様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010 ～ 2011
課題番号：22790926
研究課題名（和文） 抗原特異的Ｔ細胞制御による関節リウマチ治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of antigen specific therapy for rheumatoid arthritis

研究代表者
庄田 宏文（SHODA HIROFUMI）
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20529036

研究成果の概要（和文）：
関節リウマチ(RA)患者において、自己抗原 BiP 由来の HLA-DR4 エピトープを同定した。BiP エピトープ特異的 CD4 陽性 T 細胞は RA 患者で末梢血・関節共に増加していた。この細胞群は炎症性サイトカイン IL-17 を産生しており、RA の病態形成に関与していることが推測された。更に、RA のモデルマウスに対して BiP エピトープを内服させることで関節炎に対する治療効果を確認した。本研究結果は RA の抗原特異的新規治療法開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：
We identified autoantigen BiP-derived HLA-DR4 epitopes in rheumatoid arthritis (RA) patients. BiP-specific CD4+ T cells increased both in peripheral blood and synovial tissues of RA. This subset produced pro-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-17, and could have a close association with RA pathogenesis. Moreover, oral administration of this BiP epitope ameliorated mouse models of RA significantly. These observations support the possibility of the development of antigen-specific therapy for RA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
２０１０年度	2,200,000	660,000	2,860,000
２０１１年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医学
科研費の分科・細目：内科学・リウマチ学
キーワード：関節リウマチ・新規治療法・Ｔ細胞

１．研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ (Rheumatoid arthritis:RA)の治療は、最も強力な生物学的製剤を使用しても約 3 割の患者では無効であり、また副作用として非特異的な免疫抑制効果による重篤な感染症が問題となっている。そのため、RA の免疫異常のみを抑制する新規治療法の開発が期待されている。

(2) HLA-DR4 多型は RA の遺伝的リスクである。HLA-DR 分子は CD4 陽性 T 細胞に抗原提示を行っており、その多型により自己抗原が提示されやすい場合に自己免疫寛容の破綻および RA 発症に至る可能性が示唆されている。しかし、既存の報告された HLA-DR4 エピトープに

ついては RA における特異性は報告されていなかった。

２．研究の目的

(1)RA において BiP が重要な自己抗原たりえるかを抗 BiP 抗体、抗シトルリン化 BiP 抗体を測定することで明らかとする。更に RA において自己抗原 BiP 由来の HLA-DR4 エピトープを同定する

(2)BiP エピトープ特異的 CD4 陽性 T 細胞の健常人、RA 患者における割合、表現型、遺伝子発現、サイトカイン産生を確認する。

(3)BiP エピトープを RA モデルマウスであるコラーゲン誘発性関節炎(collagen-induced arthritis: CIA)マウスへ内服投与し、関節炎の重症度の変化を観察する。

３．研究の方法

(1)RA 患者血清を使用し、ELISA 法にて抗 BiP 抗体、抗シトルリン化 BiP 抗体価を測定する。HLA-DR4 陽性 RA 患者由来末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)を BiP 由来ペプチドで刺激し、増殖反応により HLA-DR4 エピトープを同定する。更に同定されたエピトープが HLA-DR4 分子に結合するかを試験管内で確認する。

(2)HLA-DR4-BiP エピトープテトラマーを作成し、健常人および RA 患者の末梢血・関節組織の CD4 陽性 T 細胞を染色し、FACS により割合、表現型、細胞内サイトカイン発現を観察する。またテトラマー陽性細胞の遺伝子発現を確認する。

(3)CIA を発症したマウスに、BiP エピトープ 100μg/day x 5 日間を内服投与し、関節炎スコア、病理スコア、抗 BiP 抗体価を測定する。

４．研究成果

(1)RA 患者血清においては抗 BiP 抗体は有意な上昇がみられたが、抗シトルリン化 BiP 抗体価はより上昇しており、感度・特異度ともに優れていた。RA 患者 PBMC 増殖を強く誘導する複数の BiP 由来エピトープを同定した。なかでも BiP336-355 は最も強く PBMC 増殖を誘導し、増殖反応は HLA-DR4 の量に比例した。一方、健常人 PBMC の増殖は誘導しなかった。

　BiP336-355 は代表的な HLA-DR4 である HLA-DRB1*0401, 0405 への結合を試験管内で確認し、その inhibitory concentration 50%(IC50)は 40nM と強い結合が観察された。

(2)HLA-DRB1*0405-BiP336-355 テトラマー(BiP テトラマー)により、RA 患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞の 0.1-0.5%, 関節組織の 1-5%が BiP 特異的であることがわかった。一方健常人では BiP テトラマー陽性細胞は 0.03%以下と上昇がみられなかった。末梢血 BiP-テトラマー陽性細胞は約半数がナイーブ T 細胞、残りの半数がエフェクターT 細胞であった。関節組織においてはほぼ 100%がエフェクターT 細胞であった。BiP テトラマー陽性細胞のうち CD25 陽性 FOXP3 陽性制御性 T 細胞は検出されなかった。BiP テトラマー陽性 CD4 陽性 T 細胞の細胞内サイトカイン発現を検討したところ IL-17 発現している細胞が末梢血で 10%, 関節では 20-50%と増えており、遺伝子発現では IL-17A に加えて RORC, AhR, CCR6 発現が亢進しており、BiP テトラマー陽性細胞は Th17 細胞の表現型を示した。

(3)BiP エピトープを投与された CIA マウスは関節炎スコアの改善(コントロール群の平均スコア 6、治療群の平均スコア 2, $p<0.05$)、病理スコアの改善を示した。また血清抗 BiP 抗体価は低下しており、BiP エピトープに対して経口免疫寛容を誘導することで、関節炎モデルの治療が可能であった。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

① Shoda H, et al. Detection of autoantibodies to citrullinated BiP in rheumatoid arthritis patients and pro-inflammatory role of citrullinated BiP in collagen-induced arthritis. Arthritis res Ther. 2011; 1386):R191. 査読有 DOI:10.1186/ar3520

② Shoda H, et al. Autoantigen BiP and autoimmune diseases. 日本臨床免疫学会誌. 2012: 35(1);46-50.査読なし

〔学会発表〕(計 3 件)

① 庄田　宏文他 Identification of autoantigen BiP-derived HLA-DR4 epitope and its pathological roles in rheumatoid arthritis　第 14 回国際免疫学会 2010 年 8 月 24 日　神戸国際会議場

② 庄田　宏文他　自己 BiP 由来 epitope を認識する CD4 陽性 T 細胞の健常人・関節リウマチ患者における表現型　第 55 回日本リウマチ学会　2011 年 7 月 19 日　神戸国際会議場

③ 庄田　宏文他 Autoantigen BiP-specific CD4+ T cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients.第　40 回日本免疫学会　2011 年 11 月 28 日　　幕張メッセ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
特になし

６．研究組織
(1)研究代表者
　　庄田　宏文　（SHODA HIROFUMI）
　東京大学　医学部附属病院　助教
　研究者番号：20529036