

200936121A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

全身性エリテマトーデスにおける修飾自己抗原を用いた自己反応
性B細胞を標的とする病勢モニタリングと特異的細胞機能抑制治療
の開発

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 川畑 仁人

平成 22 (2010) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

全身性エリテマトーデスにおける修飾自己抗原を用いた自己反応性B細胞を標的とする病勢モニタリングと特異的細胞機能抑制治療の開発

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 川畑 仁人

平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

I. 研究報告

全身性エリテマトーデスにおける修飾自己抗原を用いた自己反応性B細胞
を標的とする病勢モニタリングと特異的細胞機能抑制治療の開発

----- 1

主任研究者 川畑仁人

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 8

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

全身性エリテマトーデスにおける修飾自己抗原を用いた自己反応性 B 細胞を標的とする病勢
モニタリングと特異的細胞機能抑制治療の開発

主任研究者 川畑仁人

東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科 助教

研究要旨

自己抗体は、全身性エリテマトーデスにおける抗 DNA 抗体、関節リウマチにおける抗 CCP 抗体、重症筋無力症における抗 AchR 抗体、特発性血小板減少性紫斑病における抗 GP II b/IIIa 抗体のように病態形成に大きく関与しているが、これらの自己抗体を産生する B 細胞を直接標的としたモニタリングや治療はこれまでなされていなかった。本研究は、修飾自己抗原を用いて自己反応性 B 細胞を直接標識することで初めて可能になる、病勢モニタリングおよび特異的治療への応用を目的とし行われた。抗 DNA 抗体もしくは抗 CCP 抗体を産生する B 細胞の同定を、従来からある手法である ELISPOT 法で行うとともに、新たに蛍光標識自己抗原ペプチドテトラマーを用いた FACS 解析も行い比較したところ、本法は自己反応性 B 細胞を同定する手法として有用であることを確認した。この手法により、自己反応性 B 細胞を FACS で可視化でき、従来の ELISPOT 法と異なる自己反応性 B 細胞解析が可能となった。更に、修飾自己抗原ペプチドテトラマーに抑制性抗体や毒素を結合させ、生体に投与することで、自己反応性 B 細胞を標的とした特異的治療への応用や、自己抗原ペプチドを変更することで、本研究で対象とした SLE や関節リウマチ以外の多くの自己免疫疾患に応用が可能な、汎用性の高い手法と考えられた。

A. 研究目的

自己免疫疾患では、自己抗体産生は、全身性エリテマトーデスの腎炎における抗 DNA 抗体、関節リウマチにおける抗 CCP 抗体、重症筋無力症における抗 AchR 抗体、特発性血小板減少

性紫斑病における抗 GP II b/IIIa 抗体などのように病態形成に大きく関与している。更に、病原性のあるこれらの自己抗体を測定することは疾患活動性の指標に有用と考えられるが、免疫グロブリン半減期は 20 日と長く、抗体価

別紙①

測定だけでは各時点の正確な疾患活動性を反映できない。

従って、末梢血中自己抗原性 B 細胞数を直接測定できれば、より正確な評価が可能となる。

従来の手法では、プレート上に抗原を固相化しその上で B 細胞を培養したのち、抗免疫グロブリン抗体で抗原特異的 B 細胞を検出する ELISPOT 法があるが、これでは B 細胞の詳細な検討はできないうえ、煩雑であり、治療への応用もできない。

近年抗 CD20 抗体による B 細胞除去が上記自己免疫疾患治療に有用であることが報告されているが、感染症の発生など重大な懸念も示されている。自己反応性 B 細胞のみを機能抑制できれば選択的な副作用の少ない治療が可能となる。更に、自己反応性 B 細胞自体を分離できれば病態解析も進展する。

本研究は、標識自己抗原を用いて自己反応性 B 細胞を特定することで初めて可能になる、上記の病勢モニタリングおよび特異的治療への応用を目的とする。この手法は広く自己免疫疾患に利用できる汎用性の高いものと考えられるが、今回は全身性自己免疫疾患の代表的疾患である全身性エリテマトーデスにおける抗 DNA 抗体産生 B 細胞を標的としたが、最近の日本国内におけるループスモデルマウスの供給が、現在マウスの異常のため滞り、搬入も 2010 年度以降という不測の事態が生じたため、全身性自己免疫疾患であり、患者数も多

く、重症型は特定疾患にもなっている関節リウマチも対象に、その病態形成や診断に重要な抗 CCP 抗体を産生する B 細胞も標的とした。

B. 研究方法

1) 自己抗原ペプチドの合成

1-1) 抗 DNA 抗体ミモトープの合成

本研究で行う自己抗原反応性 B 細胞の検出法は、蛍光標識した自己抗原ペプチドをプローブにして、それに結合する B 細胞を FACS にて可視化するというものであり、本法は既に、幾つかの論文にて報告されている。Diamond が論文で示している方法を参考に (J Immunol Methods 2008;338:79)、dsDNA 結合 B 細胞を FACS で検出するために、ミモトープである、抗 dsDNA 抗体が結合する構造をもつペプチド DWEYSVWLSN を、またコントロールペプチドとして WSLDYWNEVS を合成した。

2-2) 抗 CCP 抗体エピトープの合成

ヒト関節リウマチだけではなく、関節リウマチモデルである、コラーゲン誘発関節炎においても、抗 CCP 抗体が病態形成に重要な役割を担っていることが明らかとなっており (J Exp Med. 2009;206:449)、抗 CCP 抗体産生 B 細胞を可視化するために、コラーゲン誘発関節炎モデルで生じる抗 CCP 抗体が認識するペプチドを合成した。シトルリン化されていない CIAC ペプチド GP-HyP-GARGLTGR-HyP-GDAGP-HyP、シトルリン化されている CIA1 ペプチド

別紙①

GP-HyP-GACitGLTGR-HyP-GDAGP-HyP を合成した。また、別の配列だが同様にコラーゲン誘発関節炎モデルで反応性が報告されている、シトルリン化されていない LRP ペプチド SHQESTRGRSRGRSGRS、シトルリン化されている LXR ペプチド SHQESTCitGRSRGRSGRS、コントロールペプチド SHQESTKGKSKGKSGKSGS を合成した。

2) 自己抗体とペプチド反応性の確認

2-1) ループスモデルマウスにおける血清 IgG の DNA ミモトープへの反応性の確認

MRL/lpr マウス血清を生後 3 ヶ月から経時的に採取した。96 穴プレート (Immulon4) に DNA ミモトープあるいはコントロールペプチドを $5 \mu\text{g/ml}$ で添加後 4°C 一晩インキュベーションし、ペプチド抗原のコーティングを行った。その後、50 倍希釈血清を室温 1 時間インキュベーションし、HRP 標識抗マウス IgG 抗体を二次抗体として TMB にて発色を行った。

2-2) コラーゲン誘発関節炎マウスにおける血清 IgG の自己抗原ペプチドへの反応性の確認
DBA マウスにニワトリ II 型コラーゲン $100 \mu\text{g/ml}$ を CFA とともに免疫し、その 3~4 週間後に再びニワトリ II 型コラーゲン $100 \mu\text{g/ml}$ を IFA とともに免疫することで、関節炎を発症させた。

コラーゲン誘発関節炎マウスの血清も経時的に採取した。CIAC ペプチド、CIA1 ペプチド、LXR ペプチド、LRP ペプチド、LXP ペプチドを

上記のように 96 穴プレートにコーティングし、50 倍希釈血清を室温 1 時間インキュベーションし、HRP 標識抗マウス IgG 抗体を二次抗体として TMB にて発色を行った。

以上の実験により、ループスモデルマウスおよびコラーゲン誘発関節炎マウスにおける自己抗体が認識する自己抗原ペプチドを同定する。

3) ELISPOT 法による自己抗原ペプチド反応性 B 細胞の存在の確認

上記 1) 2) の結果から同定された疾患モデルマウスにおける自己抗体が認識する自己抗原ペプチドを固相化したプレートを用いて自己抗原ペプチド反応性 B 細胞の存在を ELISPOT 法にて確認した。これにより修飾自己抗原を用いた FACS 法と比較し、各方法の特徴が明らかになる。

自己抗原ペプチドを ELISPOT 用 96 穴プレートに $15 \mu\text{g/ml}$ で添加後 4°C 一晩インキュベーションし固相化した。そこへ、脾細胞、骨髓細胞、コラーゲン誘発関節炎では罹患関節細胞を $5 \times 10^5 \text{ cells/well}$ および 4 倍希釈系列で一晩 37°C にて培養し、翌日 HRP 標識抗マウス IgG 抗体を加え TMB にて発色し、自己抗原ペプチド反応性 IgG を産生している B 細胞を可視化した。

4) 蛍光標識自己抗原ペプチドテトラマーの作成

ビオチン化自己抗原ペプチド CIA1 $70 \mu\text{M}$ を、

別紙①

PE 標識ストレプトアビジン $1.7 \mu\text{M}$ に 4°C 4 時間インキュベーションし結合させテトラマーとする。このテトラマーからフリーの蛍光を BioGel P-30 スピнкаラムを用いて除去し、精製した PE 標識自己抗原テトラマーを FACS 用検出プローブとした。

5) 蛍光標識自己抗原ペプチドテトラマーによる自己抗体産生 B 細胞の可視化
本プローブの機能は、抗 CCP 抗体を産生しているコラーゲン誘発関節炎マウスの脾細胞および骨髓細胞、病変部位集積細胞を染色し FACS で解析することで確認した。また、脾細胞を PE 標識自己抗原ペプチドテトラマーにて標識後、磁気ビーズ結合抗 PE 抗体を添加し、MACS にてポジティブセレクションを行い、CIA1 結合細胞を濃縮し FACS 解析も行った。

(倫理面への配慮)

動物の飼育や実験は、大学動物実験施設規定に従い適切に行われている。

C. 研究結果

1) ループスモデルマウスにおける自己抗原ペプチドの同定

MRL/lpr マウスの血清を経時的に採取し、既に報告されている DNA ミモトープに対する ELISA を行ったところ、3 ヶ月から 6 ヶ月にかけて徐々に陽性血清が増えた。コントロールペプチドに対する非特異的反応も認められた

が、ミモトープによる抗 DNA 抗体産生 B 細胞の検出は有用である可能性が示された。しかし、ループスモデルマウスの供給が、維持されているマウスにフェノタイプ異常が認められたことにより 2010 年半ばまで日本で供給が滞る不測の事態が生じたため、本研究における主な標的自己抗体を、まずは抗 DNA 抗体の検討から関節炎における抗 CCP 抗体とすることとした。本研究はそもそも広範な応用を考えた内容であり、抗 CCP 抗体は関節炎の病態形成に重要な役割を担っているほか、抗 CCP 抗体が重要なヒト関節リウマチは人口の 0.5% を占める疾患であり、かつ重症型は特定疾患にも選ばれているからである。

2) コラーゲン誘発関節炎マウスにおける自己抗原ペプチドの同定

コラーゲン誘発関節炎における自己抗体が認識する自己抗原ペプチドの同定を ELISA にて行った。本研究ではコラーゲン誘発関節炎を惹起させるのに、II 型コラーゲンを CFA とともに免疫し、その 3~4 週間後に再びコラーゲンを IFA と免疫している。LRP ペプチドや LXR ペプチドに対する抗体は、どの時期においても陽性率は低く、ブースター免疫後 1 週間においても 17% 程度の陽性率であった。一方、CIA1 ペプチドおよび CIAC ペプチドに対する抗体は、初回免疫後 2~3 週間で陽性となるマウスが出現し、ブースター後 1 週間で約 83% と高率に陽性となった。従って、CIA1 ペプチ

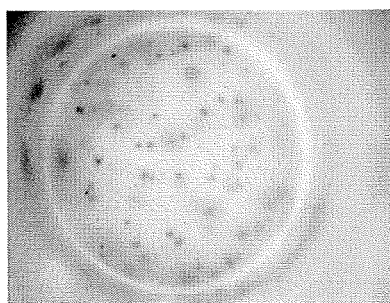
別紙①

ドをコラーゲン誘発関節炎におけるシトルリン化自己抗原ペプチドとすることが適切と考えた。このペプチドは既報告でもシトルリンに対する抗体である抗 CCP 抗体検出に有用であることが報告され、我々の系とも一致していた (J Exp Med. 2009;206:449)。

3) 自己抗原ペプチドを用いた ELISPOT 法による自己反応性 B 細胞の同定
コラーゲン誘発関節炎における抗 CCP 抗体産生自己反応性 B 細胞を検出するために、まず従来から用いられている、特定の抗体産生細胞を検出する ELISPOT 法で、抗 CIA1 抗体産生細胞の存在を検討した。その結果、本方法では脾細胞や骨髄細胞ではほとんど検出できず、病変関節部位の細胞でのみ検出 (2.5×10^6 個あたり平均 11spots) できた。

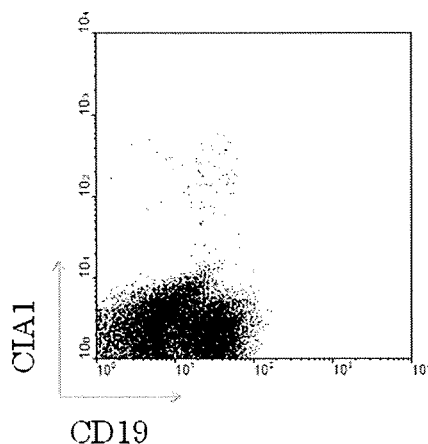
更に、ELISA 法では血清抗 CIA1 抗体を検出できなかった個体においても発症関節では、ELISPOT 法で、抗 CIA1 抗体産生細胞を検出できた。

図 1, 自己抗原ペプチドを用いた ELISPOT 法



4) 蛍光標識自己抗原ペプチドテトラマーを用いた FACS による自己反応性 B 細胞の同定
PE 標識 CIA1 ペプチドテトラマーを作成し、コラーゲン誘発関節炎脾細胞を染色したところ、図 1 に示すように PE で標識される B 細胞分画が確認された。従って、PE 標識 CIA1 ペプチドテトラマーによる FACS は CIA1 反応性 B 細胞の検出に有用な手法であると考えられた。このことは、蛍光標識自己抗原テトラマーは自己抗体産生 B 細胞の可視化に有用な手法であることを示している。

図 2, コラーゲン誘発関節炎マウス脾細胞に対する蛍光標識シトルリン化自己抗原ペプチド CIA1 テトラマーを用いた染色



D. 考察

1) 従来の ELISPOT 法と比較した修飾自己抗原ペプチドテトラマーによる自己反応性 B 細胞

別紙①

胞検出の特徴

従来の ELISPOT 法は自己抗体産生 B 細胞を検出する方法であり、形質細胞の存在に大きく左右される。一方で、修飾自己抗原ペプチドテトラマーは、細胞表面にある B 細胞受容体をみており、ELISPOT 法とは、同じ自己抗原ペプチドを使用しても、異なる発達段階の B 細胞をみている。実際に、ELISPOT 法では、関節局所の細胞で陽性細胞を認めた一方で、脾細胞ではほとんど認められなかったが、テトラマーでは脾細胞で陽性細胞を認めるという、異なる結果だった。

このことは、実際に病勢モニタリングをする際に重要な意味を持つと考える。血清の自己抗体測定は、長期間生存する形質細胞と半減期の長い抗体の存在に影響され、リアルな自己反応性 B 細胞の状態を反映しているとはいえないが、本法ではまさに自己反応性 B 細胞そのものをみており、今後、実際のヒト疾患で、自己抗体測定、ELISPOT 法、本法の比較による病勢比較の検討が重要と考える。

2) 治療への応用について

本法により病態形成に関わると考えられる B 細胞を検出できたことは、この B 細胞を特異的に標的とした治療ができる可能性を示している。B 細胞を標的とした治療が種々の自己免疫疾患で重要なことが示されているが、非特異的な除去のため、感染症などの重要な問題も生じている。従って、本法のように病態

に関わる B 細胞のみを標的とする治療は、この問題点を克服する方法と考えられる。

更に、本研究で用いる修飾自己抗原を用いた手法は、SLE や関節リウマチだけではなく、自己抗体が疾患を惹起する、自己免疫疾患、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病など多分野の多くの難治性疾患においても、病勢のほか治療に応用できるのも大きな利点である。

3) 今後の展望について

シトルリン化抗原ペプチドを用いた自己反応性 B 細胞検出ができたことにより、ヒト関節リウマチへ応用する段階にきている。関節リウマチにおける抗 CCP 抗体産生細胞を検出することで、疾患活動性評価や病態・予後との関連を検討できる。更に、マウスで、修飾自己抗原ペプチド結合抑制性抗体(抗 CD22 抗体や抗 CD72 抗体など) や、saporin 毒素結合自己抗原ペプチドテトラマーを用いて、治療応用の検討を行いたい。当初の予定通り DNA ミモトープを用いてループモデルマウスを、また CIA1 を用いてコラーゲン誘発関節炎の治療を行う。これらマウスでの治療が有効ならヒトへの応用も十分視野に入れることが可能になる。

長期的には種々の自己免疫疾患への検査や治療における応用を考えたい。自己抗体が病態形成に関わる疾患なら、基本的な手法は同じで自己抗原ペプチドを変更するだけであり、

別紙①

重症筋無力症や溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病など、汎用性はかなり高い方法と考える。

E. 結論

本研究から、自己抗体のエピトープをもとに作成した修飾自己抗原ペプチドテトラマーにより、自己反応性B細胞を検出することができた。この手法により、自己反応性B細胞をFACSで可視化でき、従来のELISPOT法とは異なる自己反応性B細胞解析が可能となった。更に、修飾自己抗原ペプチドテトラマーに抑制性抗体やターゲット毒素を結合させ、生体に投与することで、自己反応性B細胞を標的とした特異的治療への応用や、自己抗原ペプチドを変更することで、本研究で対象としたSLEや関節リウマチ以外の多くの自己免疫疾患に応用が可能な、汎用性の高い手法と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

修飾自己抗原ペプチドテトラマーに関する特許取得を予定している。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別紙①

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	該当する刊行物なし				

