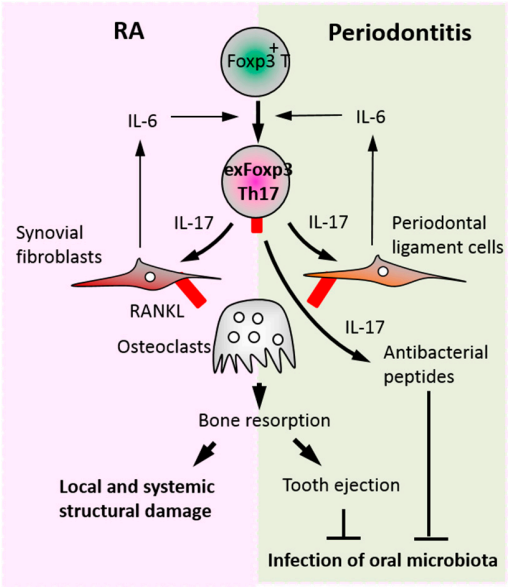
128　新規T細胞サブセットの臓器免疫連関の解明	小松　紀子

【目的】自己免疫疾患はT細胞免疫の破綻が原因となって生じる。我々は以前、Foxp3^{+}T細胞から分化転換した関節炎を惹起する新規 Th17 細胞サブセットを同定したが、本研究では関節リウマチの骨破壊における病理的意義の確立と口腔内恒常性の破綻時における病理的意義の解明を目的として研究を行った。

【方法】新規 Th17 細胞の遺伝子発現網羅解析を行うと共に、マウス自己免疫性関節炎モデルや歯周炎モデルを用いて骨破壊や免疫応答における新規 Th17 細胞の関与を μCT 解析、FACS などで評価を行った。

【結果】新規 Th17 細胞の病原性を司る候補遺伝子を複数同定し遺伝子欠損マウスを樹立した。関節リウマチにおいては新規 Th17 細胞－滑膜線維芽細胞－RANKL が骨破壊の主軸の一つとなることが示された。歯周炎においても新規 Th17 細胞は最も強力な骨破壊誘導性 T 細胞であるとともに、骨破壊に伴う感染巣である歯の脱落と、抗菌免疫の誘導を介して、生体防御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。したがって新規 Th17 細胞は、関節リウマチでは構造破壊を引きおこす悪玉細胞であるのに対し、歯周炎においては局所での口腔内細菌の制御や全身への伝播の抑制により感染防御に寄与するという善玉細胞としての一面をもつことが明らかとなった。

新規 T 細胞の病理学的意義



128. 新規 T 細胞サブセットの臓器免疫連関の解明

小松　紀子

東京大学 大学院医学系研究科 免疫学

Key words：自己免疫疾患，口腔免疫，制御性 T 細胞，Th17 細胞

緒　言

自己免疫疾患の病態形成には免疫応答を促進する Th17 細胞と抑制する Treg 細胞のバランスが疾患進行の鍵となりうる。Treg 細胞のマスター転写因子 Foxp3 はその抑制機能の発揮に必須である。関節リウマチはもっとも罹患率の高い自己免疫疾患のひとつであり、慢性的な炎症に引き続いて骨破壊がおこる炎症性骨疾患に分類される。我々は関節リウマチの炎症環境下において $Foxp3^{+}$T 細胞が関節リウマチの炎症と骨破壊を惹起する新規 Th17 細胞サブセット（exFoxp3Th17 細胞）に分化転換することを見出している［1］。exFoxp3Th17 細胞は試験管内では滑膜線維芽細胞の RANKL.発現を誘導することで破骨細胞の分化を強力に誘導したが、自己免疫性関節炎において滑膜線維芽細胞の RANKL の骨破壊への直接的な寄与については生体内での証明はなされていなかった。さらに、exFoxp3Th17 細胞の病原性を司る分子基盤や他臓器疾患における病理的意義は未だ不明な点が多い［2］。口腔は食物や水分の摂取などを通して常に外界に暴露されるとともに、固有の常在細菌叢と免疫系を有する臓器であるが、口腔内細菌に対する生体防御機構は未だ不明な点が多い。細菌感染が引き金となり口腔免疫の恒常性が破綻する症例として知られる歯周炎は、現代社会においてもっとも罹患率の高い疾患のひとつでもある。歯周炎は関節リウマチと同様に、免疫系が活性化して骨破壊がおこる炎症性骨疾患に分類されるが、どのような免疫異常により病態が形成されるかは不明である［3］。近年、関節リウマチ患者では腸内細菌だけでなく口腔内細菌の恒常性も破綻していることが報告されるなど口腔ー臓器免疫連関が注目されている。

本研究では、exFoxp3Th17 細胞が口腔内の免疫の活性化や骨破壊、口腔内細菌を制御することで臓器免疫連関を担う可能性を鑑みて、exFoxp3Th17 細胞に着眼し、①その病原性を司る分子基盤の解明、②関節リウマチの骨破壊における病理的意義の確立、③口腔内恒常性の破綻時における病理的意義の解明を目的として研究を行った。本研究により関節リウマチ及び歯周炎において $Foxp3^{+}$T 細胞から exFoxp3Th17 細胞への分化転換がおこり exFoxp3Th17 細胞ー間葉系細胞ーRANKL が骨破壊の主軸の一つとなることが明らかとなった。さらに、exFoxp3Th17 細胞は、関節リウマチでは病態の悪化を引きおこす悪玉細胞であるのに対し、歯周炎においては組織破壊を誘導する一方で、抗菌免疫の誘導と歯の脱落を介して口腔内細菌を制御することで生体防御に貢献するという善玉細胞としての機能をもつことが明らかとなった。

方　法

1. exFoxp3Th17 細胞の病原性を司る分子基盤の解明

exFoxp3Th17 細胞の病原性を司る分子基盤を明らかにするためトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を行った。また、試験管内での exFoxp3Th17 細胞の分化制御に関与する因子の探索を行い候補遺伝子をスクリーニングした。CRISPR-Cas9 システムを用いて候補遺伝子をターゲットとした遺伝子欠損マウスの樹立を試みた。

2. exFoxp3Th17 細胞の関節リウマチの骨破壊における病理的意義の確立

exFoxp3Th17 細胞が誘導する滑膜線維芽細胞の RANKL 発現の病理的意義を検討するため、コラーゲン誘導性関節炎に感受性の DBA マウスを背景とする滑膜線維芽細胞特異的に RANKL を欠損させたマウスを新規に作製し、コラーゲン誘導性関節炎誘導時における関節の炎症スコアと骨破壊レベルを評価した。

3. 口腔内恒常性の破綻時における exFoxp3Th17 細胞の病理的意義の解明

口腔内恒常性の破綻の代表的疾患である歯周炎を誘導し、Foxp3+T 細胞から exFoxp3Th17 細胞への分化転換が起こるかどうかを Foxp3 fate mapping マウスを用いて検討した。歯を支持する歯槽骨の骨破壊や口腔内細菌の制御における exFoxp3Th17 細胞の関与を、細胞移入系や分化阻害系と、FACS やμCT 解析、16S rRNA gene sequencing 法を組み合わせて検討を行った。また、歯槽骨の骨破壊は感染巣である歯の脱落を促すが、感染制御における骨破壊の病理学的意義の有無を検討するため、歯周炎環境下において口腔内細菌が全身性に伝播するかどうか、さらに抜歯により口腔内細菌の全身性への伝播が抑制されるかどうか検討を行った。

結 果 及 び 考 察

1. exFoxp3Th17 細胞の病原性を司る分子基盤の解明

Foxp3+T 細胞由来の Th17 細胞の特異的発現因子群をマイクロアレイ、プロテオーム解析により同定した。遺伝子制御系を用いて分化転換に及ぼす機能を試験管内で評価し、候補分子を複数同定し、遺伝子欠損マウスを複数樹立した。今後も表現型解析を継続して進め、exFoxp3Th17 細胞の分化や病原性を司る分子基盤の解明に繋げる。

2. 関節リウマチの骨破壊における exFoxp3Th17 細胞の病理的意義の確立

滑膜線維芽細胞で RANKL 欠損するマウスを関節炎モデル感受性のマウス背景にて新たに作製し、関節炎を誘導すると炎症は最大レベルまで誘導される一方で、関節部位の骨破壊は抑制された。この結果から滑膜線維芽細胞の RANKL は炎症の成立ではなく、炎症局所の骨破壊の誘導に重要であることが分かった。したがって exFoxp3Th17 細胞はおもに滑膜線維芽細胞の RANKL 発現を誘導することで骨破壊に寄与することが考えられた。本研究により exFoxp3Th17 細胞－滑膜線維芽細胞－RANKL が関節炎の骨破壊の主軸の一つとなることが示された。

3. 口腔内恒常性の破綻時における exFoxp3Th17 細胞の病理的意義の解明

歯周炎を誘導した Foxp3 fate mapping マウスを解析した結果、関節炎と同様に、歯周炎においても細菌感染依存的に Foxp3+T 細胞から exFoxp3Th17 細胞への分化転換が起き、歯周組織に集積することが明らかとなった（図 1a)。間葉系細胞などがおもに産生する IL-6 がその分化転換に寄与していた。exFoxp3Th17 細胞を移入すると炎症性サイトカインの産生や歯を支持する歯槽骨の骨破壊の増悪化が認められた（図 1b)。

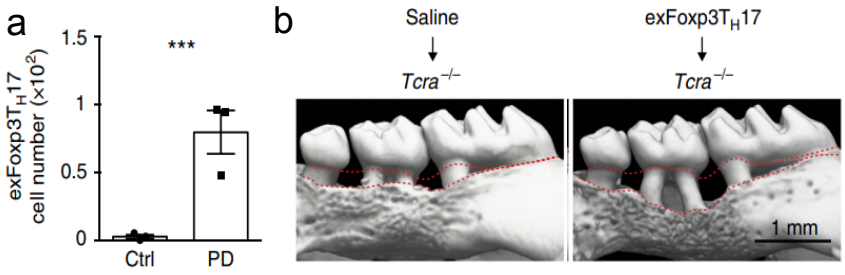


図 1. 歯周病誘導時において exFoxpTh17 細胞は歯周組織で増加し、歯槽骨の骨破壊を誘導する
a) 歯周組織における、exFoxp3Th17b 細胞の細胞数。b) 歯周炎を誘導した T 細胞欠損マウスに exFoxp3Th17b 細胞を移入すると歯を支持する歯槽骨の破壊の増悪化が認められた。***P < 0.005、Student's t-test。

その一方で、exFoxp3Th17 細胞の分化を阻害するとその抑制が認められた。したがって exFoxp3Th17 細胞が口腔内細菌感染によっておこる局所の免疫系の活性化と骨破壊の増悪化においても主要な役割を担うことが明らかとなった。主要な骨破壊誘導性の RANKL 発現細胞の決定のため RANKLcKO マウスを作製したところ、歯根膜細胞特異的 RANKL 欠損マウスでは T 細胞特異的 RANKL 欠損マウスと比較して骨破壊の抑制が大きく認められたことから、exFoxp3Th17 細胞上の RANKL による骨破壊も一部寄与するものの、おもに IL-17 を産生して歯根膜細胞の RANKL 発現を誘導し骨破壊がおこすことが示された。exFoxp3Th17 細胞の分化抑制により抗菌ペプチドの産生抑制や口腔内細菌の細菌の量的な抑制と質的な変化が認められたことから、exFoxp3Th17 細胞が口腔内細菌の局所での制御に関与

することが明らかとなった。さらに、歯周炎環境下では口腔内細菌が全身性に伝播すること、抜歯により感染した歯を除去すると口腔内細菌の全身性への伝播が抑制されることが見出された。これらの実験結果から歯周病の病態形成にexFoxp3Th17 細胞が重要な役割を果たすことが明らかとなった。その一方で、exFoxp3Th17 細胞は抗菌免疫の誘導と歯の脱落を介して口腔内細菌の局所での制御と全身への伝播の制御を行うことで感染防御に貢献することが示唆された［4］。

以上の結果より、関節リウマチにおいて exFoxp3Th17 細胞－滑膜線維芽細胞－RANKL が骨破壊の主軸の一つとなることが明らかとなった。さらに、歯周炎において、exFoxp3Th17 細胞は、局所の免疫応答の活性化と骨破壊により組織破壊を誘導する悪玉細胞としての機能をもつ一方で、抗菌免疫の誘導と歯の脱落を介して口腔内細菌を制御することで生体防御に寄与するという善玉細胞としての一面ももちあわせていることが明らかとなった。後者の役割をもつことが exFoxp3Th17 細胞、さらには $Foxp3^{+}$T 細胞の分化可塑性が生体に保存されてきた所以のひとつであると考えられる。口腔－臓器免疫連関という観点で考察すると、exFoxp3Th17 細胞は口腔や他臓器の局所における免疫応答を惹起して組織破壊を引きおこすことで細胞を介した免疫連関を促進する一方、口腔内細菌の全身への伝播の抑制すること免疫連関を抑制するという諸刃の剣としての性質をもつのではないかと考えられる。exFoxp3Th17 細胞の病原性を司る分子機構の解明は、関節リウマチや歯周病の病態形成機構の理解だけでなく、口腔－臓器免疫連関のメカニズムの理解やそれにもとづく治療法の開発によって広く人類の健康増進に寄与すると考えられる（図 2）。

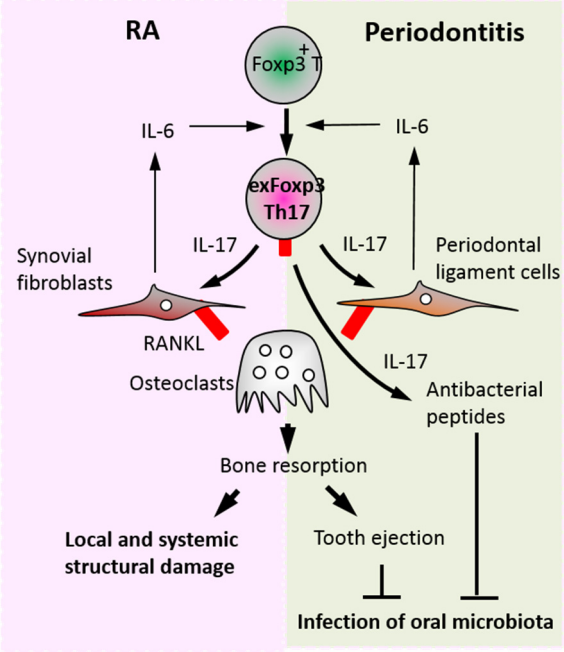


図 2. exFoxpTh17 細胞の関節リウマチと歯周病における病理学的意義

exFoxp3Th17 細胞は関節リウマチと歯周病においてもっとも強力な骨破壊誘導性 T 細胞サブセットであることを見出した。関節リウマチにおいては、exFoxp3Th17 細胞はおもに滑膜線維芽細胞の RANKL を誘導することで、歯周病においては、exFoxp3Th17 細胞は歯根膜細胞の RANKL 発現誘導により骨破壊誘導に寄与する。関節リウマチにおいては構造的破壊を引きおこす悪玉細胞であるが、歯周病においては組織破壊を引きおこす一方で、抗菌免疫の誘導と歯の脱落を介して口腔内細菌感染を抑制するという善玉細胞としての役割をもつことが明らかになった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科免疫学教室大学院生（本助成金受給時の所属。現：東京医科歯科大学学術振興特別研究員）の塚崎雅之先生であり、ここに謝辞を表します。また、貴重なマウスをご提供いただきました、東京医科歯科大学の中島友紀先生、国立国際医療研究センターの岡村匡史先生、東京大学の堀昌平先生、University of California, San Francisco の Jeffrey A Bluestone 先生、Max Planck Institute の Michael Ret 先生、広島大学の宿南知佐先生、東京理科大学の岩倉洋一郎先生、当研究室の新田剛先生に感謝申し上げます。さらに、本研究をご指導いただいた東京大学大学院医学系研究科免疫学教室の高柳広教授をはじめとし、多くの研究協力を頂いた研究室のすべてのメンバーに御礼申し上げます。

文　献

1） Komatsu N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-Hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J.A., Takayanagi, H.　Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis.　Nature Medicine. 20(1), 62-8 (2014) . DOI: 10.1038/nm.3432.

2） Komatsu N., Takayanagi H.　Arthritogenic T cells in autoimmune arthritis.　Int J Biochem Cell Biol.;58:92-6. (2015) . DOI: 10.1016/j.biocel.2014.11.008.

3） Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nat. Rev. Immunol. 15, 30–44 (2015). DOI: 10.1038/nri3785.

4） Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, Nitta T, Pluemsakunthai W, Shukunami C, Iwakura Y, Nakashima T, Okamoto K, Takayanagi H. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells.　Nat Commun. 2018 Feb 16;9(1):701. DOI: 10.1038/s41467-018-03147-6.