

## 論文の内容の要旨

論文題目 免疫細胞タイピングによる関節リウマチの臨床免疫研究

氏名 永渕 泰雄

関節リウマチは持続的な自己免疫反応と全身の関節の炎症性関節炎を生じ、進行性の関節破壊に至る炎症性疾患である。最大の感受性遺伝子が HLA-DRB1 であることが知られている。HLA-DRB1 の多型は抗原提示細胞上の MHC クラス II を介した CD4 陽性 T 細胞への抗原提示によって関節リウマチの発症に関わることが強く示唆されている。関節リウマチと関連する HLA-DRB1 多型の 70-74 番目の共通アミノ酸配列は shared epitope と呼ばれる。我々は関節リウマチ患者の shared epitope の有無、末梢血単核球の HLA-DR 発現と免疫細胞タイピングによる評価を臨床指標と合わせて検討することで臨床像と関連し治療標的となりうるサブセットの同定を試みた。また関節リウマチの炎症病態の中心は関節滑膜局所であるため、関節滑液中 CD4 陽性 T 細胞に高発現し関節への遊走に関わることが示されている CXCR4 分子に着目した解析を行った。

免疫細胞タイピングはフローサイトメトリーを利用して 1 細胞レベルで多様な免疫細胞の特徴を調べる手法である。71 名の健常人と 82 名の関節リウマチ患者末梢血との比較では、CD4 陽性 T 細胞サブセットのうち naive T 細胞比率が増加しており、Th1、Th17、Tfh 更に Treg 比率も有意に減少して

いた。B 細胞サブセット比率の広範な変化と CD14<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>単球の増加及び骨髓系樹状細胞の減少も認められた。個々のサブセット比率のうち、いずれも単独で活動性指標である DAS28 もしくは身体機能評価指標である HAQ と有意な相関を示すものは認めなかった。自己抗体のうち抗 CCP 抗体については memory T 細胞および T<sub>fh</sub>、またリウマトイド因子については形質芽細胞とそれぞれ異なるサブセットとの正の相関が示された。また、shared epitope 陽性関節リウマチ患者では memory T 細胞比率が有意に増加しており、抗 CCP 抗体値と memory T 細胞比率には正の相関が認められた。T 細胞の HLA-DR 陽性率もまた抗 CCP 抗体値との正の相関を示し、T 細胞の活性化が関節リウマチの抗 CCP 抗体産生において役割を果たすことが示唆された。shared epitope 陽性関節リウマチにおいてのみ、抗原提示細胞である B 細胞及び単球上の HLA-DR 発現量上昇を認め、抗原提示を効率化していると考えられた。

続いて我々は関節滑液中 CD4 陽性 T 細胞に高発現する CXCR4 分子に着目し解析を行った。関節滑液の CD4 陽性 T 細胞を 6 例で検討したところ、96.7%が CD45RA 陰性、92.6%が CXCR4 陽性であり、これらは関節滑液 CD4 陽性 T 細胞の特徴と考えられた。24 例の関節リウマチ患者と 26 例の健常人で比較したところ、関節リウマチ患者末梢血の CD4 陽性 T 細胞のすべてのサブセットで CXCR4 の発現上昇を認めた。更に関節リウマチ患者の memory T 細胞の CXCR4 発現が DAS28 と最も強い正の相関を示し、抗 CCP 抗体値、HAQ とも正の相関を示した。したがって末梢血 CD4 陽性 T 細胞の中でも特に memory T 細胞の CXCR4 発現上昇が疾患活動性や抗 CCP 抗体と関わることを示され、関節リウマチの関節炎病態に関与している細胞集団である可能性が考えられた。また、memory T 細胞の CXCR4 発

現と B 細胞の HLA-DR 発現量とに正の相関の傾向が認められ、B 細胞上の HLA-DR を介した T 細胞受容体刺激と CXCR4 発現の関係が示唆された。

最後に免疫細胞タイピングにおけるサブセット分類の妥当性を検討するため、1名の健常人と3名の関節リウマチ患者において、Naive、Th1、Th2、Th17、Th17.1、Tfh、CD25+の7サブセットのRNA-sequencingによる発現解析を行った。主成分分析による比較では、各サブセットはそれぞれ発現パターンが似通っており、第一主成分によって Naive サブセットはそれ以外の6サブセットと区別され、第二主成分によって CD25+サブセットはエフェクターサブセットに相当する Th1、Th2、Th17、Th17.1、Tfh と区別された。各サブセットにはそれぞれ特有の mRNA 発現パターンが存在し「サブセット」として妥当であることが示された。しかしながらマスター転写因子とされる TBX21、GATA3、RORC、BCL6、FOXP3 やサイトカイン産生などの重要遺伝子の発現から各サブセットを評価すると、表面マーカーは妥当であっても重要遺伝子の発現は必ずしも均一ではないことが示された。免疫細胞タイピングにおいて病態に関与するサブセット候補であった Th1、Th17、Tfh、Treg と疾患活動性には明確な相関を認めなかったが、その一つの背景として免疫細胞タイピングによる分類自体の不均一性が関わる可能性が示された。

これまで shared epitope 陽性が関節リウマチ患者の CD4 陽性 T 細胞サブセットへ与える影響についての知見は限られていた。本研究の結果は CD4 陽性 T 細胞を介した獲得免疫反応が実際に shared epitope

陽性関節リウマチで活性化し、抗 CCP 抗体産生に関わることを示唆した。更に、shared epitope 陽性関節リウマチ患者では、B 細胞上の HLA-DR 発現上昇を介した T 細胞受容体刺激によって CD45 陰性 CD4 陽性 T 細胞に CXCR4 の発現上昇が起こり、関節への遊走能を高め、関節局所で抗 CCP 抗体産生を促しているという新たな病態モデルが示唆された。本研究によって、個々の関節リウマチ症例の免疫学的な不均一性への理解が深まるのみならず、今後 T 細胞を中心とした関節リウマチの免疫学的異常を標的とした新規治療の開発にも結び付く可能性があるものと考えられる。