

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790996

研究課題名(和文) 自然発症関節炎モデルにおける関節炎惹起性CD4 T細胞の認識する自己抗原の同定

研究課題名(英文) Identification of autoantigens recognized by pathogenic T cells in autoimmune arthritis

研究代表者

伊藤 能永 (Ito, Yoshinaga)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：60614013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患における疾患惹起性T細胞の自己抗原特異性の解明は、病態理解の為の重要な課題であるが、これまで技術的に困難であった。我々は、T細胞シグナル減弱化による自己反応性T細胞の取得、レトロジェニックマウス作成によるTCRの疾患惹起性の検討、特異的自己抗体の選択的産生による標的抗原の同定という新規の方法を開発し、実際に関節リウマチの標的自己抗原としてRPL23A分子を同定した。この方法によりこれまで原因不明であった種々の自己免疫疾患の病因性T細胞の標的抗原が明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：T cells mediating autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), are difficult to characterize because they are likely to be deleted or inactivated in the thymus if the self-antigens they recognize are ubiquitously expressed. One way to obtain and analyze these autoimmune T cells is to alter T cell receptor (TCR) signaling in developing T cells to change their sensitivity to thymic negative selection, thereby allowing their thymic production. From mice thus engineered to generate T cells mediating autoimmune arthritis, we have isolated arthritogenic TCRs and characterized the self-antigens they recognized. One of them was the ubiquitously expressed 60S ribosomal protein L23a (RPL23A), with which T cells and autoantibodies from RA patients reacted. This strategy may improve our understanding of the underlying drivers of autoimmunity.

研究分野：免疫学

キーワード：自己抗原 自己反応性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

T細胞は、自己抗原に対する反応を介して様々な自己免疫疾患を引き起こす。しかし、関節リウマチ等の全身性自己免疫疾患の原因となっている自己反応性T細胞が、如何なる自己抗原を認識するかを特定することはこれまで困難であった。その原因の一つとして、それらの病原性T細胞は、全身に発現している自己抗原に対して高親和性のT細胞受容体を持つために、通常は胸腺でその多くが除去され(負の選択)末梢での検出が難しい点がある。この問題に対して、これまでに我々を含めたいくつかの研究グループが、T細胞シグナル強度を変えることで、胸腺で分化しつつあるT細胞の“正の選択”、“負の選択”に対する感受性を変化させ、全身性自己免疫疾患の原因となるような自己反応性T細胞が、体内のT細胞の主要なレパトアとなるように調整できることを示してきた。例えば、 $\zeta$ -associated protein 70 (ZAP-70)遺伝子に特定の機能低下型点突然変異を持つマウス(SKGマウス)は、関節リウマチに酷似したT細胞依存性自己免疫性関節炎を自然発症する。本研究ではこのマウスを用いて、自己免疫性関節炎の原因となるT細胞と、それが認識する、全身に発現する自己抗原を同定した。

## 2. 研究の目的

自己免疫疾患惹起性T細胞とその標的自己抗原の同定

## 3. 研究の方法

### 1. 関節炎を引き起こすT細胞クローンの同定

我々はまず、SKGマウス中に存在する、関節炎の原因となる病原性CD4陽性T細胞が、特定のT細胞受容体を発現しているのか否かを検討した。異なるT細胞受容体をそれぞれ発現している、SKGマウス由来のCD4陽性T細胞を免疫不全マウスへ別々に養子移入すると、各レシピエントマウスは同程度の関節炎を発症した。また、SKGマウスの関節炎局所に集積しているT細胞

のT細胞受容体配列は各マウスで異なっていた。これらの結果から、関節炎の原因となるSKG CD4陽性T細胞は非常にポリクローナルであり、様々なT細胞受容体を有すると考えられた。次に、SKGマウスから、病原性CD4陽性T細胞クローンを単離することを試みた。SKGマウスの関節炎局所に存在するCD4陽性T細胞各々から、単一のT細胞受容体遺伝子を単離し、(遺伝子組み換えが起こらないためにT細胞とB細胞を欠損する)RAG2<sup>-/-</sup>-SKGマウスの骨髓細胞へ遺伝子導入した。この骨髓細胞を免疫不全マウスへ養子移入すると、単一のT細胞受容体を発現するT細胞のみを有するマウス(Retrogenicマウス)を作ることができ、そのマウスが病気を発症するかどうか検討することで、導入したT細胞受容体の病原性の有無が分かる。この方法で9種類のT細胞受容体について検討したところ、7-39T細胞受容体、6-39T細胞受容体を有するRetrogenicマウス(それぞれR7-39マウス、6-39マウス)はそれぞれ80%、27.3%の個体で関節炎を自然発症した。R7-39マウスの罹患関節は、単核細胞浸潤、パンヌス形成、軟骨破壊といった関節リウマチと同様の病理組織所見を示した。また66.7%のR7-39マウスでは乾癬に類似した慢性皮膚炎を発症した。それ以外の臓器は組織学的に異常を認めなかった。7-39T細胞受容体を導入された細胞は、R7-39マウス体内でモノクローナルな活性化CD4陽性T細胞へ分化しており、他の免疫不全マウスへさらに養子移入すると、元のマウスと同様の関節炎や皮膚炎を惹起した。R7-39マウスも、関節炎を起こさないR1-23マウス対照群も、Foxp3陽性制御性T細胞を有さなかった。SKG ZAP-70変異を有するR7-39マウスが関節炎を発症するのに対して、野生型ZAP-70を有するRAG2<sup>-/-</sup>-BALB/cマウスの骨髓細胞へ7-3T

細胞受容体を導入後免疫不全マウスへ養子移入したマウス(W7-39 マウス)では関節炎を発症しなかった。W7-39 マウスでは、7-39T 細胞受容体発現 CD4T 細胞はそのほとんどが胸腺で除去されていた。一方、負の選択を逃れたものは不活性化されていた。これらの結果より、自己免疫性関節炎や自己免疫性皮膚炎の発症には特定の T 細胞受容体を有する T 細胞が必要であること、複数種の T 細胞受容体がそれぞれ関節炎の原因となりうるということが明らかとなった。

## 2. 関節炎の原因となる T 細胞が認識する、全身で発現する自己抗原の同定

次に、7-39T 細胞受容体、あるいは 6-39T 細胞受容体が認識する自己抗原を同定するために、これらの T 細胞受容体を発現するハイブリドーマ細胞株を樹立した。7-39 ハイブリドーマは、SKG マウスの関節滑膜細胞、あるいは形質細胞株由来の細胞破碎液の刺激によって活性化された。一方、6-39 ハイブリドーマは、抗原提示細胞のみからの刺激で活性化されたため、抗原提示細胞上に恒常的に提示されている自己抗原を認識しているものと考えられた。

7-39T 細胞受容体が認識する自己抗原を更に絞り込むために、R7-39 マウスに TCR $\beta$ <sup>-/-</sup>マウスの骨髓細胞を移入して B 細胞を補充した。このマウスでは T 細胞ヘルプが 7-39T 細胞受容体発現 CD4 陽性 T 細胞のみからもたらされるため、7-39T 細胞受容体が認識する自己抗原に特異的な自己抗体のみが血清中に分泌されると想定された。実際にこの“B 細胞再構築” R7-39 マウスの血清を形質細胞株由来細胞破碎液に対して免疫プロット法で反応させると、18kD の蛋白質が特異的に検出された。この 18kD 蛋白質は、免疫沈降、質量分析によって RPL23A 分子であることが分かった。マウスでは全身の様々な臓器で

RPL23AmRNA を発現していた。また RPL23A のアミノ酸配列はマウスとヒトで 100%保存されていた。“B 細胞再構築” R7-39 マウスの血清中自己抗体は、組み換え RPL23A 蛋白質と反応した。また 7-39 ハイブリドーマは、MHC クラス II 分子を介して、組み換え RPL23A 蛋白質の濃度依存性に活性化された。さらに RPL23A 由来ペプチドの内、RPL23A<sub>71-90</sub> ペプチドが最も強力に 7-39T 細胞受容体を刺激した。

“B 細胞再構築” R7-39 マウスでは、関節リウマチ患者さんで特異的に上昇が認められる、抗 CCP (シトルリン化ペプチド) 抗体の上昇を認めた。一方、RPL23A に対する抗体量は、シトルリン化した RPL23A に対しても、シトルリン化していない RPL23A に対しても同程度であった。

もう一つの関節炎原性 T 細胞受容体 (6-39T 細胞受容体) は RPL23A 由来ペプチドとは反応しなかった。

以上の結果より、全身に発現する RPL23A 蛋白質が、関節炎、皮膚炎両方の標的抗原となり得ること、関節炎の発症に際して、複数種の、全身に発現する自己抗原が標的となっていることが示された。

## 3. SKG マウス中の RPL23A 特異的 T 細胞

“B 細胞再構築” R7-39 マウスの CD4 陽性 T 細胞は、養子移入によって他の免疫不全マウスに関節炎を起こすことができたが、同マウス由来血清はできなかった。実際に、R7-39 マウスのリンパ節中の CD4 陽性 T 細胞は、組み換え RPL23A 蛋白質、あるいは RPL23A<sub>71-90</sub> ペプチドで刺激すると、IL-17A, IFN- $\gamma$ , GM-CSF といった炎症性サイトカインを分泌した。さらに、組み換え RPL23A 蛋白質の刺激によって、SKG マウスの CD4 陽性 T 細胞は IL-17A を分泌し、関節炎を起こしている SKG マウスではそ

の分泌が増強した。SKG マウスの関節炎局所の CD4 陽性 T 細胞には、7-39T 細胞受容体 V $\beta$  CDR3 と同配列の V $\beta$ 鎖を持つものが含まれていた。

制御性 T 細胞が関節炎原性 7-39T 細胞を抑制できるか否かを養子移入の系で検討したところ、野生型 ZAP-70 を持つ制御性 T 細胞も、SKG 変異型 ZAP-70 を持つ制御性 T 細胞も、(既に活性化している)7-39T 細胞を抑えて関節炎発症を予防することはできなかった。

これらの結果から、RPL23A は、R7-39 マウスの CD4 陽性 T 細胞を MHC クラス II 分子を介して活性化し、関節炎原性のエフェクターヘルパー T 細胞へ分化させることが分かった。

#### 4. 関節リウマチ患者さんにおける、

RPL23A 特異的液性および細胞性免疫最後に、関節リウマチ患者さんにおいて RPL23A 特異的免疫反応の有無を検討した。

RPL23AmRNA は、健常人の様々は臓器で発現していた。免疫組織染色では、変形性関節症患者さんの滑膜組織のうちの正常構造が保たれている部位、あるいは関節リウマチ患者さんの滑膜組織に RPL23A 蛋白質の発現を認め、特に CD55 陽性繊維芽細胞様滑膜細胞などの滑膜細胞の細胞質部分に発現していた。また、関節リウマチ患者さんでは、健常人 (1.3%, n=74) に比し、優位に高い割合 (16.8%, n=374) で血清中の IgG 型抗 RPL23A 抗体が陽性であった。また、変形性関節症 (n=11)、SLE (n=30)、多発性筋炎/皮膚筋炎 (n=10) の患者さんでは陽性例はなかったのに対し、乾癬性関節炎患者さんでは 23 例中 3 例 (8.7%) で抗 RPL23A 抗体弱陽性となった。更に、33% の関節リウマチ患者さんの関節液中に RPL23A に反応して IFN- $\gamma$  を分泌する

CD4 陽性 T 細胞を検出した。マウスモデルにおいて RPL23A 特異的 T 細胞が自己免疫性関節炎、乾癬様皮膚炎の原因となったことより、これらの結果から、RPL23A に対する自己免疫反応が、少なくとも一部の関節リウマチや乾癬性関節炎の患者さんにおいても病原性を有するものと考えられる。

本研究では、T 細胞受容体シグナル強度を弱くすることで、自己抗原による胸腺での負の選択に対する T 細胞の感受性を減弱させ、全身で発現する自己抗原を特異的に認識する T 細胞を、T 細胞レパトア中の主要なクローンとして生み出せること、さらにその T 細胞が実際に末梢で全身性自己免疫疾患を起こすことが示された。

T 細胞受容体シグナルを様々な強度へ調整することと、制御性 T 細胞を除去することを組み合わせれば、他の様々な自己免疫疾患がマウスで再現できることを勘案すると、本研究の方法論は、これまでに原因不明であった種々の自己免疫疾患の発症機構の解明に役立つと考えられる。また、T 細胞シグナルを担う分子の遺伝子多型が、関節リウマチを含む様々なヒト自己免疫疾患の主要な疾患関連遺伝子多型の一つであることから、このような多型が実際に、少なくとも部分的には胸腺での T 細胞選択に影響を与え、疾患の原因となる T 細胞レパトアを形成している可能性がある。本研究の結果は、全身に発現する蛋白質に対する T 細胞免疫応答がどのように局所的な組織破壊を起こしているのかを明らかにし、全身あるいは局所的に作用するような効果的な自己免疫疾患の治療法の開発につながるものである。

#### 4. 研究成果

自己免疫疾患惹起性 T 細胞とその標的自己抗原の同定

#### 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 2 件)

Ito Y, Hashimoto M, Hirota K, Ohkura N,  
Morikawa H, Nishikawa H, Tanaka A,  
Furu M, Ito H, Fujii T, Nomura T,  
Yamazaki S, Morita A, Vignali DA,  
Kappler JW, Matsuda S, Mimori T,  
Sakaguchi N, Sakaguchi S.

Detection of T cell responses to a  
ubiquitous cellular protein in  
autoimmune disease.

Science. 2014 Oct 17;346(6207):363-8.  
doi: 10.1126/science.1259077.

Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S.

T<sub>REG</sub>-cell therapies for autoimmune  
rheumatic diseases.

Nat Rev Rheumatol. 2014 Jul 1. doi:  
10.1038/nrrheum.2014.105. [Epub ahead  
of print]

〔学会発表〕(計 1 件)

The 9<sup>th</sup> International Symposium of the  
Institute network  
2014 年 6 月 1 9 日 大阪大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤能永 ( Ito Yoshinaga )

京都大学再生医科学研究所 助教

研究者番号 :