

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07821

研究課題名(和文) 抗DNA抗体による全身性エリテマトーデス病態形成機構の解明

研究課題名(英文) Pathogenetic roles of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus

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・非常勤講師

研究者番号：90205138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は全身性エリテマトーデスで産生される抗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計画した。モノクローナル抗DNA抗体WB-6は、単球に取り込まれて組織因子の発現および血栓形成傾向をもたらすが、これにはToll-like receptor 9の経路が関わっていることを証明した。2本鎖(ds)DNA特異的モノクローナル抗体2C10は単球に取り込まれて、末梢血単核球にIFN-alphaなどの産生を誘導する。これらの結果を発展させ、抗DNA抗体が中枢神経系の細胞にも取り込まれるか否かを検討したところ、WB-6および2C10がラットのアストロサイトに取り込まれることが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性エリテマトーデス(SLE)の病態形成機構の一つとして、抗DNA抗体とDNAの免疫複合体がエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、自然免疫のDNAセンサーを刺激してサイトカイン産生などが誘発されることが示唆されている。しかし、中枢神経系の細胞にもこのような機構が当てはまるか否かについてはほとんど知見がない。本研究は抗DNA抗体がアストロサイトにも能動的に取り込まれることを示したもので、SLEにしばしば見られる精神神経症状の発症機構の解明につながる重要な情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In systemic lupus erythematosus, various autoantibodies including those reactive with DNA are produced. This study aimed to clarify the pathogenetic role of the anti-DNA antibodies. In a previous study, we have shown that a monoclonal anti-DNA antibody WB-6, which is cross-reactive with phospholipid, enters monocytes and induces tissue factor expression and a pro-thrombotic state. Currently, we demonstrated that the TLR9 pathway is the main pathway in this process. In another study, we have shown that a dsDNA-specific monoclonal antibody 2C10 enters monocytes and induces expression of IFN-alpha, IFN-beta, TNF-alpha by peripheral blood mononuclear cells. Currently, we extended these results and tested if these anti-DNA antibodies also enter live cells in the brain. As a result, we observed that WB-6 entered the cytoplasm and 2C10 entered the nucleus of rat primary culture astrocytes.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス 抗DNA抗体 精神神経ループス

## 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は20歳から40歳台の女性に好発する自己免疫疾患で、厚生労働省の指定難病の一つであり、約6万人が登録されている。発熱、皮疹、関節炎、漿膜炎、糸球体腎炎、精神神経症状など多彩が症状を呈し、血液検査では様々な自己抗体が検出される。これは複数の遺伝的要因と後天的要因とが関与して、自己抗原に対する免疫反応が起こってしまうためと考えられているが、発症機構の詳細はまだ解明されていない。

SLEで産生される自己抗体の中では抗DNA抗体が本疾患に特異性が高く、多くの症例で検出され疾患活動性の指標ともなるため、臨床検査では繰り返し測定されている。しかし、抗DNA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、まだ不明な点が多い。そこで本研究は、抗DNA抗体のSLEの病態形成上の役割を明らかにすることを目的として計画された。

先行研究で私たちは、リン脂質とも交差反応するモノクローナル抗DNA抗体WB-6が、単球に取り込まれ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を発表した(1)。また、別の先行研究で2本鎖(ds)DNAに特異的なモノクローナル抗体2C10は単球に取り込まれて、末梢血単核球にSLEにおいて産生が亢進することが知られているIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ などのサイトカインの産生を誘導することを明らかにした(2)。抗DNA抗体は血液中でも培養上清中でも、死細胞から放出されるDNAと結合して免疫複合体を形成しているが、上記の知見は免疫複合体がエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、エンドソームや細胞質に存在しているDNAセンサーを刺激して細胞を活性化させることが病態形成に関わっていることを示唆している。しかし、中枢神経系の細胞もDNAを結合した抗DNA抗体を取り込むか否かについては報告がない。

## 2. 研究の目的

今回の研究期間では、上記の先行研究をさらに発展させて、以下の2点を検討することを主な目的とした。

- (1) モノクローナル抗DNA抗体WB-6が、単球に取り込まれて組織因子の発現を誘導する場合の細胞内の活性化経路を明らかにする。
- (2) モノクローナル抗DNA抗体2C10を用いた研究を、中枢神経系の細胞を用いた実験系に応用し、抗DNA抗体がSLEの精神神経症状(NPSLE)の病態形成にも関わる可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

抗 DNA 抗体は、モデルマウスのリンパ球から樹立したハイブリドーマの培養上清から、塩析とプロテイン G カラムによって精製した。しかし、微量の DNA を結合していることは避け難く、本研究で用いている抗 DNA 抗体は事実上、DNA を含む免疫複合体である。細胞は、組織因子の発現に関する研究では健常人末梢血から比重遠心法で得た単核球を用いた。中枢神経系細胞としては、胎生 20 日目のラット胎仔の脳から分離培養した神経細胞およびアストロサイトをを用いた。

細胞に 2~5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗 DNA 抗体を添加して 1~2 時間培養し、洗浄、固定、透過処理、ブロッキングを行ってから、蛍光標識抗マウス IgG 抗体を反応させて細胞内に取り込まれた抗 DNA 抗体を検出し、蛍光顕微鏡で観察した。組織因子の発現は蛍光標識抗ヒト CD142 抗体を用いて、フローサイトメトリーで検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) WB-6 の取り込みによる単球の組織因子発現に関わる細胞内シグナル伝達経路の解明

WB-6 は単球に取り込まれて組織因子の発現を誘導したが、これは Toll-like receptor 9 (TLR9) の阻害剤である chloroquine やオリゴデオキシヌクレオチド IRS869 で阻害されることが明らかとなり、主として TLR9 の経路が関わっているものと考えられた [Saito et al 2021].

#### (2) 2C10 および WB-6 の中枢神経系細胞への取り込みに関する検討

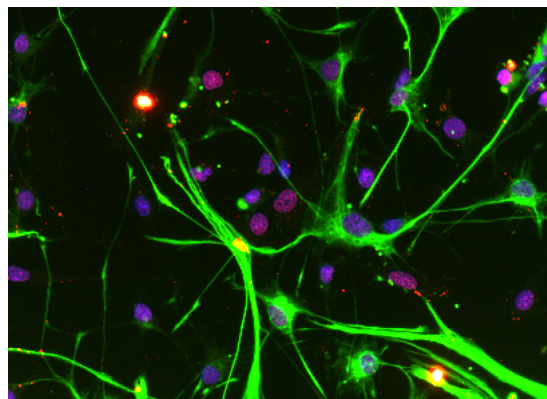
ラット脳から得た初代培養細胞に 2~5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 2C10 または WB-6 を添加して 1~2 時間培養して検討した結果、抗 DNA 抗体は神経細胞には取り込まれなかったが、アストロサイトには取り込まれることが判

明した。右図は、アストロサイトを Alexa Fluor 488 標識抗 GFAP 抗体で染色

(緑)、2C10 を Alexa Fluor 555 標識抗マウス IgG 抗体で検出 (赤)、DNA を DAPI で染色 (青) した結果を示す。

2C10 が核の DNA と結合して DAPI と共局在するため、この融合画像では核が紫色に見える。一方、図には示さないが、

WB-6 の場合はアストロサイトの細胞内に取り込まれたものの、細胞質に止まった [Inoue et al 2023].



従来、脳血液関門のために血液中の抗体が脳内に入ることは考え難いと思われていたが、最近では病的な状態ではこの関門の透過性が亢進していることが示唆されており、実際、精神神経症状を呈する SLE 患者の髄液では自己抗体が検出されることが報告されている。このことを考え合わせると私たちの検討結果から、SLE にしばしば見られる精神神経症状の病態形成にも、抗 DNA 抗体がアストロサイトなどの脳の細胞に取り込まれる現象が関わっている可能性が示唆される。

### (3) そのほかの自己抗体関連研究成果

自己抗体に関連する東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野の塩飽裕紀准教授らとの共同研究において、本邦では非常に珍しい自己抗体を有する症例を発見し、報告した[Katayama et al 2022]。また、統合失調症の一部には神経機能に影響する自己抗体が関わっている可能性を示唆する結果を得て、論文発表することができた[Shiwaku et al 2022, Shiwaku et al 2023]。

#### <引用文献>

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* 2019;195(2):167-178. doi:10.1111/cei.13229
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* 2020;199(2):150-162. doi:10.1111/cei.13382

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shiwaku Hiroki, Katayama Shingo, Kondo Kanoh, Nakano Yuri, Tanaka Hikari, Yoshioka Yuki, Fujita Kyota, Tamaki Haruna, Takebayashi Hironao, Terasaki Omi, Nagase Yukihiko, Nagase Teruyoshi, Kubota Tetsuo, Ishikawa Kinya, Okazawa Hitoshi, Takahashi Hidehiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Autoantibodies against NCAM1 from patients with schizophrenia cause schizophrenia-related behavior and changes in synapses in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 100597 ~ 100597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xcrm.2022.100597	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 Katayama Shingo, Kubota Tetsuo, Takahashi Hidehiko, Shiwaku Hiroki	4. 巻 21
2. 論文標題 Anti-rods/rings autoantibodies in a patient with pancreatic injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autoimmunity Reviews	6. 最初と最後の頁 102922 ~ 102922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.autrev.2021.102922	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 Saito Masumi, Makino Yumi, Inoue Kumi, Watanabe Yoshino, Hoshi Osamu, Kubota Tetsuo	4. 巻 44
2. 論文標題 Anti-DNA antibodies cross-reactive with <sub>2</sub>-glycoprotein I induce monocyte tissue factor through the TLR9 pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 124-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2020.1796285	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 Shiwaku Hiroki, Katayama Shingo, Gao Mengxuan, Kondo Kanoh, Nakano Yuri, Motokawa Yukiko, Toyoda Saori, Yoshida Fuyuko, Hori Hiroaki, Kubota Tetsuo, Ishikawa Kinya, Kunugi Hiroshi, Ikegaya Yuji, Okazawa Hitoshi, Takahashi Hidehiko	4. 巻 111
2. 論文標題 Analyzing schizophrenia-related phenotypes in mice caused by autoantibodies against NRXN1 in schizophrenia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 32 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2023.03.028	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 Inoue K, Hoshi O, Kubota T.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Internalization of anti-DNA antibodies by rat brain cells: a possible pathogenetic mechanism of neuropsychiatric lupus.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 窪田哲朗
2. 発表標題 抗核抗体の基礎・検査・臨床
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上久美, 星治, 窪田哲朗
2. 発表標題 抗DNA抗体は神経細胞にも取り込まれる
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田哲朗
2. 発表標題 抗DNA抗体による組織因子発現とToll-like receptors
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田哲朗.
2. 発表標題 染色パターンの新しい分類, 臨床的意義, 病態形成との関わり.
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小森恵美, 木幡桃子, 志田奈央, 細谷佳生, 井上久美, 窪田哲朗.
2. 発表標題 抗DNA抗体は生きている好中球の核に入る.
3. 学会等名 第16回日本臨床検査学教育学会
4. 発表年 2022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0件

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