

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 5 日現在

機関番号 : 12601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2012~2013

課題番号 : 24790990

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戦略の創出

研究課題名 (英文) Generation of novel therapeutic strategies for rheumatoid arthritis by regulation of autoantigen-specific T cells

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

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要 (和文) : 関節リウマチ (RA) の抗原特異的治療開発を目標として、RA 患者における抗原特異的 T 細胞の同定・機能解析を行った。RA 患者において自己抗原 BiP を認識するエフェクター T 細胞および制御性 T 細胞を同定し、エフェクター T 細胞に関してはその増殖能と病勢、抗体価が相関することがわかった。また制御性 T 細胞が認識するペプチドをマウスに経口投与したところ関節炎の軽減作用を認め、新たな関節炎治療戦略としての可能性が確認された。

研究成果の概要 (英文) : We aimed to establish new therapeutic strategies against rheumatoid arthritis (RA). In order to achieve this aim, some antigen-specific T cells were analyzed in RA patients so far. We newly identified the autoantigen BiP-specific effector and regulatory T cells in RA patients. Especially, the proliferative activities of BiP-specific effector T cells significantly correlated with RA disease activities and serum titers of anti-BiP and anti-citrullinated BiP antibodies. In contrast, BiP-specific regulatory T cells suppressed the proliferation and cytokine secretion of BiP-specific effector T cells. In addition, oral administration of the BiP-derived epitope, which were recognized by regulatory T cells in RA, could ameliorate the mouse model of arthritis by the induction of regulatory T cells. Collectively, this BiP-derived epitope could be applied for a new therapy of human diseases.

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・アレルギー内科学

キーワード : 関節リウマチ、CD4 陽性 T 細胞、BiP、T 細胞受容体、制御性 T 細胞、ペプチド療法

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ (Rheumatoid arthritis, RA) は全身の関節に持続的な炎症を起こし、関節構造破壊・機能障害に至る疾患である。近年、サイトカイン抑制療法により炎症の改善をみるようになってきているが、有効率、副作用の問題は解決がなされておらず、発症原因の解明を含めた根本的な RA 治療法の開発はまだ途上にある。RA の発症要因・病態については、自己免疫異常の強い関与が想定されている。特に、CD4 陽性 T 細胞については、T 細胞に抗原提示を行う HLA-DR 多型の高い寄与率、CD4 陽性 T 細胞が炎症関節へ集積する主なリンパ球である点、CTLA4-Ig による T 細胞抑制

療法の RA に対する有効性などから、RA 病因・病態に重要な役割を果たしていると考えられている。すなわち、RA 感受性 HLA-DR4 により抗原提示されやすい自己抗原により、活性化された自己抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞が自己免疫異常、関節炎発症のトリガーとなるという仮説が支持されている。その際、エフェクター T 細胞と制御性 T 細胞のバランス異常が免疫寛容の破綻に重要である可能性が示唆されている。実際に RA 患者においては制御性 T 細胞の機能異常が報告されており、RA 患者では制御性 T 細胞による免疫制御機構に問題が生じている可能性がある。また制御性 T 細胞に関しては、我々のグループで新規制御性 T

細胞として LAG3 陽性制御性 T 細胞を同定している(Okamura T, et al. Proc Natl Acad USA. 2009. 106:13974)。この新規制御性 T 細胞が RA においてどのような役割を果たすかについてはいまだ明らかではない。

(2) RA 感受性 HLA-DR4 に提示される自己抗原の候補として、いくつかの自己抗原由来エピトープ(vimentin など)が報告されているが、現在までに報告されているエピトープ特異的 T 細胞の割合は末梢血の 0.05%以下であり極めて minor な細胞集団である(Snir O, et al. Arthritis rheum. 2010. 62:44-52.)。エピトープ検索の困難な点としては、アルゴリズム上 HLA-DR 分子への結合の良好なペプチドであっても、生体内で実際に抗原提示されているとは限らない点である。そのため、実際の RA 患者において意義のあるエピトープは、RA 患者検体を十分用いた検討を経る必要がある。我々は RA で重要な自己抗原と考えられている BiP 蛋白に注目し、研究を進めており、特に抗シトルリン化 BiP 抗体の RA 病態への関与に関する研究の報告を行ってきた(Shoda H, et al. Arthritis Res Ther. 2011. 13:R191)。また、RA 患者検体を蓄積することで、BiP を特異的に認識する T 細胞についての検討を進めてきた。

(3) 新規 RA 治療戦略として、抗原特異的な免疫制御の可能性が期待されている。すなわち、RA で異常を起こしている免疫系の一部のみを特異的に制御することで、易感染性などの副作用のない治療法の開発が望まれている。このような抗原特異的な免疫制御療法の標的として、前述の RA で活性化されている自己抗原特異的 T 細胞集団が想定されており、RA 病態と関連する自己抗原特異的 T 細胞集団の同定と、その制御方法の確立が求められている。

## 2. 研究の目的

(1) 自己抗原 BiP 由来の HLA-DRB1\*0405 拘束性エピトープを同定する。

(2) RA 患者末梢血における BiP エピトープに対する T 細胞応答を解明する。また健康人との比較を行い RA における BiP 特異的 T 細胞応答異常の特徴を明らかにする。

(3) BiP 由来エピトープを用いた、マウス関節炎における治療モデルを確立する。

以上の検討を行うことにより、ヒト RA の抗原特異的な新規治療戦略の創出を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

HLA-DRB1\*0405 陽性 RA 患者、健康人の末梢血単核細胞(PBMC)を単離し、BiP 由来ペプチド 10<sup>6</sup> g/mL と 96 時間培養し、3H-thymidine 取り込み法にて増殖能を測定した。また培養上清のサイトカイン濃度測定(IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10)を ELISA 法(IL-17, IFN- $\gamma$ は

high-sensitivity ELISA 法)により行った。一部の実験では、抗 CD25 抗体を用いた MACS により予め CD25 陽性細胞を negative selection により除去した PBMC を使用し、同様の方法で培養を行った。

RA 症例については、血清抗 BiP 抗体、抗シトルリン化 BiP 抗体価を ELISA 法により測定し(Shoda H, et al. Arthritis Res Ther. 2011. 13:R191)、かつ DAS28, CDAI, SDAI による病勢評価を行い、BiP エピトープに対する増殖反応との相関解析を行った。

HLA-DR 分子とエピトープの結合については HA epitope の結合に対する阻害活性(IC50)を測定することで目的のペプチドの結合能を評価する Binding assay, 及び HPLC 法により結合による分子量増加を解析することで結合を確認した。

抗原特異的 T 細胞を同定する目的で HLA-DRB1\*0405 テトラマーを作成し、採取直後、および培養後の PBMC の染色を行った。またテトラマーの特異性についての検討を、テトラマー陽性細胞群を sorting したうえで、cDNA を合成し、シングルセル解析および next generation sequencing(NGS)による T 細胞受容体の配列を検討することにより行った。

マウスモデルとしては、HLA-DR4 との相同性が確認されている I-A<sup>q</sup>を MHC class II として有する関節炎感受性マウスである DBA/1J マウスを使用したコラーゲン誘導性関節炎(Collagen-induced arthritis, CIA)モデルを使用した。このマウスの関節炎発症直前(初回コラーゲン免疫後 day 28)より BiP456-475 ペプチド 200  $\mu$ g/day, 5 日間連続経口投与を行い、関節炎の重症度、病理スコアへの影響を観察した。また CIA マウス脾臓より CD4 陽性 T 細胞を単離し、T 細胞増殖、IL-10 産生、制御性 T 細胞分化をそれぞれ 3H-thymidine 取り込み法、ELISA 法、FACS 解析、遺伝子発現解析により検討した。

## 4. 研究成果

(1) BiP 由来ペプチド 42 種類のスクリーニングを行い、HLA-DRB1\*0405 陽性 RA 患者由来 PBMC の増殖を誘導する BiP エピトープを複数同定した。なかでも BiP336-355 は RA PBMC の増殖を、平均 stimulation index 2.5、HLA-DRB1\*0405 homogenous patients に限れば平均 3.0 と最も強力に誘導した。かつ、BiP336-355 は INF- $\gamma$ , IL-17 産生誘導能を有するエピトープであり、主に RA 患者においてエフェクター T 細胞(Th1, Th17, Th1/17 細胞)が認識していると考えられた。増殖誘導・サイトカイン産生ともに HLA-DRB1\*0405 陽性健康人 PBMC では認められなかったため、BiP336-355 に対する T 細胞応答は RA に特徴的であり、RA の病因・病態に関わっていることが想定された。また BiP336-355 に対する増殖反応は、RA の

疾患活動性、血清抗 BiP 抗体、抗シトルリン化 BiP 抗体価と有意な相関を示し、このことも BiP336-355 の RA の病態との関与を支持する結果であった。BiP336-355 の HLA-DRB1\*0405 分子への結合能は IC50<100nM と良好であることが複数の方法で証明された。以上より、BiP336-355 は HLA-DRB1\*0405 のエピトープであり、RA においては主にエフェクター T 細胞に認識されることがわかった。

(2) 前述の BiP エピトープスクリーニングの過程で増殖を誘導しなかった複数のペプチドに着目して、上清 IL-10 測定を行った。その結果、BiP 456-475 ペプチドが HLA-DRB1\*0405 陽性 RA 患者由来の PBMC からの IL-10 産生を最も強く誘導するエピトープとして同定された。PBMC からの IL-10 産生は RA、健常人ともに同程度認められた。また CD25 陽性制御性 T 細胞を PBMC から除去して同様の実験を行ったところ、IL-10 誘導作用は有意に減弱した。BiP456-475 との共培養は RA 患者 PBMC において BiP336-355 刺激による T 細胞増殖、IFN- $\gamma$ 、IL-17 といった炎症性サイトカイン産生を有意に抑制する作用があり、このことより BiP456-475 は制御性 T 細胞により認識されていることが想定された。この作用は抗 IL-10 抗体による IL-10 阻害により減弱したため IL-10 を介したエフェクター T 細胞抑制であると考えられた。以上の結果は、BiP456-475 を認識する細胞が、主に CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞であることを示唆している。HLA-DRB1\*0405 分子に対する BiP456-475 の結合能は BiP336-355 より弱いと有意に結合することが複数の方法により証明された。

(3) 上記の結果を踏まえ、BiP epitope-HLA-DRB1\*0405-PE テトラマーを作成し、末梢血 T 細胞染色を試みた。BiP336-355-HLA-DRB1\*0405 テトラマーは RA 患者由来の末梢血の平均 0.08% の細胞で陽性となり、コントロール (HA epitope tetramer, 0.01% 程度) と比較して増加していた。BiP336-355-HLA-DRB1\*0405 テトラマー陽性細胞は健常人末梢血の平均 0.02% であり、RA での有意な増加が確認された。また BiP336-355 と RA 患者由来 PBMC を共培養したところ、2 例中 1 例において BiP336-355-HLA-DRB1\*0405 テトラマー陽性細胞群の増加を認め (0.3%)、有意な増殖反応をみている可能性があった。培養実験については、既存のプロトコール (Snir O, et al. Arthritis rheum. 2010. 62:44-52.) に従って実験を行ったが、良好な培養条件など更なる条件検討が必要な状態である。BiP456-475 についてはその頻度はコントロールと同等であり、増殖は確認できなかった。HLA-DR テトラマーに関しては、特に MHC class II においては新技術であり、その特異性、再現性が議論されている。特に、非特異的結合をどう除くか、陽性細胞の cut-off line の設定などにつ

いてははまだ経験的であり、詳細な検討はなされていない。我々は現在、BiP336-355-HLA-DRB1\*0405 テトラマー陽性群、陰性群より CD4 陽性 T 細胞を回収し、T 細胞受容体配列をシングルセル解析および NGS による多クローン解析を用いて検討することで、テトラマーの特異性、および BiP336-355 特異的 T 細胞受容体の同定の可否について詳細に検討中である。(4) 上記の検討を踏まえて、マウス関節炎における治療実験を計画した。BiP456-475 ペプチドをマウス CIA モデルの発症直前より経口投与を行ったところ、マウスの関節炎スコア、病理スコアに有意な改善を確認した。投与用量については、100 $\mu$ g x 5 日間では関節炎は軽減したものの統計学的有意差はつかなかったが、200 $\mu$ g x 5 日間に増量したところ有意に抑制された。この CIA マウス (初回免疫後 day42) の脾臓より単離した CD4 陽性 T 細胞の増殖能を検討したところ、BiP456-475 経口投与群において II 型コラーゲン、BiP に対する T 細胞増殖が減弱していた。また BiP456-475 経口投与群において Whole BiP 蛋白、BiP456-475 再刺激による IL-10 産生が亢進していた。BiP456-475 経口投与群の脾臓においては CD4 陽性 CD25 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞がコントロール群と比較して増えており、また Foxp3、IL-10 の遺伝子発現も亢進していた。一方で LAG3、Egr2 に関しては FACS 解析、遺伝子解析において明らかな差を認めなかった。以上の結果より、BiP456-475 ペプチド経口投与が Foxp3 陽性制御性 T 細胞を誘導し、T 細胞免疫応答を抑制することで関節炎を改善させている可能性が示唆された。HLA-DR4 transgenic mouse における関節炎の検討については、この transgenic mouse における安定した関節炎の系が確立されておらず、BiP456-475 投与による治療実験は今後の検討課題となった。

## 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 Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K. Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells. Eur J Immunol. 査読有. Vol 43. No. 4. 2013. pp1063-1073. doi:10.1002/eji.201242942.
- ② Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Morita K, Ishigaki K, Suzukawa K, Kanaya K, Kondo K, Yamasoba T, Furukawa A, Kitahara N, Shoda H, Shibuya M, Okamoto A, Yamamoto K. Transcription

factor early growth response 3 is associated with the TGF- $\beta$ 1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo. J Immunol. 査読有. Vol 191. No. 5 2013. pp 2351-2359.  
doi: 10.4049/jimmunol.1202106.

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

[学会発表] (計 4 件)

- ① 庄田 宏文、藤尾 圭志、山本 一彦.  
Impaired homeostatic balance between autoantigen BiP-specific effector and regulatory T cells in rheumatoid arthritis. 第41回日本免疫学会総会. 2012年12月5日. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- ② 庄田 宏文、藤尾 圭志、山本 一彦.  
autoantigen Bip-specific CD4+ T cells in rheumatoid arthritis. 第50回日本臨床分子医学会学術集会. 2013年4月11日. 東京国際フォーラム(東京都中央区)
- ③ 庄田 宏文、藤尾 圭志、山本 一彦.  
autoantigen Bip-specific regulatory T cells in rheumatoid arthritis and thier therapeutic application. 第57回日本リウマチ学会総会. 2013年4月18日. 京都国際会議場(京都府京都市)
- ④ 庄田 宏文. 関節リウマチにおける抗原特異的T細胞応答. 第41回臨床免疫学会総会. 2013年11月29日. 海峡メッセ(山口県下関市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ペプチド、及びそれを含む医薬組成物  
発明者: 山本 一彦、藤尾 圭志、庄田 宏文

権利者: 国立大学法人 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-82683

出願年月日: 平成 25 年 4 月 11 日

国内外の別: 国内

○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