

令和 2 年 11 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19609

研究課題名（和文）自己免疫疾患における新しい抗原提示機構とその意義について

研究課題名（英文）Novel antigen presentation mechanism in autoimmune diseases and its significance

研究代表者

竹下 勝（Masaru, Takeshita）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：10571135

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）：研究成果については一部のみの公表とし、後日全てを公表できる段階になり次第開示する。

HLAとIgGの結合を詳細に調べることで、HLAとの結合にはタンパクの立体構造が重要であることを明らかにし、またIgGのどの部位がHLAに結合しているのかを明らかにした。また、関節リウマチ以外の疾患においても自己抗原がHLAに結合したことから、幅広い自己免疫疾患で同様の事が起こっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA-DRとUnfoldingタンパク質との結合として見つかった現象を詳細に解析することで結合様式をある程度明らかにすることができ、これまで考えられていた以上に抗原提示機構が複雑かつ多様であることが明らかになった。それらの機構が自己免疫疾患でどのように働いているかを明らかにすることで、疾患の根本の病態が解明できる可能性があると思われる。

研究成果の概要（英文）：Full research results will be disclosed as soon as they can be released later.

Detailed examination of the binding between HLA and IgG revealed that the conformational structure of the protein is important for binding to HLA, and we also revealed which site of IgG bound to HLA. In addition, self-antigen binding to HLA could be observed in other autoimmune diseases, suggesting that this antigen presenting manner may occur in a wide range of autoimmune diseases.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：自己免疫 抗原提示 HLA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは自己免疫学的機序を基盤とする持続性滑膜炎により関節破壊をきたす難治性疾患である。その病態には TNF、IL-6 が深く関与することが明らかになり、それらを標的とした治療は大きな効果を上げているが、これらの薬剤は病態のもととなる免疫学的異常を是正する事は出来ず、薬剤中止により再燃する例も多い。医療経済的な側面からも、寛解維持ではなく根治を目指した治療を開発することが急務となっているが、そのための病態解明は進んでおらず、依然として疾患の背景にある免疫学的異常が解明されていない。

以前より自己免疫疾患では多様な自己抗体が出現することが知られているが、その出現メカニズムについては明らかになってはいない。特に関節リウマチ患者では 60-70% の患者でリウマチ因子 (RF、変性した IgG の Fc 部分に対する IgM 型の抗体) が出現することが知られており、この自己抗体は疾患の発病に先行して出現する事や、病変局所である関節滑膜中に、RF 産生 B 細胞が存在する事などから、関節リウマチの発病に密接にかかわっていると予想されている (Dorner T, et al. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16(3):246-253.)。また、遺伝学的研究で関節リウマチの発症リスクに最も強く関わる遺伝子として、Class2 MHC の特に HLA-DR の多型が報告され、自己抗原の提示に関与する可能性が指摘されていたが、どのタンパクが自己抗原でどのように提示されているのかは未だ明らかになっていない (Jones EY, et al. *Nat Rev Immunol* 2006;6(4):271-282.)。

通常、獲得免疫反応における抗原提示においては、Class1 MHC は 8AA 程度のペプチドが結合し CD8+T 細胞を刺激し、Class2 MHC は 15-20AA 程度のペプチドを結合し CD4+T 細胞を刺激すると考えられている。Class2 MHC でペプチドの長さにはばらつきがあるのは、ペプチドを挟み込む溝の両端が開いた構造をしているためである。近年、細胞内で正しい立体構造を形成できなかった Unfolding protein が、ペプチドに切断されることなくそのまま Class2 MHC 上に乗って提示されるという機構が発見された (Jiang Y, et al. *Int Immunol* 2013;25(4):235-246.)。この Unfolding protein の提示はタンパクが IgG の場合にも起こり、Unfolding IgG と HLA-DR を共発現させると、HLA-DR に IgG が結合して提示されることが明らかになり、さらにこの際に各 HLA-DR の Unfolding IgG の提示のされやすさと、関節リウマチ発症のオッズ比が高い相関関係を示すことが明らかになった (Jin H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(10):3787-92.)。この事は、HLA-DR 上に間違えて提示されてしまった IgG を免疫細胞が認識してしまうことで、自己免疫反応が始まり、自己抗体 (RF) の産生、さらには関節リウマチの発症につながる可能性を示唆している。先述の論文で実際に関節リウマチ患者の滑膜組織でも、HLA-DR と IgG が結合していることも示された。

さらに、抗リン脂質抗体症候群においても同様の機序が考えられており、同疾患で高頻度に認められる自己抗体の対応抗原である 2GP が、同疾患の発症リスクの高い多型の HLA-DR により良く結合し、その複合体に患者の自己抗体が結合でき、それにより補体依存性の細胞障害を引き起こすことが明らかになった (Tanimura K, et al. *Blood.* 2015;125(18):2835-44.)。これらは従来の Class2 MHC による抗原提示の常識を覆す新しい発見ではあるものの、自己免疫疾患の発症頻度が非常に低い事から考えると、MHC の多型とそれによる鍵となる抗原の提示、それが起こりやすい、もしくは免疫系が反応しやすい環境要因などの様々な条件がそろって初めて起こる事象であると予想される。現時点では、こういった現象が起こっている場所や関わっている免疫細胞の特性などについては、ほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

近年、折り畳みに失敗した Unfolding protein が Class2 MHC 分子と複合体を形成し細胞表面に提示されるという機構が発見された。関節リウマチの自己抗原である IgG や抗リン脂質症候群の自己抗原である 2GP がこの機構によって細胞表面に提示されることが確認され、自己免疫疾患の病態解明における大きな手掛かりとなっているが、この複合体の詳細や提示が起こる条件、疾患の中の位置づけについては未解明な部分が多い。本研究においては関節リウマチを最初の研究対象として、疾患マーカー候補および治療標的にもなりうる HLA/自己抗原複合体の構造を明らかにし、かつそれに対する患者の免疫応答を詳細に解析することで、真の自己抗原分子を含めた病態解明に結びつく成果を上げることを目的とした。

3. 研究の方法

各種の HLA-DR や IgG、その他の抗原提示関連遺伝子の発現ベクターを作成した。293T 細胞に HLA と IgG を同時にトランスフェクションし、HLA や IgG を細胞表面に発現させた。細胞表面の分子は HLA-DR に対する抗体、IgG に対する抗体、IgG に付加したタグに対する抗体などを利用して、FACS を用いて検出した。細胞表面の複合体に患者血清中のリウマチ因子が結合できるかは、1 次抗体に血清希釈液を、2 次抗体に抗ヒト IgM を用いることで検討した。細胞における遺伝子発現はリアルタイム PCR 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1)HLA と IgG の結合について

IgG のどの部分が HLA-DR に結合しているのかを調べるため、IgG を断片化したベクターを作成した。また、抗原提示に必要とされる関連分子をクローニングした。それぞれのベクターと HLA を共発現させ、細胞表面に提示される IgG の量を FACS を用いて定量し、HLA と IgG の結合部位を探索した。当初、IgG を C 末端側から 50-100AA ずつアミノ酸を削ったものを準備し検討した。C 領域から削ったものでは C 末端側から 100AA 削ったものでは結合が認められるのに対し、150AA 程度短縮したもので HLA との結合がなくなったため、100-150AA の領域で結合しているのではないかと考えられた。しかしながらその部分のみを、全長 IgG が結合しやすい HLA の型と、結合しにくい HLA の型と共に共発現させてみると、各種 HLA と IgG 断片の結合プロファイルは、各種 HLA と IgG 全長の場合とは異なっていた。これらの結果からは、タンパクを発現した際の全体の立体構造が HLA の結合の程度に関係しているのではないかと推測された。

(2)HLA/IgG 複合体とリウマチ因子(IgG-Fc 活性を持つ IgM 抗体)の関係

HLA/IgG 複合体を用いて、関節リウマチ患者のリウマチ因子がどのように HLA/IgG 複合体を認識するのかを調べた。全長 IgG と IgG の C 末端部分を削ったもので検討したところ、RF は主に全長 IgG のみを認識したことから、リウマチ因子のほとんどは IgG-Fc の末端部分を認識することが明らかになった。

(3)抗原提示に関わる分子の発現について

一般的には抗原提示は樹状細胞や B 細胞等の恒常的に Class2 MHC 分子を発現している細胞で行われていると考えられているが、ヒトにおいては Interferon (IFN)の刺激によって普段は Class2 MHC 分子を発現していない細胞でも発現が見られることが知られている。また、関節リウマチでは滑膜線維芽細胞などの病変局所で様々な細胞が Class2 MHC 分子を発現している事が知られている。そのため、プロフェッショナルな抗原提示細胞以外の細胞でも Class2 MHC 分子が発現していれば IgG との複合体を形成できる可能性が考えられた。そこで、HLA-DR、HLA-DMA、HLA-DMB、Class transactivator、Cathepsin family、Invariant chain 等の抗原提示に関わる分子群について、滑膜線維芽細胞を含む各種細胞での遺伝子発現、およびサイトカインの影響下での発現変動について検討した。その結果、刺激のない状況では滑膜線維芽細胞は抗原提示に関わる分子をあまり発現していなかったが、IFN 刺激によって大幅に発現上昇が認められた。

(4)IgG 以外の自己抗原と HLA の結合について

関節リウマチでは IgG の Fc 部分が自己抗原となっているが、IgG 以外の抗原に対しても検討するため、シェーグレン症候群関連の抗原 (SSA, SSB) および筋炎関連の複数の抗原 (Jo-1、MDA5 等) をクローニングし、HLA との結合を検討した。これらの自己抗原は細胞内 (核内) タンパクであり、それらの抗原は発現させても細胞内で HLA と会合する機会がないと考えられ、結果も同様に結合は見られなかった。ただし、Jo-1 や MDA5 にシグナルペプチドを付加して強制的に分泌経路に乗せることで、HLA との結合が観察された。さらにその複合体に自己抗体も結合できることを確認した。

(5)本研究の意義と今後の展望

HLA と IgG の結合を詳細に調べることで、結合にはタンパクの立体構造が重要であることが判明した。この経路が抗原提示の新たな経路である可能性がある。また、関節リウマチ以外の疾患においても、自己抗原が HLA に結合したことから、幅広い自己免疫疾患で同様の事が起っている可能性があり、今後より詳細な検討を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Takeshita M, Suzuki K, Kaneda Y, Yamane H, Ikeura K, Sato H, Kato S, Tsunoda T, Arase H, Takeuchi T. Antigen-driven selection of antibodies against SSA, SSB, and the centromere “complex”, including a novel antigen, MIS12 complex. Ann Rheum Dis 2020;79(1):150-158.

〔学会発表〕(計 1件)

1. 竹下勝、シェーグレン症候群の唾液腺における自己抗体産生、第62回日本リウマチ学会総会・学術集会、2018年

〔図書〕(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 勝也

ローマ字氏名：SUZUKI, Katsuya

研究協力者氏名：荒瀬 尚

ローマ字氏名：ARASE, Hisashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。