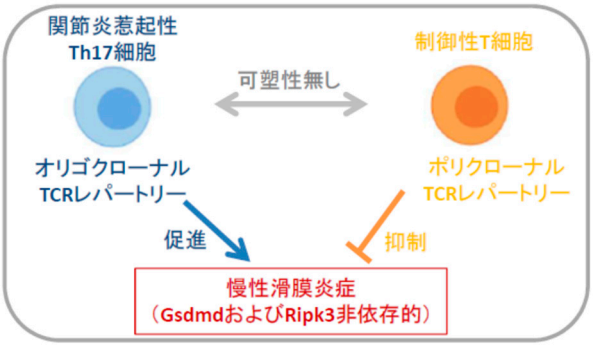
47　自己免疫性Th17細胞の疾患制御機構の解明	廣田　圭司

【目的】インターロイキン-17（IL-17）を産生する炎症性 $CD4^+$T ヘルパー（Th17）細胞は、生理的には粘膜組織の感染防御に重要なサブセットである。一方、自己抗原に対する過剰な免疫応答により自己免疫疾患を惹起する。疾患特異的な T ヘルパー細胞の制御機構を標的とした免疫学的治療法の開発には、標的となる自己抗原の理解が鍵となる。しかし、自己免疫性 Th17 細胞の T 細胞受容体（TCR）が認識する疾患惹起性の自己抗原および抗原特異的な炎症維持機構については未だ不明な点が多い。本研究では、関節炎を制御する自己免疫性 Th17 細胞と制御性 T 細胞の TCR レパートリーを解析し、疾患特異的な TCR レパートリーの特徴を明らかにする。また、関節の滑膜炎症に寄与する Th17 細胞、滑膜ストローマ細胞、滑膜自然リンパ球がどのような外的環境因子・炎症細胞死プログラム（Necroptosis、Pyroptosis など）によってクロストークし組織炎症を増悪・慢性化させているのか、これまで明らかになっておらず、関節炎発症・維持における Necroptosis および Pyroptosis の関与を明らかにする。

【方法】インターロイキン-17（IL-17）を産生する炎症性 Th17 細胞によって惹起される自己免疫性関節炎モデル（$Il17a^{eGFP}$ $Foxp3^{hCD2}$ SKG）マウスを用いて、関節炎局所に局在する IL-17 産生 Th17 細胞と $Foxp3^+$制御性 T 細胞をセルソーターで分取する。全 RNA 抽出、cDNA ライブラリーを作製後、次世代シークエンサーを用いて TCR α 鎖、TCR β 鎖、それぞれの CDR 領域のシークエンス情報を取得した。炎症関連細胞死プログラムである Necroptosis と Pyroptosis に焦点をあて、それぞれの鍵となる分子 Ripk3 と Gsdmd KO マウス（Balb/c 背景）を Crispr/Cas9 システムを用いて作製した。関節炎の発症、増悪化における Necroptosis、Pyroptosis 経路の意義について SKG 関節炎モデルを用いた解析をおこなった。

【結果】$Il17a^{eGFP}$ $Foxp3^{hCD2}$ SKG マウスを作製したことにより、従来の非特異的な再刺激をおこなった後の細胞固定処理をする必要がなくなり、炎症関節組織中で活性化した IL-17 産生 Th17 細胞、$Foxp3^+$制御性 T 細胞が解析可能となった。レポーター発現を指標に、関節炎局所の Th17 細胞、制御性 T 細胞をソートし、TCR レパートリーの解析をおこなったところ、関節炎惹起性 Th17 細胞と制御性 T 細胞は異なる TCR レパートリーのパターンを示すことを見いだした。Th17 細胞はオリゴクローナルな TCR レパートリーを有し、制御性 T 細胞はポリクローナルな TCR レパートリーを示した。加えて、Th17 細胞と制御性 T 細胞の TCR レパートリー間の重複は認められなかった。これらの結果は、Th17 細胞と制御性 T 細胞間の可塑性が乏しいことを示唆しており、それぞれ異なる自己抗原に反応して活性化および機能が制御されていることが示唆された。これまで Th17 依存性の関節炎症における Necroptosis、Pyroptosis 経路の役割は分かっておらず、それぞれの鍵となる分子である Ripk3 と Gsdmd KO SKG マウスを用いて、Th17 細胞の分化および病態の表現型を評価した。コントロール SKG マウスと同様に、Ripk3 KO SKG と Gsdmd KO SKG マウスに関節炎が誘導された。また、これら経路は Th17 細胞の分化・活性化にも影響を与えなかった。本研究によって、Th17 細胞依存性の自己免疫性関節炎モデルの病態発症および炎症維持にこれら経路は関与しないことが明らかになった。

慢性滑膜炎を制御する $CD4^+$ T 細胞の TCR レパートリーと細胞死プログラムによる炎症維持機構



47. 自己免疫性 Th17 細胞の疾患制御機構の解明

廣田　圭司

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 統合生体プロセス分野

Key words：自己免疫疾患，関節炎モデル，インターロイキン-17，炎症性 T ヘルパー細胞

緒　言

インターロイキン-17（IL-17）を産生する炎症性 $CD4^+$T ヘルパー（Th17）細胞は、生理的には粘膜組織の感染防御に重要なサブセットである［1］。一方、自己抗原に対する過剰な免疫応答により自己免疫疾患を惹起する［2，3］。疾患特異的な T ヘルパー細胞の制御機構を標的とした免疫学的治療法の開発には、標的となる自己抗原の理解が鍵となる。しかし、自己免疫性 Th17 細胞の T 細胞受容体（TCR）が認識する疾患惹起性の自己抗原については未だ不明な点が多い。本研究では、関節炎を制御する自己免疫性 Th17 細胞と制御性 T 細胞の TCR レパートリーを解析し、疾患特異的な TCR レパートリーの特徴を明らかにする。

また関節の滑膜炎症に寄与する Th17 細胞、滑膜ストローマ細胞、滑膜自然リンパ球がどのような外的環境因子・炎症細胞死プログラム（Necroptosis、Pyroptosis など）によってクロストークし組織炎症を増悪・慢性化させているのか、これまで明らかになっておらず、関節炎発症・維持における Necroptosis および Pyroptosis の関与を明らかにする。

本研究で用いる Th17 細胞依存的関節炎モデル（SKG マウス）は関節リウマチ、脊椎関節炎病態を反映する自然発症モデルであり、関節炎惹起性 Th17 細胞を起点とした慢性炎症維持機構の同定など［4］、自己免疫性関節炎の理解を深める新規の病因・病態メカニズムについてこれまで報告してきた。しかし、自己免疫性関節炎の疾患惹起に関わる自己抗原と抗原特異的な病態発症メカニズムについて未だ不明な部分が多く、これら課題を解決するため関節炎惹起性 T 細胞の TCR が認識する自己抗原を同定するプラットフォーム開発を進め［5］、これまで不明であった関節炎を惹起する自己抗原の病理学的・臓器特異的な意義について研究展開が可能となった。他のモデルも含め、国内外で関節炎惹起性の CD4 T 細胞が認識する自己抗原同定に成功したグループは無く、自己免疫性関節炎発症に関わる抗原レパートリーを決定していくための非常に強力なプラットフォームである。

TCR レパートリー解析の結果、Th17 細胞はオリゴクローナルな TCR レパートリーを有し、制御性 T 細胞はポリクローナルな TCR レパートリーを示した。加えて、Th17 細胞と制御性 T 細胞の TCR レパートリー間の重複は認められなかった。これらの結果は、Th17 細胞と制御性 T 細胞間の可塑性が乏しいことを示唆しており、それぞれ異なる自己抗原に反応して活性化および機能が制御されていることが示唆された。

自己免疫性関節炎における Necroptosis、Pyroptosis 経路の役割は分かっておらず、それぞれの鍵となる分子である Ripk3 と Gsdmd KO SKG マウスを用いて、Th17 細胞の分化および病態の表現型を評価した。コントロール SKG マウスと同様に、Ripk3 KO SKG と Gsdmd KO SKG マウスに関節炎が誘導された。また、これら経路は Th17 細胞の分化・活性化にも影響を与えなかった。よって、Th17 細胞依存性の自己免疫性関節炎モデルの病態発症および炎症維持にこれら経路は関与しないことが明らかになった［6］。

方　法

1. マウス

炎症関節で抗原特異的に活性化した自己免疫性 Th17 細胞と制御性 T 細胞を同時に同定できる Il17a^{eGFP} Foxp3^{hCD2} SKG マウス系統を作製した。CRISPR/Cas9 システムを用いて、Ripk3 KO、Gsdmd KO SKG マウスを作製し、SPF 飼育環境下で全ての実験をおこなった。全ての動物実験は京都大学ウイルス・再生医科学研究所の倫理委員会で審査・承認を受けた。

2. 関節炎惹起

20 mg マンナンを腹腔投与することで関節炎を誘導し、関節炎の重症度をスコア化した。

3. 関節炎組織からの細胞浮遊液の調整とフローサイトメトリー解析

滑膜組織を 300U の collagenase I と collagenase IVで酵素処理後、70-μm のメッシュに通し細胞浮遊液を調整した。細胞を 50 ng/ml の phorbol 12-myristate 13-acetate と 500 ng/ml の ionomycin で 2.5 時間刺激後、3.7%の formaldehyde と 0.1%の NP-40 でそれぞれ固定と細胞膜透過処理しサイトカインの細胞内染色をおこなった。

4. TCR レパートリー解析

Il17a^{eGFP} Foxp3^{hCD2} SKG マウスにマンナンを単回投与して関節炎を誘導した。腫脹関節にコラゲナーゼ処理を施し関節浸潤細胞を単離した後にセルソーターを用いて CD4^{+}eGFP^{+}（Th17）細胞および CD4^{+}hCD2^{+}（Treg）細胞分画をそれぞれ分取した。分取した各細胞検体より RNA を抽出し SMARTer® Mouse TCR a/b Profiling Kit (Takara Bio) の手順に準じてシーケンスライブラリー調整を行った。Miseq（Illumina）を用いて TCRβ鎖のシーケンス情報ならびに頻度を得てバイオインフォマティクス解析（TCR レパトア解析）を実施した。

結　果

1.　炎症関節内の Th17 と制御性 T 細胞の TCR レパートリー解析。

Th17 依存性関節炎モデル（Il17aeGFP Foxp3hCD2 SKG マウス）を用いて、関節炎局所に局在する Th17 および Foxp3^{+}制御性 T 細胞をセルソーターで分取し（図 1a）、次世代シークエンサーを用いて TCRα鎖、TCRβ鎖、それぞれの CDR 領域のシークエンス情報を取得し、TCR レパートリーを比較した。Th17 細胞はオリゴクローナルな TCR レパートリーを有し、制御性 T 細胞はポリクローナルな TCR レパートリーを示した。加えて、Th17 細胞と制御性 T 細胞の TCR レパートリー間の重複は認められなかった（図 1b）。これらの結果は、Th17 細胞と制御性 T 細胞間の可塑性が乏しいことを示唆しており、それぞれ異なる自己抗原に反応して活性化および機能が制御されていることが示唆された。

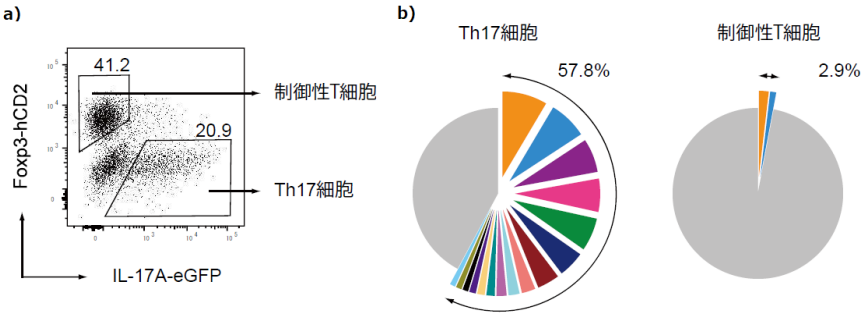


図 1.　TCR レパートリー解析

a)　TCR レパートリー解析のために分取した炎症関節内 Th17 と制御性 T 細胞。

b)　炎症関節浸潤 Th17 及び Treg 細胞の TCRβ 鎖の TCR レパトア結果を示した円グラフ。上位 TCR 配列の内、シーケンス頻度が全体の 1%を超えるものを個別にグラフ表示し、1%未満の配列は灰色のグラフに集約して表示。

2. Ripk3 と Gsdmd は自己免疫性関節炎の発症、重症度に関与しない

滑膜細胞の増殖と関節破壊が自己免疫性関節炎の主要な病態であり、細胞のストレスや傷害から放出されるダメージ関連分子パターン（IL-33 やミトコンドリア DNA など）が、直接的・間接的に Th17 細胞、ILCs 細胞間の炎症反応を増悪させていることをこれまで明らかにした。ダメージ関連分子パターンの放出にいたる中心的な分子経路として、炎症関連細胞死プログラムである Necroptosis と Pyroptosis 経路に焦点をあて、それぞれの鍵となる分子 Ripk3 と Gsdmd KO SKG マウスを Crispr/Cas9 システムを用いて作製した。これらマウスに関節炎を惹起したところ、コントロール（WT SKG）マウスと同様の発症頻度、重症度で関節炎を起こした（図 2）。これらの結果から、関節炎組織には多量の細胞死が認められるが、自己免疫性関節炎の発症、重症度に Necroptosis と Pyroptosis 経路は関与しないことが示唆された。

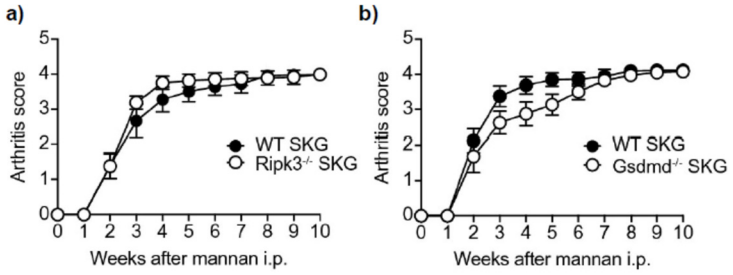


図 2. Ripk3、Gsdmd は自己免疫性関節炎の発症、重症度に影響をあたえない

a) WT または Ripk3 KO SKG マウスに関節炎を誘導し、重症度スコアを評価した。

b) WT または Gsdmd KO SKG マウスに関節炎を誘導し、重症度スコアを評価した。

3. Ripk3、Gsdmd は Th サブセットと制御性 T 細胞の分化と遊走に影響しない

次に、Necroptosis と Pyroptosis 経路が炎症性 Th 細胞および制御性 T 細胞の分化、遊走に影響を与えたかどうかフローサイトメトリーを用いて解析をおこなった。関節炎スコアに差が認められない結果と一致して、所属リンパ節および炎症滑膜組織内の $CD4^+$T 細胞が発現する IL-17、GM-CSF、IFN-γ、Foxp3 の割合にほとんど有意差は認められなかった（図 3）。従って、自己免疫性関節炎モデルにおける $CD4^+$T 細胞応答には Necroptosis と Pyroptosis 経路は関与しないことが示唆された。

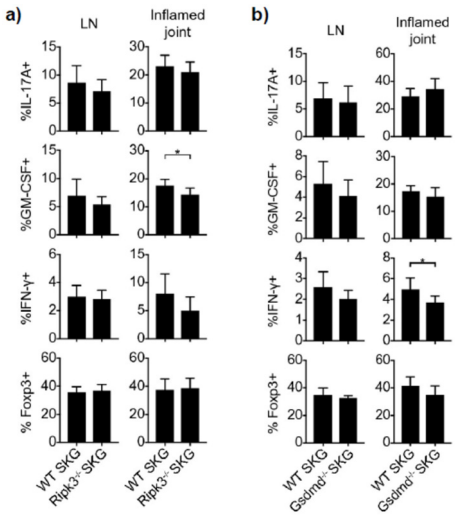


図 3. Ripk3、Gsdmd は Th サブセットと制御性 T 細胞の分化と遊走に影響しない

a) WT または Ripk3 KO SKG マウスに関節炎を誘導し、リンパ節（LN）および炎症滑膜組織（Inflamed joint）内の $CD4^+$ T 細胞が発現する IL-17、GM-CSF、IFN-γ、Foxp3 の割合をフローサイトメトリーで解析した。

b) WT または Gsdmd KO SKG マウスに関節炎を誘導し、リンパ節および炎症滑膜組織内の $CD4^+$T 細胞が発現する IL-17、GM-CSF、IFN-γ、Foxp3 の割合をフローサイトメトリーで解析した。

考　察

本研究では、Th17 細胞と制御性 T 細胞の細胞動態を時空間的に解析可能な Il17aeGFP Foxp3hCD2 レポーターSKG 系統を作製したことにより、生体内で自己抗原認識により活性化した T 細胞の迅速な分取が容易になり、抗原特異的に活性化した Th17 細胞と制御性 T 細胞の比較解析が可能となった。これまでに制御性 T 細胞が、炎症環境シグナルによって病原惹起性 Th 細胞に表現型を変化させることを示唆する報告がある一方、炎症組織局所の制御性 T 細胞と炎症性 Th 細胞の関連については分かっていなかった。私たちの自己免疫性関節炎モデルにおいては、滑膜炎症局所の Th17 細胞と制御性 T 細胞との間で TCR レパートリーの重複はほとんど認められなかった。従って、制御性 T 細胞から Th17 細胞への可塑性は非常に低く、制御性 T 細胞は炎症増悪化には関わっていないことが強く示唆された。また、TCR レパートリー解析の結果から、炎症性 Th17 細胞は限られた抗原特異性を持ち、限られた自己抗原によって関節炎が惹起されうることが示唆された。一方、免疫を抑制する制御性 T 細胞は幅広い TCR レパートリーを有することから多様な自己抗原によって活性化することで免疫を制御していることが示唆された。

炎症組織では多量の細胞死が常時起こっており、これまで Necroptosis、Pyroptosis 経路がどのように自己免疫性の炎症疾患に関わっているのか分かっていなかった。本研究により自己免疫性関節炎などの T 細胞依存性の自己免疫疾患には、これら細胞死プログラムの鍵となる分子 Ripk3 および Gsdmd は関与しないことを明らかにできた。これら経路は、感染免疫に加え、自然免疫の活性化が病態の中心である自己炎症性疾患などに強く関与するのかもしれない。従って、多量のネクローシスが付随する病態であっても、獲得免疫応答の維持と組織炎症の慢性化に Necroptosis、Pyroptosis 経路が必ずしも必要ないことが明らかとなった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の統合生体プロセス分野の竹内悠介（研究員）、小原乃也（大学院生）、近藤玄（教授）、渡邊仁美（助教）である。

文　献

1) Hirota K, Turner JE, Villa M, Duarte JH, Demengeot J, Steinmetz OM, Stockinger B. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. Nat Immunol. 2013 Apr;14(4):372-9. Epub 2013 Mar 10. PMID: 23475182. DOI: 10.1038/ni.2552.

2) Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, Wilhelm C, Tolaini M, Menzel U, Garefalaki A, Potocnik AJ, Stockinger B. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. Nat Immunol. 2011 Mar;12(3):255-63. Epub 2011 Jan 30. PMID: 21278737. DOI: 10.1038/ni.1993.

3) Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Isaka Y, Watanabe H, Kondoh G, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, Hirota K. Satb1 regulates the effector program of encephalitogenic tissue Th17 cells in chronic inflammation. Nat Commun. 2019 Feb 1;10(1):549. PMID: 30710091. DOI: 10.1038/s41467-019-08404-w.

4) Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis. Immunity. 2018 Jun 19;48(6):1220-1232.e5. Epub 2018 May 22. PMID: 29802020. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.009.

5) Ito Y, Hashimoto M, Hirota K, Ohkura N, Morikawa H, Nishikawa H, Tanaka A, Furu M, Ito H, Fujii T, Nomura T, Yamazaki S, Morita A, Vignali DA, Kappler JW, Matsuda S, Mimori T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Detection of T cell responses to a ubiquitous cellular protein in autoimmune disease. Science. 2014 Oct 17;346(6207):363-8. PMID: 25324392. DOI: 10.1126/science.1259077.

6) Takeuchi Y, Ohara D, Watanabe H, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Kondoh G, Morinobu A, Mimori T, Hirota K. Dispensable roles of Gsdmd and Ripk3 in sustaining IL-1β production and chronic inflammation in Th17-mediated autoimmune arthritis. Sci Rep. 2021 Sep 21;11(1):18679. PMID: 34548542. DOI: 10.1038/s41598-021-98145-y.