

平成 29 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：2015～2016

課題番号：15K19565

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける抗原特異的治療法の構築

研究課題名(英文) Antigen specific therapy for rheumatoid arthritis

研究代表者

廣田 智哉 (HIROTA, Tomoya)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：30742845

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)：本研究は、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ(GPI)のT細胞エピトープ配列を一部置換したAPLを米穀に発現させ(APL発現米)、これを経口予防投与して関節炎を制御することを目的とした。APL発現米の経口予防投与はGPI誘導関節炎マウスの関節炎を有意に抑制した。この際、脾臓・所属リンパ節のIL-17産生、血清抗GPI-IgG抗体産生、脾臓の制御性T細胞におけるFoxp3発現・GITR発現は有意に上昇した。以上より、APL発現米の経口予防投与は制御性T細胞のFoxp3発現・GITR発現の上昇を介して、IL-17産生、血清抗GPI-IgG抗体産生を低下させ、関節炎を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of transgenic rice seeds expressing the altered peptide ligand (APL) of human glucose-6-phosphate-isomerase (GPI) in mice model of GPI-induced arthritis (GIA). Prophylactic treatment of GIA mice with APL12 transgenic (APL12-TG) rice seeds significantly reduced the severity of arthritis and titers of serum anti-GPI antibodies. APL12-TG rice seeds improved the histopathological arthritis scores and decreased IL-17 production. APL12-TG rice-treated GIA mice showed upregulation of Foxp3 and GITR protein in CD4+CD25+Foxp3+ cells in the spleen. APL12-TG rice seeds improved the severity of GIA through a decrease in production of IL-17 and anti-GPI antibodies via upregulation of Foxp3 and GITR expression on Treg cells in spleen.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：関節リウマチ Altered Peptide Ligand GPI

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は関節痛や関節腫脹を主徴とする慢性の自己免疫性炎症疾患である。RAの有病率は全世界で約1~3%とされており、わが国においても100万人余の患者が存在しているが、その発症メカニズムについては未だに十分な説明がなされていない。

Gluco-6-Phosphate Isomerase (GPI)はユビキタスに発現する解糖系酵素であるが、関節局所では軟骨表面や滑膜表面に局在しており、局所での免疫複合体活性化が関節炎を誘導することが明らかにされている。当研究室では、DBA/1JマウスにおけるGPIのT細胞エピトープを同定し、GPIペプチドを免疫することでRA類似の関節炎が誘導されるマウスモデル(GPI induced arthritis; GIA)を樹立している(Iwanami K et al. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10:130-141)。

マウスで関節炎原性が証明されている抗GPI抗体の検出は、RA患者では約15%と高くはないが、陽性者では関節炎の病勢を反映する。GPIへの免疫応答はRAの病態形成の一因である可能性が示唆されるとともに、ヒトにおいても抗原特異的な病態抑制に応用できる可能性が期待される。

申請者は、抗原特異的T細胞の活性を抑制する手段として、T細胞エピトープのアミノ酸配列の一部を置換した変異ペプチド(Altered Peptide Ligand; APL)に注目している。APLは、MHCクラスII分子には結合するがT細胞受容体には不完全にしか結合せず、抗原特異的T細胞をアナジーに陥らせて免疫応答を抑制すると考えられている。APLは抗原特異的T細胞にのみ抑制能を示すため、副作用の少ない治療薬になりうることを期待される。

当研究室では、II型コラーゲン(CII)誘導関節炎(type II Collagen Induced Arthritis; CIA)のモデルマウスに対して、CIIにおけるT細胞エピトープのAPLを作成し、腹腔内投与することで関節炎が抑制されることを報告している(Wakamatsu E et al. *Mod Rheumatol.* 2009; 19:366-371)。

また、イネ種子はプロテインボディーと呼ばれる小器官にタンパク質を大量に蓄積することが可能で、プロテインボディーに封入されたタンパク質は消化管内でタンパク分解の影響を受けにくくなる。さらに、室温での安定性、安全性、費用効果などの点から、遺伝子導入米は植物由来の食用医薬品の候補として期待されている。

APLと遺伝子組換え技術を組み合わせて、先行研究ではCIIペプチドのAPLのアミノ酸配列をコシヒカリ米に導入したAPL発現米を開発し、これをCIAマウスへ経口投与することで、関節炎が抑制されることを報告している(Iizuka M et al. *Plant Biotech J.* 2014; 12: 1143-1152)。

2. 研究の目的

本研究では、GIAマウスモデルを用いて、GPIのAPLを経口投与することで関節炎を抗原特異的に制御する新規経口治療法を構築する。また、将来的なRAの治療応用における実用性を念頭に、GPIにおけるT細胞エピトープのアミノ酸配列の一部を置換した変異ペプチドを導入した米穀(APL発現米)を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) APL発現米の作成とペプチド発現の評価
hGPI₃₂₅₋₃₃₉のアナログペプチドであるAPL12 (IWYINCFCETHAML)を設計し、APL12をグルテリンタンパクと連結させてキヌアカ米に遺伝子導入した。栽培・収穫した遺伝子導入米をビーズショッカーで粉末化し、抗グルテリン抗体を用いたImmunoblotでAPL12のペプチド発現を確認した。

(2) APL発現米の経口予防投与

GIAを誘導前、DBA/1Jマウスにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁したAPL12発現米(APL12-TG)を7日間(day -7~-1)ペプチド量として1回400 μ gずつ経口予防投与した。非遺伝子導入米(Non-TG)を経口投与したマウスをコントロールとした。

(3) GPI誘導関節炎の誘導と重症度評価

DBA/1Jマウスに、Day0でhGPI₃₂₅₋₃₃₉ 10 μ gを完全フロインドアジュバント 50 μ lおよびPBS 50 μ lで乳化して皮内免疫してGIAを誘導した。ブースター効果のために、Day0およびDay2に百日咳毒素 200ngを腹腔内投与した。足関節の関節炎重症度を2日毎に重症度スコアで評価した。

(4) 組織学的評価

Day14の足関節組織の炎症細胞浸潤をHE染色による組織学的スコアで評価した。

(5) 血清抗GPI IgG抗体産生

Day28における血清抗GPI IgG抗体価をELISAで評価した。

(6) 脾臓・単径リンパ節・腸間膜リンパ節のIL-17産生

Day14で採取した脾臓・単径リンパ節・腸間膜リンパ節細胞を、in vitroでhGPI₃₂₅₋₃₃₉ 18 μ g/mLで再刺激し、培養上清中のIL-17産生をELISAで評価した。

(7) 脾臓におけるCD4⁺T細胞のmRNA発現

Day14における脾臓CD4⁺T細胞のmRNA発現(IL-10、GITR、Egr2)を定量PCRで評価した。

(8) 脾臓のCD4⁺CD25⁺T細胞のFoxp3およびGITRにおける発現強度

Day14における脾臓CD4⁺CD25⁺T細胞のFoxp3発現、GITR発現をフローサイトメトリーで評価した。

4. 研究成果

(1) APL 発現米の作成とペプチド発現の評価
栽培・収穫した APL12-TG において、APL12 の発現が確認された (図 1)。APL12-TG 中の APL12 の推定発現量はグルテリン融合タンパク質として約 3.8mg / g であった。

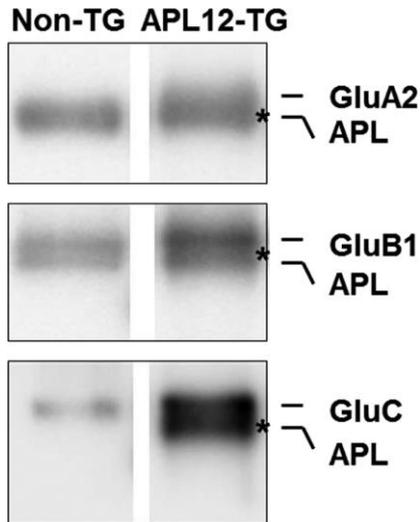


図 1 APL のペプチド発現

*は APL コンストラクトの遺伝子産物

(2) 関節炎の重症度と組織学的評価

Day10, 12, 14, 16 において、APL12-TG 群の関節炎の重症度は Non-TG 群より有意に抑制された (図 2)。APL12-TG 群の発症は Non-TG 群より遅延したが、発症率に有意差は認めなかった。

APL12-TG 群の足関節組織の炎症細胞浸潤は Non-TG 群より有意に抑制された (図 3)。

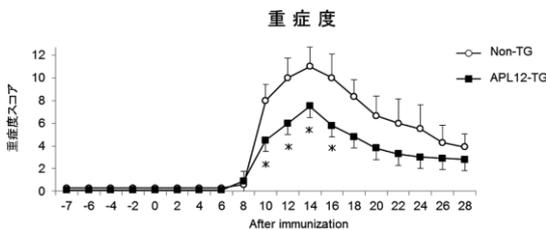


図 2 関節炎の重症度

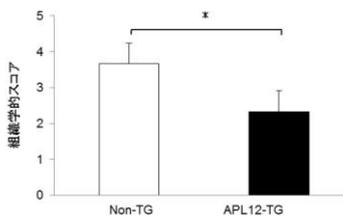
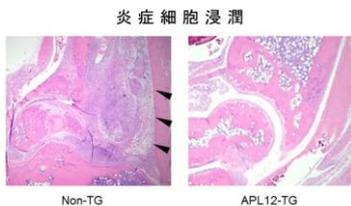


図 3 関節炎の炎症細胞浸潤

矢印は炎症細胞浸潤. * $P < 0.05$ (t-test)

(3) 血清抗 GPI IgG 抗体産生

APL12-TG 群の血清抗 GPI IgG 抗体価は Non-TG 群より有意に低下した (図 4)。

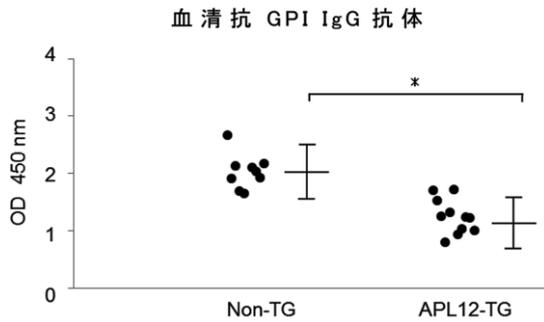


図 4 抗GPI IgG抗体産生 * $P < 0.05$ (t-test)

(4) 脾臓・単径リンパ節・腸間膜リンパ節における GPI 刺激下での IL-17 産生

APL12-TG 群の脾臓・単径リンパ節では、GPI 刺激下での IL-17 産生は Non-TG 群より有意に抑制された (図 5)。腸間膜リンパ節の IL-17 産生は有意差を認めなかった。

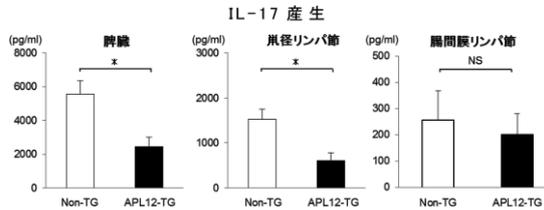


図 5 脾臓・単径リンパ節・腸間膜リンパ節の IL-17 産生 * $P < 0.05$ (t-test)

(5) 脾臓 CD4⁺T 細胞の mRNA 発現

APL12-TG 群の脾臓 CD4⁺T 細胞における GITR mRNA 発現は、Non-TG 群より有意に上昇していた (図 6)。その他、IL-10、Egr2 の mRNA 発現は有意差を認めなかった。

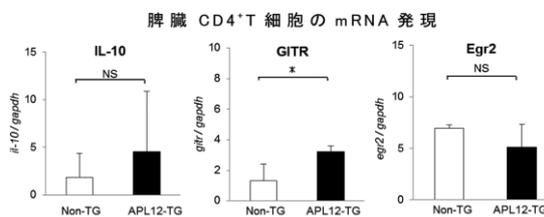


図 6 脾臓CD4⁺T 細胞のmRNA発現

* $P < 0.05$ (t-test)

(6) 脾臓 CD4⁺CD25⁺T 細胞の Foxp3 および GITR の発現強度

APL12-TG 群の脾臓 CD4⁺CD25⁺T 細胞の Foxp3 および GITR の発現強度 (mean fluorescence intensity: MFI) は Non-TG 群より有意に上昇していた (図 7)。脾臓における CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞、すなわち制御性 T 細胞の分画には有意差を認めなかった。

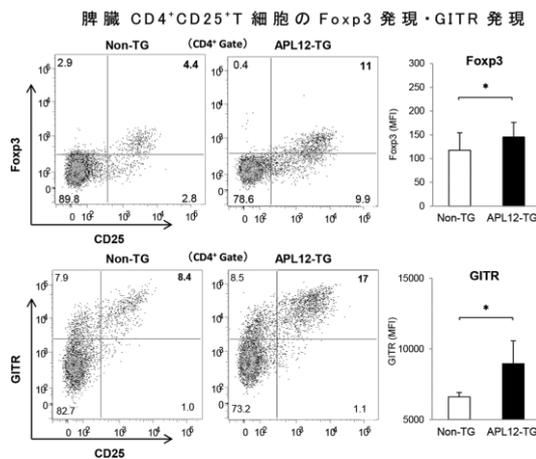


図7 脾臓CD4⁺CD25⁺T細胞の抑制関連分子

* $P < 0.05$ (t-test)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

① 廣田智哉、坪井洋人、飯塚-古賀麻菜、高橋広行、浅島弘充、横澤将宏、近藤裕也、太田賢、若佐雄也、松本功、高岩文雄、住田孝之、**Suppression of glucose-6-phosphate isomerase induced arthritis by oral administration of transgenic rice seeds expressing altered peptide ligands of glucose-6-phosphate-isomerase.** *Mod Rheumatol.* 27:457-465. 2017. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

① 廣田智哉、**Altered Peptide Ligand** 発現米を用いた GPI ペプチド誘導関節炎の抑制効果の検討、第 59 回日本リウマチ学会、2015 年 4 月 23 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

② 廣田智哉、**Altered Peptide Ligand** 発現米を用いた GPI ペプチド誘導関節炎の抑制効果の検討、第 44 回日本免疫学会、2015 年 11 月 18 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

③ 廣田智哉、**Altered Peptide Ligand** 発現米を用いた GPI ペプチド誘導関節炎の抑制効果の検討、第 60 回日本リウマチ学会、2016 年 4 月 21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

④ 廣田智哉、**Altered Peptide Ligand** 発現米を用いた GPI ペプチド誘導関節炎の抑制効果の検討、第 44 回臨床免疫学会、2016 年 9 月 8 日、京王プラザ (東京都・新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田智哉 (HIROTA TOMOYA)