

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17449

研究課題名（和文）SLE特異的自己抗体の細胞表面エピトープの探索とシグナル伝達経路の解明

研究課題名（英文）Identification of Epitopes on Monocytes and Signaling Pathways by Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus

研究代表者

松枝 佑（Matsueda, Yu）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：00623208

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：全身性エリテマトーデス（SLE）の中樞神経病変は難治性にもかかわらず、その発症メカニズムは未解明な点が多い。本研究では、SLE特異的自己抗体が単球表面に結合し、炎症性サイトカインの産生を促進するメカニズムを解明することを目的とした。フローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡解析により、抗RNP抗体が抗Sm抗体よりも単球への結合力が高いことが判明した。また、NF- κ B経路の活性化による単球の炎症性サイトカイン産生の増加が示唆された。これらの結果は、SLE特異的自己抗体が単球を介して中樞神経病変に関与する可能性を示しており、新たな治療戦略の開発に重要な知見を提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて抗RNP抗体が抗Sm抗体と共に存在することで、NF- κ B経路の活性化され、単球の炎症性サイトカイン産生の増加することが明らかになった。さらに、この自己抗体の作用はFcレセプターを介さない経路である可能性が示唆された。

これらの結果は、SLE特異的自己抗体による中樞神経病変の発症のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、SLEの新たな治療戦略の開発に重要な知見を提供するものである。今後は、自己抗体の単球に対する詳細な作用メカニズムの解明が求められる。

研究成果の概要（英文）：Although central nervous system (CNS) lesions in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) are difficult to treat, their mechanisms remain unclear. Previous studies have reported associations between CNS lesions in SLE and antibodies such as anti-Sm antibodies, anti-RNP antibodies, anti-ribosomal P antibodies, and anti-NMDA receptor antibodies. This study aimed to elucidate the mechanism by which autoantibodies in SLE bind to the surface of monocytes and promote the production of inflammatory cytokines. Flow cytometry and confocal laser microscopy analyses revealed that anti-RNP antibodies exhibit a higher affinity for monocyte binding compared to anti-Sm antibodies. Additionally, increased production of inflammatory cytokines by monocytes, mediated by activation of the NF- κ B pathways, was suggested. These findings indicate that autoantibodies in SLE may contribute to CNS lesions through monocyte interaction, providing crucial insights for the development of new therapeutic strategies.

研究分野：リウマチ膠原病内科学

キーワード：SLE 抗RNP抗体 抗Sm抗体 中樞神経病変

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は、疾患特異的自己抗体の存在を特徴とする自己免疫性疾患である。その中で中枢神経病変は SLE における難治性病変であるものの、その発症メカニズムについては未知な部分が多い。これまでの臨床的検討において、SLE 疾患特異的自己抗体である抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗リボソーム P 抗体、抗 NMDA レセプターサブユニット NR2 抗体が SLE の中枢神経病変、特に精神症状の出現と関連していることが報告されている。また我々が行った基礎的検討から、抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗リボソーム P 抗体は単球細胞表面に結合し炎症性サイトカインの産生促進を介して SLE の中枢神経病変の発症に関与する可能性が示唆された。しかしながら、自己抗体の細胞表面への結合から炎症性サイトカイン上昇のメカニズムについては不明である。この事実により実臨床における SLE の中枢病変治療は困難を極め、確立した治療戦略は存在しない。SLE 疾患特異的自己抗体と単球の結合のメカニズムを明らかにすることは、SLE の中枢神経病変の予防や寛解導入といった観点から、治療戦略に革新的な影響をもたらすと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、SLE の中枢神経病変の新たな治療法開発に向けて SLE 疾患特異的自己抗体の細胞表面エピトープの探索と活性化されるシグナル伝達経路を解明することにより機能的病的抗体としての作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

健常人ボランティアより末梢血を採取し、Ficoll 比重遠心法にて末梢血単核球を分離し、磁気ビーズ法により単球(PBMC)を単離した。得られた PBMC を、マウスモノクローナル抗ヒト Sm 抗体 (抗 Sm mAb)、マウスモノクローナル抗ヒト U1 RNP 抗体 (抗 RNP mAb) またはコントロール IgG1 または IgG3 を用いて培養した。細胞表面に結合しているかどうかをフローサイトメトリーで確認後、さらに蛍光染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

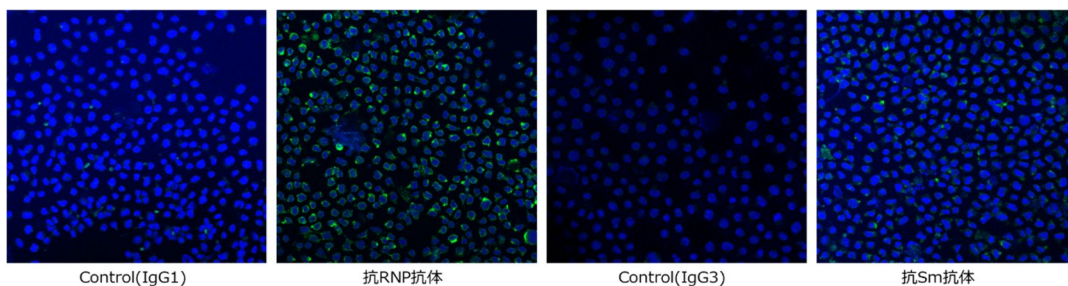
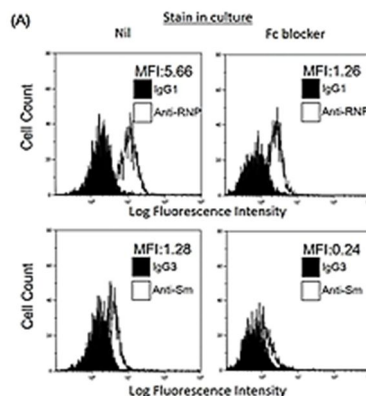
次に、PBMC を用いた実験系にヒト IgG もしくはヒト F(ab')₂ フラグメントを追加し、高濃度の IgG 存在下もしくは F(ab')₂ フラグメント存在下で、SLE 疾患特異的自己抗体刺激による単球の炎症性サイトカインの産生に与える影響を解析した。また、SLE 疾患特異的自己抗体刺激の有無別に RT-PCR を用いてシグナル伝達経路を探索した。またその結果を用い、同定された経路の阻害薬を用いて経路を遮断することで単球の炎症性サイトカインの産生に与える影響を調べた。

最後に、自己抗体で血管内皮細胞を刺激、血液脳関門を構成しているタイトジャンクションタンパク(オクルディン、クローディン 5 など)の発現量をタンパクレベルで検討した。また上清中、セルライゼート中の mRNA およびタンパクのうちタイトジャンクションタンパクの発現と関連しているサイトカインを測定した。

4. 研究成果

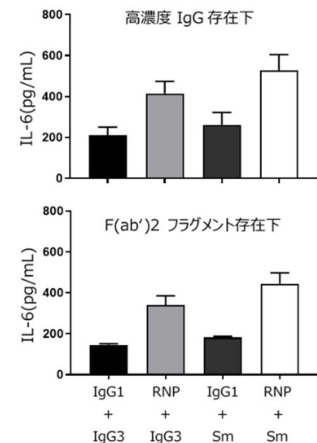
刺激により活性化した PBMC と SLE 疾患特異的自己抗体のモノクローナル抗体を培養した後の、フローサイトメトリーの結果を示す(右図)。この結果から、単球 Fc 受容体をブロックした状態でも、SLE の疾患特異的自己抗体は単球の細胞表面に結合することが明らかになった。また特異的自己抗体毎に比較するとその MFI の差から抗 RNP mAb の方が、抗 Sm mAb よりも単球への結合力が高い可能性が示された。

また、蛍光染色を行った後の共焦点レーザー顕微鏡で観察では SLE の疾患特異的自己抗体が単球の表面のみに結合していることが視覚的に確認できた(下図)。前述の抗 RNP mAb と抗 Sm mAb の単球への結合力の差はこの実験でも確認できた。

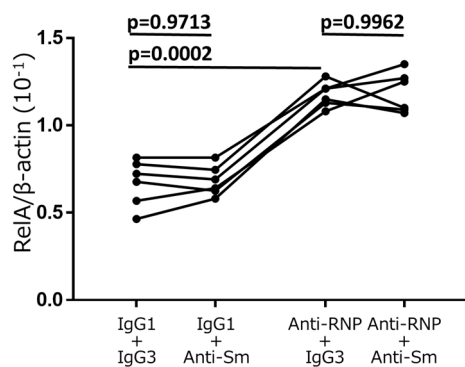


以上のことから、SLE の疾患特異的自己抗体は Fc 受容体を介さずに単球表面に結合し、その後のシグナル伝達へと影響を与える可能性が示された。

前述の活性化した PBMC の SLE の疾患特異的自己抗体刺激において、ヒト IgG やヒト F(ab')₂ フラグメントを添加し、上清中の炎症性サイトカイン IL-6 を測定した結果を示す(右図)。高濃度のヒト IgG 存在下においてもヒト F(ab')₂ フラグメント存在下においても、抗 RNP mAb・抗 Sm mAb による IL-6 産生上昇効果および相乗効果は担保され、基礎研究と同様の結果であった。このことは、SLE の疾患特異的自己抗体刺激の Fc 受容体を介さないシグナル伝達の仮説を支持する結果であるとともに、Fab 領域を介したシグナル伝達の可能性も低いと考えられた。



SLE の疾患特異的自己抗体刺激産生された炎症性サイトカインから、NF B 経路の活性化を推定し、RT-PCR を用いて NF B 経路に関連する種々のコンポーネントに対する mRNA を測定した。抗 RNP mAb は単独で、STAT3、RelA の mRNA 発現を有意に増強したが、p50 や p52 といったコンポーネントの mRNA 発現には影響を与えなかった(下図)。一方、抗 Sm mAb 単独では全てのコンポーネントの mRNA 発現に対して影響が見られなかった。



上述の結果から、NF B 阻害薬である N-acetyl cysteine、pyrrolidine dithiocarbamate や cytochalasinD の存在下で同様の実験を行った。抗 RNP mAb も抗 Sm mAb もすべての NF B 阻害薬にて IL-6 産生が抑制されることが示された。

抗 RNP mAb も抗 Sm mAb による血管内皮細胞を刺激後のタイトジャンクションタンパクの発現の検討では、オクルディン、クローディン 5 を上昇させる傾向は認められたが、有意な上昇は認めなかった。

一般的には、抗 Sm 抗体も抗 RNP 抗体も核タンパク質を認識すると考えられている。本研究では、PBMC の表面に抗 Sm 抗体および抗 RNP 抗体が認識するエピトープが存在することが示された。それらのエピトープの発現は単球の活性化により増加することも明らかになった。

さらに重要なことには、ヒト IgG もしくはヒト IgG F(ab')₂ の添加により減弱しなかったため、Fc レセプターへの作用を必要としない経路でシグナル伝達が行われていると考えられた。mRNA の発現レベルや NF B 阻害薬添加実験の結果から、部分的には NF B 経路の関与が類推できたが、その経路のみでのシグナル伝達ではない可能性が示唆された。

実臨床において、抗 RNP 抗体単独陽性患者は存在するものの、抗 Sm 抗体単独陽性患者は存在せず必ず RNP 抗体と共陽性となる。先行する臨床研究において、SLE の中枢病変のリスクファクターは抗 RNP 抗体ではなく、抗 Sm 抗体であることが明らかになっている。また、抗 Sm 抗体は炎症病態が首座と考えられる関節炎においても関連する因子であることが研究期間中の新たな臨床研究で明らかになった。同様の傾向は、筆者が所属する研究室で行われた生物製剤を使用した SLE 患者の観察研究においても明らかとなった。これらの臨床研究の結果は、抗 Sm 抗体が抗 RNP 抗体と共に単球を刺激することにより、SLE の炎症病態に関与しているという仮説を支持するものとなる。

本研究の結果より、SLE 疾患特異的自己抗体は単球の炎症性サイトカインの産生を増強することにより、SLE における脳血液関門の障害にも関与する可能性が強く示唆される。今後は SLE 疾患特異的自己抗体の単球に対する作用の分子メカニズムの詳細についてさらに検討してゆく必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Hasegawa Yasuhiro, Arinuma Yoshiyuki, Asakura Hiroto, Shindo Risa, Ino Kazuma, Kanayama Yoshiro, Tanaka Tomoki, Matsueda Yu, Wada Tatsuhiko, Oku Kenji, Yamaoka Kunihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Real-world efficacy of belimumab in achieving remission or low-disease activity in systemic lupus erythematosus: A retrospective study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mr/road078	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 -

1. 著者名 Hasegawa Yasuhiro, Arinuma Yoshiyuki, Muramatsu Takumi, Kondou Junichi, Matsueda Yu, Kanayama Yoshiro, Ino Kazuma, Tanaka Tomoki, Wada Tatsuhiko, Oku Kenji, Yamaoka Kunihiro	4. 巻 32
2. 論文標題 The pathogenic role of lupus-specific autoantibodies and Interleukin-6 on demyelination of the brainstem and spinal cord in systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lupus	6. 最初と最後の頁 401 ~ 410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/09612033231151600	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 -

1. 著者名 Shindo Risa, Abe Ryohei, Oku Kenji, Tanaka Tomoki, Matsueda Yu, Wada Tatsuhiko, Arinuma Yoshiyuki, Tanaka Sumiaki, Ikenoue Tatsuyoshi, Miyakawa Yoshitaka, Yamaoka Kunihiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Involvement of the complement system in immune thrombocytopenia: review of the literature	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 182 ~ 190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/25785826.2023.2213976	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0件

〔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
---------	---------