

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17880

研究課題名(和文) シェーグレン症候群におけるM3R反応性Th17細胞の病因的意義

研究課題名(英文) Identification of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive Th17 cells in peripheral blood of primary Sjogren's syndrome.

研究代表者

安部 沙織 (Abe, Saori)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：00830093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、一次性シェーグレン症候群(SS:Sjogren's syndrome)患者末梢血中で自己抗原の一つと考えられるM3ムスカリン作動性アセチルコリン受容体(M3R:M3 Muscarinic acetylcholine receptor)反応性Th17細胞を同定し、さらに口唇唾液腺浸潤T細胞においても末梢血中M3R反応性Th17細胞との重複クローンが存在していることを明らかにした。M3R反応性Th17細胞の存在は、疾患活動性、および抗原特異的B細胞応答と関与している可能性があることも明らかにし、新たな治療標的となる可能性を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シェーグレン症候群(SS:Sjogren's syndrome)は慢性外分泌腺炎を主徴とする原因不明の自己免疫疾患の一つであり、国の難病に指定されている。その効果的な治療方法は未確立であり、根治的治療法の確立が本疾患における最大の課題である。本研究はSSにおける病態解明を目的としており、本研究結果からSSに対して唾液腺局所と重複して存在する末梢血中の自己抗原特異的T細胞が新たな治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have reported the identification of circulating M3R-reactive Th17 cells in treatment-naive pSS patients, and the identical TCR repertoire was also detected in LSG of the same patient. The presence of these cells tended to correlate with a higher disease activity score and significantly higher titers of functional anti-M3R antibodies. These results suggest that screening for M3R-specific Th17 cells and targeting them therapeutically is a potentially effective treatment strategy for pSS.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：T細胞 自己免疫

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、IL-17を産生するTh17細胞と自己免疫疾患の病態の関与が注目されており、既にIL-17を標的とした生物学的製剤の有効性が乾癬をはじめとする免疫疾患で明らかにされ、臨床応用されていた。SS患者では2008年に初めて唾液腺浸潤リンパ球からIL-17が検出されたと報告(*J Immunol* 2008;181:2898-906)された。

本研究室の先行研究で、M3Rに対する自己免疫応答により誘導されたSSマウスモデル(MIS)においては、唾液腺炎の発症にIL-17産生が関与し(*Mod Rheumatol*. 2015;25:158-60)、さらにROR γ t(Th17マスター転写因子)を過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいてSS類似の病態が引き起こされたと(*J Immunol*. 2015;194:56-67)報告した。以上の結果より抗原特異的Th17細胞およびTh17の分化に必須のROR γ tは唾液腺炎モデルマウスの発症において重要と考えられる。MISに対する治療戦略として、ROR γ tアンタゴニスト(A213)の投与はM3R反応性Th1細胞、およびTh17細胞を抑制することで唾液腺炎を抑制し(*Clin Exp Immunol*. 2017;187:213-224)、またM3R-APL(altered peptide ligand)の経静脈的投与はMISの唾液腺炎を抑制する(*Arthritis Rheumatol*. 2015;67:2213-25))ことを明らかにした。ヒトSSにおけるM3R反応性Th17細胞の病因的意義を明らかにできれば、APL、ROR γ tアンタゴニスト、IL-17阻害等の組み合わせによる、M3R反応性Th17細胞を標的とした、新規抗原特異的治療戦略の構築に繋がると期待できると考えられた。

2. 研究の目的

ヒトSS患者において、M3R反応性Th17細胞のSS病態への関与を解析することで抗原特異的治療法の構築を研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究は主にSS患者検体を用いて、以下の点を明らかにする。

【末梢血中でのM3R反応性Th17細胞の検出】ヒトM3Rの全長(590アミノ酸配列)をカバーする合成ペプチドを用いて、HLA DRB1アリルタイピングに基づき、T細胞へ抗原提示されやすいペプチドを患者ごとに選択する。HLA DRB1分子への結合が推定された上位10種類のペプチドと、SS患者の末梢血より分離した末梢血単核球(PBMC)を39時間共培養し、ELISPOTを用いてIL-17産生細胞を検出する。SS患者10名、健常人10名、疾患コントロール10名で行いM3R刺激後の有意なスポット数増加が認められるかを各群で検討する。

【T細胞エピトープの決定】M3Rペプチド刺激によりIL-17産生が認められたSS患者において、T細胞エピトープ決定のため選択されたM3Rペプチド10種類に関して1種類ずつペプチド刺激を分けて行い同様にELISPOTにてIL-17産生の検討を行う。有意なスポット数の増加が認められた際の刺激に用いられた約20merのアミノ酸配列中にM3R反応性Th17細胞のエピトープが存在すると考えられる。

【末梢血中でのM3R反応性Th17細胞の分離】M3R反応性Th17が検出されたSS患者を上述のELISPOTにて同定する。M3R反応性Th17細胞を有すると同定されたSS患者のPBMCを上記で同定されたT細胞エピトープを含むM3Rペプチドで刺激培養する。その後IL-17MACS cytokine secretion assayを用いてM3R反応性Th17細胞を検出、FACSでsingle cell sortingにて分離し、in vitroでのM3R反応性Th17細胞クローンを樹立する。

【唾液腺でのM3R反応性Th17細胞の検出】末梢血中のM3R反応性Th17が検出・分離されたSS患者の口唇唾液腺組織に浸潤するT細胞をFACSにてsingle cell sortし、IL-2刺激とCD3/28刺激を反復してT細胞クローンを樹立する。樹立したT細胞クローンより、唾液腺でM3R抗原に反応してIL-17を産生するM3R反応性T細胞クローンを同定する。そして末梢血および唾液腺より樹立されたM3R反応性Th17細胞クローンのTCR解析、CDR3領域のsequenceを行い、末梢血と唾液腺で同一のクローンが存在するかどうかを明らかにする。

【M3R反応性Th17細胞の病態形成における役割と臨床像との相関解析】、 で末梢血及び唾液腺から樹立したM3R反応性Th17細胞クローンと唾液腺上皮細胞株を共培養し、腺組織破壊への影響やサイトカイン産生を検討する。M3R反応性Th17細胞の出現とSSの臨床像（抗M3R抗体を含む自己抗体、唾液腺分泌能、腺外病変）との関連を解析する。

4. 研究成果

シェーグレン症候群(SS:Sjogren's syndrome)において、M3ムスカリン作働性アセチルコリン受容体(M3R:M3 Muscarinic acetylcholine receptor)反応性Th17細胞に着目し、以下の解析を行った。

- 1)SSの末梢血中M3R反応性IL-17産生細胞の陽性率は50%（5/10例）であった。
- 2)1)の陽性例において、T細胞エピトープはM3Rペプチド（AA76-95）であった。
- 3)M3R反応性Th17細胞のサイトカイン産生能を解析し、IL-17産生細胞のみでなくIL-17/IFN γ 共産生細胞もM3R反応性Th17細胞には含まれることを確認した。
- 4)臨床像の比較を行い、M3R反応性Th17細胞陽性例は、陰性例と比較し、M3R第2、3細胞外領域に対する抗体価が有意に高く、疾患活動性が高い傾向が明らかになった。
- 5)M3R反応性Th17細胞陽性例において、血中M3R反応性Th17細胞と同一T細胞クローンが炎症局所の唾液腺に存在することを明らかにした。

以上の解析を行い、論文にまとめて発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Abe Saori, Tsuboi Hiroto, Kudo Hanae, Asashima Hiromitsu, Ono Yuko, Honda Fumika, Takahashi Hiroyuki, Yagishita Mizuki, Hagiwara Shinya, Kondo Yuya, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 5
2. 論文標題 M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive Th17 cells in primary Sjogren's syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e135982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.135982	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Saori Abe
2. 発表標題 Detection and clinical significance of circulating M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) reactive Th17 cells in patients with primary Sjogren's syndrome
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saori Abe
2. 発表標題 M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) reactive Th17 cells in patients with primary Sjogren's syndrome
3. 学会等名 22nd Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Virtual Congress
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部沙織
2. 発表標題 シェーグレン症候群におけるM3ムスカリン作働性アセチルコリン受容体（M3R）反応性Th17細胞の臨床的意義
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部沙織
2. 発表標題 Detection of circulating M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive Th17 cells in patients with primary Sjogren ' s syndrome
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 安部沙織
2. 発表標題 シェーグレン症候群患者末梢血中におけるM3ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 (M3R) 反応性Th17細胞と臨床的意義
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Saori Abe
2. 発表標題 Detection and clinical significance of circulating M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive Th17 cells in patients with primary Sjogren ' s syndrome
3. 学会等名 2019 ACR/ARP annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Saori Abe
2. 発表標題 M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive Th17 cells in patients with primary Sjogren ' s syndrome
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計2件

国際研究集会 2019 ACR/ARP annual meeting	開催年 2019年～2020年
国際研究集会 2020 APLAR annual meeting	開催年 2020年～2021年

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------