

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461462

研究課題名(和文) 関節リウマチを標的とした抗原特異的新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Antigen specific therapy for rheumatoid arthritis

研究代表者

庄田 宏文 (Shoda, Hirofumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20529036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 関節リウマチ(RA)患者の免疫細胞タイピングによりCXCR4陽性T細胞の重要性を見出した。NGSによるT細胞レパトア解析ではRAにおいてHLA-DRB1アレル陽性患者でT細胞レパトア多様性が減少しており、HLAを介したT細胞レパトアの偏りが想定された。RAでは自己抗原BiPに特異的なT細胞が増殖しており、またBiP特異的な免疫抑制はマウスモデルにおける関節炎を改善させた。BiPに対する自己免疫の原因としてMycobacteriaの相同蛋白HSP70とのmolecular mimicryが想定された。以上の検討よりRAにおけるT細胞免疫の重要性とその制御によるRA治療戦略の方向性が示された。

研究成果の概要(英文)： HLA-DRB1 is the most potent genetic risk locus in rheumatoid arthritis (RA). Autoantigens are presented on HLA-DRB1 and activate CD4+ T cells, which contribute to RA pathogenesis. Here, we analyzed T cell receptor (TCR) repertoire by next generation sequencing (NGS), and demonstrated that a significant correlation between HLA-DRB1 and TCR repertoires. We identified HLA-DRB1\*0405 epitopes derived from autoantigen, BiP. In RA patients, BiP-specific effector T cells were proliferated and BiP-specific regulatory T cells controlled their proliferations. Tolerance to BiP peptides ameliorated mouse model of arthritis. Furthermore, Mycobacterium HSP70-specific T cell responses were increased in RA, and molecular mimicry is speculated on the basis of autoimmunity to BiP. Taken together, we proposed the new therapeutic approach for RA by autoantigen-specific T cell regulation.

研究分野： 膠原病

キーワード： 関節リウマチ T細胞 BiP T細胞受容体

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis, RA)は自己免疫異常を背景とする慢性炎症性関節炎である。RA治療は、生物学的製剤に代表される分子標的療法により大きく進展がみられたものの、その寛解率(Booleen's criteria)は2~3割とされており、RA病態の解明と、その結果に基づく根本的なRA治療法の開発は依然急務である。

RAの遺伝的背景としてHLA-DRB1多型が知られており、その寄与は遺伝的因子の5~6割とされている。HLA-DRB1\*0401, 0101, 0405などがRAリスクアレルとして知られているが、特にp70-75の配列に相同性があり、Share epitope(SE)と言われている。HLA-DRはCD4陽性T細胞への抗原提示に関与しており、RAにおいてはHLA-DRB1リスクアレルに提示された自己抗原により活性化された自己抗原特異的CD4陽性T細胞が病態を形成していると考えられている。以上より、抗原特異的T細胞の制御はRAの新規治療戦略と成る可能性がある。一方で、RAにおける自己抗原について、および抗原特異的T細胞についての詳細は不明であり、治療標的そのものの探索が必要であった。

## 2. 研究の目的

CD4陽性T細胞を標的とした抗原特異的免疫制御によるRAの新規治療戦略の創出を目的とした。上記の目的を達する為、以下の3点についての検討を行った。

(1) RAにおけるCD4陽性T細胞動態の解析  
(2) RAに関連したHLA-DRB1エピトープの同定と抗原特異的T細胞のRA病態における機能解析

(3) 抗原特異的T細胞を標的としたマウス関節炎モデルにおける治療実験

上記の検討を通して、RAの新規治療標的となりうるT細胞サブセットおよびT細胞シグナルの同定、また抗原特異的T細胞免疫に関するエピトープ配列の同定を通じた抗原特異的T細胞免疫抑制の可能性について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) FACSによる免疫細胞解析

RA患者および健康人より末梢血を採取し、FACSによるT細胞、B細胞、単球、樹状細胞、NK細胞subsetを測定する免疫細胞サブセット解析を行った。これらの免疫細胞サブセットの割合とRAの臨床的なパラメーターである疾患活動性、自己抗体価、CRPとの相関を解析した。また疾患活動性と相関のあったサブセットについてはsortingを行い、RNaseqによる遺伝子発現解析を行った。血清サイトカインはMultiplexELISAにより測定を行った。

(2) T細胞レパトア解析

RA患者および健康人末梢血を採取し、FACS

によりCD45RA+naive T cells, CD45RA-memory T cellを5万細胞sortingし、T細胞受容体(TCR)鎖CDR3配列特異的プライマーを用いてライブラリー作成の上、Miseqにより配列を解析した。Renyi entropy( $\alpha=1$ )を用いて計算されたTCRレパトア多様性とSE、RA疾患活動性、血清サイトカイン値との相関を検討した。

(3) HLA-DRB1\*0405 エピトープの検索

RA患者では抗BiP抗体、抗シトルリン化BiP抗体が出現し、BiPはRA関連自己抗原と考えられている。ヒトBiP配列をカバーする20Mersペプチドライブラリーを作成し、SE陽性RA患者PBMCを刺激することで増殖反応、炎症性サイトカイン産生を誘導するペプチド配列を検索した。また同じペプチドライブラリーを用いて、細胞増殖の抑制とIL-10産生を誘導するペプチドを検索した。またヒトBiPはMycobacterium(Myc)HSP70と相同性が高いことより、MycHSP70由来のペプチドライブラリーを作成し、MycHSP70由来HLA-DRB1\*0405エピトープをRA患者PBMCを用いて同様に検索し、その機能を解析した。

(4) マウス関節炎抑制実験

(3)で同定したエピトープを関節炎発症直前のマウスに経口投与することで、マウスにT細胞性の免疫寛容を誘導し、コラーゲン誘導性関節炎(CIA)の抑制効果、BiPに対するT細胞増殖、制御性T細胞の割合を検討した。

## 4. 研究成果

(1) RAにおけるCXCR4陽性CD4陽性T細胞

CXCR4はSDF-1の受容体であり、RAにおいてはT細胞の炎症関節への遊走に関与しており、炎症関節におけるT細胞はほとんどがCXCR4を発現している。RA患者末梢血ではCXCR4陽性T細胞が健康人と比較して有意に増加しており、かつ末梢血CXCR4陽性T細胞の割合はRAの疾患活動性と強い相関がみられた。このような病勢との相関はほかの末梢血helper T cell subsetでは明らかではなく、CXCR4陽性T細胞のRA関節炎病態における重要性が示唆された。CXCR4陽性T細胞の割合はB細胞表面に発現するHLA-DR量と相関がみられ、in vitroのT細胞とB細胞の共培養でHLA-DRを阻害するとT細胞におけるCXCR4の細胞表面発現が低下することから、B細胞上のHLAを介した抗原提示がT細胞におけるCXCR4発現に重要と考えられた。CXCR4陽性T細胞のtranscriptome解析ではTCR下流のsignalの亢進が認められ、CXCR4陽性T細胞におけるTCRを介した抗原特異的なCD4陽性T細胞の活性化が示唆された。

(2) 免疫細胞サブセットdatabaseを活用したRAにおける肥満とT細胞動態の検討

RAにおいて肥満は関節炎増悪因子のひとつであり、肥満患者ではTNF阻害薬の有効性

が低いといった問題があるとされている。このことの免疫学的背景の機序解明のため(1)で用いた RA における免疫細胞サブセット解析の結果を用いて、肥満 RA 患者における免疫異常を解析した。BMI を用いて RA、健康人を 3 群に分類し、BMI>25 以上の RA 患者における特徴を検討したところ、肥満 RA 患者においては Th17 細胞および Plasmablast の増加がみられた。また、BMI と血清 IL-18、IL-21 には有意な相関がみられた。肥満 RA 患者の Th17 細胞では Pathogenic Th17 細胞に特徴的な遺伝子発現がみられた。以上の結果より、肥満 RA 患者については、IL-1-Pathogenic Th17 細胞軸が亢進しており、Th17 細胞を標的とした治療がより奏功する可能性が示された。

(3)RA における TCR レパトア多様性 NGS により解析した TCR レパトア配列に関して、その多様性を Renyi entropy( $\alpha=1$ , Shannon index)を指標として解析した。TCR レパトア多様性は、TCR レパトア内における特定の T 細胞クローンへの偏りが強いほど低下する指標と考えられる。RA においては SE 陽性患者で健康人および SE 陰性 RA 患者と比較してメモリー T 細胞における TCR レパトア多様性が低下しており、更に TCR レパトア多様性は SE dosage との負の相関がみられた。健康人では SE 陰性、陽性間で TCR レパトア多様性の差は認めなかった。またナイーブ T 細胞では RA 患者において有意な TCR レパトア多様性の変化はみられなかった。TCR レパトア多様性は RA 疾患活動性が高いほど有意に低下したが、多変量解析の結果、SE と疾患活動性はそれぞれ独立に TCR レパトア多様性の predictors であることがわかった。一方で RA 患者においては血清 IL-2 濃度と TCR レパトア多様性は正の相関を示し、サイトカインは TCR レパトアの偏りを伴わないクローン増殖に関与していると考えられた。以上の検討より、SE に提示される抗原により誘導されたメモリー T 細胞の偏った増殖が、RA の TCR レパトア多様性の低下に関与していることが推定され、RA 病態における SE 依存的な T 細胞クローン増殖の重要性が示唆された。

(4)RA における BiP 特異的 T 細胞

BiP ペプチドライブラリーを用いた PBMC 増殖反応によるスクリーニングを行い、HLA-DRB1\*0405 に提示される BiP 由来ペプチドを複数同定した。なかでも BiP336-355 は RA 患者 T 細胞を最も強く増殖誘導し、IFN- $\gamma$ 、IL-17 産生を誘導した。これらの応答は RA 疾患活動性、抗 BiP 抗体価と有意に相関した。一方で BiP456-475 は制御性 T 細胞を活性化し、IL-10 産生を誘導した。BiP456-475 ペプチドは BiP336-355 ペプチドによる T 細胞増殖を IL-10 依存性に抑制した。健康人においては BiP336-355 に対する増殖反応はみられず、BiP456-475 による IL-10 産生は RA と同等であった。以上の

観察より BiP 特異的エフェクター T 細胞/制御性 T 細胞のバランスの異常が RA で観察された。また MycHSP70 由来の BiP336-355 と相同性のある HLA-DRB1\*0405 エピトープに反応する T 細胞が RA において増殖していることが明らかとなり、BiP336-355 に対する増殖反応と強い相関がみられた。自己抗原への免疫応答に関して微生物における相同性のある抗原との molecular mimicry が関与していることが示唆された。

(5) (4)で同定した制御性 T 細胞エピトープである BiP456-475 は、これを関節炎発症直前マウスに経口投与して免疫寛容を誘導することで、マウスコラーゲン誘導性関節炎を有意に軽減させた。BiP456-475 を投与された群では、抗 BiP 抗体価の減少、BiP に対する T 細胞増殖応答の低下、および脾臓における制御性 T 細胞の増加が観察され、T 細胞免疫応答の抑制が示された。

以上の研究結果より、RA 病態における T 細胞受容体からの抗原特異的シグナルの重要性、T 細胞活性化に際しての SE による抗原提示の重要性、および具体的な抗原エピトープの同定による自己免疫寛容破綻のプロセスの証明および T 細胞を標的とした抗原特異的な関節炎治療の方向性が示された。ヒトに対する抗原特異的な免疫寛容誘導法研究の進展により、これらのエピトープによる関節炎治療の臨床応用の可能性があると考えられる。

## 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 5 件)

1. Increased serum concentrations of IL-1 beta, IL-21 and Th17 cells in overweight rheumatoid arthritis patients. Shoda H, Nagahuchi Y, Tsuchida Y, Sakurai K, Sumitomo S, Fujio K, Yamamoto K. Arthritis Res Ther. 2017. Accepted. 査読有

2. Immunophenotyping of rheumatoid arthritis reveals a linkage between HLA-DRB1 genotype, CXCR4 expression on memory CD4<sup>+</sup> T cells, and disease activity. Nagafuchi Y, Shoda H, Sumitomo S, Nakachi S, Kato R, Tsuchida Y, Tsuchiya H, sakurai K, hanata N, Tateishi S, Kanda H, Ishigaki K, Okada Y, Suzuki A, Kochi Y, Fujio K, Yamamoto K. Sci Rep. 6: 29338, 2016. 査読有

3. Immune responses to Mycobacterium heat shock protein 70 accompany self-reactivity to human BiP in rheumatoid arthritis. Shoda H, Hanata N, Sumitomo S, Okamura T, Fujio K, Yamamoto K. Sci Rep. 6: 22486, 2016. 査読有

4. Quantitative and qualitative characterization of expanded CD4(+) T cell clones in rheumatoid arthritis patients.

Ishigaki K, Shoda H, Kochi Y, Yasui T, Kadono Y, Tanaka S, Fujio K, Yamamoto K. Sci Rep. 5:12937, 2015. 査読有

5. Autoantigen BiP-derived HLA-DR4 epitopes differentially recognized by effector and regulatory T cells in rheumatoid arthritis. Shoda H, Fujio K, Sakurai K, Ishigaki K, Nagafuchi Y, Shibuya M, Sumitomo S, Okamura T, Yamamoto K. Arthritis Rheumatol. 67(5):1171-81, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

庄田宏文、永瀨 泰雄、他. Immunological phenotyping of obese patients with rheumatoid arthritis. 第 61 回日本リウマチ学会総会. 平成 29 年 4 月 20 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Sakurai K, Shoda H, et al. Analysis of T cell repertoire diversity of CD4+ naive and memory T cells by next generation sequencing and its association with clinical parameters in rheumatoid arthritis. ACR annual meeting 平成 28 年 11 月 15 日. Washington DC(USA)

櫻井恵一、庄田宏文、他. 次世代シーケンサーによる関節リウマチ患者 CD4 陽性 T 細胞受容体レパトア解析. 第 44 回日本臨床免疫学会. 平成 28 年 9 月 8 日、京王プラザホテル(東京都・新宿区).

櫻井恵一、庄田宏文、他. Evaluation of pathophysiology of rheumatoid arthritis by T cell repertoire analysis using next generation sequencing. 第 60 回日本リウマチ学会総会. 平成 28 年 4 月 22 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

庄田宏文、他. T cell and B cell responses to Mycobacterium heat shock protein70 in rheumatoid arthritis and their correlation with autoimmune responses to BiP. 第 60 回日本リウマチ学会総会. 平成 28 年 4 月 22 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Nagafuchi Y, Shoda H, et al. Immunophenotyping of rheumatoid arthritis reveals the linkage between HLADRB1 genotype, CXCR4 expressions on memory CD4+ T cells, and disease activity. ACR annual meeting 平成 27 年 11 月 7 日. San Fransisco(USA)

Shoda H, et al. Immune responses to Mycobacterium heat shock protein 70 accompany self-reactivity to human BiP in rheumatoid arthritis. ACR annual meeting 平成 27 年 11 月 7 日. San Fransisco(USA)

藤尾圭志、庄田宏文、他. 分野を超えた生物学的製剤治療 関節リウマチの病態と治療反応性に関わる免疫応答のイムノフェノタイピングによる解析. 第 43 回日本臨床免疫学会総会. 平成 27 年 10 月 22 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

永瀨泰雄、庄田宏文、他. CXCR4 が関節リウマチの HLA-DRB1 遺伝型と疾患活動性とを結びつける. 第 43 回日本臨床免疫学会総会. 平成 27 年 10 月 22 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

庄田宏文、他. 関節リウマチにおける抗酸菌 HSP70 と自己抗原 BiP に対する免疫応答の関連. 第 43 回日本臨床免疫学会総会. 平成 27 年 10 月 22 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

永瀨泰雄、庄田宏文、他. CXCR4 Links the Shared Epitope to Anti-CCP Antibody

Production in Rheumatoid Arthritis. 第 59 回日本リウマチ学会総会、平成 27 年 4 月 23 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Ishigaki K, Shoda H, et al. Quantitative and Qualitative characterization of expanded CD4+ T cell clones in rheumatoid arthritis patients. ACR annual meeting 平成 26 年 11 月 17 日. Boston(USA)

石垣和慶、庄田宏文、他. T細胞の制御と自己免疫疾患 関節リウマチの病態に關与する CD4 陽性 T 細胞クローンの同定. 第 42 回日本臨床免疫学会総会. 平成 26 年 9 月 25 日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

永瀨泰雄、庄田宏文、他. 関節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析の試み. 第 42 回日本臨床免疫学会総会. 平成 26 年 9 月 25 日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/areri18/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

庄田 宏文 (SHODA, Hirofumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20529036

### (4) 研究協力者

永瀨 泰雄 (NAGAFUCHI, Yasumo)

東京大学・医学部附属病院・助教

櫻井 恵一 (SAKURAI, Keiichi)

東京大学・医学部附属病院・非常勤医員