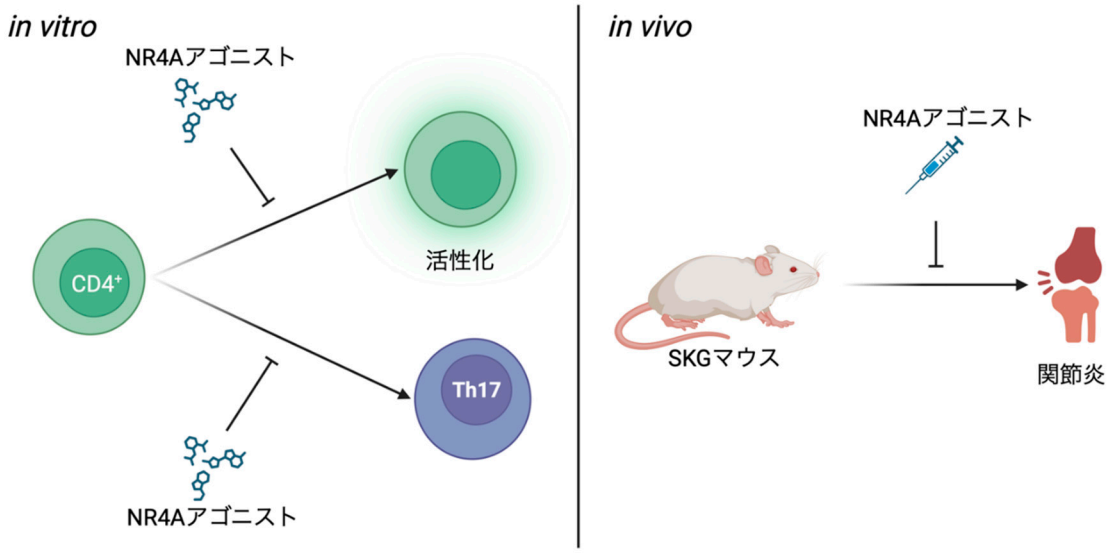
51　核内受容体NR4Aによる関節リウマチ病態解明と治療応用	日和　良介

【目的】関節リウマチは、慢性の関節炎およびそれに続く関節破壊によって、日常生活動作や生活の質を障害する自己免疫疾患である。関節リウマチの治療は、サイトカインなどを標的とした生物学的製剤や、分子標的抗リウマチ薬の臨床応用によって大きく進歩した。しかしながら、それらの治療では副作用として外来抗原に対する免疫応答も抑制してしまうことが課題である。核内受容体 NR4A ファミリーは、リンパ球では抗原刺激によって発現が誘導される初期応答遺伝子の一つであり、転写因子として機能する。B 細胞、T 細胞免疫寛容の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。本研究の目的は、NUR77（*Nr4a1*）を標的として自己反応性リンパ球を特異的に制御する、関節リウマチ治療への臨床応用を検討する基盤を創出することである。

【方法】NR4A 低分子アゴニストのマウス $CD4^+$T 細胞への作用を検証するため、*in vitro* で T 細胞の活性化を抑制できるかどうかを調べた。WT マウスの $CD4^+$T 細胞を *in vitro* で抗 CD3/28 抗体で刺激する際に、NR4A 低分子アゴニストを添加し、活性化マーカーの発現をフローサイトメトリーで評価した。また、遺伝子発現の変化を RNA シーケンス解析によって評価した。次に、SKG マウス関節炎モデルに対して NR4A 低分子アゴニストを投与し、経時的に関節炎スコアを評価した。NR4A 低分子アゴニストを投与した SKG マウスの脾臓 $CD4^+$T 細胞をフローサイトメトリーで解析した。また、マウス滑膜中の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析した。

【結果】NR4A アゴニストを加えることで、マウス $CD4^+$T 細胞の *in vitro* での活性化マーカーの発現が低下した。NR4A アゴニストによって、炎症に関連するサイトカインなどの遺伝子発現が抑制された。さらに、*in vitro* での Th17 分化に対する影響を調べたところ、NR4A 低分子アゴニストによって Th17 分化が阻害されることが示された。次に、NR4A 低分子アゴニストによって SKG マウス関節炎の程度が抑制されることが示された。NR4A アゴニストを投与した SKG マウスの脾臓では、コントロールのマウスと比較してエフェクターT 細胞、特に Th17 細胞が減少していた。NR4A 低分子アゴニストを投与したマウスではコントロールと比較して滑膜中の Th17 細胞の割合が減少していた。以上の結果から、NR4A が関節リウマチなどの関節炎、あるいは Th17 細胞依存性の自己免疫病態の治療標的となりうることが示唆された。NR4A を標的とした治療の開発に向けて、今後、自己免疫病態における NR4A の役割について更なる解明が望まれる。

NR4A アゴニストによる T 細胞活性化抑制と、SKG マウス関節炎の制御



（Created with BioRender.com）

51. 核内受容体 NR4A による関節リウマチ病態解明と治療応用

日和　良介

京都大学 医学部附属病院 免疫・膠原病内科

Key words：核内受容体 NR4A，関節リウマチ，SKG マウス，T 細胞，Th17 細胞

緒　言

関節リウマチは、慢性の関節炎およびそれに続く関節破壊によって、日常生活動作や生活の質を障害する自己免疫疾患である。関節リウマチの治療は、サイトカインなどを標的とした生物学的製剤や、分子標的抗リウマチ薬の臨床応用によって大きく進歩した。しかしながら、それらの治療では副作用として外来抗原に対する免疫応答も抑制してしまうことが課題であり、副作用として日和見感染症を含む種々の感染症により入院治療を要したり、敗血症など重篤な状態に陥ったりすることも少なくない。

本研究の目的は、NUR77（*Nr4a1*）を標的として自己反応性リンパ球を特異的に制御する、関節リウマチ治療への臨床応用を検討する基盤を創出することである。

NR4A ファミリーは、種々の免疫細胞で発現している核内受容体である。特に B 細胞と T 細胞では抗原刺激によって速やかに誘導される初期応答遺伝子の一つで、恒常的に活性のある転写因子として機能することが知られている。NR4A ファミリーは *Nr4a1*～*3* の 3 つのメンバーからなり、B 細胞と T 細胞では主に *Nr4a1* と *Nr4a3* が発現している。

我々は近年、NR4A ファミリーの B 細胞免疫寛容を維持する機能を初めて明らかにした［1］。NR4A ファミリーは、補助刺激を伴わずに抗原刺激を受けた B 細胞の活性化を制御している。すなわち、自己抗原に遭遇した自己反応性 B 細胞が活性化して病原性を発揮することを防いでいる。また、我々は、T 細胞において NR4A ファミリーが複数の免疫寛容機構に重要であることも示した［2］。NR4A ファミリーは、胸腺での負の選択による自己応答性 T 細胞の排除および、制御性 T 細胞の分化・維持、末梢での自己反応性 T 細胞のアナジー（不応答性）の誘導・維持を司っており、NR4A ファミリーを欠損したマウスは抗核抗体、抗 ds-DNA 抗体を産生し、重症の自己免疫現象によって生後 5 週以内に死亡する。

以上のように、NR4A ファミリーは B 細胞および T 細胞の免疫寛容の維持に重要な役割を果たしており［3］、関節リウマチの治療標的となる可能性が考えられる。しかしながら、自己免疫病態における NR4A ファミリーの働きは十分に解明されていない。関節リウマチは獲得免疫系がその病態に大きく寄与しており、抗原刺激を受けた B 細胞、T 細胞で発現が最も高くなる NUR77（*Nr4a1*）の活性を亢進させることで、自己免疫現象を抑制できる可能性が考えられる。

NUR77（*Nr4a1*）低分子アゴニストは化合物として利用可能であるが、関節炎モデルで治療効果を検証された報告は少ない。NR4A 低分子アゴニストが関節炎モデルマウスに治療効果を有することが示されれば、自己反応性リンパ球に特異的に作用することで免疫抑制の副作用が少ない治療法になる可能性がある。

本研究で、NR4A 低分子アゴニストが *in vitro* で T 細胞の活性化を制御し、さらに Th17 細胞への分化を抑制することが明らかとなった。また、SKG マウス関節炎に対して NR4A 低分子アゴニストを投与することで、関節炎を抑制する効果が示され、*in vivo* で T 細胞の活性化抑制、Th17 細胞の減少が認められた。これらの結果から、NR4A が関節炎あるいは Th17 細胞依存性の自己免疫病態の治療標的となりうることが期待される。

方法および結果

1. NR4A 低分子アゴニストによる *in vitro* での T 細胞の活性化制御

まず、NR4A 低分子アゴニストが *in vitro* で T 細胞の活性化を抑制できるかどうかを調べた。WT マウスの $CD4^+$T 細胞を *in vitro* で抗 CD3/28 抗体で刺激する際に、NR4A 低分子アゴニストを添加することで、活性化マーカーである CD25 や PD-1 の発現の低下が認められた（図 1）。同様に *in vitro* で $CD4^+$T 細胞に NR4A アゴニストの有無による遺伝子発現を RNA シーケンス解析によって評価したところ、炎症に関連するサイトカインなどの遺伝子発現が抑制された。さらに、*in vitro* での Th17 分化に対する影響を調べたところ、NR4A 低分子アゴニストによって Th17 分化が阻害されることが示された。

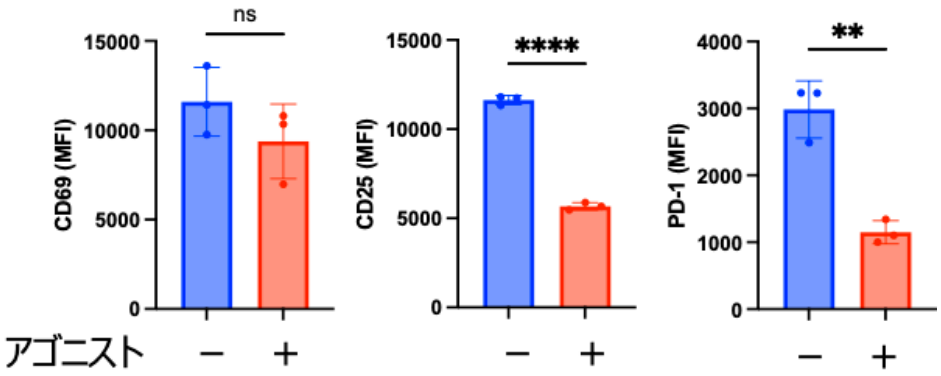


図 1. NR4A 低分子アゴニストによる $CD4^+$T 細胞の活性化抑制
WT マウスの脾臓 $CD4^+$T 細胞を *in vitro* で抗 CD3/28 抗体で刺激した。この際、NR4A 低分子アゴニストを添加し、24 時間後にフローサイトメトリーで活性化マーカーの発現を評価した。Student's t-test、** $p<0.01$、**** $p<0.0001$。

2. NR4A 低分子アゴニストによる SKG マウス関節炎の抑制

次に、SKG マウス関節炎モデルに対して NR4A 低分子アゴニストを投与することで、*in vivo* で関節炎の抑制効果があるかどうかを検証した。SKG マウスに zymosan A を投与することで関節炎を誘発した。Zymosan A の投与後から NR4A 低分子アゴニストを投与し、経時的に関節炎スコアを評価したところ、NR4A 低分子アゴニストによって関節炎の程度が抑制されることが示された（図 2）。

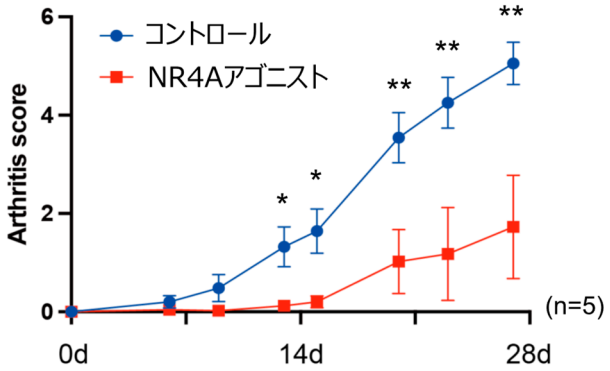


図 2. NR4A 低分子アゴニストによる SKG マウス関節炎の抑制
SKG マウスに zymosan A を投与して関節炎を誘発した。この際、NR4A 低分子アゴニストを腹腔内投与し、関節炎スコアを経時的に評価した。Mann-Whitney test、* $p<0.05$、** $p<0.01$。

NR4A 低分子アゴニストを投与した SKG マウスの脾臓 $CD4^+$T 細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、コントロールのマウスと比較して、エフェクターT 細胞が減少していた。IL-17 を産生する $CD4^+$T 細胞（Th17 細胞）をフローサイトメトリーで評価したところ、NR4A 低分子アゴニストを投与したマウスではコントロールと比較して Th17 細胞の割合が減少していた（図 3）。

脾臓のその他の免疫細胞について、フローサイトメトリーで解析を行った。制御性 T 細胞、胚中心 B 細胞、形質細胞、単球の割合は、NR4A 低分子アゴニスト投与によって影響を受けなかった。

滑膜中の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、NR4A 低分子アゴニストを投与したマウスではコントロールと比較して滑膜中の Th17 細胞の割合が減少していた。

これらの結果は、*in vivo* でも NR4A 低分子アゴニストが Th17 細胞の分化を抑制することを示唆している。

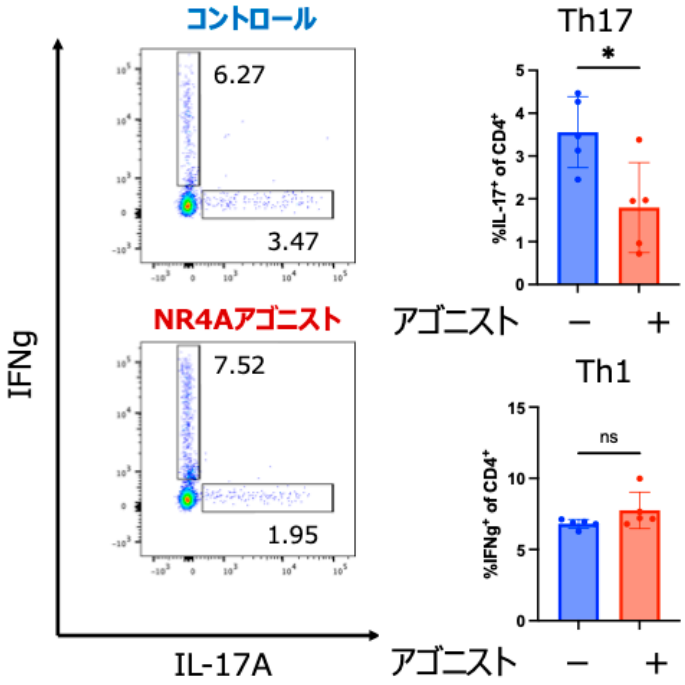


図 3. NR4A 低分子アゴニストによる Th17 細胞の減少
SKG マウスに zymosan A を投与して関節炎を誘発した。この際、NR4A 低分子アゴニストを腹腔内投与し、脾臓細胞の IFNγ陽性 $CD4^+$T 細胞（Th1 細胞）と IL-17A 陽性 $CD4^+$T 細胞（Th17 細胞）をフローサイトメトリーで評価した。
Student's t-test、* $p<0.05$。

3. 関節リウマチ患者滑膜内の NR4A 発現

関節リウマチ患者の滑膜細胞内の NR4A 発現を調べるため、既報の single cell RNA シークエンスデータ［4］を用いて再解析を行った。関節リウマチ患者の滑膜では、変形性関節症患者と比較して $CD4^+$T 細胞の数が多かった。特に関節リウマチ患者のメモリー$CD4^+$T 細胞で *Nr4a1* の発現レベルが高いことが明らかになった。

考　察

本研究によって、NR4A 低分子アゴニストが *in vitro* で T 細胞の活性化を制御し、さらに Th17 細胞への分化を抑制することが明らかとなった。また、SKG マウス関節炎に対して NR4A 低分子アゴニストを投与することで、関節炎を抑制する効果が示され、*in vivo* で T 細胞の活性化抑制、Th17 細胞の減少が認められた。

NR4A ファミリーはリンパ球では転写因子として機能する初期応答遺伝子の一つであり、その発現量は抗原刺激の強さと相関する［3］。T 細胞での機能として、T 細胞免疫寛容を司ることがわかっており［4］、*Nr4a1*、*Nr4a3* の両者を欠損したマウスは制御性 T 細胞を欠損する［5］他、胸腺での負の選択、アナジーの誘導・維持にも異常をきたす［2］。

本研究での *in vitro* の結果より、NR4A 低分子アゴニストによって NR4A の転写因子活性が増強された結果、T 細胞受容体下流にある初期応答遺伝子の発現が抑制されたものと思われる。刺激から 24 時間後の活性化マーカーの抑制は、遺伝子発現の低下の結果によると考えられる。

SKG マウスでは、*Zap70* の点突然変異により胸腺での負の選択の閾値が変化し、末梢で自己反応性 T 細胞が増加することが知られている［6］。SKG マウス関節炎では、$CD4^+$T 細胞、特に Th17 細胞が関節炎を惹起することが明らかとなっている［6］。本研究で、*in vitro* で Th17 細胞の分化抑制効果が認められ、*in vivo* で脾臓および滑膜内の Th17 細胞の減少が認められたことから、NR4A 低分子アゴニストの SKG マウス関節炎の抑制効果は、少なくとも一部は Th17 細胞の分化抑制によるものと考えられる。この結果は、*Nr4a1* 欠損 $CD4^+$T 細胞が *in vitro* で Th17 細胞に分化しやすいという既報［7］とも矛盾しないものである。

さらに、SKG マウスでは *Nr4a1* を高発現している $CD4^+$T 細胞が関節炎惹起性を有していることが他の研究室から示されている［8］。自己抗原からの刺激を受けた自己反応性 $CD4^+$T 細胞で高発現している *Nr4a1* の機能をさらに増強させることで、自己反応性 $CD4^+$T 細胞が優先的に制御された結果、関節炎が抑制されたものと思われる。自己反応性リンパ球の活性化、すなわち末梢性免疫寛容の破綻は自己免疫病態の本態の一つであり、NR4A は自己免疫疾患の治療標的として理に適っているものと考えられる。

また、関節リウマチ患者の滑膜内の $CD4^+$T 細胞、特にメモリー$CD4^+$T 細胞で *Nr4a1* の発現が増えていることを確認した。タンパク質レベルでも関節リウマチ患者の滑膜内の $CD4^+$T 細胞で NUR77（*Nr4a1*）は変形性関節症よりも発現が高い［8］。これらの結果から、ヒトの関節リウマチでも NR4A が病態に関与していることと、炎症が起こっている局所の $CD4^+$T 細胞で発現が高いことがわかった。

以上の結果から、NR4A が関節リウマチなどの関節炎、あるいは Th17 細胞依存性の自己免疫病態の治療標的となりうることが示唆された。NR4A は自己免疫疾患の本態である免疫寛容に関わっており、治療標的とすることで病態の根本を改善することが期待される。NR4A を標的とした治療の開発に向けて、今後、自己免疫病態における NR4A の役割について更なる解明が望まれる。

文　献

1） Tan C, Hiwa R, Mueller JL, Vykunta V, Hibiya K, Noviski M, et al. NR4A nuclear receptors restrain B cell responses to antigen when second signals are absent or limiting. Nature immunology. 2020;21(10):1267-79. Epub 2020/09/02. PMID: 32868928, DOI: 10.1038/s41590-020-0765-7.

2） Hiwa R, Nielsen HV, Mueller JL, Mandla R, Zikherman J. NR4A family members regulate T cell tolerance to preserve immune homeostasis and suppress autoimmunity. JCI Insight. 2021;6(17):e151005. Epub 20210908. PMID: 34343134, DOI: 10.1172/jci.insight.151005.

3） Hiwa R, Brooks JF, Mueller JL, Nielsen HV, Zikherman J. NR4A nuclear receptors in T and B lymphocytes: Gatekeepers of immune tolerance(). Immunological reviews. 2022;307(1):116-33. Epub 20220217. PMID: 35174510, DOI: 10.1111/imr.13072.

4） Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. Nature immunology. 2019;20(7):928-42. Epub 20190506. PMID: 31061532, DOI: 10.1038/s41590-019-0378-1.

5) Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, Fukaya T, Morita R, Kimura A, et al. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. Nature immunology. 2013;14(3):230-7. Epub 2013/01/22. PMID: 23334790, DOI: 10.1038/ni.2520.
6) Takeuchi Y, Hirota K, Sakaguchi S. Impaired T cell receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis. Immunological reviews. 2020;294(1):164-76. Epub 2020/01/17. PMID: 31944330, DOI: 10.1111/imr.12841.
7) Liebmann M, Hucke S, Koch K, Eschborn M, Ghelman J, Chasan AI, et al. Nur77 serves as a molecular brake of the metabolic switch during T cell activation to restrict autoimmunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018;115(34):E8017-E26. Epub 20180802. PMID: 30072431, DOI: 10.1073/pnas.1721049115.
8) Ashouri JF, Hsu LY, Yu S, Rychkov D, Chen Y, Cheng DA, et al. Reporters of TCR signaling identify arthritogenic T cells in murine and human autoimmune arthritis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2019;116(37):18517-27. Epub 2019/08/29. PMID: 31455730, DOI: 10.1073/pnas.1904271116.