

筑波大学

博士（医学）学位論文

CD4 陽性 T 細胞中の T-bet は
ROR γ t の発現と機能, 及び IL-17A 産生を
抑制し自己免疫性関節炎を制御する.

2021

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

清水 優

目次

概要	3
第一章：背景	7
第二章：目的	10
第三章：実験材料と方法	11
第四章：結果	19
1. T-bet KO マウスにおける胸腺内の T 細胞発生の評価	
2. T-bet KO マウスにおける CIA の評価	
3. CII 免疫後の T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞による サイトカイン産生評価	
4. CII 免疫後の T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞のサブセット解析	
5. CII 免疫後の T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現解析	
6. T-bet の Th17 細胞分化における役割の解析	
7. cKO マウスにおける CIA と炎症関節局所の解析	
8. RNA-seq を用いた CII 免疫後の cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞の 遺伝子発現解析	
第五章：考察	25
第六章：結論	31

主要略字	32
謝辭	34
出典	35
参考文献	36
図表	41

概要

【目的】

関節リウマチは多関節炎を特徴とする慢性炎症性疾患である。その病態は未解明であるが、炎症滑膜に多数の CD4 陽性 T 細胞が浸潤し、病態形成に関与する事が指摘されている。特に Th1 細胞分化に重要な転写因子である T-Box Expressed in T cells (T-bet) 発現は、関節リウマチにおいて炎症と負に相関し、病態形成に重要な役割を果たすと考えられる。当研究室では T 細胞特異的に T-bet を過剰発現させたマウスにおいて関節リウマチのマウスモデルであるコラーゲン誘導関節炎 (CIA) が抑制される事を報告したが、CD4 陽性 T 細胞に生理的に発現する T-bet の関節炎における役割は不明であり、T-bet の病態形成に与える影響と機能的意義を明らかにする事を目的として研究を行った。

【実験材料と方法】

8~11 週齢の雄 C57BL/6 系統の野生型マウス (WT), T-bet 欠損マウス (T-bet KO), T-bet^{fl/fl} マウス, CD4-Cre T-bet^{fl/fl} (cKO) マウスを対象として下記の実験を行った。

- 1) WT マウスと T-bet KO マウスに CIA を誘導した。
- 2) CII 免疫後の WT マウスと T-bet KO マウスのリンパ節中 CD4 陽性 T 細胞と CD11c 陽性樹状細胞を CII 存在下で培養し、サイトカイン産生を評価した。

- 3) CII 免疫後の WT マウスと T-bet KO マウスのリンパ節中 CD4 陽性 T 細胞における ROR γ t 発現, IL-17A 産生を評価した.
- 4) CII 免疫後の WT マウスと T-bet KO マウスのリンパ節中 CD4 陽性 T 細胞における CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞と CXCR5 陽性 ICOS 陽性濾胞性ヘルパー T 細胞の割合を評価した.
- 5) WT マウスと T-bet KO マウス由来 naïve CD4 陽性 T 細胞を Th17 条件で培養し, ROR γ t 発現, IL-17A 産生を評価した.
- 6) T-bet^{fl/fl} マウスと CD4-Cre T-bet^{fl/fl} (cKO) マウスに CIA を誘導した.
- 7) T-bet^{fl/fl} マウスと cKO マウスの炎症関節の CD4 陽性 T 細胞における ROR γ t 発現, IL-17A 産生を評価した.
- 8) CII 免疫後の T-bet^{fl/fl} マウスと cKO マウスのリンパ節中 CD4 陽性 T 細胞のトランスクリプトームを RNA-seq で比較した.

【結果】

- 1) T-bet KO マウスでは WT と比較して CIA の発症率, 重症度ともに増悪した.
- 2) T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では WT マウス由来 CD4 陽性 T 細胞と比較して CII 反応性 IFN γ , IL-10 産生が低下し, IL-17A, IL-17F, TNF α 産生が亢進した.
- 3) T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では WT マウス由来 CD4 陽性 T 細胞と比較し

て ROR γ t 発現が亢進し, ROR γ t 陽性 CD4 陽性 T 細胞において IL-17A 産生が亢進した.

4) T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では WT マウス由来 CD4 陽性 T 細胞と比較して CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞と CXCR5 陽性 ICOS 陽性濾胞性ヘルパー T 細胞の割合は同等であった.

5) T-bet KO マウス由来 naïve CD4 陽性 T 細胞では WT マウス由来 naïve CD4 陽性 T 細胞と比較して, Th17 条件培養後の ROR γ t 発現は同等であったが, IL-17A 陽性率が亢進した.

6) cKO マウスでも T-bet^{fl/fl} マウスと比較して CIA の発症率, 重症度ともに増悪した.

7) cKO マウスの炎症関節では, T-bet^{fl/fl} マウスと比較して CD4 陽性 T 細胞の ROR γ t 発現が亢進し, IL-17A 産生が亢進した.

8) cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では T-bet^{fl/fl} マウス由来 CD4 陽性 T 細胞と比較して Th1 細胞関連遺伝子発現が低下し, Th17 細胞関連遺伝子発現が亢進した. *rorc* 発現を制御する遺伝子や *rorc* 以外の *il17a* 発現を制御する遺伝子の発現レベルは cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞と T-bet^{fl/fl} マウス由来 CD4 陽性 T 細胞で同等であった.

【考察】

Th1 細胞分化の主要な転写因子である T-bet の過剰発現や Th1 細胞の主要サイトカインである IFN γ は CIA を抑制し, 関節リウマチにおいても CRP と逆相関する事が知ら

れる。本研究で、CD4 陽性 T 細胞中の T-bet は ROR γ t の発現と機能を抑制し、関節炎原性 Th17 細胞の発生と CIA の病態を抑制する事が示された。

CD4 陽性 T 細胞はサブセットにより CIA への病態寄与が異なり、Th17 細胞や濾胞性ヘルパーT細胞は CIA を促進、制御性 T 細胞は CIA を抑制する事が知られる。T-bet KO マウスでは制御性 T 細胞や濾胞性ヘルパーT細胞の割合は変化無かったが、Th17 細胞が増加していたことから、T-bet は Th17 細胞発生を抑制する事で CIA の病態を制御すると考えられた。

T-bet が Th17 細胞発生を抑制する機序として、in vitro 分化誘導系の結果から T-bet は naïve CD4 陽性 T 細胞の Th17 細胞への分化を抑制する事が示された。分子生物学的観点からは、T-bet は ROR γ t 発現を抑制する事に加え、T-bet は ROR γ t 陽性 CD4 陽性 T 細胞において IL-17A 産生を抑制した事から、ROR γ t の機能を抑制する事が示された。

RNA-seq の結果から、T-bet は Th17 細胞関連遺伝子の発現を抑制したが、*rorc* や *il17a* 発現を制御する遺伝子の発現には影響を与えず、T-bet が *rorc* や *il17a* の転写制御に直接関与する可能性が示唆された。

【結論】

CD4 陽性 T 細胞における T-bet は ROR γ t の発現と機能を抑制することで Th17 応答を抑制し、CIA を抑制すると考えられた。

第一章：背景

関節リウマチは本邦において人口の約 1%が罹患する骨・軟骨破壊を特徴とする慢性炎症性疾患である¹。関節炎が制御されない場合には続発性の関節破壊を来とし、日常生活に支障を来しうる²。その治療は古くから試みられており、紀元前 1500 年頃に史上初めて関節リウマチを記載した Ebers papyrus には既に緑青や硫酸銅の塗布による治療が記載された³。その有効性は確立していないが、興味深い知見として古典的な疾患修飾性抗リウマチ薬である D-penicillamine は銅依存性に T 細胞増殖を抑制する⁴。今日では、1985 年に有効性が確立された methotrexate⁵や、1994 年に登場した TNF α 阻害薬⁶に代表される生物学的製剤により関節リウマチの治療成績は向上してきた。しかし、実臨床において、未だに十分な治療効果を得ることの出来ない症例や薬剤関連有害事象により治療継続困難な症例も散見され、関節リウマチの病態解明や新規治療標的の同定が必要である。

関節リウマチの病態は未解明であるが、関節リウマチ発症前からリウマチ因子や抗 cyclic citrullinated peptide (CCP) 抗体が陽性化する事が知られ、免疫異常の関与が指摘される⁷。特に CD4 陽性 T 細胞への抗原提示に関連する human leukocyte antigen (HLA) -DR 多型は関節リウマチ発症のリスクファクターであり⁸、炎症関節の滑膜にオリゴクローナルに増殖した T 細胞が浸潤する⁹事から CD4 陽性 T 細胞の病態への関与

が推定される。

抗原に暴露されていない naïve CD4 陽性 T 細胞は抗原刺激や周囲のサイトカイン環境により機能的に成熟したサブセットへ分化する。CD4 陽性 T 細胞サブセットとしてヘルパーT (Th) 1 細胞, Th2 細胞, Th17 細胞, 制御性 T 細胞, 濾胞性ヘルパーT 細胞が知られる。Th1 細胞は interferon- γ (IFN γ) を産生し細胞内寄生菌感染, Th2 細胞は interleukin (IL) -4 を産生し蠕虫感染, Th17 細胞は IL-17A を産生し細菌や真菌感染に対する免疫応答に重要であり, 制御性 T 細胞は免疫寛容の維持, 濾胞性ヘルパーT 細胞は B 細胞の抗体産生に寄与する¹⁰。各 CD4 陽性 T 細胞サブセットへの分化には系統特異的な転写因子発現が重要であり, T-box expressed in T cells (T-bet) は Th1 細胞¹¹, GATA binding protein 3 (GATA3) は Th2 細胞¹², Retinoic acid-related orphan receptor (ROR) γ t は Th17 細胞¹³, Forkhead box P3 (Foxp3) は制御性 T 細胞¹⁴, B-cell lymphoma 6 (BCL6) は濾胞性ヘルパーT 細胞¹⁵の分化を規定する。

関節リウマチでは転写因子による CD4 陽性 T 細胞サブセット制御異常が指摘されている。関節リウマチ症例の末梢血では T-bet をコードする遺伝子である *tbx21* 発現と *ifng* 発現が全身の炎症を反映する C 反応性蛋白と逆相する¹⁶。また, 関節リウマチ症例の CD4 陽性 T 細胞では ROR γ t をコードする *rorc* の発現レベルが上昇し, 関節炎の活動性が高い症例では Th17 細胞の割合が増加する事も知られる¹⁷。従って, T-bet と ROR γ t による CD4 陽性 T 細胞の分化制御異常と続発する Th17 細胞増加が関節リウマチの病

態に関与する事が推察される。

コラーゲン誘導関節炎 (collagen-induced arthritis: CIA) は II 型コラーゲン (collagen type II: CII) 免疫により誘導される慢性滑膜炎で、関節リウマチのマウスモデルとして病態解析に用いられる。CIA の病態は特定のサイトカインやサイトカインシグナリングに依存的である。IFN γ シグナリングを欠損すると CIA が増悪し¹⁸⁻²⁰、IL-17 受容体 A が欠損すると CIA 抵抗性を呈する事が知られ²¹、関節リウマチの CD4 陽性 T 細胞サブセット制御異常と関連した病態が CIA にも存在することが示される。CIA において転写因子による CD4 陽性 T 細胞のサブセット分化制御も同様に重要で、当研究室から T-bet 過剰発現マウスでは CD4 陽性 T 細胞における *rorc* や *ahr* 発現が低下し、CII 反応性 IL-17A 産生が低下し、CIA 抵抗性になることを報告した^{22, 23}。T-bet は Th17 細胞を抑制する事で CIA を抑制する事が示唆されるが、T-bet 過剰発現マウスでは胸腺内で T 細胞発生異常が見られ、T 細胞発生異常により CIA が抑制された可能性も想定される。従って、T-bet による CD4 陽性 T 細胞の分化制御と CIA の病態の関係の詳細は未だ不明であり、研究を行うこととした (図 1)。

第二章：目的

CD4 陽性 T 細胞に発現する Th1 細胞の主要転写因子である T-bet の CIA における役割を明らかにする。

第三章：実験材料と方法

1. マウス

本研究では、8~11 週齢の雄の C57BL/6 系統の野生型 (wild-type: WT) マウス, T-bet 欠損 (T-bet knockout: T-bet KO), T-bet^{fl/fl} マウス, T 細胞特異的に T-bet を欠損する CD4-Cre T-bet^{fl/fl} (conditional knockout: cKO) マウスを用いた。WT マウス, T-bet KO マウス, T-bet^{fl/fl} マウスは Jackson Laboratory から購入した。cKO マウスは T-bet^{fl/fl} マウスと CD4-Cre マウスを交配し, 作製した。CD4-Cre マウスは筑波大学医学医療系解剖学発生研究室 高橋智教授から御供与頂いた。本研究の実験は筑波大学動物実験委員会に実験計画書を提出し, また, 筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会に遺伝子組換え実験計画書を提出し, 承認を得た上で, 筑波大学動物実験取扱規定を遵守して実施した。

2. CIA 誘導

CII 2 mg を 0.01 M 酢酸 500 μ l に溶解し, 加熱結核死菌 2.5 mg と不完全フロイントアジュバント 500 μ l を用いてエマルジョンを作製した。マウスをイソフルランで麻酔後, 尻根部周囲に CII 200 μ g を皮内注射した。同様の操作を 21 日後にも施行した。

下記の肉眼的評価に基づいて重症度スコアを付け, 合計した。

<重症度スコア>

0 点：正常な四肢

1点：関節の軽度腫脹，または発赤

2点：中等度腫脹

3点：著明な腫脹，または強直

病理学的評価は，初回 CII 免疫後 60 日目の両側足関節を用いて施行した．10%中性緩衝ホルマリン液で固定後，EDTA 飽和液を用いて 4 週間程度脱灰後，矢状断で足関節断面が最大となるように作製した標本を用いてヘマトキシリン・エオジン染色を行い，既報を参照し，下記の所見に基づいて滑膜炎スコア，骨糜爛スコアを付けた²⁴．

<滑膜炎スコア>

0点：正常（炎症所見なし）

1点：極僅かな炎症細胞浸潤

2点：滑膜増生や周囲の軟部組織の浮腫を伴わない軽度の炎症細胞浸潤

3点：幾らかの滑膜増生や軽度の周囲の軟部組織の浮腫を伴う中等度の炎症細胞浸潤

4点：滑膜増生や周囲の軟部組織の浮腫を伴う著明な炎症細胞浸潤

5点：著明な滑膜増生や広範な周囲の軟部組織の浮腫を伴う重度の炎症細胞浸潤

<骨糜爛スコア>

0点：正常（骨糜爛無し）

1点：弱拡大では明らかでない僅かな骨糜爛

2点：弱拡大では明らかではないが複数の骨吸収像

3点：中等度の明らかな骨吸収像

4点：著明な骨皮質内部に達するような骨吸収像

5点：皮質骨の全層性の欠損を伴うような重度の骨糜爛

3. CII 特異的 IgG 抗体価測定

0.1 M Na_2CO_3 に溶解した 10 $\mu\text{g/ml}$ CII 溶解液 100 μl を 96 well-plate に入れ、4°C で一晩インキュベートした。0.05% ポリソルベート含有 phosphate buffered saline (PBS) 300 μl で3回洗浄後に、1% bovine serum albumin (BSA) 含有 PBS 300 μl を入れ、室温で1時間インキュベートした。各 well を洗浄し、1% BSA 含有 PBS で5000倍希釈した血清 100 μl を加え、室温で1時間インキュベートした。各 well を洗浄し、1% BSA 含有 PBS で5000倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体、抗マウス IgG1 抗体、または抗マウス IgG2c 抗体を加え、室温で1時間インキュベートした。各 well を洗浄し、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine 100 μl を加え、室温で5~10分間インキュベートし、1M H_2SO_4 50 μl を加えた。マイクロプレートリーダーを用いて450 nm で吸光度を測定した。

4. 細胞表面抗原、細胞内抗原染色と flow cytometry (FCM) による解析

胸腺細胞における CD4, CD8 発現評価のための染色は次の通りに行った。

anti-CD4-peridinin chlorophyll/cyanin 5.5 (PerCP/Cy5.5) , anti-CD8-allophycocyanin /cyanin 7 (APC/Cy7) により細胞外染色を施行した。

CD8 陽性 T 細胞, CD19 陽性 B 細胞, CD11c 陽性樹状細胞における T-bet 発現評価のための染色は次の通りに行った。anti-CD8-APC/Cy7, anti-CD19-phycoerythrin/cyanin 7 (PE/Cy7), anti-CD11c-fluorescein isothiocyanate (FITC) により細胞外染色を施行し, FOXP3/Transcription factor staining buffer set (Invitrogen) を用いて細胞膜透過処理後に, anti-T-bet-allophycocyanin (APC) を用いて細胞内染色を行った。

ナチュラルキラー (natural killer: NK) 細胞における T-bet 発現評価のための染色は次の通りに行った。anti-CD3-PerCP/Cy5.5, anti-NK1.1-FITC により細胞外染色を施行し, 細胞膜透過処理後に, anti-T-bet- APC を用いて細胞内染色を行った。

CD4 陽性 T 細胞における T-bet, ROR γ t 発現評価のための染色は次の通りに行った。anti-CD4-PerCP/Cy5.5 により細胞外染色を施行し, 細胞膜透過処理後に, anti-T-bet-APC と anti-ROR γ t-phycoerythrin (PE) を用いて細胞内染色を行った。

CD4 陽性 T 細胞における CD25 と Foxp3 発現評価のための染色は次の通りに行った。anti-CD4-PerCP/Cy5.5 と anti-CD25-APC により細胞外染色を施行し, 細胞膜透過処理後に, Anti-Foxp3-Alexa Fluor (AF488) を用いて細胞内染色を行った。

CD4 陽性 T 細胞における CXCR5 と ICOS 発現評価のための染色は次の通りに行った。anti-CD4-PerCP/Cy5.5 と anti-ICOS-APC により細胞外染色を施行し, 同時に

biotin 標識 anti-CXCR5 とインキュベートした。その後、PE 標識 streptavidin を用いて染色した。

CD4 陽性のサイトカイン染色にあたり、事前に細胞を 50 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA), 1 μ g/ml ionomycin, 1 μ l/ml of GolgiStop 存在下で 4 時間培養した。初めに fixable viability dye eFluor 780 を用いて死細胞染色を行い、anti-CD4-PerCP/Cy5.5 により細胞外染色を施行し、細胞膜透過処理後に、anti-T-bet-APC, anti-IL-17A-PE/Cy7, anti-ROR γ t-PE を用いて細胞内染色を行った。

染色したサンプルは FACSVerse flow cytometer を用いて解析し、データは FlowJo (version 8.8.7) を用いて解析した。

5. CD4 陽性 T 細胞と CD11c 陽性樹状細胞の培養

CII 免疫後 10 日目のマウスの所属リンパ節から anti-CD4 monoclonal antibody (mAb) と anti-CD11c mAb を使用し、magnetic activated cell sorting (MACS) を用いて positive selection で CD4 陽性 T 細胞と CD11c 陽性樹状細胞を単離した。単離した 1×10^5 CD4 陽性 T 細胞と 2×10^4 CD11c 陽性樹状細胞を加熱溶解した 100 μ g/ml CII 存在下で 96 時間培養した。また、純度について CD4 陽性 T 細胞は $98.8 \pm 0.15\%$ 、CD11c 陽性樹状細胞は $97.4 \pm 0.35\%$ であった。

6. CII 反応性サイトカインの解析

上記の通り、CII 存在下で 96 時間培養後、培養上清を回収した。培養上清中の各種サイトカイン濃度を LEGENDplex bead-based immunoassay を用いて測定した。20 μ l のアッセイバッファー、mixed capture beads、サンプルもしくはスタンダードを 96 well-plate 上で室温にて 2 時間混和した。ウォッシュバッファーで beads を洗浄し、20 μ l の detection antibody を加え、室温で 1 時間混和した。その後、20 μ l の PE 標識 streptavidin を加え、室温で 30 分混和した。ウォッシュバッファーで beads を洗浄し、サンプルもしくはスタンダードの beads を FACSVerse flow cytometer を用いて解析した。データは BioLegend 社が提供する付属のソフトウェアを用いて解析した。

7. 定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative real-time PCR: qRT-PCR)

細胞中の全リボ核酸 (ribonucleic acid: RNA) を Isogen 法で抽出した。抽出した RNA から PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) を合成した。Thermo Fisher Scientific 社の TaqMan gene expression assays として販売されているプライマーを用い、リアルタイム PCR システムとして QuantStudio3 を用いてリアルタイム PCR を施行した。各種遺伝子発現量は *gapdh* により標準化した。

8. ナイーブ CD4 陽性 T 細胞の単離

マウスの脾臓から細胞懸濁液を作製し、CD4+ CD62L+ T cell MACS cell solation kit を使用し、MACS を用いて negative selection でナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離した。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞の純度は $95.1 \pm 3.5\%$ であった。

9. Th17 細胞分化誘導

脾臓から単離した 2×10^5 ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を $2 \mu\text{g/ml}$ plate-bound anti-CD3 ϵ mAb, $1 \mu\text{g/ml}$ soluble anti-CD28 mAb, 2.5 ng/ml human TGF- β , 50 ng/ml マウス IL-6, 10 ng/ml マウス IL-23 存在下で 72 時間培養した。

10. 炎症関節に浸潤する細胞の単離

CII 免疫後 35 日目の関節炎を発症した足関節を $0.08 \text{ Wunsch unit/ml}$ Liberase と 37°C で 1 時間インキュベートした。関節周囲の筋組織や結合組織を手動的に除去し、関節包を切り開いた。関節包を液体培地で洗浄し、炎症関節に浸潤する細胞の懸濁液とした。

11. RNA sequencing

CII 免疫後 10 日目のマウスの所属リンパ節から MACS 法を用いて CD4 陽性 T 細胞を単離した。 1×10^4 CD4 陽性 T 細胞から TRIzol を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA 500 ng から NEBNext rRNA Depletion Kit を用いて rRNA を除去した。NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit を用いてライブラリー合成を行い、ライブラリーを

Illumina NextSeq500 を用いてシーケンスした。Ensemble gene annotation system を用いてリードをマッピングした。リードカウントは quantile 法を用いて標準化し、主成分分析、スキャッタープロット作製、ヒートマップ作製に用いた。また、Gene Ontology 解析は DAVID を用いて施行した。

シーケンスデータは DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録し、DRA accession number: DRA011788 から入手可能である。

12. 統計解析

統計解析は IBM SPSS statistics version 25 を用いて行った。データは平均値±標準誤差で提示した。群間差の検定には Welch の t 検定、Dunnet 検定、Log-rank 検定を用いた。 $P < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

第四章：結果

1. T-bet KO マウスにおける胸腺内の T 細胞発生の評価

T-bet 欠損により胸腺内での T 細胞発生に変化を来す可能性があり，胸腺細胞の分画を評価した．全腺細胞数，各細胞分画割合 (CD4 陰性 CD8 陰性細胞，CD4 陽性 CD8 陽性細胞，CD4 陽性 CD8 陰性細胞，CD4 陰性 CD8 陽性細胞) は WT マウス，T-bet KO マウスで同等であった (図 2). T-bet KO マウスを用いて，正常な T 細胞発生下での T-bet の CIA における解析が可能であると考えられた．

2. T-bet KO マウスにおける CIA の評価

CIA の病態における T-bet の役割を解析するため，WT マウス，T-bet KO マウスに CIA を誘導した．WT マウスと比較して，T-bet KO マウスでは CIA の重症度・発症率とも有意に増悪した (図 3)．病理組織学的には T-bet KO マウスの炎症関節において著明な炎症細胞浸潤や滑膜増成が見られ，関節全体に広範な骨糜爛が見られた (図 4)．また，T-bet KO マウスでは CII 特異的総 IgG 抗体価と CII 特異的 IgG1 抗体価が上昇していた．しかし，T-bet KO マウスでは CII 特異的総 IgG2c 抗体価は低下していた (図 5)．

以上の結果から T-bet は CIA において抑制的な役割を持つことが示された．

3. CII 免疫後の T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞によるサイトカイン産生評価

CIA は Th17 細胞により増悪する病態であり²⁵, T-bet KO マウスでは CII に対する Th17 応答が亢進する事で CIA の病態が増悪する可能性が考えられた. また, CII 免疫下において T-bet は CD11c 陽性樹状細胞にも発現する事から (図 6), CD11c 陽性樹状細胞に発現する T-bet が持つ CD4 陽性 T 細胞によるサイトカイン産生への影響についても評価を行った. WT マウス由来 CD4 陽性 T 細胞によるサイトカイン産生は CD11c 陽性樹状細胞の T-bet の影響を受けなかった. WT マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を WT マウス由来 CD11c 陽性樹状細胞と培養した場合と比較して, T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞による IFN γ や IL-10 産生は低下していたが, IL-17A, IL-17F, IL-22, TNF α といった Th17 細胞関連サイトカイン産生は亢進していた. WT マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を WT マウス由来 CD11c 陽性樹状細胞と培養した場合と比較して, T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞による IL-4 産生は T-bet KO マウス由来 CD11c 陽性樹状細胞と培養した場合にのみ亢進していた (図 7).

以上から CD4 陽性 T 細胞の T-bet は CII 反応性サイトカイン産生制御に重要で, 特に Th17 細胞関連サイトカイン産生を抑制する事が示唆された.

4. CII 免疫後の T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞のサブセット解析

Th17 細胞に加えて, 制御性 T 細胞^{26, 27} や濾胞性ヘルパー T 細胞^{28, 29} も CIA の病態に

において重要な役割を果たすため、CD4 陽性 T 細胞のサブセットの解析を行った。T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞で Th17 細胞関連サイトカイン産生が亢進する事と一致して、Th17 細胞の主要な転写因子である ROR γ t 発現が亢進していた (図 8)。しかし、CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞や CXCR5 陽性 ICOS 陽性濾胞性ヘルパー T 細胞の割合は同等であった (図 9-10)。また、ROR γ t 陰性 CD4 陽性 T 細胞における IL-17A 陽性細胞は WT マウス、T-bet KO マウスともに乏しく、同等であったが、ROR γ t 陽性 CD4 陽性 T 細胞においては、WT マウスと比較して、T-bet KO マウスで IL-17A 陽性細胞割合が増加していた (図 11)。

これらの結果から、T-bet は CII 免疫下において、ROR γ t の発現と機能を抑制し、Th17 細胞を特異的に抑制する事が示唆された。

5. CII 免疫後の T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現解析

T-bet は転写因子であり、CII 免疫下の T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現変化について解析を進める事とした。T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞において *tbx21*, *ifng*, *il10* 発現が低下していた。一方で、T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞において *rorc* や *il17a*, *il17f*, *il22* といった *rorc* の標的遺伝子発現は亢進していた。T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では *ccr6* や *ccl20* 発現も亢進していた。しかし、Th17 細胞分化に関連する *irf4*, *ahr*, *rora* 等の遺伝子群の発現レベルは同等で

あった (図 12).

6. T-bet の Th17 細胞分化における役割の解析

T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞は CII 免疫下で *in vivo* で Th17 応答が亢進する事が示され, T-bet が Th17 細胞分化を抑制している可能性が考えられた. ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における *rorc* や *il17a* 発現レベルは WT マウス, T-bet KO マウスで同等であった (図 13). Th17 条件で培養すると, WT マウスと比較して T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞の IL-17A 陽性率が亢進した. しかし, ROR γ t 陽性率は WT マウス, T-bet KO マウスで同等であった (図 14-15). この結果から, T-bet は Th17 細胞分化を抑制する事が確認された. また, ROR γ t 発現が二群間で同等であった事から, T-bet が ROR γ t 陽性 CD4 陽性 T 細胞からの IL-17A 産生を抑制する事を示した *ex vivo* の実験の結果と同様に, T-bet が ROR γ t の機能を抑制する可能性が示唆された.

7. cKO マウスにおける CIA と炎症関節局所の解析

CD4 陽性 T 細胞の T-bet の CIA における役割を評価するため, CD4-Cre マウスと T-bet^{fl/fl} マウスを交配し, T細胞特異的に T-bet を欠損する cKO マウスを作製し (図 16), CIA の評価を行った. T-bet^{fl/fl} マウスと比較して, cKO マウスでは CIA の重症度・発症率とも有意に増悪した (図 17). 炎症関節局所の CD4 陽性 T 細胞について, cKO マウスでは ROR γ t 陽性率が亢進し, IL-17A 産生も亢進していた. また, T-bet^{fl/fl} マウスの

CD4 陽性 T 細胞の T-bet 陽性率は $51 \pm 7.5\%$ であった (図 18). 以上から CD4 陽性 T 細胞の T-bet は関節炎原性 Th17 細胞抑制に重要である事が示された.

8. RNA-seq を用いた CII 免疫後の cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現解析

CII 免疫下において T-bet が CD4 陽性 T 細胞のトランスクリプトームに与える影響を解析するため, CII 免疫後の T-bet^{fl/fl} マウスと cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を用いて RNA-seq 法を用いた検討を行うこととした. 主成分分析により T-bet^{fl/fl} マウスと cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞は異なる遺伝子発現を呈する事が示された (図 19). T-bet により fold change 2.0 以上かつ false discovery rate adjusted *P* 値 0.05 未満を満たす 52 遺伝子が同定された. cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞で発現が亢進していた 29 遺伝子には Th17 細胞関連遺伝子が含まれ, 発現が低下していた 23 遺伝子には Th1 細胞関連遺伝子が含まれていた (図 20). 発現変動遺伝子を用いた Gene Ontology 解析では炎症応答, リンパ球遊走, IL-17 産生への濃縮が示された (図 21). Th17 細胞や Th1 細胞以外のサブセットにも重要な遺伝子群を含む遺伝子セット³⁰ を用いて作製したヒートマップでは, cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞で Th1 細胞関連遺伝子発現低下と Th17 細胞関連遺伝子発現亢進が見られた (図 22). 一方, Th2 細胞関連遺伝子群は二群間で同等であった (図 23). 以上から CD4 陽性 T 細胞における T-bet は Th17 細胞関連遺伝子発現を特異的に抑制する事が示された.

また, シークエンスデータを用いて既報³¹⁻³³にある Th17 細胞分化を制御する遺伝子

発現レベルを解析したが、T-bet^{fl/fl} マウスと cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞で有意な発現変動は見られなかった (図 24).

第五章：考察

T-bet は Th1 細胞分化の主要な転写因子であり, Th1 細胞に特徴的なサイトカインである IFN γ 産生を促進する¹¹. 既報では T-bet の過剰発現²² や IFN γ ¹⁸⁻²⁰ は CIA を抑制し, T-bet や IFN γ は関節リウマチの炎症と逆相関する¹⁶ 事が知られる. 本研究において, CD4 陽性 T 細胞中の T-bet は ROR γ t の発現と機能を抑制し, 関節炎原性 Th17 細胞の発生を抑制し, CIA を抑制する事が示された.

T-bet が関節炎を抑制する機序として, 1. Th17 細胞の抑制, 2. 自己抗体産生の抑制, 3. 制御性 T 細胞の増加, の 3 つの可能性を想定した. 既報によれば, CD4 陽性 T 細胞の CIA における役割はサブセット依存的であり, Th1 細胞¹⁸⁻²⁰ や制御性 T 細胞^{26, 27} は CIA を抑制するが, Th17 細胞²⁵ や濾胞性ヘルパー T 細胞^{28, 29} は CIA を促進する. 本検討では, T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では Th17 細胞の主要転写因子である ROR γ t 発現と Th17 細胞関連サイトカイン産生が亢進していた. 一方で, Th1 細胞関連の IFN γ に加えて IL-10 産生が低下していた. Type 1 regulatory T 細胞では, T-bet は *il10* promoter 近傍に結合し, IL-10 産生を促進する³⁴ 事が知られ, CII 反応性 IL-10 産生においても同様の機序が存在する可能性が考えられた. T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生プロファイルは T-bet が Th1 細胞分化や IFN γ 産生に重要で, かつ IFN γ は IL-17A を抑制する事で CIA を抑制するとした既報²⁰ とも整合する結果であ

った。また、Th17 細胞による IL-10 産生は、Th17 細胞の関与が指摘される実験的自己免疫性脳脊髄炎や、T cell adoptive transfer colitis の病態を抑制する^{35,36} 事が知られており、T-bet は CIA において、IL-10 産生を促進することで Th17 細胞の病原性も抑制する可能性が示唆された。実験的自己免疫性脳脊髄炎においては T-bet と Th17 細胞の病原性の関連が指摘される³⁷ が、T-bet 陽性 ROR γ t 陽性 CD4 陽性 T 細胞を欠く T-bet KO マウスで CIA が増悪する事から、CIA においては T-bet 陽性 ROR γ t 陽性 CD4 陽性 T 細胞の病原性は明らかでなかった。

CIA の重症度と相関するとされる CII 特異的 IgG 抗体価³⁸ は、T-bet KO マウスで高値であった。CII 特異的 IgG 抗体産生は Th17 細胞や濾胞性ヘルパー T 細胞により促進される^{29,39}。濾胞性ヘルパー T 細胞は T-bet により発生が抑制される⁴⁰ が、濾胞性ヘルパー T 細胞の割合は WT マウス、T-bet KO マウスで同等であった。また、CII 特異的 IgG サブクラスとして、T-bet KO マウスでは CII 特異的 IgG1 抗体価が上昇していたが、CII 特異的 IgG2c 抗体価は低下していた。CII 特異的 IgG1 抗体価は T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では Th17 細胞関連サイトカインに加えて、一部 Th2 細胞関連サイトカイン産生亢進が見られ、高値を呈したと考えられた⁴¹。IgG2c 抗体価は Th1 細胞により産生が促進される⁴² ため、T-bet KO マウスでは低値をきたしたと考えられた。なお、理由は未解明であるが、RNA-seq のシークエンスデータでは cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における Th2 細胞関連遺伝子発現亢進は見られなかった。RNA-seq のシーク

エンスデータは細胞培養系と異なり、1時点での遺伝子発現レベルの評価であることや、*in vivo* では CII 免疫で用いた完全フロイントアジュバントに含まれる結核死菌による、樹状細胞の Th2 サイトカイン産生を抑制する IL-12 産生^{43,44}により、T-bet による Th2 細胞関連遺伝子発現抑制が顕在化しなかった可能性は否定できていない。最後に、関節炎を抑制するサブセットである制御性 T 細胞割合は WT マウス、T-bet KO マウスで同等であった。T-bet KO マウスでは Th1 応答を抑制するとされる T-bet 陽性制御性 T 細胞⁴⁵が欠損すると考えられるが、T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では CII 反応性 IFN γ 産生は低下しており、T-bet KO マウスにおける CIA 増悪への関与は乏しいと考えられた。以上から、T-bet は CD4 陽性 T 細胞サブセットの分化を制御し、特に Th17 細胞を抑制する事で CIA を抑制する事が示唆された。

T-bet が Th17 細胞を抑制する時機、機序について考察を行う。T-bet KO マウス由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞で *rorc* や *il17a* 発現亢進が見られず、Th17 細胞分化が亢進した事から、T-bet は Th17 細胞分化プロセス開始以降に Th17 細胞分化を抑制すると考えられる。T-bet が Th17 細胞を抑制する機序として以下の 4 つの仮説について検討した。まず、T-bet が *il17a* 発現を直接抑制する仮説であるが、ROR γ t 陰性 CD4 陽性 T 細胞において T-bet は IL-17A 産生に影響を及ぼさず、その可能性は乏しいと考えられた。次は T-bet が *rorc* 発現を抑制する仮説である。CII 免疫後の所属リンパ節中の T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では *rorc* 発現亢進に加えて、標的遺伝子である *il17a*, *il17f*,

il22 発現^{31, 46, 47}が亢進していた。加えて、T-bet KO マウス由来 ROR γ t 陽性 CD4 陽性 T 細胞からの IL-17A 産生が亢進しており、T-bet は ROR γ t の機能も抑制する事が示唆された。in vitro Th17 細胞分化誘導系では T-bet による ROR γ t 発現抑制が確認されなかったが、in vitro 分化誘導系における T 細胞受容体刺激、IL-6、TGF- β による強力な ROR γ t 誘導シグナルにより、T-bet による ROR γ t 発現抑制が顕在化しなかった可能性が考えられた。第三に T-bet が *rorc* や *il17a* 発現を制御する遺伝子の発現レベルを制御する仮説が挙げられるが、RNA-seq のシーケンスデータからは *rorc* や *il17a* 発現変動を説明する遺伝子は同定されなかった。最後は他の細胞に発現する T-bet による細胞間相互作用を介して Th17 細胞が抑制される仮説である。当科の先行研究で T-bet 過剰発現マウスと T-bet 過剰発現 IFN γ KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では同程度に Th17 細胞分化が抑制された²³事から、CD4 陽性 T 細胞内部の T-bet が Th17 細胞分化抑制に重要である事が示唆される。以上から CD4 陽性 T 細胞内の T-bet は ROR γ t の発現と機能を抑制し、Th17 細胞を抑制する可能性が最も考えられた。本検討からは T-bet が ROR γ t の発現と機能を抑制する機序は同定されなかったが、T-bet は *rorc* や *il17a* 発現を制御する遺伝子の発現レベルではなく、機能を制御する可能性が示唆された。T-bet が機能制御する *rorc* や *il17a* 発現制御遺伝子として、RUNX1 が挙げられる⁴⁸。T-bet は RUNX1 と複合体を形成し、RUNX1 による *rorc* 発現亢進や、RUNX1 の ROR γ t と共役して *il17a* 発現亢進させる機能を阻害する事が知られ、本検討でみられた T-bet により ROR γ t の発現

と機能が抑制された事象の部分的な説明になりうると考えられる。

CD4 陽性 T 細胞中の T-bet の炎症関節局所での役割について考察を行う。CD4 陽性 T 細胞と CD11c 陽性樹状細胞を用いた培養実験結果から CD4 陽性 T 細胞中の T-bet が CII 反応性 IL-17A 産生に重要である事が明確に示された。CD4 陽性 T 細胞中の T-bet の炎症関節局所での役割を明らかにするための cKO マウスを用いた検討で、CIA が増悪する事を確認した。また、炎症関節局所において CD4 陽性 T 細胞の約半数が T-bet 陽性であり、cKO マウスの炎症関節中 CD4 陽性 T 細胞では ROR γ t 発現と IL-17A 産生が亢進していた。IL-17A は滑膜線維芽細胞からの CXCL2⁴⁹ や CCL20⁵⁰ 産生を促し、好中球⁵¹ や Th17 細胞⁵² を含む炎症細胞集簇を促進する。更に、Th17 細胞は NF- κ B ligand (RANKL) を発現し⁵³, IL-17A を介して破骨細胞や滑膜線維芽細胞からの RANKL 発現を誘導する⁵⁴。従って、本検討の結果から CD4 陽性 T 細胞中の T-bet は関節炎原性 Th17 細胞発生を抑制する事で、関節局所の炎症や骨破壊を抑制する事が示唆された。

本研究の限界について考察を行う。本研究では CD4 陽性 T 細胞に発現する T-bet の CIA と細胞内での役割に着目した解析を行ったが、CD4 陽性 T 細胞外に発現する T-bet の関節炎における役割は未解明である。CD11c 陽性樹状細胞中の T-bet は CD4 陽性 T 細胞からのサイトカイン産生に必須でない事を示したが、CD11c 陽性樹状細胞中の T-bet は IL-1 α , macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), thymus- and activation-related chemokine (TARC) の産生に関係する⁵⁵とされる。辺縁帯 B 細胞の

T-bet は IL-10 産生を促進し、CIA 抑制に関与する⁵⁶とされる。T-bet による自己免疫性関節炎制御機構の全体像解明には更なる検討が求められる。本研究では Cre-loxP システムを利用して、CD4 陽性 T 細胞に発現する T-bet の解析を行った。WT マウス、T-bet KO マウスの CIA と T-bet^{fl/fl} マウス、cKO マウスの CIA は異なる時期に施行した検討のため直接比較は不可能であるが、T-bet^{fl/fl} マウスは WT マウスと比較した場合、cKO マウスは T-bet KO マウスと比較した場合に CIA の発症率と重症度が軽度である可能性が考えられた。T-bet^{fl/fl} マウスや cKO マウスに存在する loxP 配列や cKO マウスに存在する Cre recombinase が CIA の病態に影響を与えた可能性は低いと考えられるが、現時点では否定は困難である。

総じて、CD4 陽性 T 細胞中の T-bet は ROR γ t の発現と機能を抑制し、関節炎原性 Th17 細胞の発生を抑制し、CIA を抑制すると考えられた (図 25)。T-bet-ROR γ t-Th17 細胞軸は自己免疫性関節炎の新規治療標的となりうる可能性が示唆された。

第六章：結論

CD4 陽性 T 細胞中の T-bet は ROR γ t の発現と機能を抑制し，関節炎原性 Th17 細胞の発生を抑制し，CIA を抑制した。

主要略字

APC: allophycocyanin
APC/Cy7: allophycocyanin /cyanin 7
BCL6: B-cell lymphoma 6
BSA: bovine serum albumin
CCP: cyclic citrullinated peptide
CIA: collagen-induced arthritis
CII: collagen type II
cDNA: complementary DNA
cKO: conditional knockout
DDBJ: DNA Data Bank of Japan
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
FCM: flow cytometry
FITC: fluorescein isothiocyanate
fl: flox
Foxp3: Forkhead box P3
GATA3: GATA binding protein 3
HLA: human leukocyte antigen
HRP: horseradish peroxidase
IFN: interferon
IL: interleukin
KO: knockout
mAb: monoclonal antibody
MACS: magnetic activated cell sorting
PBS: phosphate buffered saline
PE: phycoerythrin
PE/Cy7: phycoerythrin/cyanin 7
PerCP/cy5.5: peridinin chlorophyll/cyanin 5.5

PMA: phorbol myristate acetate

qRT-PCR: quantitative real-time PCR

RNA: ribonucleic acid

RNA-seq: RNA sequencing

ROR: retinoic acid-related orphan receptor

rRNA: ribosomal RNA

T-bet: T-box expressed in T cells

Tfh: T follicular helper

Th1: helper T type 1

Th2: helper T type 2

Th17: helper T type 17

TNF: tumor necrosis factor

Treg: regulatory T

WT: wild-type

謝辞

本研究を行うに当たり，ご指導下さいました住田孝之先生，松本功先生，近藤裕也先生に厚く御礼を申し上げます。また，日々の研究生活を支え，多くのアドバイスを頂きました臨床免疫学研究室の皆様に感謝申し上げます。

最後に，いつも支えてくれた大切な家族に感謝します。

出典

本学位論文では *Scientific Reports* 1–13 (2021) doi:10.1038/s41598-021-96699-5 に掲載された論文の内容を、上記論文中に記載のある Creative Commons Attribution 4.0 International License の規定に従って再利用している。

参考文献

1. Kojima, M. *et al.* Epidemiological characteristics of rheumatoid arthritis in Japan: Prevalence estimates using a nationwide population-based questionnaire survey. *Mod. Rheumatol.* **30**, 941–947 (2020).
2. Smolen, J. S., Aletaha, D., Grisar, J. C., Stamm, T. A. & Sharp, J. T. Estimation of a numerical value for joint damage-related physical disability in rheumatoid arthritis clinical trials. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1058–1064 (2010).
3. Rosenstein, E. D. & Caldwell, J. R. Trace elements in the treatment of rheumatic conditions. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **25**, 929–935 (1999).
4. Lipsky, P. E. Immunosuppression by D-penicillamine in vitro. Inhibition of human T lymphocyte proliferation by copper- or ceruloplasmin-dependent generation of hydrogen peroxide and protection by monocytes. *J. Clin. Invest.* **73**, 53–65 (1984).
5. Williams, H. J. *et al.* Comparison of low - dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. A Controlled Clinical Trial. *Arthritis Rheum.* **28**, 721–730 (1985).
6. Elliott, M. J. *et al.* Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**, 1105–1110 (1994).
7. Nielen, M. M. J. *et al.* Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis: A Study of Serial Measurements in Blood Donors. *Arthritis Rheum.* **50**, 380–386 (2004).
8. Okada, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506**, 376–381 (2014).
9. Klarenbeek, P. L. *et al.* Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 1088–1093 (2012).
10. Hirahara, K. & Nakayama, T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int. Immunol.* **28**, 163–171 (2016).
11. Szabo, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655–669 (2000).
12. Zheng, W. P. & Flavell, R. A. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* **89**, 587–596 (1997).

13. Ivanov, I. I. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* **126**, 1121–1133 (2006).
14. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *J. Immunol.* **198**, 981–985 (2017).
15. Johnston, R. J. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science (80-.)*. **325**, 1006–1010 (2009).
16. Kawashima, M. & Miossec, P. mRNA quantification of T-bet, GATA-3, IFN- γ , and IL-4 shows a defective Th1 immune response in the peripheral blood from rheumatoid arthritis patients: Link with disease activity. *J. Clin. Immunol.* **25**, 209–214 (2005).
17. Leipe, J. *et al.* Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 2876–2885 (2010).
18. Chu, C. Q., Song, Z., Mayton, L., Wu, B. & Wooley, P. H. IFN γ deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor V β 6 and V β 8 in arthritic joints. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 983–990 (2003).
19. Guedez, Y. B. *et al.* Genetic ablation of interferon- γ up-regulates interleukin-1 β expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain. *Arthritis Rheum.* **44**, 2413–2424 (2001).
20. Chu, C. Q., Swart, D., Alcorn, D., Tocker, J. & Elkon, K. B. Interferon- γ regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. *Arthritis Rheum.* **56**, 1145–1151 (2007).
21. Corneth, O. B. J. *et al.* Absence of interleukin-17 receptor signaling prevents autoimmune inflammation of the joint and leads to a Th2-like phenotype in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 340–349 (2014).
22. Kondo, Y. *et al.* Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 162–172 (2012).
23. Yokosawa, M. *et al.* T-bet over-expression regulates aryl hydrocarbon receptor-mediated T helper type 17 differentiation through an interferon (IFN) γ independent pathway. *Clin. Exp. Immunol.* **188**, 22–35 (2017).
24. Bendele, A. *et al.* Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: Comparison of efficacy in animal models with human clinical data. *Arthritis Rheum.* **42**, 498–506 (1999).
25. Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. Suppression of Immune Induction of Collagen-Induced Arthritis in IL-17-Deficient Mice. *J. Immunol.* **171**, 6173–6177 (2003).

26. Morgan, M. E. *et al.* CD25⁺ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 1452–1460 (2003).
27. Morgan, M. E. *et al.* Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25⁺ regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* **52**, 2212–2221 (2005).
28. Ryu, J. G. *et al.* Treatment of IL-21R-Fc control autoimmune arthritis via suppression of STAT3 signal pathway mediated regulation of the Th17/Treg balance and plasma B cells. *Immunol. Lett.* **163**, 143–150 (2015).
29. Leavenworth, J. W., Wang, X., Schellack, C., Spee, P. & Cantor, H. Mobilization of natural killer cells inhibits development of collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14584–14589 (2011).
30. Plank, M. W. *et al.* Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J. Immunol.* **198**, 2182–2190 (2017).
31. Ciofani, M. *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* **151**, 289–303 (2012).
32. Zhou, L. & Littman, D. R. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 146–152 (2009).
33. Stadhouders, R., Lubberts, E. & Hendriks, R. W. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J. Autoimmun.* **87**, 1–15 (2018).
34. Zhang, H. *et al.* An IL-27-Driven Transcriptional Network Identifies Regulators of IL-10 Expression across T Helper Cell Subsets. *Cell Rep.* **33**, 108433 (2020).
35. McGeachy, M. J. *et al.* TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* **8**, 1390–1397 (2007).
36. Sun, M. *et al.* ROR γ t Represses IL-10 Production in Th17 Cells To Maintain Their Pathogenicity in Inducing Intestinal Inflammation. *J. Immunol.* **202**, 79–92 (2019).
37. Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic T H 17 cells. *Nat. Immunol.* **13**, 991–999 (2012).
38. Cho, Y. G., Cho, M. La, Min, S. Y. & Kim, H. Y. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **7**, 65–70 (2007).
39. Mitsdoerffer, M. *et al.* Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14292–14297 (2010).
40. Nakayamada, S. *et al.* Early Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell-like Transition. *Immunity* **35**, 919–931 (2011).
41. Svensson, L., Nandakumar, K. S., Johansson, Å., Jansson, L. & Holmdahl, R. IL-4-deficient mice develop less acute but more chronic relapsing

- collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2944–2953 (2002).
42. Gracie, J. A. & Bradley, J. A. Interleukin-12 induces interferon- γ -dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1217–1221 (1996).
 43. Schnare, M. *et al.* Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **2**, 947–950 (2001).
 44. Kaplan, M. H., Sun, Y.-L., Hoey, T. & Grusby, M. J. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **382**, 174–177 (1996).
 45. Levine, A. G. *et al.* Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature* **546**, 421–425 (2017).
 46. Yang, X. O. *et al.* T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* **28**, 29–39 (2008).
 47. Zhang, F., Meng, G. & Strober, W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1297–1306 (2008).
 48. Lazarevic, V. *et al.* T-bet represses TH 17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat. Immunol.* **12**, 96–104 (2011).
 49. Fossiez, F. *et al.* T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* **183**, 2593–2603 (1996).
 50. Chabaud, M., Page, G. & Miossec, P. Enhancing Effect of IL-1, IL-17, and TNF- α on Macrophage Inflammatory Protein-3 α Production in Rheumatoid Arthritis: Regulation by Soluble Receptors and Th2 Cytokines. *J. Immunol.* **167**, 6015–6020 (2001).
 51. Huber, A. R., Kunkel, S. L., Todd, R. F. & Weiss, S. J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science (80-.)*. **254**, 99–102 (1991).
 52. Hirota, K. *et al.* Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.* **204**, 2803–2812 (2007).
 53. Sato, K. *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.* **203**, 2673–2682 (2006).
 54. Kotake, S. *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis Find the latest version : IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of

- osteoclastogenesis. **103**, 1345–1352 (1999).
55. Wang, J. *et al.* Transcription factor T-bet regulates inflammatory arthritis through its function in dendritic cells. *J. Clin. Invest.* **116**, 414–421 (2006).
 56. Huber, K., Sármay, G. & Kövesdi, D. MZ B cells migrate in a T-bet dependent manner and might contribute to the remission of collagen-induced arthritis by the secretion of IL-10. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2239–2246 (2016).

図表

図 1 背景の概要

CD4 陽性 T 細胞は系統特異的な転写因子を発現することで、各サブセットへ分化する。関節リウマチや CIA において Th1 細胞は関節炎保護的であり、Th17 細胞が病態悪化と関連する。

図 2 T-bet KO マウスにおける胸腺細胞数と胸腺細胞分画

WT マウス (n=4) と T-bet KO マウス (n=4) の全胸腺細胞数と胸腺細胞分画を FCM で評価した。上段に代表的 FCM 図、下段に全胸腺細胞数と各胸腺分画割合から作製した棒グラフを提示した。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した。

図 3 T-bet KO マウスにおける CIA の重症度と累積発症率

WT マウス (n=15) と T-bet KO マウス (n=14) に CIA を誘導し、重症度と累積発症率をプロットした。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は、重症度は Welch の t 検定、累積発症率は Log-rank 検定を用いて施行した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

図 4 T-bet KO マウスにおける CIA の病理学的評価

WT マウス (n=15) と T-bet KO マウス (n=14) に CIA を誘導し、初回 CII 免疫後 60 日目の両側足関節を用いてヘマトキシリン・エオジン染色を行い、滑膜炎スコア、骨糜爛スコアを付けた。左に代表的な病理所見、右に滑膜炎スコア、病理スコアから作製した棒グラフを提示した。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

図 5 T-bet KO マウス由来の血清における CII 特異的 IgG 抗体価

WT マウス (n=15) と T-bet KO マウス (n=14) に CIA を誘導し、初回 CII 免疫後 60 日目の血清を用いて CII 特異的総 IgG 抗体価, IgG1 抗体価, IgG2c 抗体価を測定した。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

図 6 各種免疫細胞における T-bet 発現

CII 免疫後 10 日目の WT マウス (n=4) の所属リンパ節中の各免疫細胞における T-bet 陽性率を FCM で評価した。上段に代表的 FCM 図、下段に各細胞分画における T-bet 陽性率から作製した棒グラフを提示した。データは平均±標準誤差で表記した。

図 7 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞による CII 反応性サイトカイン産生

CII 免疫後 10 日目の WT マウス (n=6) と T-bet KO マウス (n=6) の所属リンパ節中

CD4 陽性 T 細胞と CD11c 陽性樹状細胞を CII 存在下で培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は Dunnet 検定を用いて施行した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

図 8 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における T-bet, ROR γ t 発現

CII 免疫後 10 日目の WT マウス (n=6) と T-bet KO マウス (n=6) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞の T-bet, ROR γ t 発現を FCM で評価した。左に代表的な FCM 図, 右に T-bet, ROR γ t 陽性率から作製した棒グラフを提示した。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

図 9 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における制御性 T 細胞分画の評価

CII 免疫後 10 日目の WT マウス (n=6) と T-bet KO マウス (n=6) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞における CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞割合を FCM で評価した。左に代表的な FCM 図, 右に CD25 陽性 Foxp3 陽性細胞割合から作製した棒グラフを提示した。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した。

図 10 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における濾胞性ヘルパー T 細胞分画の評価

CII 免疫後 10 日目の WT マウス (n=8) と T-bet KO マウス (n=8) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞における CXCR5 陽性 ICOS 陽性細胞割合を FCM で評価した。左に代

表的な FCM 図, 右に CXCR5 陽性 ICOS 陽性細胞割合から作製した棒グラフを提示した. データは平均±標準誤差で表記した. 統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した.

図 11 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における IL-17A 産生評価

CII 免疫後 10 日目の WT マウス (n=6) と T-bet KO マウス (n=6) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞の ROR γ t 陰性分画, ROR γ t 陽性分画における IL-17A 陽性率を FCM で評価した. 左に代表的な FCM 図, 右に各分画における IL-17A 陽性率から作製した棒グラフを提示した. データは平均±標準誤差で表記した. 統計解析は Welch の t 検定を用いて施行し, Bonferroni 補正した (** $P < 0.001$).

図 12 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現レベル解析

CII 免疫後 10 日目の WT マウス (n=8) と T-bet KO マウス (n=8) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞における各遺伝子発現レベルを qRT-PCR 法で解析した. データは平均±標準誤差で表記した. 統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した.

図 13 T-bet KO マウス由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現レベル解析

WT マウス (n=7) と T-bet KO マウス (n=7) の脾臓から単離したナイーブ CD4 陽性 T 細胞における各遺伝子発現レベルを qRT-PCR 法で解析した. データは平均±標準誤差で表記した. 統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した (** $P < 0.01$).

図 14 T-bet KO マウス由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を用いた Th17 細胞分化誘導

WT マウス (n=6) と T-bet KO マウス (n=6) の脾臓から単離したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th17 条件で 72 時間培養し、IL-17A, ROR γ t, T-bet 陽性率を FCM で評価した。上段に代表的な FCM 図, 下段に IL-17A, ROR γ t, T-bet 陽性率から作製した棒グラフを提示した。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

図 15 T-bet KO マウス由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を用いた Th17 細胞分化誘導下における ROR γ t 陽性率の経時的推移

WT マウス (n=6) と T-bet KO マウス (n=6) の脾臓から単離したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th17 条件で 24, 48, 72 時間培養し、ROR γ t 陽性率を FCM で評価した。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した。

図 16 cKO マウスの各種免疫細胞における T-bet 発現

WT マウス, cKO マウス, T-bet KO マウスの脾臓の各免疫細胞における T-bet 陽性率を FCM で評価した。

図 17 cKO マウスにおける CIA の重症度と累積発症率

T-bet^{fl/fl} マウス (n=12) と cKO マウス (n=14) に CIA を誘導し、重症度と累積発症率

をプロットした。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は、重症度は Welch の t 検定、累積発症率は Log-rank 検定を用いて施行した (* $P < 0.05$).

図 18 cKO マウスの炎症関節中 CD4 陽性 T 細胞の解析

初回 CII 免疫後 35 日目時点で足関節に関節炎を発症した T-bet^{fl/fl} マウス (n=8) と cKO マウス (n=5) の足関節中 CD4 陽性 T 細胞における IL-17A, ROR γ t, T-bet 陽性率を FCM で評価した。上段に代表的な FCM 図、下段に IL-17A, ROR γ t, T-bet 陽性率から作製した棒グラフを提示した。データは平均±標準誤差で表記した。統計解析は Welch の t 検定を用いて施行した (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

図 19 主成分分析

CII 免疫後 10 日目の T-bet^{fl/fl} マウス (n=3) と cKO マウス (n=3) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞を用いて RNA-seq を施行し、quantile 法により標準化したリードカウントを用いて主成分分析を施行した。T-bet^{fl/fl} マウスは青, cKO マウスは赤で表示した。

図 20 スキャッタープロット

CII 免疫後 10 日目の T-bet^{fl/fl} マウス (n=3) と cKO マウス (n=3) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞を用いて RNA-seq を施行し、quantile 法により標準化したリードカウントを用いてスキャッタープロットを作製した。

図 21 Gene Ontology 解析

CII 免疫後 10 日目の T-bet^{fl/fl} マウス (n=3) と cKO マウス (n=3) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞を用いて RNA-seq を施行し, quantile 法により標準化したリードカウントを用いて DAVID による Gene Ontology 解析を施行した.

図 22 ヒートマップ

CII 免疫後 10 日目の T-bet^{fl/fl} マウス (n=3) と cKO マウス (n=3) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞を用いて RNA-seq を施行し, quantile 法により標準化したリードカウントを用いて Th1 細胞, Th2 細胞, Th17 細胞関連遺伝子を含むヒートマップを作製した.

図 23 cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における Th2 関連遺伝子発現

CII 免疫後 10 日目の T-bet^{fl/fl} マウス (n=3) と cKO マウス (n=3) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞を用いて RNA-seq を施行し, quantile 法により標準化したリードカウントを用いて Th2 細胞関連遺伝子発現をプロットした. 群間比較は edgeR 解析を用いた.

図 24 cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における *rorc* もしくは *il17a* 制御遺伝子発現

CII 免疫後 10 日目の T-bet^{fl/fl} マウス (n=3) と cKO マウス (n=3) の所属リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞を用いて RNA-seq を施行し, quantile 法により標準化したリードカウントを用いて *rorc* もしくは *il17a* 発現を制御する遺伝子の発現レベルをプロットした. 群間比較は edgeR 解析を用いた.

図 25 概念図

CD4 陽性 T 細胞に発現する T-bet は ROR γ t の発現と機能を抑制することで IL-17A 産生を抑制し, CIA を抑制する.

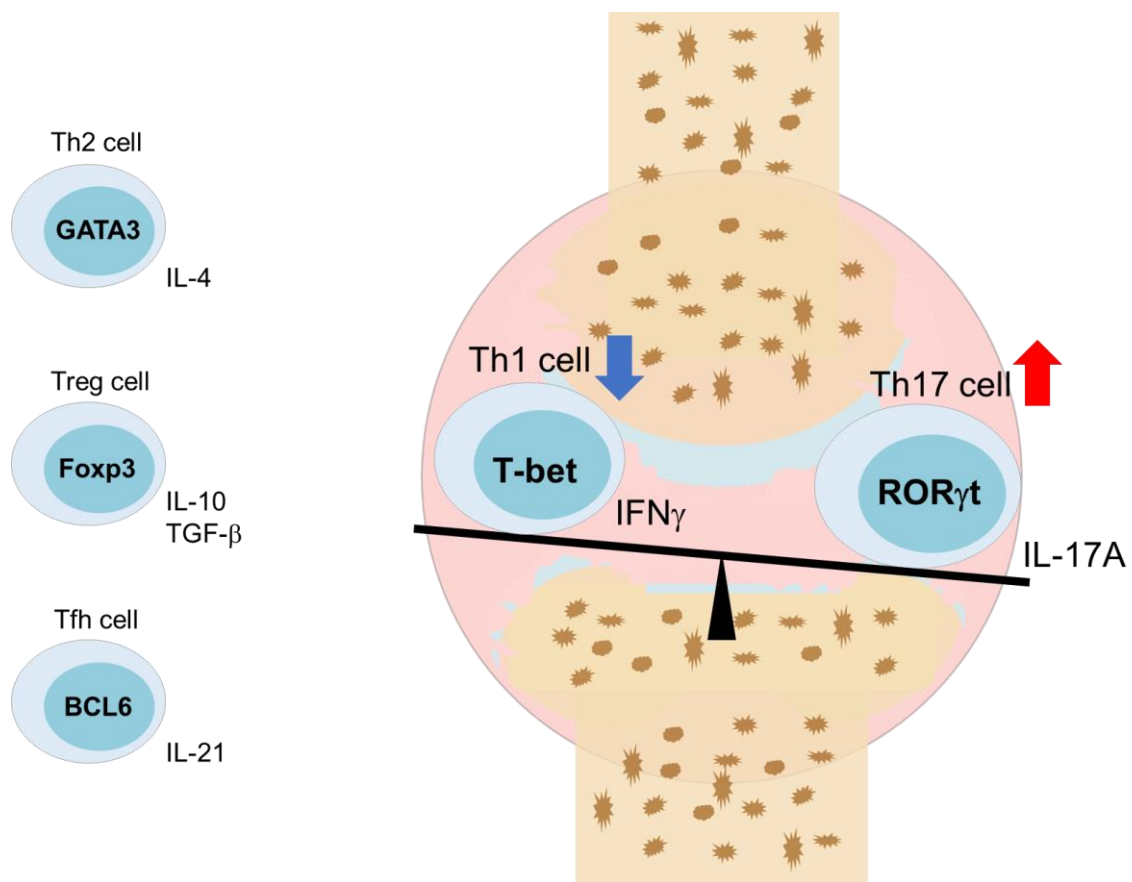


図 1 背景の概要

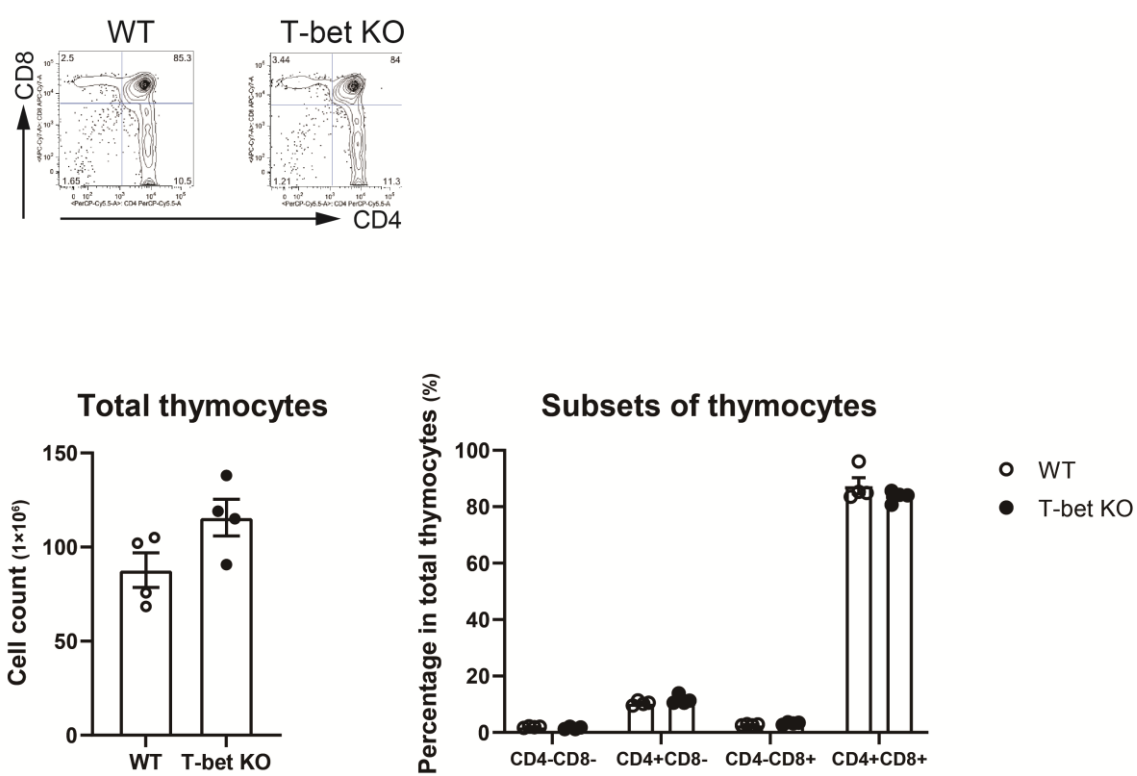


図2 T-bet KO マウスにおける胸腺細胞数と胸腺細胞分画

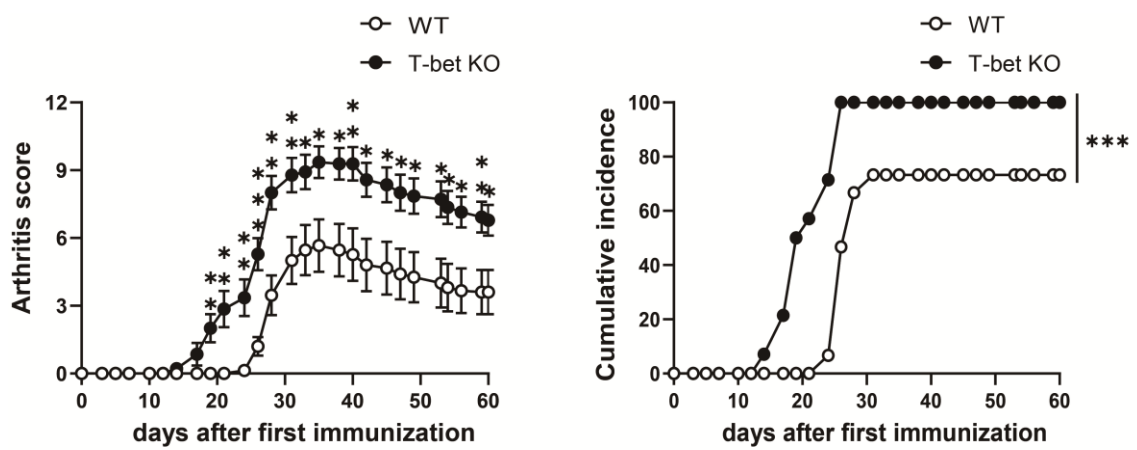


図3 T-bet KO マウスにおける CIA の重症度と累積発症率

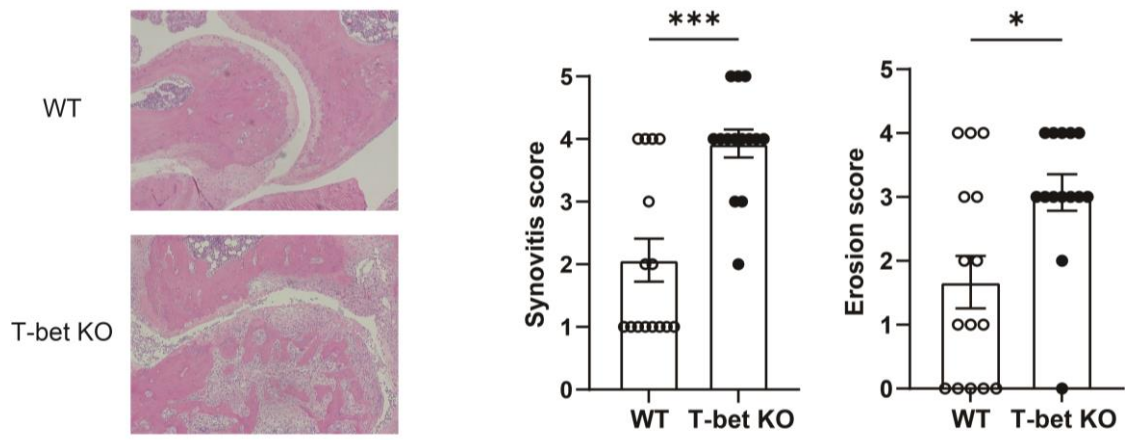


図4 T-bet KO マウスにおける CIA の病理学的評価

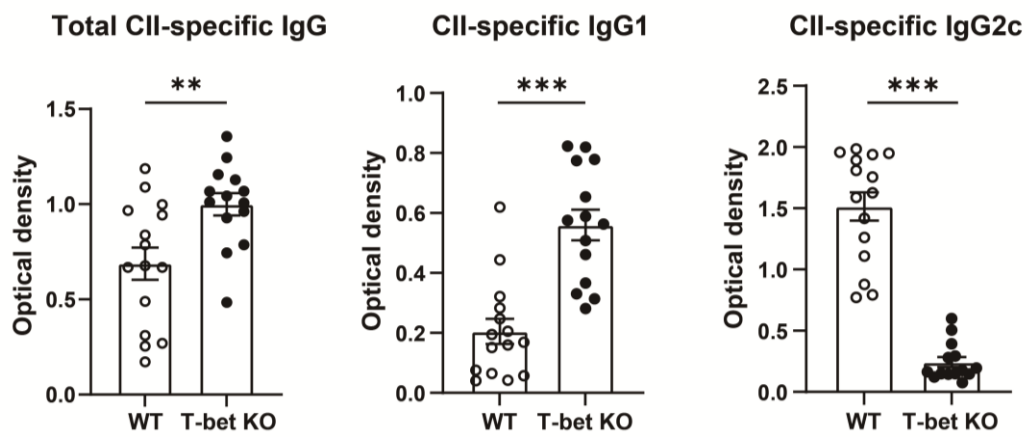


図5 T-bet KO マウス由来の血清における CII 特異的 IgG 抗体価

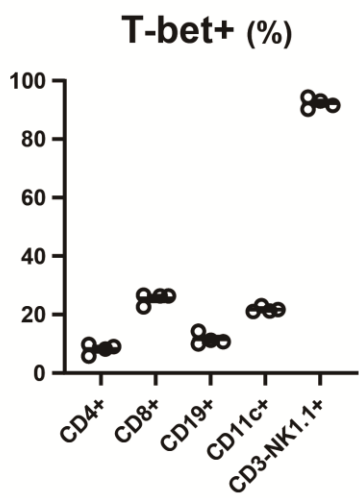
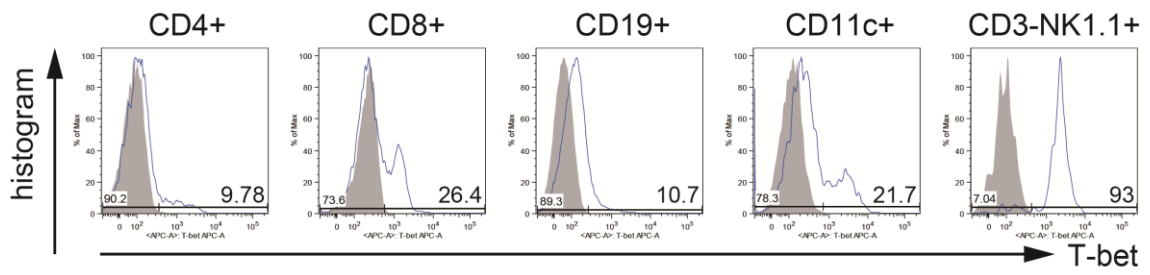


図6 各種免疫細胞における T-bet 発現

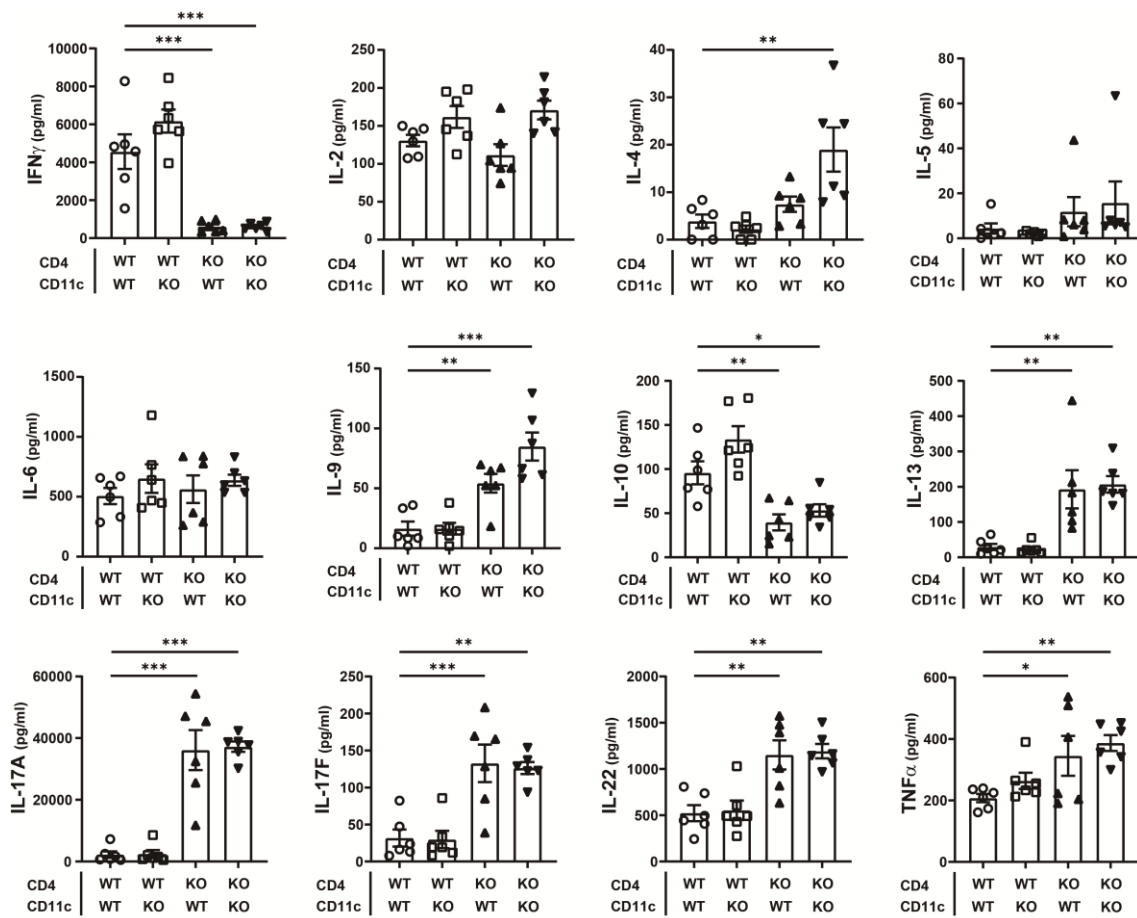


図7 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞による
CII 反応性サイトカイン産生

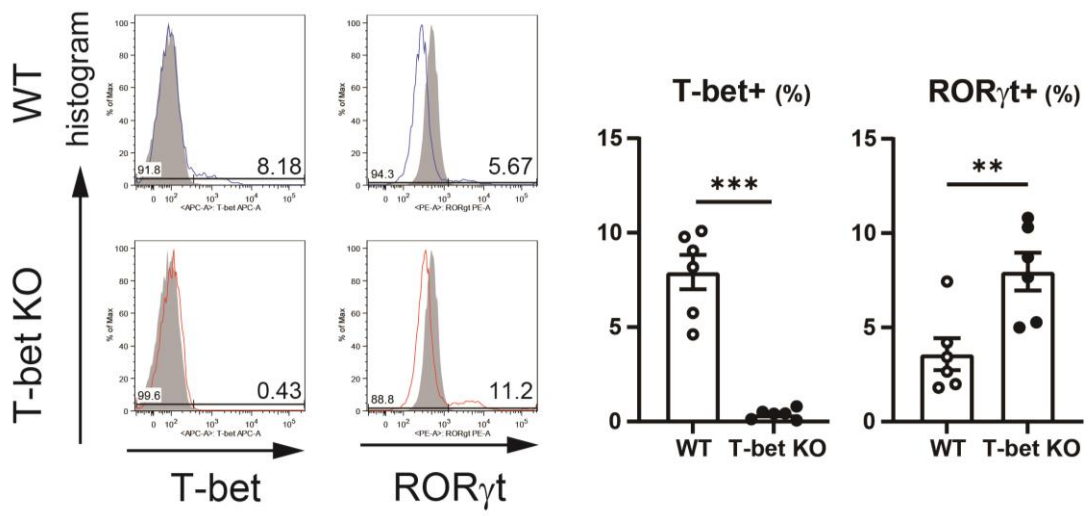


図8 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における

T-bet, ROR γ t 発現

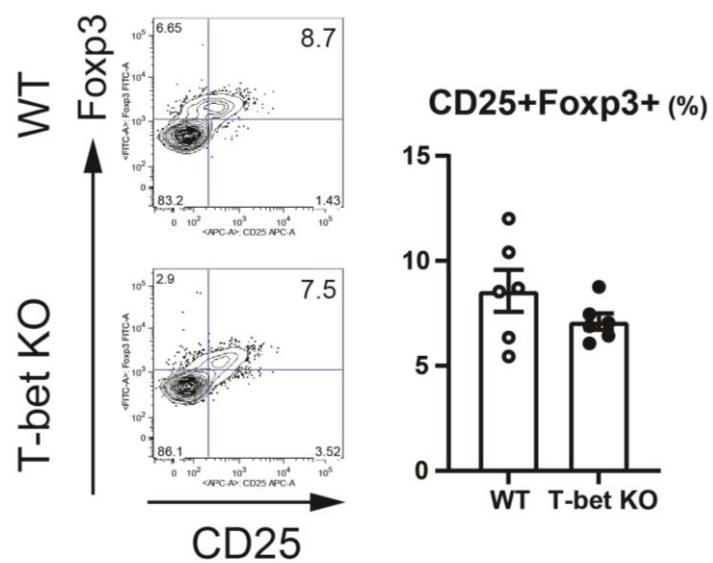


図9 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における
制御性 T 細胞分画の評価

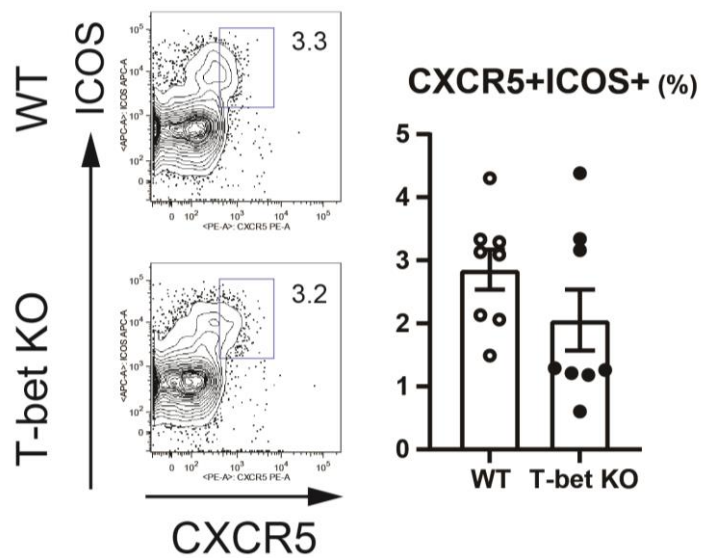


図 10 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における
濾胞性ヘルパーT 細胞分画の評価

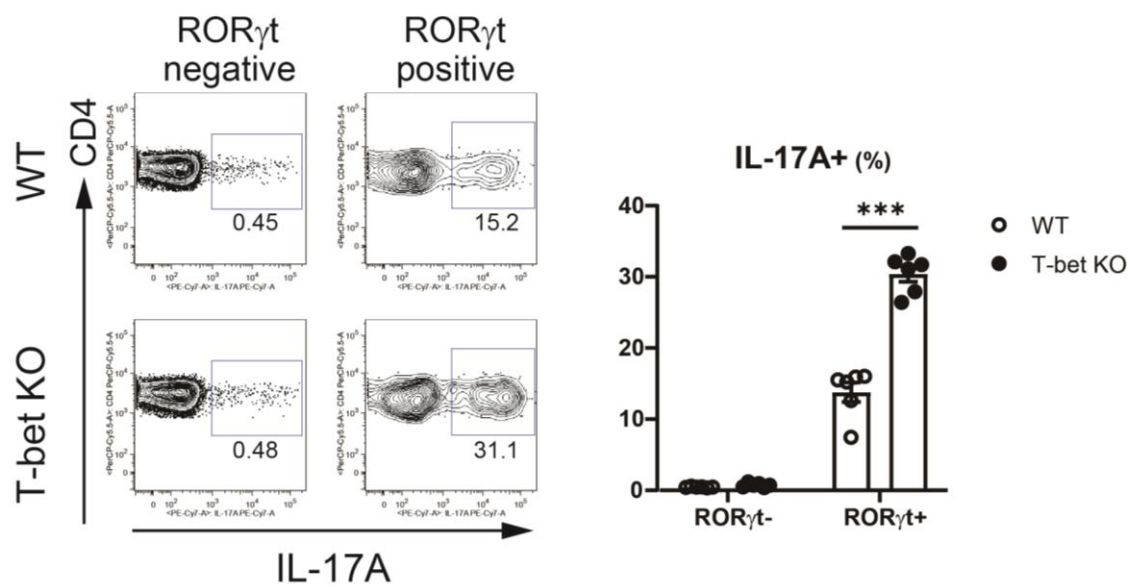


図 11 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における
IL-17A 産生評価

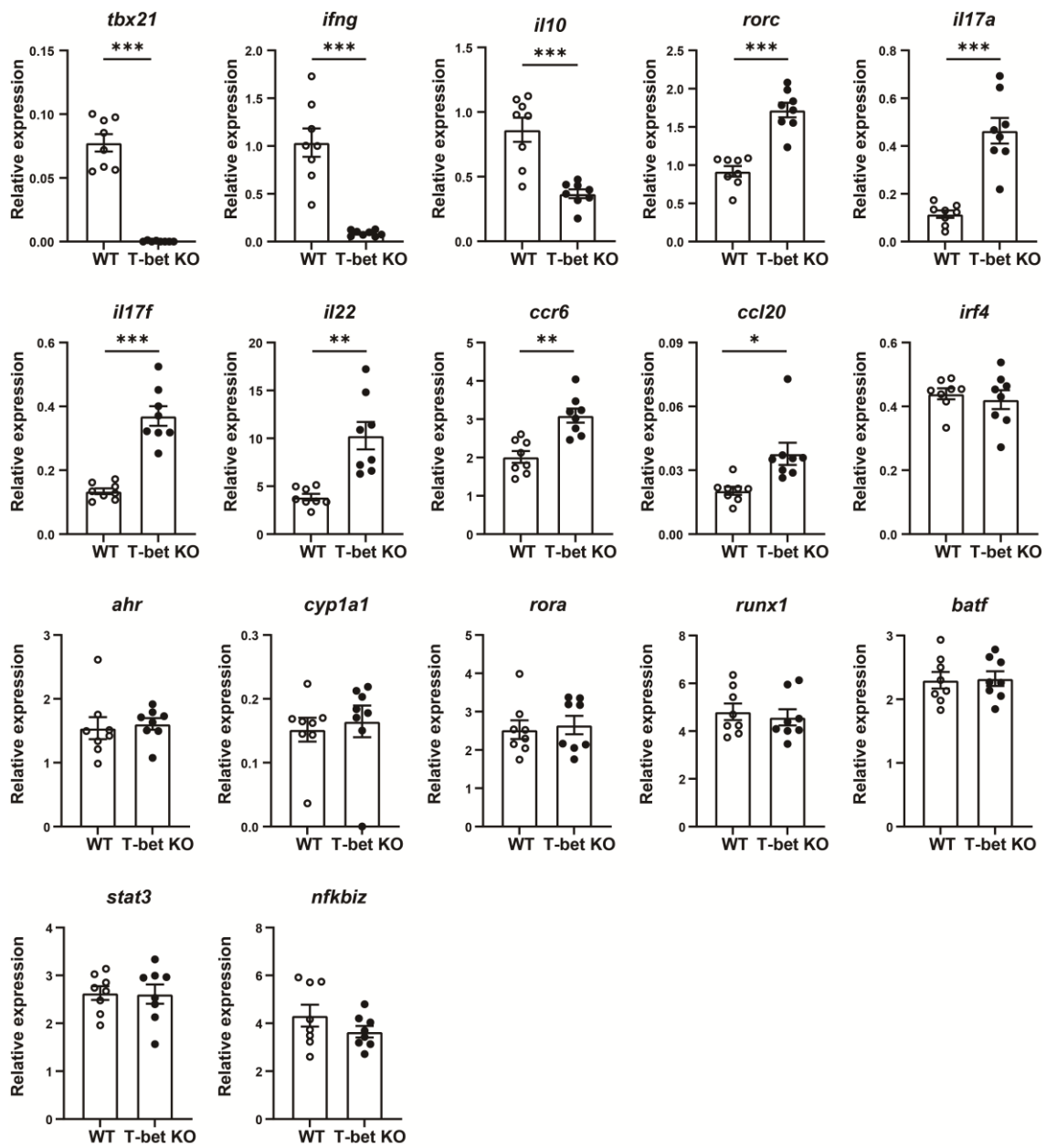


図 12 T-bet KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における
遺伝子発現レベル解析

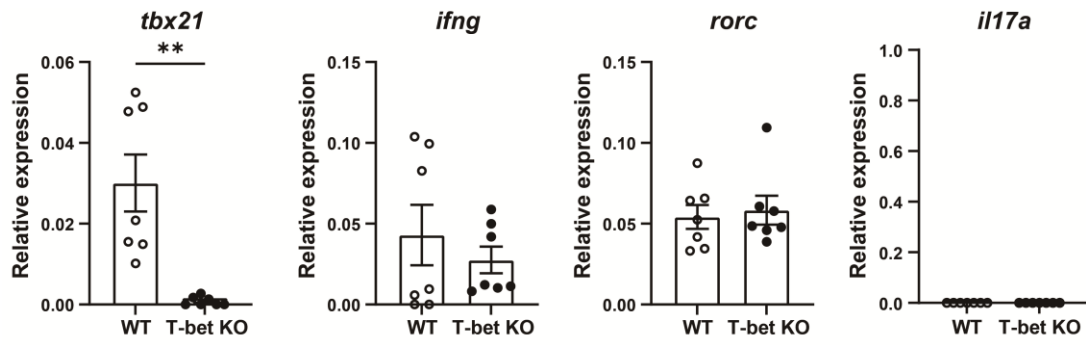


図 13 T-bet KO マウス由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における
遺伝子発現レベル解析

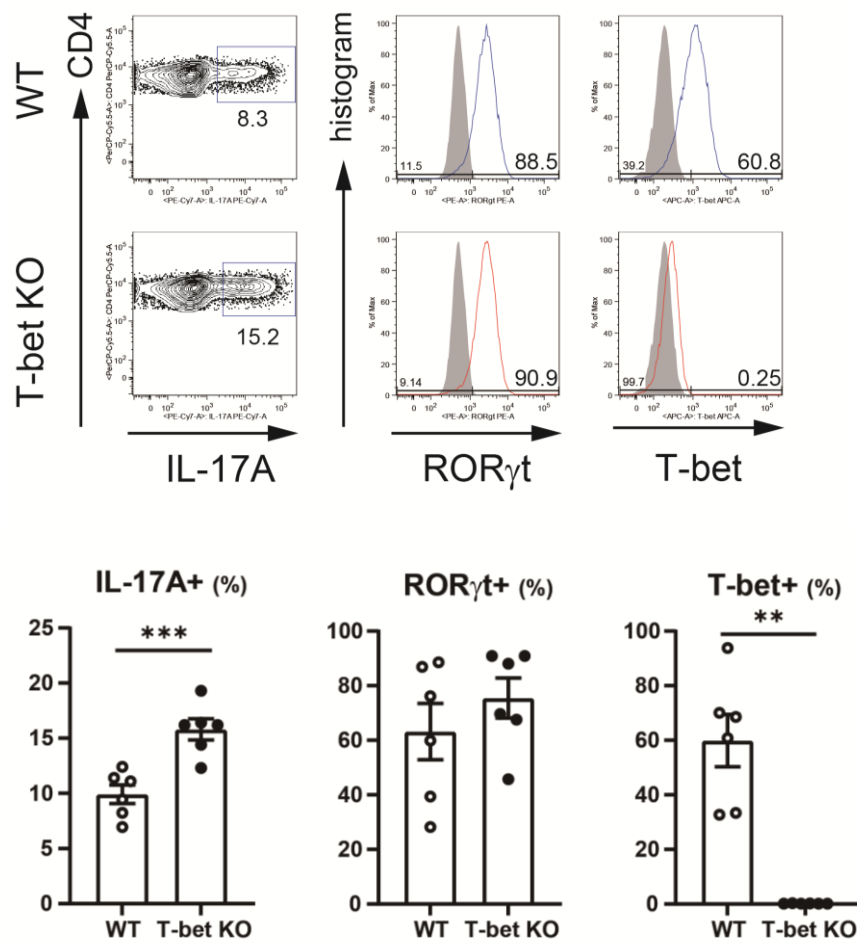


図 14 T-bet KO マウス由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を用いた Th17 細胞分化誘導

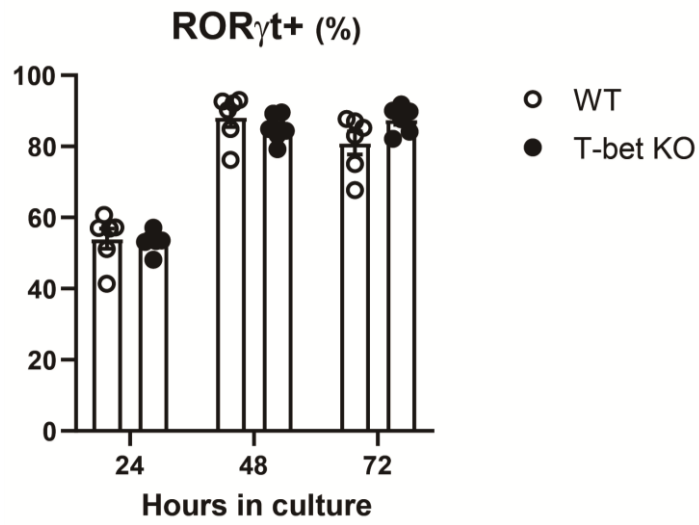


図 15 T-bet KO マウス由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を用いた
Th17 細胞分化誘導下における ROR γ t 陽性率の経時的推移

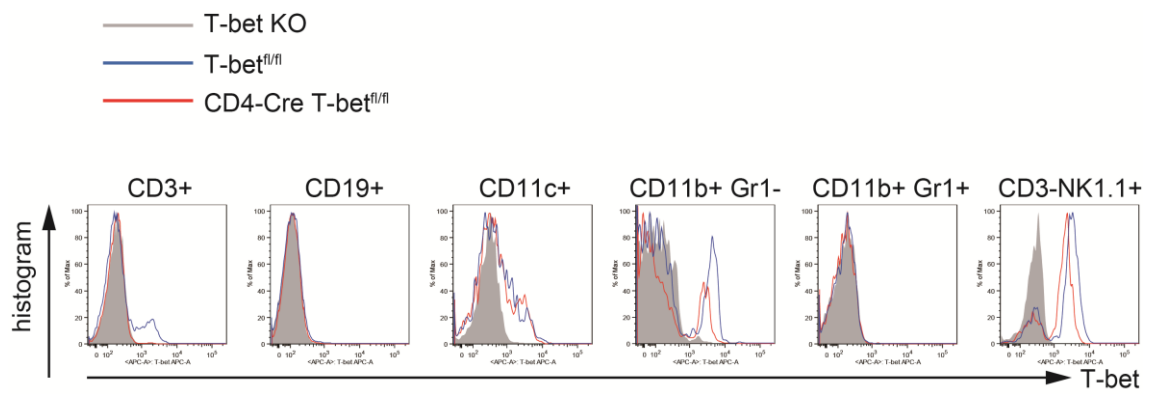


図 16 cKO マウスの各種免疫細胞における T-bet 発現

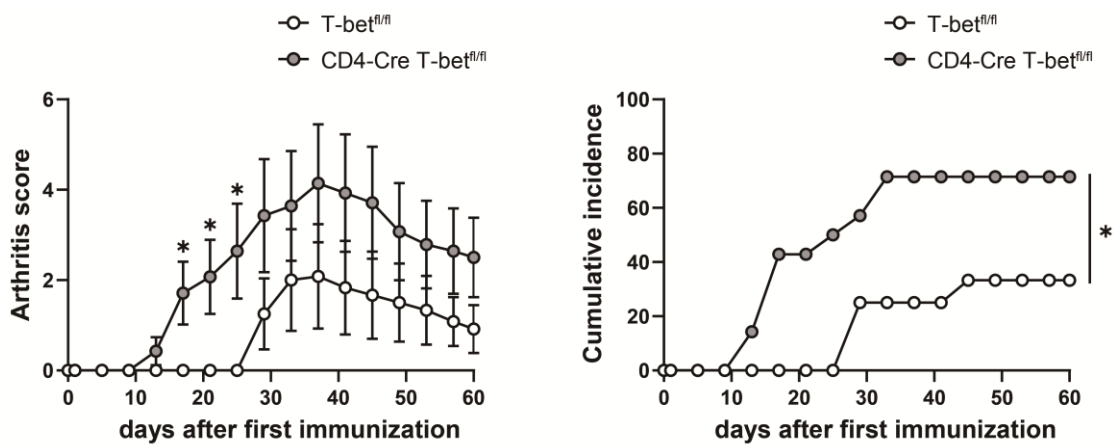


図 17 cKO マウスにおける CIA の重症度と累積発症率

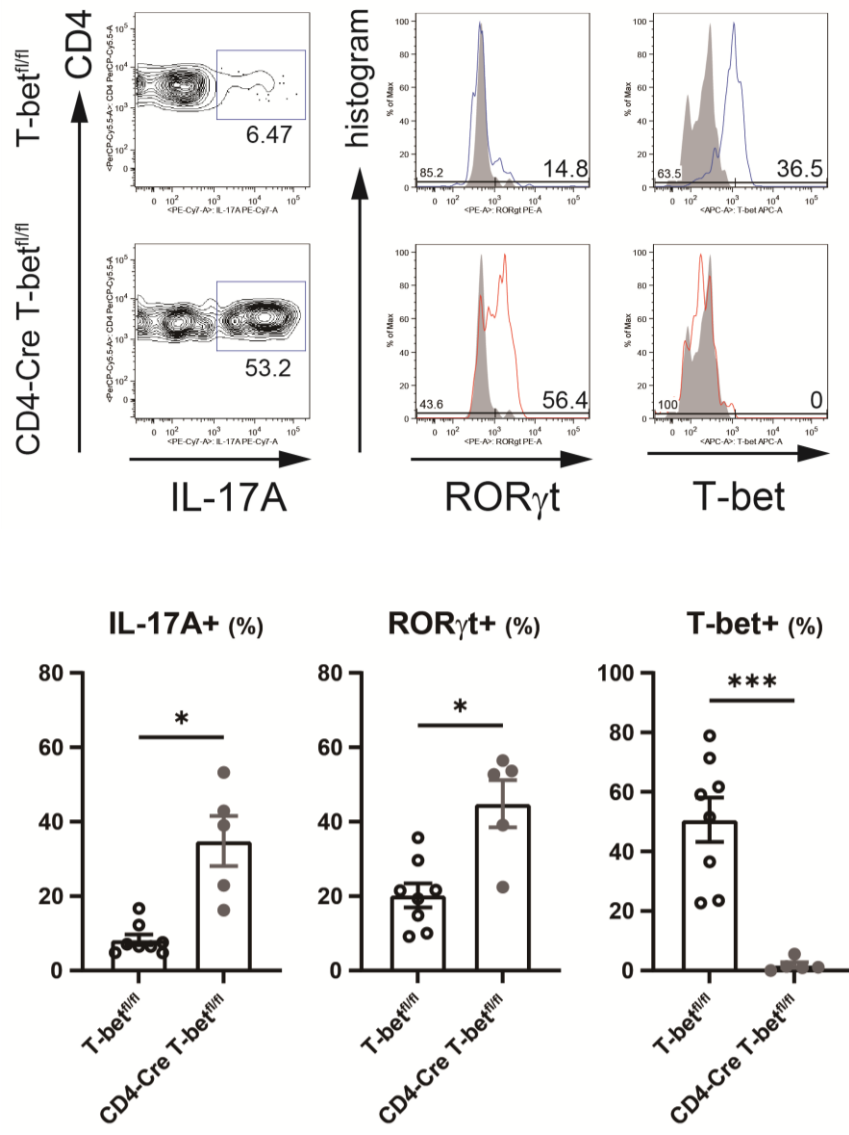


図 18 cKO マウスの炎症関節中 CD4 陽性 T 細胞の解析

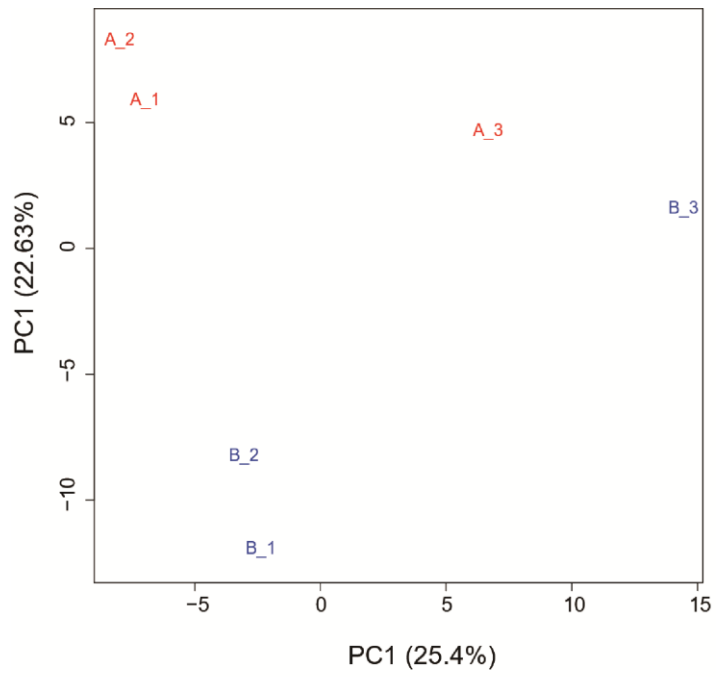


图 19 主成分分析

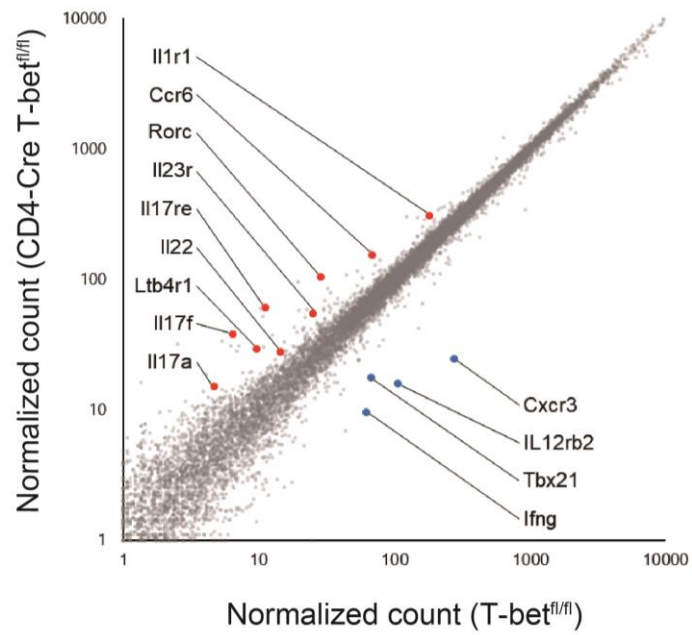


図 20 スキャッタープロット

Gene ontology term	Count	<i>P</i> value
Inflammatory response	9	8.7E-7
Chemotaxis	5	0.00014
Positive regulation of tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 11 production	2	0.0045
Lymphocyte migration	3	0.009
Interleukin-17 production	2	0.009

图 21 Gene Ontology 解析

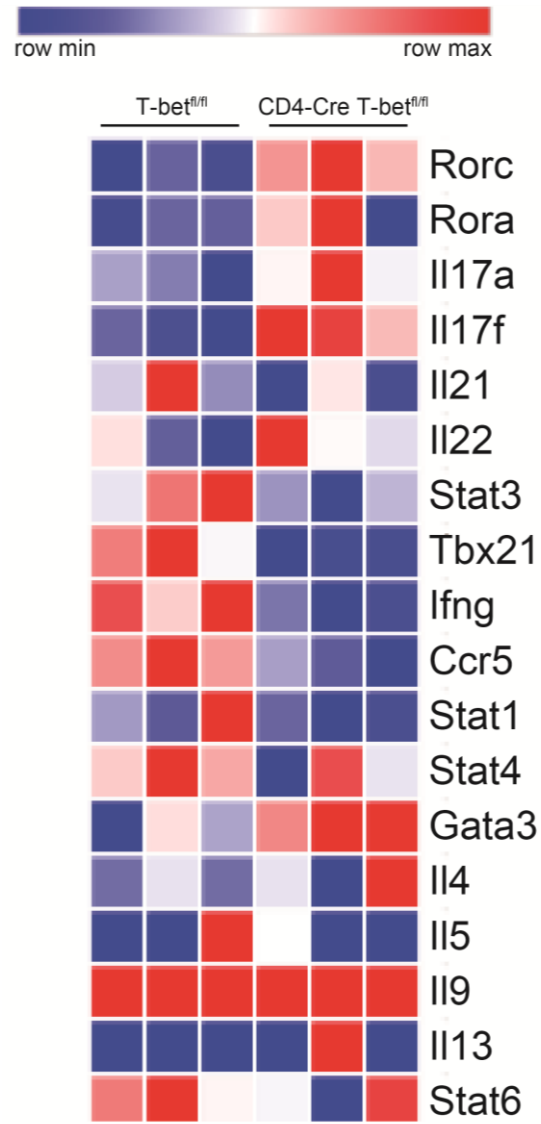


図 22 ヒートマップ

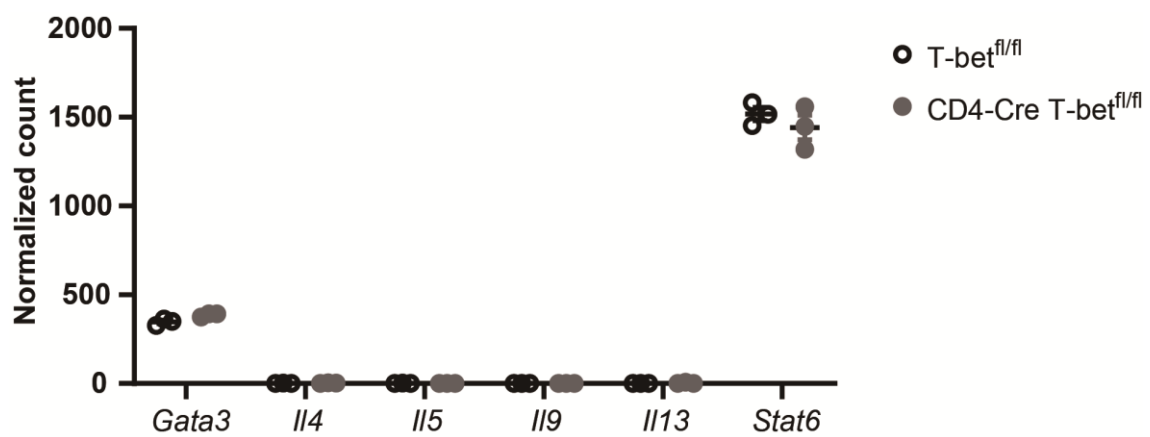


図 23 cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における
Th2 関連遺伝子発現

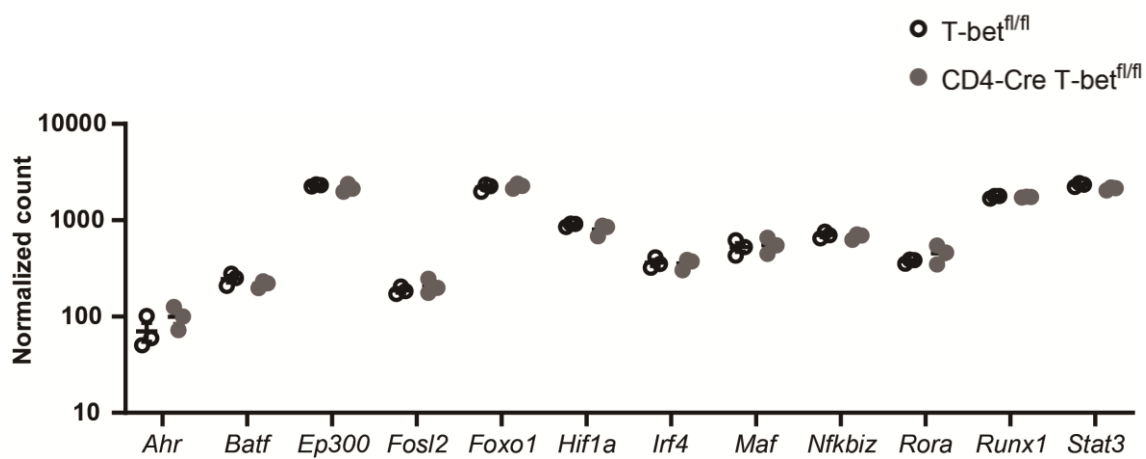


図 24 cKO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における
rorc もしくは *il17a* 制御遺伝子発現

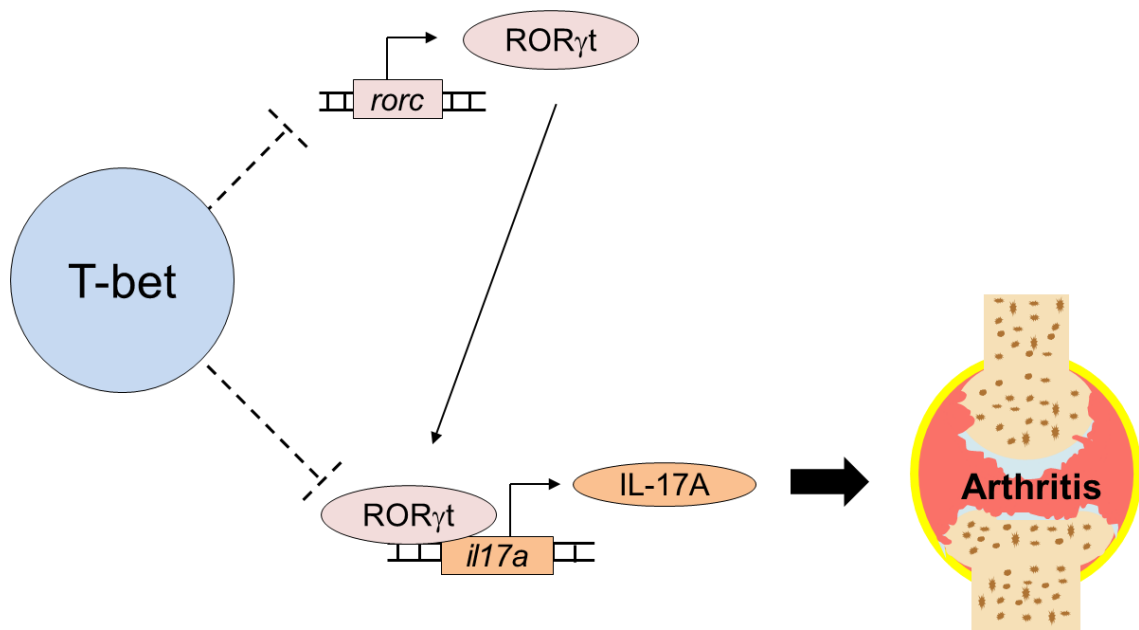


图 25 概念图