胞比率の関連につき解析を行ったところ、ThA 細胞は RA において HC よりも増加するものの、興味深いことに ThA 細胞の割合は疾患活動性 (DAS28) と負に相関する傾向が認められ、リウマトイド因子 (RF) とは正の相関を示すという結果を得た。

そこで、ThA 細胞が実際 B 細胞の抗体産生を直接促進するか否かにつき、ヒト末梢血細胞を用いて *in vitro* における検証実験を行った。具体的には、RA 末梢血より末梢血単核球を分離後、ThA 細胞および既に B 細胞刺激能を有することが知られている Tfh 細胞をフローサイトメトリーを用いて無菌的に分取し、同一患者より分取した B 細胞と抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体存在下で共培養を行った。培養上清中の total IgG を ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法で定量したところ、B 細胞単独培養条件と比して、ThA 細胞の共培養で、有意に B 細胞からの IgG 産生が亢進し、その抗体産生誘導能は Tfh 細胞と同程度であった。これらの結果より、ThA 細胞が直接 B 細胞を刺激することで液性免疫を正に制御することが示された。

さらに ThA 細胞の抗原特異性に関して検討すべく本研究で得られた RNA-seq データを用いて T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析を行った。その結果、ThA 細胞がその他の Th 細胞サブセットと比して非常に高い TCR clonality を有していることが判明した。また、ThA 細胞の TCR レパトアは Th1 細胞と重複を認めることより、ThA 細胞が Th1 細胞を由来とする液性免疫促進性のエフェクターメモリー T 細胞集団であると考えられた。

既報では 2017 年に Rao らが mass cytometry を用いて PD-1<sup>hi</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cell で定義され

る”Tph: peripheral helper T cell”が RA の炎症関節局所で増加し、CXCR5<sup>+</sup>でありながら、B 細胞に対する抗体産生誘導能を有することを報告した。2018 年には Yoshitomi らが PD-1<sup>hi</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞において転写因子の SOX4 が CXCL13 の産生を制御しており、IL-2 中和条件下、TGF- $\beta$  刺激条件下でこれらの細胞への分化が誘導されることを示した。一方 2019 年に Zhang らは、関節滑膜に浸潤した免疫細胞の single cell RNA-seq と mass cytometry の統合的解析を行い、特に滑膜への白血球浸潤の強い RA 症例の滑膜組織において、CXCL13<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>で示される Tph および Tfh が増加していることを示した。またこのような Tph 細胞は全身性エリテマトーデス (SLE) の末梢血や腎組織でも増加が認められることが報告されている。Bocharnikov らの報告では、同じく SLE の末梢血で増加が認められ、濾胞外での Plasma cell への分化と抗体産生を担うことが推定されている B 細胞の一種の DN2 細胞 (CXCR5<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> B cell) の割合と、Tph との割合の間に正の相関が認められることが示されている。Tph 細胞は PD-1 陽性により規定されるが、PD-1 は T 細胞の活性化だけでも誘導される。今後は、本研究で同定された ThA 細胞と Tph 細胞との異同につき、trajectory 解析も含めた single cell RNA-seq を用いた更なる検証を進める予定である。

近年 Musters らは、高頻度に認められる TCR  $\beta$  の上位 25 クローンのうち約 50%が複数関節間で重複して認められることを報告した。本研究では末梢血における ThA 解析を行ったが、今後は RA 滑膜生検検体を用いて、滑膜浸潤する ThA 細胞と末梢血 ThA との TCR レパトアの比較を行うことで、RA 病態がより一層解明されることが期待される。

本研究では、RA および HC の末梢血のフローサイトメトリー解析を通じ、新規細胞サブセットとして ThA 細胞を同定し、RNA-seq による詳細な遺伝子発現解析を行うことで同サブセットが既報の各種 Th 細胞とは異なる遺伝子発現プロファイルを取ること、またその機能解析により抗体産生誘導促進能を有するという知見を得た。ThA 細胞は RA のみならず HC にも認められることより、免疫学的恒常性維持における ThA 細胞の役割、また機能に関するマスター制御遺伝子の同定についても今後更なる検討を行う予定である。これらの知見と臨床情報との統合解析によるアプローチは、患者層別化や、個別化医療の実現につながる新規創薬ターゲットの同定の可能性を内包していると考えられた。