

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08929

研究課題名(和文) 抗DNA抗体は生細胞に結合/侵入して全身性エリテマトーデスの病態形成に関わるか？

研究課題名(英文) Do anti-DNA antibodies play a role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus by binding/entering live cells?

研究代表者

窪田 哲朗 (Kubota, Tetsuo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90205138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、SLEで特異的に産生される抗DNA抗体について、病態形成上の役割を明らかにすることを目的として実施された。リン脂質とDNAの両方と交差反応するモノクローナル抗体WB-6は、細胞表面のDNAに結合して単球の細胞内にDNAと共に取り込まれ、細胞内のDNAセンサーを刺激して組織因子の発現を誘導し、血栓形成傾向をもたらすことが示唆された。一方、リン脂質と交差反応しないモノクローナル抗体2C10は、やはり単球などの細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれたが、その結果として全身性エリテマトーデスにおいて産生が亢進していることが知られている種々のサイトカインの産生を誘導することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、抗DNA抗体の病態形成上の役割を明らかにすることを目的として実施された。リン脂質と交差反応するモノクローナル抗体WB-6は、細胞表面のDNAに結合して単球の細胞内に取り込まれ、細胞内のDNAセンサーを刺激して組織因子の発現を誘導した。一方、リン脂質と交差反応しない抗体2C10は、やはり単球などの細胞内に取り込まれたが、その結果、全身性エリテマトーデスにおける産生亢進が知られている炎症性サイトカインの産生が誘導された。抗DNA抗体と言っても、その詳細な特異性の違いによって、誘導される病態も大きく異なることが観察され、今後の病態形成機構の研究に有用な知見を提供することができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the pathogenic role of anti-DNA antibodies which are produced specifically in systemic lupus erythematosus (SLE). A monoclonal antibody WB-6 was demonstrated to cross-react with beta-2-glycoprotein I and DNA. We found it binds to cell surface DNA, and enters live monocytes accompanying DNA, which results in activation of intracellular DNA sensors to induce expression of tissue factor. These results suggest a novel mechanism in pathogenesis of antiphospholipid syndrome accompanied by SLE. On the other hand, another monoclonal anti-DNA antibody 2C10, which is specific to double-stranded DNA and does not cross-react with beta-2-glycoprotein I, also entered live monocytes by endocytosis. As a result, it induced secretion of several proinflammatory cytokines which is known to be elevated in SLE via activation of the TLR9 and AIM2 signaling pathways. These results established a simple and useful assay system to reproduce a pathological state resembling SLE.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：抗DNA抗体 全身性エリテマトーデス エンドサイトーシス 抗リン脂質抗体症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 膠原病における抗核抗体の多様性と疾患特異性

膠原病患者血清中には細胞の核の様々な成分と反応する抗核抗体が存在し、臨床検査では間接蛍光抗体法や ELISA 法で検出されている。抗体が認識する抗原は疾患ごとに異なり、たとえば全身性エリテマトーデス(SLE)に特異性が高いものは抗 DNA 抗体と抗 Sm 抗体である。他の膠原病においても、混合性結合組織病では抗 RNP 抗体、びまん型の強皮症では抗トポイソメラーゼ I 抗体、限局型の強皮症では抗セントロメア抗体など、種々の抗核抗体の検出が診断の参考に用いられている。しかし、各疾患との強い相関性にもかかわらず、これらの抗体が病態形成にどのように関わっているかについては充分解明されていない。

### 2) SLE の病態の多様性

SLE は皮疹、漿膜炎、血管炎、関節炎、糸球体腎炎、中枢神経症状、血球減少など、症例ごとに異なる多彩な病態を呈することが特徴であり、従来の抗 DNA 抗体や抗 Sm 抗体の検出等による疾患診断のみでは不十分で、病態診断が重要となる。また、SLE はしばしば抗リン脂質抗体症候群を合併するが、その場合にはカルジオリピン $\beta$ 2-glycoprotein-I(CL- $\beta$ 2GPI)と反応する抗体の存在が血栓症と相関することが知られている。

### 3) SLE における抗 DNA 抗体の病態形成上の役割に関する研究動向

抗 DNA 抗体と DNA の免疫複合体は、単球の NLRP3 インフラマソームを活性化して、IL-1 $\beta$ 産生を誘導する(Shin, et al. J Immunol 2013)、糸球体の $\alpha$ -actinin と交差反応する抗 DNA 抗体サブセットが腎炎を起こす(Deocharan, et al. J Immunol 2002)、神経伝達に関わる NMDA レセプターと交差反応する抗 DNA 抗体サブセットが精神症状を起こす(Kowal, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2006)など、抗 DNA 抗体の病態形成上の役割を示唆する研究結果が報告されている。

私たちは、SLE の T 細胞を刺激すると IFN $\gamma$ を多量に分泌して、単球に多量の BAFF(B 細胞活性化因子)を産生させること、同じ濃度の IFN $\gamma$  に対して、SLE の単球はより多くの BAFF を産生することなどを発表してきた(Harigai, et al. J Immunol 2011)。BAFF は自己抗体産生 B 細胞の生存を助長するサイトカインである。SLE の単球が BAFF を産生しやすい原因は解明されていないが、私たちは、単球系細胞株を抗 DNA 抗体の存在下で培養すると、BAFF mRNA の発現が誘導されることを見出した。また、CL- $\beta$ 2GPI 複合体と交差反応する抗 DNA 抗体が単球を活性化して組織因子の発現を誘導し、独自に開発した in vivo モデルで血栓形成傾向をもたらすことも観察していた(Nishimura, et al. J Nephropathology 2013)。

## 2. 研究の目的

以上のように、SLE の様々な病態の形成に抗 DNA 抗体が関わっていることを示唆する結果が主に海外から散発的に報告されており、また私たちも SLE の単球などが抗 DNA 抗体の作用によって活性化することを観察していたが、いずれにしても抗 DNA 抗体のサブセット、または抗 DNA 抗体の免疫複合体と、細胞との作用様式が不明であった。したがって、本研究はどのような抗 DNA 抗体が、どのような細胞に結合し、さらには細胞内に取り込まれて、細胞の機能にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的として計画された。

### 3. 研究の方法

- 1) 種々の抗 DNA 抗体と、種々の細胞を用いて、細胞膜に結合するのか、あるいはさらに細胞内に取り込まれるのかを、免疫組織化学的方法と電子顕微鏡を用いて形態学的に検討する。
- 2) 抗 DNA 抗体と細胞との結合部位や、取り込み経路を明らかにするために、種々のアゴニスト、アンタゴニスト等の効果を、フローサイトメトリーで定量的に検討する。
- 3) 抗体の結合または取り込みが、細胞の機能や生存に及ぼす効果を検討する。
- 4) 実際の症例の抗体を用いて、抗 DNA 抗体サブセットと SLE の各種病態との関連性を解析する。

### 4. 研究成果

1. Virachith S, Saito M, Watanabe Y, Inoue K, Hoshi O, Kubota T. Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibody with DNA binding activity enters living monocytes via cell surface DNA and induces tissue factor expression. *Clin Exp Immunol* 195:167-178, 2019.  
概要：私たちは以前の研究で、正常マウスに投与すると血栓形成傾向を誘発するモノクローナル抗体 WB-6 を作製した。今回の研究では、この抗体がどのように正常の単球を刺激し、活性化して組織因子の発現を誘導するのか、その機構を検討した。その結果、WB-6 は $\beta_2$ -グリコプロテイン I のみならず、DNA とも反応することが明らかになった。WB-6 は細胞表面の DNA に結合し、DNA と共に細胞内に取り込まれて、自然免疫の DNA センサーを刺激することによって、組織因子の発現を誘導する可能性が示唆された。全身性エリテマトーデスに合併する抗リン脂質抗体症候群の病態形成機構に関する、新たな知見を提唱することができた。
2. Inoue K, Ishizawa M, Kubota T. Monoclonal anti-dsDNA antibody 2C10 escorts DNA to intracellular DNA sensors in normal mononuclear cells and stimulates secretion of multiple cytokines implicated in lupus pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 199:150-162, 2020.  
概要：2 本鎖 DNA に特異的なモノクローナル抗体 2C10 を健常人末梢血単核球の培養に添加すると、全身性エリテマトーデス(SLE)において産生が亢進していることが報告されている種々のサイトカインの発現が誘導されることが明らかになった。2C10 は主に単球に、マクロピノサイトーシスの機構で DNA と共に取り込まれ、Toll-like receptor 9 や AIM2 の経路を活性化することが示された。遺伝子操作などを伴わない単純な実験系を使って、SLE の病態形成機構を検討するモデル実験系を確立することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue K, Ishizawa M, Kubota T.	4. 巻 199
2. 論文標題 Monoclonal anti-dsDNA antibody 2C10 escorts DNA to intracellular DNA sensors in normal mononuclear cells and stimulates secretion of multiple cytokines implicated in lupus pathogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 150-162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cei.13382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Virachith S, Saito M, Watanabe Y, Inoue K, Hoshi O, Kubota T.	4. 巻 195
2. 論文標題 Anti- 2-glycoprotein I antibody with DNA binding activity enters living monocytes via cell surface DNA and induces tissue factor expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 167 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cei.13229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 窪田哲朗, 井上久美.	4. 巻 71
2. 論文標題 全身性エリテマトーデスの病態形成における抗DNA抗体の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 455-460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Egawa M, Imai K, Mori M, Miyasaka N, Kubota T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Placental Transfer of Canakinumab in a Patient with Muckle-Wells Syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 339-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10875-017-0389-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 窪田哲朗.
2. 発表標題 DNAと交差反応する抗リン脂質抗体はTLR9の経路を活性化して血栓形成傾向を誘導し、それはchloroquineにより抑制される.
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上久美, 石澤未来, 窪田哲朗.
2. 発表標題 細胞外のdsDNAは抗DNA抗体によってリンパ球にも取り込まれる.
3. 学会等名 日本臨床免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上久美, 斎藤ますみ, Siriphone Virachith, 窪田哲朗.
2. 発表標題 抗DNA抗体はDNAの細胞内侵入を促進してSLEの自然免疫機構を活性化する可能性がある.
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Siriphone Virachith, Kumi Inoue, Masumi Saito, Tetsuo Kubota.
2. 発表標題 Some anti-CL-beta2-GPI antibodies induce a prothrombotic state by the dual reactivity with DNA and internalization into live cells.
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石澤未来, 井上久美, 加藤優子, 窪田哲朗.
2. 発表標題 抗DNA抗体は細胞表面に付着したDNAやFcレセプターを介してマクロピノサイトーシスで生細胞内に入る.
3. 学会等名 第13回日本臨床検査学教育学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 槇野友美, 齋藤ますみ, 井上久美, 加藤優子, 窪田哲朗.
2. 発表標題 抗DNA抗体は 2-glycoprotein Iと交差反応して血栓形成傾向の原因となり得る.
3. 学会等名 第13回日本臨床検査学教育学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上久美, 窪田哲朗.
2. 発表標題 抗DNA抗体はDNAの細胞内侵入を促進してSLEの自然免疫機構を活性化する.
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 ますみ, 井上 久美, 窪田 哲朗.
2. 発表標題 一部の抗DNA抗体は 2-glycoprotein Iと交差反応してSLEに合併する2次性抗リン脂質抗体症候群の原因となる.
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Egawa M, Miyasaka N, Fudono A, Yokota M, Hirose A, Imai K, Mori M, Kubota T.
2. 発表標題 The first case of canakinumab administration during pregnancy for cryopyrin associated periodic syndrome.
3. 学会等名 21st International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江川真希子, 森雅亮, 岡本圭祐, 窪田哲朗.
2. 発表標題 妊娠期もカナキヌマブ投与を継続したクリオピリン関連周期熱症候群の1例.
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Virachith S, Inoue K, Kato Y, Kubota T.
2. 発表標題 Internalization of anti-DNA antibodies into live cells: One of the possible pathogenic mechanisms in SLE.
3. 学会等名 The 60th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology. (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Virachith S, Inoue K, Tamura S, Saito M, Kubota T.
2. 発表標題 Anti-DNA antibodies are internalized into live cells via cell surface DNA.
3. 学会等名 The 13th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity. (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----