

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04216

研究課題名(和文) 自己免疫疾患における病変局所の自己反応性免疫細胞の網羅的解析

研究課題名(英文) Multiomics analysis of auto reactive immune cells in the inflammatory sites in autoimmune diseases.

研究代表者

竹内 勤 (Takeuchi, Tsutomu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：50179610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患患者では自己に反応するリンパ球(B細胞、T細胞)が存在する事が知られているが、それらの細胞の病変局所での動態は明らかではなかった。本研究ではシェーグレン症候群の病変局所(唾液腺)の細胞に着目し、特にB細胞を中心に何に反応するのかを1細胞毎に解析した。その結果、病変局所では高率に自己に対する抗体を産生するB細胞が存在しており、それらの細胞は病変局所で自己抗原に対して特化して選択されている事が明らかになった。病変局所での自己抗体の成り立ちを明らかにできたことは、今後の病態解明につながる重要な手掛かりになると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、B細胞の自己反応性を病変部位で確認できる事が明らかになり、自己免疫反応がなぜ起こるのか、という根本的な病態解明に向けて、病変部位の解析の重要性が示された。また、病変部位の探索により新規の自己抗原を同定できることも明らかになった。同様の手法は他の自己免疫疾患の組織にも応用可能であり、本研究は今後の自己免疫疾患の研究におけるモデルケースになると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is known that lymphocytes (B cells, T cells) that react to self-protein are present in patients with autoimmune disease, but the dynamics of these cells at the lesion site was not clear. In this study, we focused on the cells in the local lesions of Sjogren's syndrome (saliva glands) and analyzed what they responded to, especially B cells. We clarified that one third of B cells at the lesion site produced antibodies against self-protein, and these cells were specifically selected for the self-antigen at the lesion site. These results about origin of autoantibodies in the local lesion is considered to be an important clue to reveal disease pathophysiology.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：自己免疫 シェーグレン症候群 B細胞 抗セントロメア抗体 自己抗原

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) これまでの自己免疫疾患の病態解明研究における問題点

多くの自己免疫疾患の中で最も罹患数の多い関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)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来す難治性疾患である。これまでの滑膜炎の分子病態の解析によって、TNF- および IL-6 が中心的な役割を果たしている事が明らかとなった。それらを標的とした生物学的製剤は RA 治療に大きな進歩をもたらし、治療目標は滑膜炎がほぼ消失した寛解にまで高められたものの、その治療の本質は分子標的「対症療法」であり、薬剤を中止するとほとんどの患者において疾患は再燃してしまうため、高価な薬剤の定期投与を中止することができない場合も多い。RA 以外の膠原病においても、その多くが自己抗体の産生を伴う自己免疫学的機序を基盤とした病態である事は既に明らかとなっているものの、RA と比較すると分子病態の解析はかなり遅れていると言わざるを得ず、病態を形成する中心的な分子が明確でない疾患も数多く存在しているのが現状である。

これらの事から、現在の治療標的よりも上流に位置する疾患の根本的な原因に近い領域を狙った治療法の開発が望まれている。即ち自己免疫反応自体の制御法を確立する必要がある。そのためには、まず自己免疫反応を起こしている細胞の性質・挙動・特徴を正確に捕捉することが必要である。申請者らはこれまでに、患者(RA、シェーグレン症候群等)と健常者の末梢血中のタンパク質および遺伝子発現の比較解析(Nakamura S. et al. Arthritis Res Ther.18:159, 2016, Akiyama M. et al. Arthritis Rheumatol. 25:5,2015, Murota A et al. Cytokine 78:87-93,2016, Nishikawa A. et al. Arthritis Res Ther. 18(1):106,2016)により多くの知見を得ることができたが、申請者らを含む多くの既存研究は検体採取の容易さから末梢血を対象としており病変部位の真の病原細胞が末梢血中の他の多くの正常細胞に埋もれた状態での検討であった。

一方、病変局所の細胞を用いた研究も少数ながら存在し、例えば関節リウマチでは滑液・滑膜浸潤細胞の解析から Th17 が中心病態ではないかと報告 (Toh ML. et al. Curr Opin Rheumatol. 19:3,2007, van den Berg WB, Nat Rev Rheumatol. 5:10,2009) されたこともあった。しかしながら RA に対する IL-17 を標的とした分子標的療法は予想されたような効果を認めることができなかった。いくつかの解釈がなされているが、自己免疫病態の中心経路を特定できていなかったと考えるのが妥当であろう。一般に炎症部位には多くのリンパ球がケモカインに導かれて引き寄せられる。RA の関節腔で CCL20 が増加すると報告されているが、受容体である CCR6 を発現する細胞は末梢血中の CD4 陽性 T 細胞中、健常人でも 10-30%程度存在する。これらが関節にリクルートされるとしても、自己抗原に反応する T 細胞受容体を持つ“本物”の病原細胞はこの中のごく一部であり、末梢血より濃縮されているとしても、同じケモカイン受容体を持つその他の細胞に埋もれた状態での解析になってしまう。結局のところ、自己反応性免疫細胞が他の多くの正常免疫細胞と区別できないことが、自己免疫病態の本質を捉えることができない最大の原因であろうと考えられる。

#### (2) 次世代の自己免疫疾患の病態解明研究における有用な技術革新

免疫細胞、特に抗体を産生する B 細胞や、HLA とペプチドの複合体を認識する T 細胞は、多種多様な外的因子に対抗するために、細胞ごとに違った反応性の受容体を持っており、そのバリエーションはそれぞれ 10 の 14 乗および 10 の 18 乗に上るとされる。古くから自己免疫疾患においてはレパトアに偏りがあること、そしてある特定のクローンが病変局所で増殖している事が知られていたが、そのクローンが何に反応しているのかを解析することが技術的に困難であった。2000 年代後半より単一細胞の B 細胞/T 細胞受容体の配列の解析が報告され始めた。例として RA では滑液の B 細胞を分取し、それぞれの細胞が持つ抗体の遺伝子配列を調べ、そこから自己抗体をリコンビナントタンパク質(抗体)として人工的に作成し、反応性を調べた研究が報告された(Corsiero E, Ann Rheum Dis. 75:10,2016)。こうした手法や申請者らの教室で行ってきたこれまでの予備検討、国内の他施設・企業との共同研究の成果を応用することにより、自己抗体あるいは自己反応性リンパ球が自己ペプチド・自己タンパク質と反応性を持つかをヒトの in vitro 系を用いて定量的に評価することは簡便ではないが可能となってきている。

もう一つの重要な技術革新は、次世代シーケンサー (NGS) を利用した遺伝子発現解析であり、効率的でバイアスのかかりにくい遺伝子増幅法が開発され、超微量検体からのトランスクリプトーム解析が可能となった事である。特にフローサイトメーターやマイクロ流路、デジタル PCR で使われる様なドロップレット制御法を応用した専用デバイスで単一細胞を捕捉し、それぞれの細胞ごとに RNA 抽出、cDNA 合成、遺伝子増幅を経て NGS により網羅的発現解析する手法(シングルセルトランスクリプトーム解析)が複数種類開発され、細胞分化や幹細胞研究に盛んに用いられている(Picelli S, Nat Protoc. 9:11,2014, Hashimshony T, Genome Biol. 28:17,2016)。免疫領域でもこのような手法が応用されつつあり、これまで行われていた細胞表面マーカーによる免疫細胞の分類から、個々の細胞の遺伝子発現プロファイルに基づいた細胞の分類へのパラダイムシフトが起こるのも時間の問題と考えられていた。

### 2. 研究の目的

申請者らはこれらの最新の 2 つの技術を組み合わせることにより、自己免疫疾患における中心的な自己免疫反応の仕組みを解明することができると考えた。即ち、B/T 細胞受容体の解析から真の病原細胞を特定し、同時にシングルセルトランスクリプトーム解析を行うことにより、病

原細胞にのみ特徴的にみられる標的ならびに分子経路を同定する。それにより根治療法につながる真の病因細胞や、それらの細胞で見られる特異的な遺伝子タンパクパスウェイを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 病変局所からの細胞採取

シェーグレン症候群患者の小唾液腺生検検体を対象とした。検体採取後すぐに4℃で研究室まで運搬の上、剪刀で機械的に細切し、コラゲナーゼを用いて組織に浸潤した細胞を単細胞まで分離した。その後、抗体産生B細胞(plasma blast, plasma cell)をセルソーターによりシングルセルとして96ウェルプレートに分取し、Smart-seq2法(Picelli S, Nat Protoc. 9:11, 2014)を用いてシングルセルcDNAライブラリを作成した。

#### (2) B細胞受容体の解析

上記cDNAライブラリからPCR法でB細胞受容体のH鎖・L鎖の遺伝子配列を増幅し(Thomas T, J Immunol Methods. 1:329, 2008)、それぞれの遺伝子を発現ベクターに組み込み、哺乳類細胞系でリコンビナント蛋白質(抗体)として発現させ、精製した。それぞれの精製自己抗体について、シェーグレン症候群で認められる自己抗体(抗核抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体等)の対応抗原に対する反応性があるかを調べ、自己反応性B細胞とその他を分ける指標とした。さらにこれまで報告がなかった抗原に対する抗体も見つかったため、培養細胞からの免疫沈降・質量分析を用いたタンパク同定を行い、同定されたタンパク質の発現系を樹立した。それぞれの抗原はタグ付きのリコンビナントタンパクとして哺乳類細胞で発現させ、磁気ビーズに結合させ、ビーズに対する抗体の反応性のFACSで定量する手法(antigen-binding beads assay)を確立した。さらに、リウマチ内科で保存されている患者血清を用いて、同定した自己抗原に対する自己抗体の有無を各種疾患で検討した。

#### (3) 抗原による組織染色

自己抗体産生細胞を検出するプローブとして、自己抗原にリンカーでGFPを繋いだものを精製した。GFP-自己抗原と抗CD138(形質細胞マーカー)抗体を凍結切片に反応させ、共焦点顕微鏡で検出した。

#### (4) T細胞受容体の解析

上記B細胞を分取する際に、同時に自己反応性T細胞も分取し、cDNAライブラリとした。そこからB細胞受容体の解析と同様に、PCR法を用いてT細胞受容体の配列を同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 病変局所からの細胞採取、cDNAの作成

シェーグレン症候群患者の小唾液腺生検検体を十数例入手した。入手後すぐに細切しコラゲナーゼ処理を行い、単細胞まで分離し、抗体産生B細胞をセルソーターによりシングルセルとして96ウェルプレートに分取するまでのプロトコルを確立した。さらに、Smart-seq2法でシングルセルcDNAライブラリを作成するまでの最適な試薬・PCR条件を確立した。

#### (2) B細胞受容体の遺伝子配列の解析

上記cDNAライブラリからPCR法でB細胞受容体のH鎖・L鎖の遺伝子配列を解析するためのプライマー設計やベクター設計、PCRなどの条件設定を行ない、効率的にH鎖・L鎖をクローニングできる手法を確立した(図1)。さらに、それぞれの遺伝子を発現ベクターに組み込み、発現プラスミドを作成した。それらを用いて哺乳類細胞系でリコンビナント蛋白質(モノクローナル抗体)として発現させ、精製する手法を確立した。その結果として、数人のシェーグレン症候群患者およびシェーグレン症候群の診断基準を満たさないドライマウスの患者から、250種類程度の抗体ライブラリを作成することができた。本手法ではシングルセルcDNAライブラリの70%以上で抗体作成を行う事が出来た。

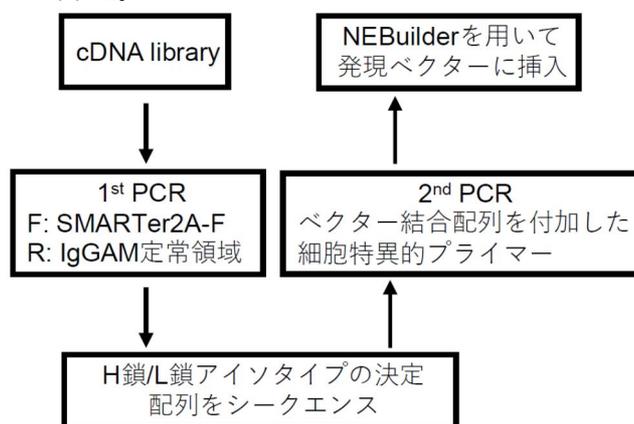


図1 抗体配列のクローニング手法

(3)病変部位における抗 SSA 抗体、抗 SSB 抗体の産生

約 250 種類を抗体パネルとして作成し、既存の自己抗体検出用の ELISA を用いて抗 SSA 抗体、抗 SSB 抗体を同定した。さらに、ELISA での固着化した抗原に対する反応性に加え、立体構造を持ったタンパク質抗原との反応性を見るため、ビーズ上に固定した抗原タンパクに対する抗体の反応 (Antigen-binding beads assay) も調べた。ELISA とビーズでどちらかで反応性が認められたものを陽性とみなすと、作成した抗体の約 30%が抗 SSA 抗体もしくは抗 SSB 抗体であった。次に自己抗体の遺伝子配列の中で、体細胞変異 (somatic hypermutation) を変異前に戻した抗体を作成し、反応性を検討した所、ほとんどの自己抗体で自己抗原への反応性が減少/消失した。この事は、これらの抗体が抗原依存的に選択されて親和性を高めている事を示唆している。

(4)病変局所における抗セントロメア抗体の産生

シェーグレン症候群では約 15%の患者で抗セントロメア抗体が検出されることが知られている。本研究でも血清抗セントロメア抗体が陽性の症例が含まれていたため、この患者からの抗体がセントロメアの主要な対応抗原とされる CENP-B に反応するか調べたが、抗 CENP-B 抗体は検出できなかった。ではこれらの抗体が何に反応するのかを調べるため、K562 細胞のタンパク抽出液を用いて、免疫沈降と質量分析によるタンパク同定を行った所、新規自己抗原として DSN1、NSL1、PMF1、MIS12 の 4 種類のタンパクからなる MIS12 複合体が同定された (図 2)。MIS12 複合体はセントロメア領域に存在する KMN 複合体の一部で、4 つのタンパクが縄の様にねじれた構造をしている。それぞれ構成タンパクを哺乳類細胞で発現させて抗体の反応性を検討した所、MIS12 複合体の様々な部位に対する抗体が検出された。さらに、MIS12 複合体と接する CENP-A、CENP-C、CBX5 を反応性も検討した所、これらに対する抗体も同定された。それらの抗体の somatic hypermutation を戻したところ、抗 SSA 抗体と同様に、セントロメア抗原に対する反応性はほとんどが消失した。以上の結果は、抗 SSA 抗体と同程度に、セントロメア複合体に特異的な抗体が病変局所で産生されている事を示唆している。

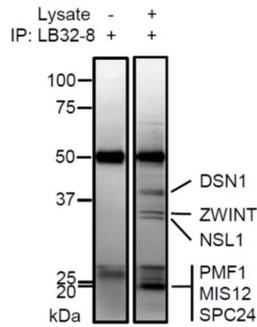


図 2 質量分析の結果

(5)血清における新規自己抗体のプロファイルの検討

次に、唾液腺で産生されている抗体が患者血清中でも検出可能かどうかをするため、抗セントロメア抗体が陽性となる一部のシェーグレン症候群患者、全身性強皮症患者、原発性胆汁性胆管炎の患者で、各セントロメア抗原に対する抗体の有無をプロファイルした。MIS12 (図 3) を始めとした各種セントロメア抗原に対する抗体は血清中でも検出可能であり、かつ、各患者が複数の抗体を併せ持っており、疾患による差は認められなかった。これらの疾患がある程度合併して起こる事と合わせて考えると、これらの疾患は抗セントロメア抗体陽性という免疫学的異常を背景に起こってくる一連の症候群なのではないか、という新たな疾患概念が示唆された。

さらに、既存の抗セントロメア抗体検出系である抗核抗体検査と抗 CENP-B 抗体検査で陰性となる患者であっても、新規自己抗原を用いる事で検出が可能となる症例が存在する (図 4) ことを見出した。これらの成果は臨床応用可能であると考え、特許出願を行なっている。

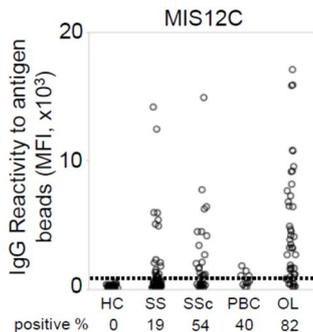


図 3 MIS12 複合体に対する血清反応

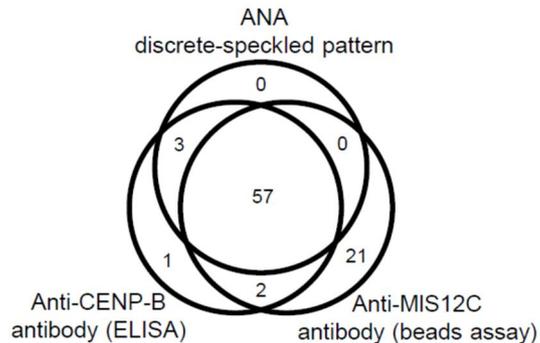
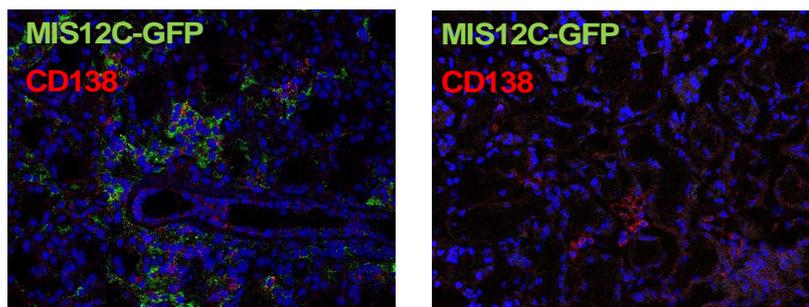


図 4 抗セントロメア抗体の検出方法の比較

#### (6)病変局所の自己抗体産生細胞の免疫染色

上記の結果より病変局所から採取した細胞に自己抗体産生細胞が含まれることを確認したが、病変組織で直接自己抗体産生細胞を同定するため、自己抗原を用いた免疫染色を行った。GFP-自己抗原と抗 CD138(形質細胞マーカー)抗体で強染色をしたところ、血清抗セントロメア抗体陽性患者の唾液腺のみでセントロメア抗原に対する抗体を産生している細胞が検出された(図 5)。また、多くの患者では血清中は複数のセントロメア抗体に対する抗体が存在していたが、組織中では、MIS12 複合体と CENP-C に対する抗体産生細胞が多く、CENP-A, CENP-B, CBX5 に対する抗体産生細胞は希であり、血清中と組織で抗体の反応性に差異が認められた。



血清抗セントロメア抗体陽性

血清抗セントロメア抗体陰性

図 5 抗原による免疫染色

#### (7)T 細胞受容体の解析

病変局所の自己反応性 T 細胞については、シングルセルセルソート法および TCR 配列解析手法を確立し、レパトア解析を進行中である。

#### (8)結果のまとめと今後の展望

病変局所では、約 1/3 と高率に疾患に特徴的な自己抗体を産生する細胞が存在している事が明らかになった。また、抗 SSA 抗体、抗 SSB 抗体だけでなく、抗セントロメア抗体もシェーグレン症候群の病態形成に深く関わっている事が明らかになった。当初予期していなかった点としては、新規の自己抗原として MIS12 複合体が同定でき、これに対する抗体を検出することで従来の抗核抗体検査及び抗 CENP-B 抗体 ELISA で検出できない患者で抗セントロメア抗体が検出できる可能性が示唆された。

今後は自己反応性 T 細胞の解析を進めるとともに、自己抗体産生細胞に特徴的な遺伝子発現・パスウェイ等を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukamoto M, Suzuki K, and Takeuchi T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Initial presenting determines clinical entity in patients with anti-centromere antibody positivity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Rheum Dis	6. 最初と最後の頁 103-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1756-185X.13439.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto M, Suzuki K, and Takeuchi T	4. 巻 5
2. 論文標題 Clinical and immunological features of anti-centromere antibody-positive sjogren 's syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatol Ther,	6. 最初と最後の頁 499-505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40744-018-0126-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshita M, Suzuki K, Kaneda Y, Yamane H, Ikeura K, Sato H, Kato S, Tsunoda T, Arase H, Takeuchi T.	4. 巻 79
2. 論文標題 Antigen-driven selection of antibodies against SSA, SSB, and the centromere " complex ", including a novel antigen, MIS12 complex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis	6. 最初と最後の頁 150-158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/annrheumdis-2019-215862.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹下 勝、鈴木 勝也、竹内 勤
2. 発表標題 シェーグレン症候群の唾液腺における自己抗体産生
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 自己免疫疾患の検出剤となるタンパク質複合体、及びその使用	発明者 竹下 勝、竹内 勤、鈴木 勝也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-107179	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	竹下 勝  (Takeshita Masaru)  (10571135)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教   (32612)	
研究 分 担 者	鈴木 勝也  (Suzuki Katsuya)  (70306695)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師   (32612)	
研究 分 担 者	浅川 修一  (Asakawa Shuichi)  (30231872)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授   (12601)	