

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16285

研究課題名（和文）全身性エリテマトーデスの抗DNA抗体とHLAクラスIIの関連性についての研究

研究課題名（英文）Study of the association between anti-DNA antibodies and HLA class II in systemic lupus erythematosus

研究代表者

辻 英輝（Tsuji, Hideaki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50894755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は全身性エリテマトーデス（SLE）に関わるHLAクラスII分子の機能を解析し、抗DNA抗体の産生機序を解明することを目的とする。HLAクラスII分子発現細胞とゲノムDNAと共培養したところ、細胞表面のHLA-DRとDNAの特異的結合が確認された。HLAクラスII分子各アリルとDNAの結合能がSLEの疾患感受性と関連がみとめられた。DNA応答性BCR発現レポーター細胞はHLAクラスII分子によって提示されるDNAにより活性化された。マウスを用いたDNA/HLAクラスII分子複合体の免疫による抗DNA抗体産生実験を試みたが、腎炎や抗DNA抗体産生の増強は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLAクラスII分子とDNAの結合性、およびその疾患感受性との関連、HLAクラスII分子/DNA複合体によるB細胞受容体の反応性が解明された。抗DNA抗体は疾患活動性と相関し、SLEの発症に関わる重要な自己抗体であることより、本研究成果はSLEの病態解明につながると考えられる。さらに今後、抗DNA抗体産生の制御によるSLEの新規治療法の創出が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to analyze the function of HLA class II molecules involved in systemic lupus erythematosus and to elucidate the mechanism of anti-DNA antibody production. When cells expressing HLA class II molecules were co-cultured with genomic DNA, specific binding of DNA to HLA-DR on the cell surface was observed. The binding ability of DNA to each allele of HLA class II molecules was associated with disease susceptibility to SLE. DNA-responsive BCR-expressing reporter cells were activated by DNA presented by HLA class II molecules. Immunization of mice with DNA/HLA class II molecule complexes did not stimulate nephritis or production of anti-DNA antibodies.

研究分野：膠原病

キーワード：全身性エリテマトーデス

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus, SLE) は DNA などの自己抗原に対する抗体が産生され、皮疹や腎炎を生じる難治性の自己免疫疾患である。抗 DNA 抗体は疾患活動性と相関し、SLE の発症に関わる重要な自己抗体である。SLE では従来ステロイドや免疫抑制薬による治療が行われ、最近では B 細胞が SLE における治療標的として注目され B 細胞除去療法や B 細胞活性化因子阻害薬などが治療応用されている。しかしながらそれらの効果は不十分であり、非特異的な B 細胞機能抑制による日和見感染のリスクがある。

抗 DNA 抗体の産生機序を解明することが SLE の病態解明につながると考えられる。これまでのマウス実験の報告によると、DNA 単独を免疫しても抗 DNA 抗体は産生されないが、DNA と特定の蛋白/ペプチドの複合体を免疫すると抗 DNA 抗体が産生される。抗 DNA 抗体の産生機序として、蛋白・ペプチドが DNA の hapten として機能し抗原提示される説、DNA と蛋白・ペプチドの相同性による抗原認識説が唱えられているが、十分に解明されていない。

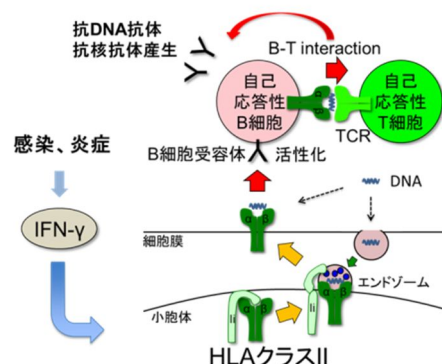
主要組織適合遺伝子複合体 (MHC、ヒトでは HLA) クラス II 分子は抗原提示を担い自己抗体の産生に関わる。過去の遺伝子研究の結果から特定の HLA クラス II 分子は SLE の発症と関連する。また、ループモデルマウスである NZB/WF1 マウスにおいても MHC クラス II (H-2z) が発症に関わる。SLE 患者では血中 DNA 濃度の上昇、血中 IFN- γ 濃度の上昇および腎臓での HLA クラス II 分子の発現亢進が観察され、それらの分子の病態への関与が示唆される。

最近 HLA クラス II 分子に提示されたミスフォールド蛋白質が関節リウマチ、抗リン脂質抗体症候群、ANCA 関連血管炎などの自己免疫疾患で産生される自己抗体の特異的標的であることが明らかとなった (PNAS.2014;111:3787-92, Blood.2015;125:2835-44, Arthritis Rheumatol.2017;69:2069-80)。これまで HLA クラス II 分子と DNA の結合に関する in vitro での報告がある (Eur J Immunol. 1998; 28(12): 3968-79.)。しかし、HLA クラス II 分子と DNA の結合を証明しているのみであり、それ以上の詳細は解明されていなかった。

2. 研究の目的

上記の背景から申請者はいかにして抗 DNA 抗体が産生され SLE を発症させるかという学術的「問い」をたてた。そして、SLE 感受性アリルの HLA クラス II 分子と DNA が直接結合し抗原として提示されることが抗 DNA 抗体の産生に関わり SLE の病態形成の一要因となるという仮説を立て、HLA クラス II 分子の観点から SLE の発症にアプローチすることとした (図 1)。すなわち、本研究では HLA クラス II 分子と DNA の複合体による抗 DNA 抗体の産生能、SLE 患者における HLA クラス II 分子による DNA の提示能との臨床症状の相関について研究する計画とした。本研究によって、HLA クラス II 分子に着目した特異的 B 細胞活性化抑制や抗 DNA 抗体産生抑制ができれば、SLE に特異的かつ有効な治療法の開発が創造されることが期待される。

図1 仮説：HLAクラスII分子によるDNAの提示と抗DNA抗体の産生



3. 研究の方法

本研究では HLA クラス II 分子と抗 DNA 抗体産生の関連性を明確にすることを旨とする。

(1) HLA クラス II 分子による DNA の提示能の解析。

HLA クラス II 分子によって提示される DNA の臨床的意義を示す。ヒト胎児腎細胞 (HEK) 293T 細胞に transfection にて HLA クラス II 分子 (HLA-DRA1*01:01、HLA-DRB1*15:01 あるいは HLA-DRB1*13:01) を細胞表面に発現させゲノム DNA と共培養する。SLE 患者由来 DNA 特異的ヒトモノクローナル抗体 (mAb) 71F12 (Sci Rep. 2017;27;7(1):16428.) を使用し flow cytometry で解析し、細胞表面に発現する HLA クラス II 分子 (HLA-DR15) と DNA の結合を確認する。Biotin 化 DNA を HLA クラス II 発現細胞と共培養した lysate を streptavidin で沈降し Western-blot し、DNA と HLA-DR の結合を確認する。さらに、HLA クラス II 分子 (HLA-DR15) のペプチド結合溝に特異的に結合する SP3 ペプチドを用い、DNA の HLA クラス II 分子への結合の競合阻害を確認し、HLA クラス II 分子への DNA の特異性を検証する。HLA クラス II 分子各アリルと DNA の結合能が SLE の疾患感受性と関連するかを検討する。HEK293T 細胞を用いて biotin 化 DNA の細胞内取り込みから細胞表面での提示に至るまでの過程を解析する。

(2) HLA クラス II 分子によって提示される DNA による DNA 応答性 BCR 刺激実験。

SLE 患者由来のヒト抗 DNA モノクローナル抗体 (clone: 71F12) を用い DNA 応答性の IgM 型 B 細胞受容体 (BCR) を表面に発現する reporter 細胞、B 細胞ラインを作製する。Reporter 細胞は

BCR に刺激が入ると NFAT を介して GFP、IL-2 を産生する細胞である (Science. 2002; 17; 296: 1323-6)。この抗 DNA-BCR をもつ細胞を HLA クラス II 分子と DNA の複合体と共培養し BCR の反応性を Flow cytometry で解析する。

(3) マウスを用いた DNA/HLA クラス II 分子複合体による抗 DNA 抗体産生実験。

これまでの報告では自験例も含めマウスに DNA 単独を免疫しても抗 DNA 抗体は産生されない。しかし、DNA と特定の蛋白/ペプチドの複合体を免疫すると抗 DNA 抗体が産生される報告がある。ループモデルマウスである NZB/WF1 マウスでは MHC クラス II (H-2z) が SLE の発症に関わるとされる。そこで、MHC クラス II として H-2z を持つ NZW マウスを用いて、DNA と MHC クラス II (H-2z) 複合体を NZW マウスに免疫、あるいは NZW マウスを IFN- γ で刺激し MHC クラス II を過剰発現させた状態に DNA を免疫し、免疫 10-14 日後の血清を回収し抗 DNA 抗体、抗核抗体産生の有無を調べる。

4. 研究成果

(1) HLA クラス II 分子による DNA の提示能の解析

HEK293T 細胞に transfection にて HLA クラス II 分子 (HLA-DRA1*01:01, HLA-DRB1*15:01 (HLA-DR15)) を細胞表面に発現させ、ゲノム DNA と共培養した場合、HLA クラス II 分子と DNA の結合が確認された (図 2A)。B16F10 細胞 (野生型) を IFN- γ 刺激下でゲノム DNA と共培養したところ、内在性の MHC クラス II 分子による DNA の提示が確認でき、CIITA knock out の B16F10 細胞と比較すると、MHC クラス II 発現時に DNA の結合が示された (図 2B)。さらに、Biotin 化 DNA と HLA クラス II の結合が、Western-blot で確認された (図 2C)。以上より HLA クラス II 分子と DNA の結合が確認できた。

図 2 HLA クラス II 分子による DNA の提示の確認

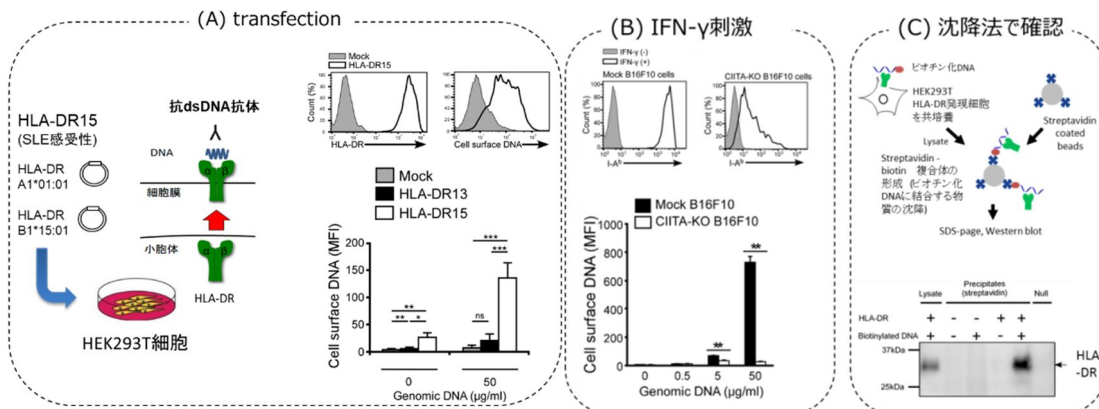
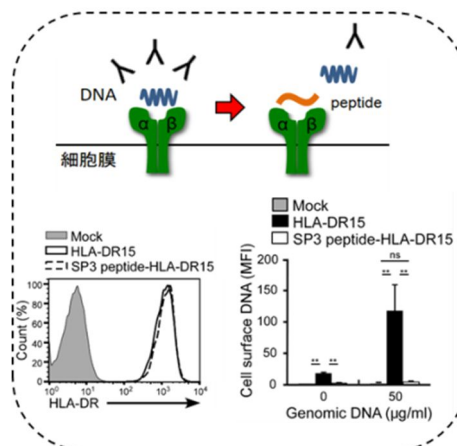


図 3 HLA クラス II 分子に結合する DNA とペプチドの競合阻害実験

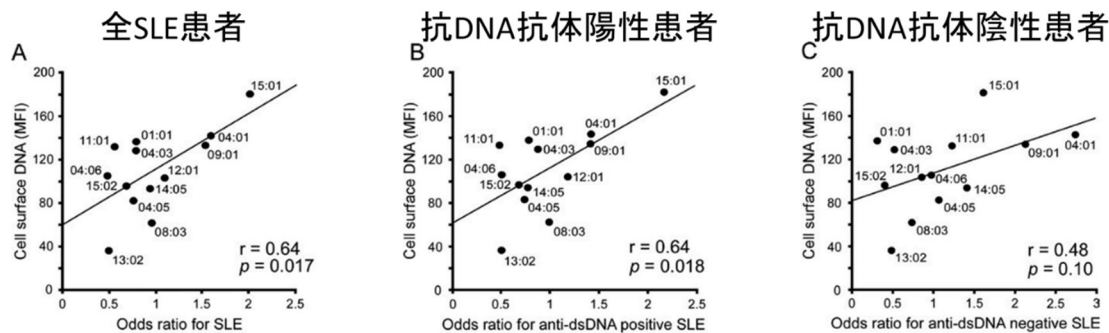
HLA-DR15 に特異的な SP3 ペプチド (独自作成) を用いたところ、HLA-DR15 に対するゲノム DNA の結合は SP3 ペプチドで競合的に阻害された (図 3)。さらに、HLA-DR1 に特異的に結合する transferrin receptor peptide を用いた場合も、同様に HLA-DR1 に対するゲノム DNA の結合はペプチドで競合的に阻害された。そのため、DNA が HLA クラス II 分子のペプチド結合溝に結合することが示唆された。ペプチド結合溝と DNA の結合にヒストン蛋白が介在しているかを解析したところ、HEK293T 内にはヒストン蛋白が発現していたが、細胞表面で DNA と同時に HLA クラス II 分子による提示は認めなかった。



HEK293T 細胞に transfection 法で各アレルの HLA-DR 分子を発現させ、ゲノム DNA と共培養し、DNA の提示能を解析し、その結果を SLE の疾患感受性 (odds ratio) と比較した。SLE に対して感受性の HLA-DR アレルで DNA との強い結合性がみられ、抵抗性の HLA-DR アレルで提示能が低い結果が得られ、有意な相関がみられた ($r=0.64$, $p=0.017$) (図 4)。さらに両者の相関は抗 DNA 抗体陽性患者においてよい相関であり、一方抗 DNA 抗体陰性患者では相関の程度が低かった。この結果より、HLA クラス II 分子による DNA の提示が直接的に SLE の疾患感受性や抗 DNA

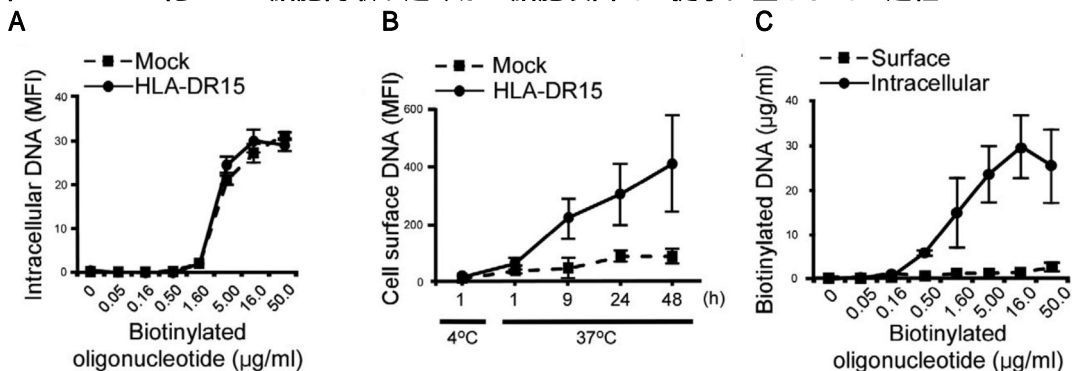
抗体の産生に関係していることが示唆された。

図4 HLA アリルの DNA/HLA-DR 複合体形成能と SLE 疾患感受性の関係



これらの細胞を用いて biotin 化 DNA の細胞内取り込みから細胞表面での提示に至るまでの過程を解析したところ、Mock 細胞、HLA-DR15 発現細胞ともに細胞内に DNA の取り込みが見られた (図 5A)。細胞表面では HLA-DR15 が発現する場合のみ細胞表面の DNA 提示がみられ (図 5B) それらは培養時間によって経時的に提示量が増加することが確認された (図 5C)。

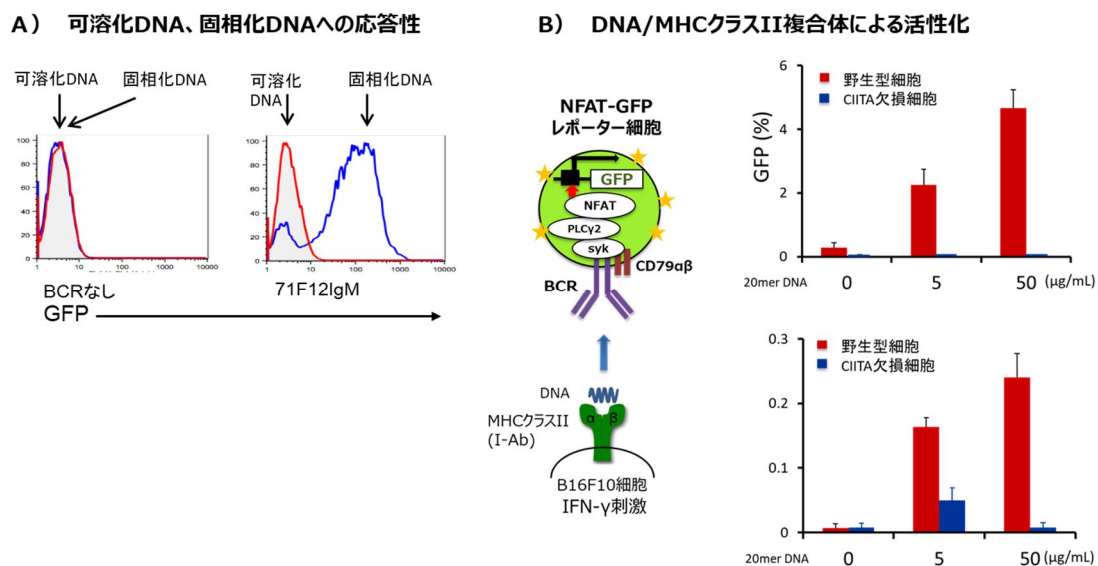
図5 biotin 化 DNA の細胞内取り込みから細胞表面での提示に至るまでの過程



(2)HLA クラス II 分子によって提示される DNA による DNA 応答性 BCR 刺激実験

SLE 患者由来のヒト抗 DNA モノクローナル抗体 (clone: 71F12) を用い、DNA 応答性の IgM 型 B 細胞受容体 (BCR) を表面に発現する reporter 細胞、B 細胞ラインを作製した。この reporter 細胞は BCR に刺激が入ると NFAT を介して GFP、IL-2 を産生する細胞であり、固相化 DNA に応答性がみられるが、可溶性 DNA には応答が見られない。このレポーター細胞を HLA クラス II 分子と DNA の複合体と共培養したところ、IL2 や GFP の産生がみられ BCR の応答性が確認された。

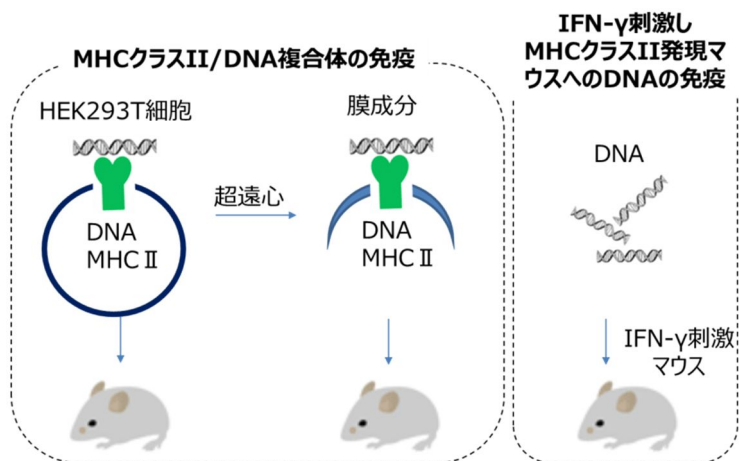
図6 DNA 応答性 BCR 発現レポーター細胞/B 細胞の樹立と DNA/MHC II 複合体による活性化



(3)マウスを用いた DNA/HLA クラス II 分子複合体による抗 DNA 抗体産生実験

MHC クラス II として H-2z を持つ NZW マウスを用いて、DNA と MHC クラス II (H-2z) 複合体を NZW マウスに免疫、あるいは NZW マウスを IFN- γ で刺激し MHC クラス II を過剰発現させた状態に DNA を免疫し、免疫 10-14 日後の血清を回収し抗 DNA 抗体、抗核抗体産生の有無を調べた。MHC クラス II として H-2z を持つ NZW マウスを用いて、DNA と MHC クラス II (H-2z) 複合体を NZW マウスに免疫、あるいは NZW マウスを IFN- γ で刺激し MHC クラス II を過剰発現させた状態に DNA を免疫し、免疫 10-14 日後の血清を回収し抗 DNA 抗体、抗核抗体産生の有無を調べた。その結果、NZW マウスに IFN- γ で刺激すると多くの臓器で MHC クラス II 異所性発現が確認され、一部のマウスでは時間経過で抗 DNA 抗体上昇を認めた。その状況でさらに DNA を免疫したが、コントロールに比べ腎炎の発症や抗 DNA 抗体産生の増強は認められなかった。また、NZW マウスを用いて、DNA と MHC クラス II (H-2z) 複合体を NZW マウスに免疫した場合も、コントロールと比べ、腎炎の発症や抗 DNA 抗体産生の増強は認められなかった。ループス症状の発現や抗 DNA 抗体産生の増強に関して、DNA と MHC クラス II (H-2z) 複合体の免疫原性が乏しいあるいは、さらなる条件検討が必要と考えられた。

図 7 MHC クラス II/DNA 複合体の免疫による抗 DNA 抗体の産生



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tsuji H, Ohmura K, Jin H, Naito R, Arase N, Kohyama M, Suenaga T, Sakakibara S, Kochi Y, Okada Y, Yamamoto K, Kikutani H, Morinobu A, Mimori T, Arase H.	4. 巻 74(1)
2. 論文標題 Anti-Double-Stranded DNA Antibodies Recognize DNA Presented on HLA Class II Molecules of Systemic Lupus Erythematosus Risk Alleles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 105-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.41897.	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 -

〔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 辻 英輝
2. 発表標題 基礎研究のすすめ
3. 学会等名 第31回日本リウマチ学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 門場 啓一郎、辻 英輝	4. 発行年 2024年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 8
3. 書名 全身性エリテマトーデスと自己抗体	

〔産業財産権〕

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------