

# 新規 T 細胞亜集団を標的とした自己免疫疾患の創薬開発

東京大学大学院 医学系研究科 免疫学

小松紀子

## 1. 目的

T細胞は免疫応答の促進と抑制の双方向からの制御により生体の恒常性維持に重要な役割を果たす。過剰な免疫応答や不必要な免疫抑制は、それぞれ自己免疫疾患や易感染症などの病態形成の要因となる。自己免疫疾患において免疫応答を促進する Th17 細胞と抑制する Foxp3+Treg 細胞のバランス制御の重要性が広く認識されている。Treg 細胞が発現する抑制機能因子である Foxp3 の炎症における発現の安定性は、自己免疫疾患の抑制と促進のバランスの鍵を握ることからも高い関心が集めているが議論の余地があった。申請者らは、Foxp3+T 細胞には Foxp3 発現が安定なものと不安定なものが存在し、不安定型のみが炎症環境下 Foxp3 の発現を消失して関節炎を惹起し、これまで報告のない遺伝子発現パターンをもつ Th17 細胞 (exFoxp3Th17 細胞) へと分化転換することを明らかにした (Komatsu et al Nat. Med. 2014)。さらにこの細胞自身が破骨細胞誘導因子 RANKL を発現するが、滑膜線維芽細胞との共培養にて破骨細胞の分化を強力に誘導できる骨破壊誘導性 T 細胞であることを見出した。このように新しい病原性 Th17 細胞を世界に先駆けて同定し、Foxp3 発現細胞の分化可塑性の病理学的意義を明らかにした。最近、他研究者によっても Foxp3 を消失した T 細胞が 1 型糖尿病や多発性硬化症を悪化させる T 細胞へと分化することが報告され、創薬開発の標的としての重要性が広く認知される状況となった。しかしながら exFoxp3Th17 細胞の病原性を司る分子基盤や炎症性骨破壊を引き起こす詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。exFoxp3Th17 細胞の炎症性骨破壊における関与のメカニズムを解明すること、および exFoxp3Th17 細胞の分子基盤の解明を足掛かりとし、T 細胞を標的とする自己免疫疾患の創薬開発の基盤を確立することが、本研究の目的である。

## 2. 方法

### ①新規Th17細胞の生体内における骨破壊誘導能の評価

exFoxp3Th17細胞は滑膜線維芽細胞の共培養系において破骨細胞の分化を強力に誘導する。RANKLは破骨細胞分化誘導因子であり、T細胞、滑膜線維芽細胞がRANKLを発現することが知られている。生体内においてどちらの細胞由来のRANKLが破骨細胞の分化に寄与しているか検討するため、滑膜線維芽細胞、T細胞それぞれにRANKLを欠損したLck-Cre RANKL floxマウス、Col6-Cre RANKL floxマウスを作成し、関節炎モデルであるコラーゲン抗体誘導性関節炎およびコラーゲン誘導性関節炎を誘導した上で骨破壊および破骨細胞の分化を評価した。

### ②新規 Th17 細胞のマーカーの同定と自己免疫疾患の創薬開発の基盤の確立

Foxp3<sup>hCD2</sup>IL-17<sup>GFP</sup> マウスを利用して *in vitro* にて誘導した exFoxp3Th17 細胞、Th17 細胞、Treg 細胞、Th0 細胞のトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析により、exFoxp3Th17 細胞のバイオマーカーや分化制御を担う候補遺伝子を選別した。スクリーニングされた候補遺伝子に関しては、Naïve CD4+T 細胞、

Foxp3+T 細胞の Th17 細胞分化誘導条件下での培養中にレトロウイルスによる遺伝子発現制御系を利用することでそれぞれ Th17 細胞、exFoxp3Th17 細胞への分化誘導能の評価を行った。さらに、分化誘導能を亢進または抑制すると認められた候補遺伝子に関しては、病態における評価のため CRISPR/Cas9 による候補遺伝子の欠損マウスの作成を行った。樹立した遺伝子欠損マウスから Naïve CD4+T 細胞及び Foxp3+T 細胞を単離し、試験管内において Th17 細胞や exFoxp3Th17 細胞への分化能を評価した。

### 3. 結果

#### ①新規Th17細胞の炎症性骨破壊における生体内における骨破壊誘導能の評価

滑膜線維芽細胞、T細胞それぞれにRANKLを欠損したLck-Cre RANKL flox, Col16-Cre RANKL floxマウスを作成し、滑膜線維芽細胞、T細胞におけるRANKL発現の低下を確認した。これらのマウスにコラーゲン抗体誘導性関節炎を誘導したところ、どちらの系統も同程度の炎症が認められるにもかかわらず、滑膜線維芽細胞特異的RANKL欠損マウスでは骨破壊や破骨細胞の分化が有意に抑制されることを見出した。一方でT細胞特異的RANKL欠損マウスにおいては骨破壊や破骨細胞の分化の抑制は認められなかった。このことから生体内において滑膜線維芽細胞由来のRANKLが炎症性骨破壊ならびに破骨細胞の分化誘導の主要な役割を果たすことが示された。また、コラーゲン誘導性関節炎を発症したマウスに関しても、滑膜線維芽細胞特異的RANKL欠損マウスでは骨破壊や破骨細胞の分化が有意に抑制されるのに対し、T細胞特異的RANKL欠損マウスにおいてはこの抑制は認められなかった。したがって炎症性骨破壊における主要な破骨細胞誘導性細胞はT細胞ではなく滑膜線維芽細胞であることが示された。

#### ②新規 Th17 細胞のマーカーの同定と自己免疫疾患への治療応用

exFoxp3Th17 細胞、Th17 細胞、Treg 細胞、Th0 細胞のトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析により、exFoxp3Th17 細胞もしくは Th17 細胞に高発現する約 100 の遺伝子を抽出し、クローニングを行った。クローニングした遺伝子のなかで遺伝子過剰発現系により Th17 細胞、exFoxp3Th17 細胞への分化誘導を正に制御するものと負に制御するものを複数見出した。これらのスクリーニングされたこれらの候補遺伝子に関して、CRISPR/Cas9 システムを利用して遺伝子欠損マウスを作製した。樹立した遺伝子欠損マウスから Naïve CD4+T 細胞及び Foxp3+T 細胞を単離し、試験管内において Th17 細胞や exFoxp3Th17 細胞への分化能を評価したところ、分化能を制御すると考えられる予備的な知見が得られた。

### 4. 考察

以上の結果より、滑膜線維芽細胞が関節炎における破骨細胞誘導の実行役であり、exFoxp3Th17細胞は滑膜線維芽細胞のRANKL発現を強力に誘導することで炎症性骨破壊に寄与することが示唆された。

試験管内の破骨細胞分化誘導系において、exFoxp3Th17細胞の非存在下では滑膜線維芽細胞の破骨細胞誘導能は著しく低下することから、この新規Th17細胞サブセットと滑膜線維芽細胞の協調作用が関節炎における炎症性骨破壊の新機軸であることが考えられる。exFoxp3Th17細胞やTh17細胞に特異的に発現する遺伝子の欠損マウスから単離したNaïve CD4+T細胞やFoxp3+T細胞ではコントロールと比較して試験管内でのTh17細胞、exFoxp3Th17細胞への分化に差があると考えられる予備的な知見が認められた。

今後、これらの遺伝子欠損マウスにさまざまな自己免疫疾患モデルを誘導し、病態形成の評価を行うと共に、中和抗体や阻害剤の開発により特異的に細胞群を除去したときの病態評価を行うことで、新規Th17細胞を治療標的とした自己免疫疾患の新規治療法の開発に繋げていく予定である。

### 5. 参考文献

1. Komatsu N, Takayanagi H. Regulatory T cells in Arthritis.  
Prog Mol Biol Transl Sci. 2015;136:207-15
2. Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, Nakashima T, Takayanagi H. "RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation." Ann Rheum Dis. 2015
3. Komatsu N, Takayanagi H.  
Arthritogenic T cells in autoimmune arthritis.  
Int J Biochem Cell Biol. 2015 Jan;58:92-6.1.
4. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Takana S, Bluestone JA, Takayanagi H "Pathogenic conversion of Foxp3<sup>+</sup> T cells into Th17 cells in autoimmune arthritis"  
*Nature Medicine* 20(1) 62-68, 2014
5. Tsuji M\*, Komatsu N\*, Kawamoto S\*, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, Hori S, Fagarasan S.  
"Preferential generation of follicular B helper T (TFH) cells from Foxp3<sup>+</sup>T cells in gut Peyer' s patches" *Science* \*These authors contributed equally to this work 323(5920):1488-92. 2009
6. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. "Heterogeneity of natural Foxp3<sup>+</sup> T cells: a committed regulatory T cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(6):1903-8, 2009