

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20928

研究課題名(和文) 抗原特異的T細胞の抑制によるシェーグレン症候群での新規治療薬の開発

研究課題名(英文) The establishment of new therapies for Sjogren's syndrome focusing on antigen-specific T cells

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(SS)において注目されている自己抗原であるM3ムスカリン作働性アセチルコリン受容体(M3R)に対する免疫応答に着目し、ヒトM3R反応性CD4+T細胞のSS病態への影響、およびその解析結果を元にした抗原特異的治療法の構築を目的とした。ヒトSS患者の小唾液腺に浸潤するT細胞より細胞株を樹立した。同時に、ヒトM3Rの全長(590アミノ酸配列)をカバーする約20mer×45種類の合成ペプチドを作成(5merずつ前後のペプチドが重なるようデザイン)した。現在、同一患者のCD14+細胞から誘導した樹状細胞および作製したペプチドを用いてT細胞株のM3R反応性を継続して評価している。

研究成果の概要(英文)：Sjogren's syndrome (SS) is an autoimmune disease characterized by infiltration of lymphocytes including CD4+ T cells into salivary glands. The restricted usage of T cell receptor (TCR) has been reported, suggesting the antigen-specific immune response is the main pathologic mechanism. M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) is evaluated to be one of the auto-antigens of SS, so we tried to evaluate M3R reactive CD4 T cells from patients. CD4+ T cells from salivary glands of a patient with primary SS were single-cell sorted and clones were established. The TCR V sequences among established clones were checked. Next, functional dendritic cells were induced from CD14+ cells of the same patient. Now the evaluation of M3R reactivity of established T cell clones are going on, using dendritic cells and M3R peptides.

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 M3ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 抗原特異的T細胞

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 M3R 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。SS 患者の末梢血中に抗 M3R 抗体が存在すること (Dawson L, et al. Arthritis Rheum. 2005; 52: 2984-2995) や、M3R 反応性 T 細胞が検出されること (Naito Y, et al. Ann Rheum Dis. 2006; 65: 269-71.) などから、SS 病態に M3R 抗原への自己免疫応答の関与が示唆されている。また、本研究室ではマウスを用いて M3R に対する自己免疫応答により SS 様の唾液腺炎が誘導されること (M3R induced sialadenitis; MIS) を確認した。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り、更に申請者はこの自己抗原反応性 T 細胞をアナログペプチドにより抑制することで唾液腺炎の発症が抑制できることを示した (Asashima H, et al. Arthritis Rheumatol. 2015; 67: 2213-25.)。これらの知見から、現時点では

- ・ ヒト末梢血において M3R の自己免疫応答が何らかの SS 病態に関与していること
- ・ マウスモデルの検討から M3R 反応性 T 細胞の自己免疫応答が唾液腺炎を誘導すること、およびアナログペプチドにより T 細胞を抑制することで抗原特異的に唾液腺炎が抑制されること

が確認されている。しかし、ヒト SS で実際に病変部局所において M3R 反応性 T 細胞が存在するか、またその T 細胞が腺組織の破壊にどのような影響を及ぼすのかは不明である。病態に関与するのであれば、末梢血中でも M3R 反応性 T 細胞を検出し、末梢血/小唾液腺いずれの M3R 反応性 T 細胞も抑制しうるアナログペプチドを選定することで抗原特異的治療法の確立が期待できる。

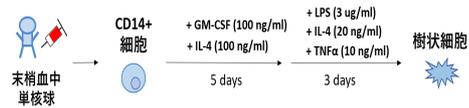
2. 研究の目的

SS マウスモデルにおけるアナログペプチドによる抗原特異的治療法を実際 SS 患者においても臨床応用すべく、まずは唾液腺局所における M3R 反応性 T 細胞の検出を行い SS 病態への関与を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SS 患者の診断時に摘出された小唾液腺より CD4+T 細胞の single cell sorting を行い、T 細胞株を樹立する。
 (2) T 細胞株のモノクローナリティを確認するため、(1) で樹立した CD4+T 株より cDNA を合成し multiplex PCR 法より T 細胞受容体 (TCR) をシークエンスで確認する。
 (3) M3R 分子全長をカバーする M3R ペプチドを作製する。
 (4) T 細胞株を樹立した同一患者の末梢血中より MACS にて CD14+細胞を単離する。その後、

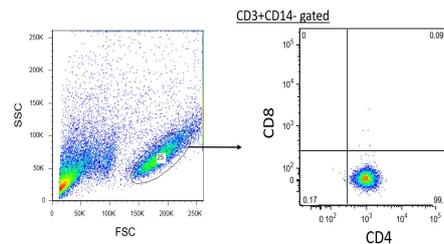
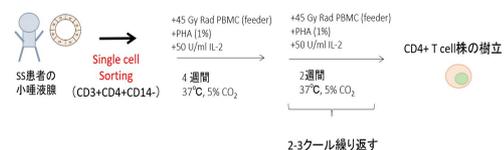
GM-CSF/IL-4 で 5 日間培養後に TNF/LPS/IL-4 で刺激を行い、樹状細胞を誘導する (下図)。



(5) (2) で monoclonality が確認できた CD4+T 細胞株および (4) で誘導した樹状細胞を M3R ペプチド抗原下で共培養を行い、樹立した T 細胞株の抗原特異性および T 細胞エピソードを Elispot Assay および BrdU を用いて評価する。

4. 研究成果

(1) ヒト SS 患者の小唾液腺より CD4+CD4+CD14-細胞を single cell sorting し 45Gy 放射線照射済のアロ末梢血単核球をフィーダー細胞として用いて T 細胞株が樹立できた (下図)。



(2) (1) で樹立した各々の T 細胞株より TCR を確認した。樹立した一部の T 細胞株において CDR3 領域を含めた TCR 解析を行い、monoclonality が確認できた。

(3) ヒト M3R の全長 (590 アミノ酸配列) をカバーする約 15-20mer のペプチドを 45 種類作製した。尚、それぞれのペプチドが 5mer 前後ずつ重なるようにデザインすることで、全長をカバーした。

(4) T 細胞株を樹立した同一の SS 患者の末梢血より CD14+細胞を採取し、上記のプロコールにより培養を行った。HLA-ABC, DR や CD80/86 などの発現も FACS にて確認し、抗原提示能を有する樹状細胞が誘導できた。

(5) (2) で monoclonality を確認した T 細胞株と (4) で誘導した樹状細胞の M3R ペプチド下での共培養を行い、M3R 反応性 T 細胞株の選定を行った。Elispot Assay にて IFNγ 産生を確認すると共に、BrdU にて細胞増殖能も評価を行った。現在、各 T 細胞株および M3R

ペプチドを組み合わせて順次評価中である。

本内容は、病変局所に存在する抗原特異的 T 細胞の病態への影響を解析するのみならず、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になりうる有用な研究と期待される。

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 12 件)

Sumida T, Azuma N, Moriyama M, Takahashi H, Asashima H, Honda F, Abe S, Ono Y, Hirota T, Hirata S, Tanaka Y, Shimizu T, Nakamura H, Kawakami A, Sano H, Ogawa Y, Tsubota K, Ryo K, Saito I, Tanaka A, Nakamura S, Takamura E, Tanaka M, Suzuki K, Takeuchi T, Yamakawa N, Mimori T, Ohta A, Nishiyama S, Yoshihara T, Suzuki Y, Kawano M, Tomiita M, Tsuboi H. Clinical practice guideline for Sjögren's syndrome 2017. *Mod Rheumatol* 28(3):383-408, 2018. doi: 10.1080/14397595.2018.1438093. (査読あり)

Hirota T, Tsuboi H, Takahashi H, Asashima H, Ohta M, Wakasa Y, Matsumoto I, Takaiwa F, Sumida T. Suppression of GPI-induced arthritis by oral administration of transgenic rice seeds expressing altered peptide ligands. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 40(1):28-34, 2017. doi: 10.2177/jsci.40.28. (査読あり)

Iizuka-Koga M, Asashima H, Ando M, Lai CY, Mochizuki S, Nakanishi M, Nishimura T, Tsuboi H, Hirota T, Takahashi H, Matsumoto I, Otsu M, Sumida T. Functional Analysis of Dendritic Cells Generated from T-iPSCs from CD4+ T Cell Clones of Sjögren's Syndrome. *Stem Cell Reports* 8(5):1155-1163, 2017. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.010. (査読あり)

Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Takahashi H, Hirota T, Noma H, 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, Matsumoto I, Sumida T. Comparison of performance of the 2016 ACR-EULAR classification criteria for primary Sjögren's syndrome with other sets of criteria in Japanese patients. *Ann Rheum Dis* 76(12):1980-1985, 2017. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210758. (査読あり)

Hirota T, Tsuboi H, Iizuka-Koga M, Takahashi H, Asashima H, Yokosawa M, Kondo Y, Ohta M, Wakasa Y, Matsumoto I, Takaiwa F, Sumida T. 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(3):457-465, 2017. doi: 10.1080/14397595.2016.1218598. (査読あり)

Tsuboi H, Matsumoto I, Hagiwara S, Hirota T, Takahashi H, Ebe H, Yokosawa M, Yagishita M, Takahashi H, Kurata I, Ohya A, Honda F, Asashima H, Miki H, Umeda N, Kondo Y, Hirata S, Saito K, Tanaka Y, Horai Y, Nakamura H, Kawakami A, Sumida T. Effectiveness of abatacept for patients with Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis. An open label, multicenter, one-year, prospective study: ROSE (Rheumatoid Arthritis with Orencia Trial toward Sjögren's syndrome Endocrinopathy) trial. *Mod Rheumatol* 26(6):891-899, 2016. doi: 10.3109/14397595.2016.1158773. (査読あり)

坪井洋人、本田文香、大山綾子、浅島弘充、住田孝之：シェーグレン症候群の筋・関節病変、リウマチ科 第 57 巻 5 号、472-481 頁、2017 (査読なし)

坪井洋人、安部沙織、高橋広行、浅島弘充、住田孝之：シェーグレン症候群の神経病変、リウマチ科 第 57 巻 5 号、466-472 頁、2017 (査読なし)

坪井洋人、高橋広行、浅島弘充、住田孝之：アバタセプト (abatacept: IV vs SC) Mebio 第 34 巻 4 号、45-53 頁、2017 (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、分子リウマチ治療 第 10 巻 1 号、27-31 頁、2017 (査読なし)

坪井洋人、高橋広行、萩原晋也、浅島弘充、廣田智哉、住田孝之：シェーグレン症候群、炎症と免疫、第 24 巻 4 号、48-54 頁、2016 (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と C 型肝炎ウイルス感染、リウマチ科、第 56 巻 3 号、301-306 頁、2016 (査読なし)

[学会発表](計 20 件)

Takahashi H, Tsuboi H, Asashima H, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T. DNA microarray analysis identifies nuclear receptor subfamily 4 group a member 2(NR4A2) as a novel molecule involved in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. The 82 Annual Scientific Meeting on the ACR, 2017/11/4, San Diego, USA

高橋広行、坪井洋人、浅島弘充、近藤裕

也、松本功、住田孝之：シェーグレン症候群患者の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 発現亢進と Th17 分化、第 4 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2017 年 10 月 8 日、東京

高橋広行、坪井洋人、浅島弘充、森山雅文、近藤裕也、松本功、中村誠司、住田孝之：DNA マイクロアレイによるシェーグレン症候群の唾液腺における遺伝子解析、第 45 回日本臨床免疫学会総会、2017 年 9 月 29 日、東京

本田文香、坪井洋人、寺崎真由、寺崎俊彦、清水優、柳下瑞希、大山綾子、高橋広行、横澤将宏、浅島弘充、近藤裕也、松本功、住田孝之：シェーグレン症候群の入院症例における ESSDAI、ESSPRI の解析、第 26 回シェーグレン症候群学会学術集会、2017 年 9 月 8 日、東京

浅島弘充、飯塚麻菜、安藤美樹、頼貞儀、坪井洋人、高橋広行、松本功、大津真、住田孝之：シェーグレン症候群患者由来 T-iPS 細胞から誘導した樹状細胞の機能解析、第 26 回シェーグレン症候群学会学術集会、2017 年 9 月 8 日、東京

高橋広行、坪井洋人、浅島弘充、近藤裕也、松本功、住田孝之：シェーグレン症候群患者の CD4 陽性 T 細胞における NR4A2 発現亢進と Th17 分化、第 26 回シェーグレン症候群学会学術集会、2017 年 9 月 8 日、東京

坪井洋人、萩原晋也、浅島弘充、高橋広行、廣田智哉、野間久史、梅原久範、川上純、中村英樹、佐野統、坪田一男、小川葉子、高村悦子、斎藤一郎、井上裕子、中村誠司、森山雅文、竹内勤、田中良哉、平田信太郎、三森経世、松本功、住田孝之：2016 年アメリカリウマチ学会-欧州リウマチ学会一次性シェーグレン症候群新分類基準の日本人における検証、第 26 回シェーグレン症候群学会学術集会、2017 年 9 月 8 日、東京

瀨川誠司、近藤裕也、飯塚晃、金子駿太、横澤将宏、古山琴菜、浅島弘充、坪井洋人、後藤大輔、松本功、住田孝之：DNA マイクロアレイを用いた成人 Still 病由来単球の遺伝子発現解析、第 38 回日本炎症・再生医学会、2017 年 7 月 19 日、大阪

Takahashi H, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T.: DNA microarray analysis identifies NR4A2 as a novel molecule involved in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. The 7th East Asian Group of Rheumatology, 2017/7/8, Tokyo

Asashima H, Iizuka M, Ando M, Lai C-Y, Tsuboi H, Hirota T, Takahashi H, Matsumoto I, Otsu M, Sumida T.: The functional analysis of dendritic cells developed from

T-iPS cells-derived from a single CD4+ T cell of Sjögren's syndrome. The 7th East Asian Group of Rheumatology, 2017/7/8, Tokyo

本田文香、坪井洋人、東光裕史、大山綾子、高橋秀典、安部沙織、横澤将宏、浅島弘充、廣田智哉、萩原晋也、近藤裕也、松本功、住田孝之：シェーグレン症候群の入院症例における ESSDAI、ESSPRI の解析、第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017 年 4 月 20 日、福岡

高橋広行、坪井洋人、浅島弘充、廣田智哉、近藤裕也、森山雅文、松本功、中村誠司、住田孝之：DNA microarray analysis of labial salivary glands in patients with Sjögren's syndrome: comparison with IgG4-related disease. 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017 年 4 月 20 日、福岡

坪井洋人、萩原晋也、浅島弘充、高橋広行、廣田智哉、梅原久範、川上純、中村英樹、佐野統、坪田一男、小川葉子、高村悦子、斎藤一郎、井上裕子、中村誠司、森山雅文、竹内勤、田中良哉、平田信太郎、三森経世、松本功、住田孝之：日本人一次性シェーグレン症候群患者の診断における 2016 年アメリカリウマチ学会 -ヨーロッパリウマチ学会新分類基準の検証：従来の 3 つの診断基準・分類基準との比較、第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017 年 4 月 20 日、福岡

Takahashi H, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Sumida T.: DNA microarray analysis of labial salivary glands in patients with Sjögren's syndrome: comparison with IgG4-related disease. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2016 年 12 月 6 日、沖縄

坪井洋人、飯塚麻菜、高橋広行、浅島弘充、廣田智哉、近藤裕也、中井雄治、阿部啓子、田中昭彦、森山雅文、中村誠司、吉原俊雄、松本功、住田孝之：IgG4 関連疾患の病因-分子生物学的アプローチ-、第 31 回日本臨床リウマチ学会、2016 年 10 月 30 日、東京

高橋広行、坪井洋人、中井雄治、浅島弘充、廣田智哉、近藤裕也、古川祥子、森山雅文、松本功、吉原俊雄、中村誠司、阿部啓子、住田孝之：DNA マイクロアレイによるシェーグレン症候群の唾液腺における遺伝子発現解析、第 25 回日本シェーグレン症候群学会学術集会、2016 年 9 月 9 日、東京

本田文香、坪井洋人、東光裕史、萩原晋也、高橋秀典、大山綾子、安部沙織、横澤将宏、廣田智哉、浅島弘充、近藤裕也、松本功、住田孝之：シェーグレン症候群の検査入院症例における診断基準の満足度と ESSDAI、ESSPRI の解析、第 25 回日本シェーグレン症候群

学会学術集会、2016年9月9日、東京

坪井洋人、高橋広行、飯塚麻菜、浅島弘充、廣田智哉、近藤裕也、中井雄治、阿部啓子、田中昭彦、森山雅文、中村誠司、吉原俊雄、松本功、住田孝之：IgG4 関連疾患 vs シェーグレン症候群：遺伝子発現比較からみた病因・病態の違い、第25回日本シェーグレン症候群学会学術集会、2016年9月9日、東京

廣田智哉、坪井洋人、高橋広行、浅島弘充、若佐雄也、松本功、高岩文雄、住田孝之：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回日本臨床免疫学会総会、2016年9月8日、東京

Takahashi H, Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Moriyama M, Furukawa S, Matsumoto I, Nakamura S, Yoshihara Y, Sumida T.: DNA microarray analysis of labial salivary glands in patients with Sjögren's syndrome: comparison with IgG4-related disease. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016年4月23日、横浜

〔図書〕(計 2 件)

浅島弘充、安部沙織、近藤裕也、高橋広行、坪井洋人、住田孝之：分子細胞免疫学(第19章過敏症)、エルゼビア、439-457頁、2018

浅島弘充、坪井洋人、飯塚麻菜、住田孝之：ドライシンドロームの基礎と臨床(日本ドライシンドローム学会監修)、メディカルレビュー社、1113-1118頁、2016

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