

氏名	金子 駿太
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博甲第 8697 号
学位授与年月	平成 30年 3月 23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	The ROR γ t-CCR6-CCL20 axis augments Th17 cells invasion into the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients (ROR γ t-CCR6-CCL20 経路は関節リウマチ患者の Th17 細胞の炎症局所への遊走を促進する)
主査	筑波大学教授 博士 (医学) 土屋 尚之
副査	筑波大学講師 博士 (医学) 栗田 尚樹
副査	筑波大学講師 博士 (医学) 田原 聡子
副査	筑波大学講師 博士 (医学) 渡辺 玲

論文の内容の要旨

金子駿太氏の博士学位論文は、ヒト関節リウマチにおける CD4 陽性 T 細胞サブセットを、特に Th17 細胞に注目し、過去の研究と異なり、Human Immunology Project Consortium による定義に基づいて解析を加えたものである。その要旨は以下のとおりである。

(背景)

関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)の病因、病態においては、CD4 陽性 T 細胞の関与が重要と考えられている。CD4 陽性 T 細胞は Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞や制御性 T 細胞などのサブセットに分類され、それぞれのサブセットで T-bet、GATA3、ROR γ t、Foxp3 など異なる転写因子が発現し、分化、制御に関わっている。著者はまず、これまでの RA の病因・病態研究における T 細胞サブセットの先行研究を概説し、これまで関節炎モデルマウスにおいて Th17 細胞の関与が報告されているが、ヒトの RA においては結果が必ずしも一致していないこと、T 細胞サブセットはマスター転写因子発現やサイトカイン産生により定義されることが多かったが、これらの可塑性が報告され、一つの転写因子やサイトカインで CD4 陽性 T 細胞を定義することは困難であることが明らかになり、また、T 細胞サブセットの定義が研究間で異なることが、研究者による成績の違いの原因になっている可能性があることと論じている。

近年、Human Immunology Project Consortium により、フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) により検出される細胞表面マーカーの発現により CD4 陽性 T 細胞を分類、標準化することで研究間の違いの解消をめざすことが提唱されている。そこで、著者は本研究において FCM を用いた細胞表面マーカー

一による CD4 陽性 T 細胞サブセットの分類を行い、その転写因子の発現が RA の病態へ及ぼす影響を解析している。

(方法)

著者は本研究において、筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会において審査され、承認を受けた研究計画に則り、RA 患者 19 人、変形性関節症(osteoarthritis, OA)患者 12 人、健常対照群(healthy controls, HC)16 人についての解析を施行している。RA 患者は発症半年未満で、無治療の患者が解析されている。筆者は、被験者より得られた末梢血や滑液から単離された CD4 陽性細胞を FCM により解析し、CXCR5⁻/CD45RA⁻を Th 細胞、CXCR5⁻/CD45RA⁻/CXCR3⁺/CCR6⁻を Th1 細胞、CXCR5⁻/CD45RA⁻/CXCR3⁻/CCR6⁻を Th2 細胞、CXCR5⁻/CD45RA⁻/CXCR3⁻/CCR6⁺を Th17 細胞 CXCR5⁻/CD45RA⁻/CXCR3⁺/CCR6⁺を CXCR3⁺/CCR6⁺細胞と定義して解析している。

著者は各サブセットを抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体存在下で 96 時間培養し、上清中の各種サイトカインを測定している。また血清、滑液中の CXCL9 及び CXCL10、CCL20 を測定している。さらに、Th 細胞のケモカイン (CXCL9、CXCL10、CCL20) に対する遊走能を transwell システムを用いて検討している。

(結果)

著者はまず、細胞表面マーカーを用いて FCM により HC 末梢血 CD4 陽性細胞を Th サブセットに分類し、サブセット特異的な転写因子、サイトカインの発現を確認することにより、細胞表面マーカーによる分類の妥当性を確認している。次に、RA 患者と OA 患者について同様の解析を行い、末梢血 Th サブセットの割合については 3 群間で有意差を認めなかったものの、RA 患者の Th17 細胞における ROR γ t 発現と CCR6 発現が有意に亢進していること、これらは有意な正の相関を示し、ROR γ t 陽性細胞は陰性細胞に比べ有意に CCR6 発現が亢進していることを見出している。著者はさらに、分離した各 Th サブセットを抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体存在下で培養し、上清中の IFN γ 、IL-4、IL-17 を比較し、3 群間でいずれの Th 細胞サブセットにおいても有意差は検出されないことを示している。

次に著者は、RA の末梢血および滑液中の Th 細胞を比較し、滑液中の Th17 細胞の割合が末梢血に比べて有意に増加し、Th1 細胞が有意に減少していることを見出している。著者は、この知見に基づき、炎症局所への Th17 細胞の遊走能を検討している。Th1 細胞については、特異的な細胞表面マーカー CXCR3 のリガンドである CXCL9 や CXCL10 に対する遊走能は 3 群間で有意な差がなかったが、Th17 細胞では CCR6 のリガンドである CCL20 に対する遊走能が RA 患者で有意に亢進していることを示している。また、RA 患者の滑液中の CXCL10 と CCL20 濃度が、RA 血清、HC 血清、OA 血清と滑液と比較して有意に増加していることを示している。

最後に著者は、RA に対する治療による Th 細胞の細胞表面マーカーや転写因子発現の変化を解析するために、7 例について治療前と治療開始後 24 週時点での比較を行い、治療前後での Th サブセットの割合については差が見られなかったが、Th17 細胞における ROR γ t および CCR6 発現は有意に低下したことを見出している。

(考察)

先行研究では、RA 末梢血中の Th17 細胞の増加を示す報告が多いが、本研究では有意な増加は認められなかった。この違いの理由として、著者は、本研究では発症半年以内の早期の無治療かつ抗 CCP 抗体陽性の患者のみを解析したこと、Th 細胞を細胞表面マーカーに基づいて定義したことを可能性としてあげている。

本研究において、RA 患者末梢血 Th17 における ROR γ t、CCR6 の発現亢進が認められたのに対し、IL-17 産生については OA、HC との差が認められなかったことについて、著者は、これらの知見は、RA では CCR6 の遺伝子多型が発症に関連することや、ヒト RA に対して抗 IL-17 抗体や抗 IL-17 受容体抗体の有効性が乏しいことと矛盾せず、ROR γ t-CCR6 経路がより強く RA の病態に関与している可能性を示唆するもの

と考察している。

著者は、これらの結果から、RA 患者の末梢血における Th17 細胞の CCR6 と ROR γ t 発現の亢進と滑液中の CCL20 の上昇が、Th17 細胞の炎症関節での集積に寄与し、RA の病態形成に重要な役割を有する可能性を提唱している。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は近年、Human Immunology Project Consortium により提唱されている、細胞表面マーカーにより標準化された定義を本研究に適用して RA の Th サブセットを詳細に解析し、先行研究において報告されてきた RA の末梢血における Th17 細胞の増加、IL-17 産生増加は認められないことを示すとともに、滑液における Th17 細胞が増加していることを示した。著者はさらにその分子機構について解析を進め、Th17 における転写因子 ROR γ t および CCR6 発現の亢進と、そのリガンドである CCL20 の滑液における増加により、Th17 細胞が炎症組織である関節内へ遊走したことに基づくものであるとするモデルを提唱している。本研究は、ヒトリンパ球の解析に基づき、RA の病態における ROR γ t-CCR6-CCL20 経路の重要性を新たに示した研究として、高く評価される。

平成 29 年 12 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。