

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870078

研究課題名(和文)シェーグレン症候群における抗原特異的治療法の新規構築

研究課題名(英文)The establishment of antigen specific therapy for Sjogren syndrome

研究代表者

浅島 弘充 (Asashima, Hiromitsu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50708485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(Sjogren's syndrome; SS)のマウスモデルとして、MIS (M3R induced sialadenitis)が報告されている。本研究はMISのT細胞エピトープがN1と1st領域の2つあること、そして、それぞれのアミノ酸配列においてTCR結合部を置換した変異ペプチド(altered peptide ligand; APL)を作製、投与することで抗原特異的に唾液腺炎が抑制されることを報告した。更にはAPLによる抑制機序としてT細胞アナジの誘導が関与する機序も確認した。本研究結果はArthritis and Rheumatologyに論文掲載した。

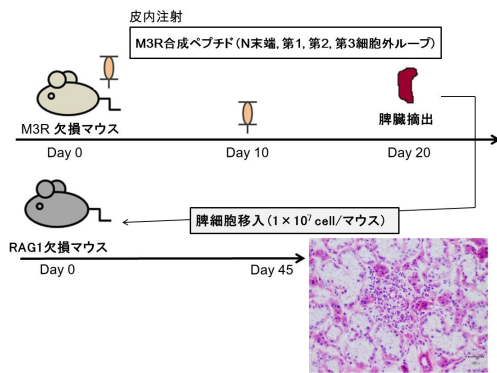
研究成果の概要(英文)：Rag1^{-/-} mice transferred with splenocytes of M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R)^{-/-} mice immunized with M3R peptides mixture (N-terminal regions; N1, N2, N3, and three extracellular loops; 1st, 2nd, 3rd) developed sialadenitis like Sjogren's syndrome (SS) (M3R induced sialadenitis; MIS). we confirmed that in MIS, M3R reactive CD4⁺ T cells were indispensable and the T cell epitopes were both N1 and 1st regions. Besides, altered peptide ligands (APLs), substituted in amino acid residues at TCR contact sites, of N1 peptide can regulate the T cell activation by inducing anergy, leading to the suppression of sialadenitis in vivo. This research was reported by the journal of 'Arthritis and Rheumatology'.

研究分野：自己免疫

キーワード：抗原特異的治療法 シェーグレン症候群 アナジー

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (Sjogren's syndrome; SS) は慢性唾液腺炎を主徴とする自己免疫疾患であるが、根治的治療法はない。近年、SSの自己抗原として唾液腺に高発現し唾液分泌に重要な役割を果たす M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3R) が注目されている。M3R の細胞外領域 (N 末端<N1、N2、N3>、第 1、2、3 細胞外ループ<1st、2nd、3rd>) をコードする混合ペプチドを免疫した M3R^{-/-}マウスの脾細胞を Rag1^{-/-}マウスに移入すると、SS 様の唾液腺炎 (M3R induced sialadenitis; MIS) が誘導される (下図)。本モデルは、M3R 反応性 T 細胞が唾液腺炎の発症に重要であること、IFN-g や IL-17 といったサイトカインが病態形成に関与することが示されている。しかし、MIS における T 細胞エピトープは同定されていない。また、TCR 結合部位のアミノ酸配列を置換した変異ペプチド (altered peptide ligand; APL) は、T 細胞の機能抑制を誘導する。T 細胞エピトープを同定後に APL を作製、投与することで MIS の誘導を抑制できることが期待される。



2. 研究の目的

MIS における M3R 反応性 T 細胞のエピトープを明らかにし、APL を用いた抗原特異的制御法の構築を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) M3R 混合ペプチド (N1, N2, N3, 1st, 2nd, 3rd) を免疫した M3R^{-/-}マウスの脾細胞を各ペプチドで刺激し、サイトカイン産生を測定した。
- (2) N1, 1st ペプチドを単独免疫した M3R^{-/-}マウスの脾細胞を Rag1^{-/-}マウスに移入し、唾液腺炎の発症を検討した。
- (3) N1, 1st ペプチドの altered peptide ligand (APL) を作成し、各々の APL を準至適濃度下で CD11c⁺、CD4⁺細胞と共培養した。培養上清中のサイトカイン産生を ELISA で測定した。
- (4) (1) で抑制性 APL の候補として挙げられた 1st-APL および N1-APL を各々 MIS に予防投与し、唾液腺炎への影響を評価した。

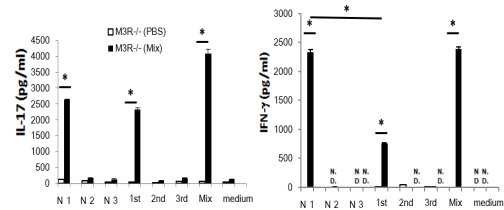
(5) 有意に唾液腺炎の発症を抑制した N1-APL7 投与群における頸部リンパ節中の CD4⁺細胞を単離し、リアルタイム PCR で発現上昇分子を探索した。

(6) N1-APL7 投与群における頸部リンパ節を単離し、M3R 混合ペプチド培養下で exogenous IL-2 を加え、細胞増殖能を検討した。

(7) アナジー関連分子の発現を N1-APL7 と CD11c⁺、CD4⁺細胞との共培養下で検討した。

4. 研究成果

(1) N1, 1st ペプチドに対する M3R 反応性 T 細胞からの IFN-g、IL-17 の有意に高い産生が認められた (下図)。

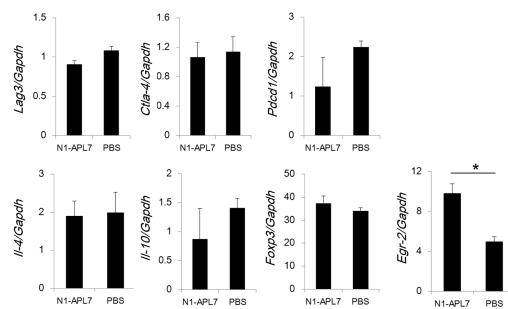


(2) N1, 1st ペプチドを単独免疫した M3R^{-/-}マウスの脾細胞を移入した Rag1^{-/-}マウスで、唾液腺炎の発症が確認された。

(3) N1 で 7 種類 (N1-APL1-7)、1st で 8 種類 (1st-APL1-8) の APL を作成した。N1-APL5 (AA15 N T)、N1-APL6 (AA15 N C)、N1-APL7 (AA15 N S) との共培養で IFN-g 産生が有意に抑制された。また、1st-APL8 (AA140 A M) で IL-17 産生が有意に抑制された。

(4) N1-APL7 投与群で唾液腺炎の発症が有意に抑制された。

(5) N1-APL7 投与群の頸部リンパ節中 CD4⁺細胞は有意に Early Growth Response 2 (Egr-2) の発現が高かった (下図)。

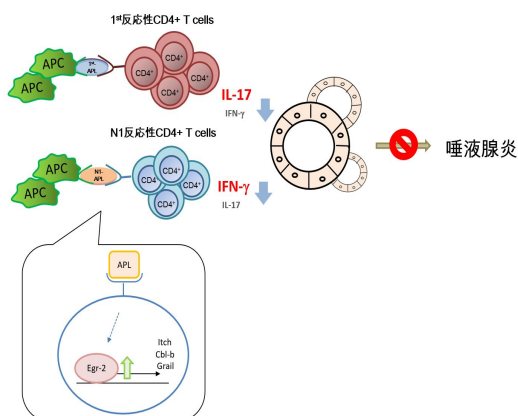


(6) N1-APL7 投与群の頸部リンパ節は exogenous IL-2 の添加により M3R 混合ペプチド培養下での細胞増殖が促進された。

(7) Itch, Cbl-b, Deltex-1 といったアナジー関連分子の発現が上昇した。

以上より *in vitro* で選定された抑制性 APL

の1つであるN1-APL7は *in vivo*でもMISの病態発症を有意に抑制した。T細胞のアナジ-誘導が抑制機序の可能性として示唆された(下図)。



本研究内容は、SSという根治的治療薬に乏しい自己免疫疾患の治療薬開発の一助として有用であるのみならず、TCR親和性の違いが抗原特異的T細胞に与える影響を解析するうえでも重要な成果と考える。今後、TCR親和性がT細胞に与える影響を詳細に解析することで、抗原特異的治療法の開発の一助になると期待する。

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 14 件)

Asashima H, Tsuboi H, Iizuka M, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. The Energy Induction of M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor-Reactive CD4+ T Cells Suppresses Experimental Sialadenitis-like Sjogren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 67(8):2213-25, 2015. (査読あり)

Iizuka M, Tsuboi H, Matsuo N, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Iwakura Y, Takahashi S, Matsumoto I, Sumida T. A Crucial Role of RORγt in the Development of Spontaneous Sialadenitis-like Sjögren's Syndrome. *J Immunol*. 194(1):56-67, 2015. (査読あり)

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. (査読あり)

Tsuboi H, Matsumoto I, Hagiwara S, Hirota T, Takahashi H, Ebe H, Yokosawa M, Hagiya C, Asashima H, Takai C, Miki H, Umeda N, Kondo Y, Ogishima H, Suzuki T, Hirata S, Saito K, Tanaka Y, Horai Y,

Nakamura H, Kawakami A, Sumida T. Efficacy and safety of abatacept for patients with Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis: Rheumatoid Arthritis with Orencia Trial toward Sjögren's syndrome Endocrinopathy (ROSE) trial-an open-label, one-year, prospective study-Interim analysis of 32 patients for 24 weeks. *Mod Rheumatol*. 25(2): 187-93, 2014. (査読あり)

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: 2892-9, 2014. (査読あり)

Tsuboi H, Ohira H, Asashima H, Tsuzuki S, Iizuka M, Matsuo N, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res*. 44(14): E471-9, 2014. (査読あり)

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 Autoimmun*. 51: 44-50, 2014. (査読あり)

Tsuboi H, Asashima H, Takai C, Hagiwara S, Hagiya C, Yokosawa M, Hirota T, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Yoshifuji H, Ohta A, Matsumoto I, Sumida T. Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjögren's syndrome in Japan. *Mod Rheumatol*. 24: 464-70, 2014. (査読あり)

浅島弘充、坪井洋人、高橋広行、廣田智哉、住田孝之：シェーグレン症候群に合併する呼吸器疾患、呼吸器内科、第27巻4号、282-286頁、2015(査読なし)

坪井洋人、萩原晋也、浅島弘充、高橋広行、廣田智哉、住田孝之：シェーグレン症候群、炎症と免疫、第23巻6号、522-529頁、2015(査読なし)

坪井洋人、浅島弘充、高橋広行、住田孝之：シェーグレン症候群、Mebio、第32巻5号、10-19頁、2015(査読なし)

坪井洋人、浅島弘充、高橋広行、廣田智哉、住田孝之：シェーグレン症候群 免疫異常における唾液腺傷害について、リウマチ科、第53巻3号、252-259頁、2015(査読なし)

坪井洋人、飯塚麻菜、浅島弘充、住田孝之：シェーグレン症候群におけるM3ムスカ

リン作働性アセチルコリン受容体に対する自己免疫応答、分子リウマチ治療、第8巻1号、49-54頁、2015(査読なし)

坪井洋人、浅島弘充、高橋広行、廣田智哉、住田孝之：Sjögren症候群、日本内科学会雑誌、第103巻10号、2507-2519頁、2014(査読なし)

〔学会発表〕(計6件)

浅島弘充、坪井洋人、飯塚麻菜、高橋広行、廣田智哉、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24回日本シェーグレン症候群学会、2015年9月8-9日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

H.Asashima, H.Tsuboi, H.Takahashi, T.Hirota, M.Iizuka, Y.Kondo, I.Matsumoto, T.Sumida. The anergy induction of M3R reactive CD4+ T cells suppresses experimental sialadenitis like Sjogren's syndrome in vivo. The 13th International Symposium on Sjogren's syndrome, 2015/5/19-22, Radisson Blu Royal Hotel, Bryggen (Bergen)

H.Asashima, H.Tsuboi, H.Takahashi, T.Hirota, M.Iizuka, Y.Kondo, I.Matsumoto, T.Sumida. The anergy induction of M3R reactive CD4+ T cells suppresses experimental sialadenitis like Sjogren's syndrome in vivo. The 59th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, 2015年4月23-25日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

浅島弘充、坪井洋人、飯塚麻菜、高橋広行、萩谷千裕、廣田智哉、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、2014年9月12-13日、ホテルニュー長崎(長崎県長崎市)

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 sialadenitis in vivo. EULAR 2014- Annual European Congress of Rheumatology, 2014/6/11-14, ExCel London, London (United Kingdom)

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 sialadenitis. International Concurrent Workshop, The 58th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, 2014年4月24-26日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)

〔図書〕(計1件)

浅島弘充、坪井洋人、住田孝之他：関節リウマチクリニカルクエスション100(住田孝之編集) 診断と治療社、232(74-75)頁、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 浅島 弘充
(ASASHIMA Hiromitsu)

筑波大学医学医療系・講師

研究者番号：50708485

(2)研究分担者 特記事項なし

(3)連携研究者 特記事項なし