

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591439

研究課題名(和文)シェーグレン症候群発症の分子免疫学的解析と制御

研究課題名(英文)Molecular mechanism and regulation of Sjogrens syndrome

研究代表者

住田 孝之(Sumida, Takayuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00183054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体3(M3R)に対する免疫応答がシェーグレン症候群(SS)の発症に関わっているか否かを明らかにする事を目的とした。その結果、1)M3R反応性Th1細胞およびTh17細胞が、SS類似の自己免疫性唾液腺炎を誘導すること、2)M3R自己抗原のT細胞エピトープがN1領域と第一細胞外ドメイン領域に存在すること、3)アナログペプチド(N1APL7)によりMISが抑制されること、を明らかにした。以上の結果から、SSの発症にM3R反応性Th1およびTh17細胞が関わり、その標的分子のAPLによりSSを抗原特異的に治療する戦略の開発が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of M3R immune response in the generation of Sjogren's syndrome (SS), we established M3R induced sialadenitis (MIS) mouse model and examined whether M3R reactive T cells trigger the autoimmune sialadenitis or not. In the present study, we obtained evidence that M3R reactive Th1 and Th17 cells were associated with the generation of MIS, the major T cell epitopes of M3R were N1 and the first extra-cellular domain, and one of analogue ligand peptide (APL) coding N1 region could inhibit the induction of sialadenitis significantly. These observations should shed light on the antigen-specific therapy in SS near future.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：自己抗原 ヒトープ 自己反応性T細胞 IFN- IL-17 ROR t 自己免疫性唾液腺炎 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 T細胞エ

### 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群(SS)は原因不明の自己免疫疾患である。その発症の分子機構を明らかにし、分子をターゲットとした新規治療戦略を開発する事は重要課題である。

これまでのところ、SSの発症機構に関して以下のことを明らかにしてきた。1)唾液腺、涙腺、腎臓に浸潤したT細胞のT細胞受容体を解析し、一部のT細胞がクローナルに増加していること、2)唾液腺浸潤T細胞の自己抗原の一つがムスカリン作働性アセチルコリン受容体3(M3R)であること、3)約50%のSS患者において、抗M3R抗体およびM3R反応性T細胞が検出されること、等を明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

本研究においては、M3R分子に焦点をあて、SS発症の分子機構の解明とM3Rを標的とした抗原特異的治療戦略を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)M3R ノックアウト(M3R<sup>-/-</sup>)マウスに、M3RのN領域、第一細胞外ドメイン、第二細胞外ドメイン、第三細胞外ドメインをそれぞれコードする合成アミノ酸を作成して混合して免疫した。免疫後脾細胞をRag1<sup>-/-</sup>マウスに移入して(M3R<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウス)唾液腺炎の有無についてH-E染色法により検討した。

(2)1)で生じた唾液腺炎の発症にCD3<sup>+</sup>T細胞が関わっているか否かを検討するために、MACSを用いて、M3Rを免疫したM3R<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞をCD3<sup>+</sup>細胞とCD3<sup>-</sup>細胞に分画し、それぞれの細胞をRag1<sup>-/-</sup>マウスに細胞移入した。

(3)M3R<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞とM3Rペプチドをin vitroで培養し、産生されるサイトカインをELISA法で検討した。

(4)M3R<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウスの唾液腺組織に関して、IF法によりIFN<sup>-</sup> およびIL-17発現を検討した。

(5)IFN<sup>-</sup> およびIL-17のどちらが唾液腺炎発症に関わっているかを検討するために、M3R<sup>-/-</sup>xIFN<sup>-</sup> マウス、M3R<sup>-/-</sup>xIL-17<sup>-/-</sup>マウスを作成し、それぞれをM3Rペプチドで免疫した後にRag1<sup>-/-</sup>マウスに細胞移入し、唾液腺炎スコアについて解析した。

(6)M3R<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウスにおけるM3R反応性T細胞のT細胞エピトープを決定するために、3つのN領域(N1, N2, N3)と3つの細胞外ドメイン領域(第一、第二、第三)をコードする合成アミノ酸を用いて共培養し、それぞれのペプチドに反応するT細胞から産生されるIFN<sup>-</sup> およびIL-17をELISA法で解析

した。

(7)N1領域に関しては7つの変異ペプチド(TCRモチーフの一つのアミノ酸を別のアミノ酸に置換)を、第一細胞外ドメインに関しては8つの変異ペプチドを作成し、M3R<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウス由来のT細胞応答を抑制できるか否かを検討し、アナログペプチド(APL)を選定した。

(8)7)で選定したAPLをM3R<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウスに予防投与して唾液腺発症を抑制できるか否かを検討した。

### 4. 研究成果

(1)M3R<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウスの唾液腺において、唾液腺周囲に著明な単核球浸潤が認められ、そのマウスにおける唾液量も減少していた。病理像はSSの唾液腺炎に極めて類似し、SSの新しいマウスモデル(M3R induced sialadenitis, MIS)として報告した。

(2)MISマウスにおいて、M3R反応性T細胞が唾液腺炎を誘導していることを証明した。また、抗M3R抗体のみでは、本唾液腺炎が誘導できないことは別の実験で明らかにしている。

(3)MISマウスにおいて、M3R反応性T細胞からIFN<sup>-</sup> およびIL-17が有意に産生されていた。

(4)MISマウスの唾液腺において、IFN<sup>-</sup> およびIL-17発現細胞が有意に検出された。

(5)M3R<sup>-/-</sup>xIFN<sup>-</sup> <sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウス、およびM3R<sup>-/-</sup>xIL-17<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウスともに、M3R<sup>-/-</sup> Rag1<sup>-/-</sup>マウスに比べて、唾液腺炎スコアは有意に改善していた。この結果から、IFN<sup>-</sup> およびIL-17の両方のサイトカインがMIS発症に関わっていることが判明した。

(6)MISマウスにおけるM3RのT細胞エピトープは、N1領域と第一細胞外ドメインにあることが判明した。N1領域あるいは第一細胞外ドメイン反応性T細胞はともに、IFN<sup>-</sup> およびIL-17を産生していた。

(7)N1領域においては、APL5(AA7N T)、APL6(AA7N C)、APL7(AA7N S)がIFN<sup>-</sup>産生を80%以上抑制し、APLとして選定された。一方、第一細胞外ドメインにおいては、APL8(AA140A M)がIL-17産生を80%以上抑制しAPLとして選定された。

(8)N1-APL7をMISに投与した結果、唾液腺炎が著明に抑制されることが明らかになった。

以上の結果から、(1)M3R反応性Th1細胞およびTh17細胞がSS類似の自己免疫性唾液腺

炎発症に関わっていることが判明した。  
(2)APL 投与により自己免疫性唾液腺炎の抗原特異的制御が可能であることが証明された。今後、SS における APL を選定し、SS の抗原特異的治療戦略を開発する。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Asashima H, Tsuboi H, Iizuka M, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T.: The regulation of antigen-specific CD4+ T cells suppresses Sjögren's syndrome-like M3R induced autoimmune sialadenitis in vivo. *Arthritis Rheum*(in press) 査読有  
10.1002/art.39163
2. Iizuka M, Tsuboi H, Matsuo N, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Iwakura Y, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T.: A crucial role of ROR $\gamma$ t in the development of spontaneous sialadenitis-like Sjögren's syndrome. *J Immunol* 194(1):56-67,2015 査読有  
10.4049/jimmunol.1401118
3. Iizuka M, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T.: M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive IL-17- producing T cells promotes development of Sjögren's syndrome like sialadenitis. *Mod Rheumatol* 25(1):158-60, 2015 査読有  
10.3109/14397595
4. Tsuboi H, Nakai Y, Iizuka M, Asashima H, Hagiya C, Tsuzuki S, Hirota T, Miki H, Hagiwara S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Yoshihara T, Abe K, Sumida T.: DNA microarray analysis of labial salivary glands in IgG4-related disease. Comparison with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 66(10):2892-9,2014 査読有  
10.1002/art.38748
5. Sumida T., Tsuboi H, Iizuka M, Hirota T, Asashima H, Matsumoto I. : The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjögren's syndrome: A Critical Review *J Autoimmunity* 51:44-50,2014 査読有  
10.1016/j.jaut.2013.12.012
6. Sumida T., Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Matsumoto I.: Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol* 23(5): 841-5, 2013 査読有  
10.1007/s10165-012-0788-5

7. Iizuka M, Tsuboi H, Matsuo N, Kondo Y, Asashima H, Matsui M, Matsumoto I, Sumida T.: The crucial roles of IFN-g in the development of M3 muscarinic acetylcholine receptor induced Sjögren's syndrome-like sialadenitis. *Mod Rheumatol* 23(3):614-6, 2013 査読有  
10.1007/s10165-012-0785-8
8. Sumida T., Iizuka M, Asashima H, Tsuboi H, Matsumoto I. : Pathogenic role of anti-M3muscarinic acetylcholine receptor immune response in Sjögren's syndrome. *Presse Med* 41(9 Pt 2):e461-6,2012 査読有  
10.1016/j.lpm.2012.05.019

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Iizuka M, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T. ROR $\gamma$ t inhibit the expression of Foxp3 in CD4+CD25+ T cells in spontaneous development Sjögren's syndrome like sialadenitis. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014 年 4 月 25 日 グランドプリンス新高輪(東京都品川区)
2. Asashima H, Tsuboi H, Iizuka M, Hagiya C, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. The suppressive ability of altered peptide ligands to M3R induced autoimmune sialoadenitis in vivo. The EULAR Annual European Congress of Rheumatology 2014 年 6 月 12 日 Le Palais des Congres de Paris - Palais des Congres Paris(France)
3. 飯塚麻菜、坪井洋人、浅島弘充、廣田智哉、近藤裕也、高橋智、松本功、住田孝之 唾液腺炎発症における Th17 マスター転写因子 ROR $\gamma$ t の機能解析 第 23 回日本シェーグレン症候群学会・学術集会 2014 年 9 月 12 日 ホテルニュー長崎(長崎県長崎市)
4. 浅島弘充、坪井洋人、飯塚麻菜、高橋広行、萩谷千裕、近藤裕也、松本功、住田孝之 APL 投与による M3R 誘導自己免疫性唾液腺炎の抗原特異的制御 第 23 回日本シェーグレン症候群学会・学術集会 2014 年 9 月 13 日ホテルニュー長崎(長崎県長崎市)
5. Asashima H, Tsuboi H, Takahashi H, Hagiya C, Hirota T, Iizuka M, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. The suppressive ability of altered peptide ligands to M3R reactive T cells in M3R induced autoimmune sialadenitis. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10 日 国立京

都国際会館（京都府京都市）

6. Iizuka M, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Takahashi H, Kondo Y, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T. Enforced ROR  $\gamma$ 1 expression in T cells induced spontaneous development. 第43回日本免疫学会学術集会 2014年12月10日 国立京都国際会館（京都府京都市）

〔図書〕（計1件）

1. シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第2版 住田孝之 川上純 監修 診断と治療社、2014

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-medicine/rheumatology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住田 孝之 (SUMIDA, Takayuki)

研究者番号：00183054