

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

自己抗体誘導性関節炎のメカニズムとその制御機構の解明

### 2 研究者氏名: 松本 功

研究員: 安河内 孝徳 (研究期間 H.15.4.1~H.18.3.31)

技術員: 張 華 (研究期間 H.15.11.1~H.18.3.31)

### 3 研究のねらい:

K/BxN 関節炎モデルでは、解糖系 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) に対する自己抗体が単独で関節炎を惹起する。これらのことより、関節特異的抗原に対する免疫応答とは別の、ユビキタスな抗原により誘導される関節炎が存在する。また、この抗原 GPI をある特定種のマウスに免疫することによって関節炎を惹起できる。これら 2 種のモデルマウスより得られた知見と、ヒト関節リウマチ (RA)、特に抗 GPI 抗体陽性患者と比較解析し、共通の pathway を探索統合することにより真の関節炎の病態解明、及び新規治療法の開拓を目指す。

### 4 研究成果:

#### I. ヒト RA での抗 GPI 抗体—病因性に関して

RA ではリウマトイド因子、抗 CCP 抗体など多くの自己抗体が頻出し、抗 CD20 抗体が奏功することより、病態に直接関与している可能性が指摘されている。マウスで関節炎原性が証明されている抗 GPI 抗体は、RA 患者において約 15% と頻度は低いが、陽性患者においては関節炎の病勢を反映しており、関節外症状を伴う重度の RA に陽性者が多い (Hayashi T, et al. Mod. Rheumatol. 2005)。ただし、その他関節炎でも同定できることがあり、病因性についていくつかの検討を行った。マウスに直接ヒト型抗 GPI 抗体を投与しても、今までのところ関節炎は惹起できていない。そこで、我々は抗 GPI 抗体を含む IgG を、遺伝的に我々に近いと考えられるサル指関節内に直接投与したところ、IgG の軟骨表面への沈着、C5a レセプターを保持する細胞群の流入に伴う滑膜炎が証明された。これらのことより抗 GPI 抗体を含む RA 患者血清 IgG 軟骨表面に直接沈着し、単独で弱い滑膜炎を起こすことができるが、関節炎を起こすには十分でないことが考えられた (Suzuki, et al. Autoimmunity Reviews 2005, Matsumoto I, et al. Int. J. Mol. Med 2005)。

自己抗体と炎症性サイトカイン、あまりつながりが無いように思われる 2 つの分子だが、RA ではどのような関係にあるのだろうか。関節炎原性がありうると考えられる抗 GPI 抗体を保持していても関節炎が起きない健康人 (HS) では、炎症性サイトカインにつなげる分子に異常があるのではないかと考え、抗 GPI 抗体 HS9 人 (158 人中) に着目した。ではなぜこれらの人は関節炎を起こさないのだろうか? K/BxN マウスの抗 GPI 抗体移入の遺伝子解析により、protective な因子は Fcγレセプター、C5 が推測されている。われわれはヒトでアフィニティーの変化が起こるポリモルフィズムがすでに同定されている 2 つの刺激性 Fcγレセプター (FcγRIIIa-158V/F、FcγRIIIa-131H/R) に注目し、そのポリモルフィズムを比較検討した。187 人の RA (うち 23 人が抗 GPI 抗体陽性)、158 人の HS (うち 9 人が抗 GPI 抗体陽性) のゲノムより RFLP 法を用いてポリモルフィズムを解析したところ、FcγRIIIa においては抗 GPI 抗体陽性 HS では 9 人中 8 人がアフィニティーの弱い 158F のホモであった。一方、抗 GPI 抗体陽性 RA 患者では 158V を持つ患者が 6 割をしめ、有意差をもって抗 GPI 抗体陽性健康人に 158F が多いことが検定された ( $p=0.019$ )。しかしながら、FcγRIIIa にはこのような傾向が全く認められなかった。さらに、高親和性の FcγRIIIa-158V/V の homozygous の RA 患者、HS に注目して比較解析すると、ヒト GPI、ウサギ GPI 両者に対して、明らかに反応性の違いが見られた ( $p=0.0027$ ,  $p=0.0015$ )。一方抗 GPI 抗体陰性群の RA、HS の比較では差が認められなかった。これらのことより FcγRIIIa-158F は関節炎原性抗体の防御因子であることが考えられ、この遺伝子多系により関節炎原性抗体から逃れている可能性が示唆された。実際、FcγRIIIa はマウス抗 GPI 抗体の解析より、自己抗体の関節腔内への流入、及び関節内での免疫複合体の活性化に寄与していることが判明しているため、この遺伝子多系が 2 箇所関節炎に関与していることを示唆した (Matsumoto I, et al Arthritis Res. Ther. 2005)。

関節炎と自己抗体をつなげるその他の分子、特に獲得免疫を担う T 細胞はどのようなのであろうか。抗 GPI 抗体強陽性患者 (RA15 人、SLE4 人、HS4 人) に着目し、MACS サイトカイン分泌アッセイで GPI 反応性 Th1/Th2 細胞の同定を試みた。RA 患者では 15 人中 7 人より GPI 反応性 IFN $\gamma$  産生 T 細胞が、4 人より IL-4 陽性 T 細胞が同定され、それら患者は HLA-DR \*0405 ないしは \*0901 を保持していた。SLE や HS ではこれら GPI 反応性 T 細胞は殆ど同定できず、これらのことより HLA-DR \*0405 ないしは \*0901 RA 患者群において、関節炎原性抗体の産生に Th1/Th2 タイプの自己反応性 T 細胞が関与している可能性が示唆された。また、コントロール群で

の HLA-DR は一定の傾向がなく、抗 GPI 抗体産生に直接関わる要素は少ないと考えられた (Kori Y, et al. Ann. Rheum. Dis. in press)。

## II. ヒト RA での抗 GPI 抗体—産生機序に関して

抗 GPI 抗体が認識する抗原 GPI は、すべての細胞内に存在する解糖系酵素であり、また細胞外サイトカイン AMF/neuroleukin/maturation factor として機能しており、自己免疫疾患や抗体産生への関与が報告されている。GPI には 24 の変異型が存在し、非球状赤血球溶血性症との関連が指摘されている。我々は、抗 GPI 抗体陽性者における抗原 GPI の変異について検討した。抗 GPI 抗体陽性および陰性 RA 患者、陽性および陰性 HS 各 5 名の末梢血単核球より GPI 全長 cDNA をクローニングし、塩基配列を比較した。すると、39 種類の欠損変異型 cDNA が得られ、欠損変異型 GPI cDNA の保持率は、抗 GPI 抗体陽性健康人において(31.5%:23/73)、陰性者(6.4%:5/78)と比較して有意に高かった( $p < 0.001$ )。また抗 GPI 抗体陽性 RA 患者(28.6%:22/77)では、陰性者(1.6%:1/63)と比べて有意に高かった( $p < 0.0001$ )。これらのことから、欠損変異型 GPI の存在により、epitope spreading などの機序により GPI に対する自己抗体が産生されている可能性が示唆された (Muraki Y, et al. Biochem. Biophys. Research. Commun. 2004)。

## III. GPI 免疫モデルでの解析—B 細胞及び免疫グロブリンの重要性

ヒトリコンビナント GPI を DBA/1 マウスに免疫すると 100%関節炎を発症する。同様に native rabbit GPI 抗原を免疫しても関節炎が起きることから、GPI に対する免疫応答が DBA/1 マウスにおいて関節炎と関与しているのは確実である。RA における GPI に対する免疫応答の意義をさらに理解する為に、本研究ではもう 1 つの GPI 依存性モデルである DBA/1 マウスの GPI 免疫関節炎モデルを中心に検討を進めた。現在までの検討では、GPI 免疫関節炎マウスよりの血清や、IgG 成分だけでは関節炎が転移できていない。また、Fc $\gamma$ R を欠損したマウスに GPI を免疫しても関節炎は発症しないが、抑制性の Fc $\gamma$ RIIb を欠損したマウスでは関節炎が悪化する。この GPI 免疫マウスでの B 細胞の役割はどうなのだろうか？まず細胞移入により関節炎が転移できるかどうかを確認するために、SCID マウスに GPI 免疫マウス脾臓細胞を抗原 GPI とともに腹腔内投与した。すると関節炎がわずか 3 日で転移できることが明らかになった。さらにこれらの免疫担当細胞で関節炎に重要なものを同定するため CD19<sup>+</sup>B 細胞、CD4<sup>+</sup>陽性 T 細胞を MACS で depletion すると関節炎の発症が起きなくなる。これら行われてきた検討と関節炎を起こしているもの、起こしていないものの抗 GPI 抗体価で比較したところ、この自己抗体が存在するようになり関節炎が発症すること、また出現しないものでは関節炎は起きないことが明らかになり、同様にこれら欠損させた細胞群が関節炎発症に重要であることが明らかになった。

## IV. GPI 免疫モデルでの解析—TNF $\alpha$ 依存性関節炎での制御機構

このモデルは TNF $\alpha$ 依存性が大変強く、TNF antagonist でほぼ完全に関節炎が抑制できる。厚生省研究班で、生物製剤で着目されている抗 TNF $\alpha$ 抗体の治療抵抗性 RA 患者では、IFN inducible gene の発現が亢進していることがつきとめられ、サイトカイン同士の相互関係に注目が集まっている。我々は GPI 免疫関節炎発症直後の脾臓細胞より CD4<sup>+</sup>細胞を分離し、マイトマイシン処理した抗原提示細胞と GPI とともに培養し、抗原特異的に産生されるサイトカインを Cytometric Beads Array (CBA) システムを用いて比較解析した。対照としては関節炎抵抗性 C57Bl/6 マウスを用いた。すると関節炎マウスの脾臓細胞を用いた検討では抗原特異的に TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  が産生された。これらのサイトカインは関節炎発症に重要な意味を持っていると考えられるが、これらのサイトカインの hierarchical な関係や、細胞内シグナルで重要な pathway はどうなのだろうか。抗原特異的な炎症性サイトカインを抗原刺激で誘導後、共刺激分子の抗体(抗 CD40L 抗体、抗 ICOS 抗体、CTLA-4Ig など)や抗サイトカイン抗体(抗 TNF $\alpha$ 抗体、抗 IFN $\gamma$ 抗体、抗 IL-12 抗体など)を用いてこれらサイトカインの抑制実験を行った。すると共発現分子では CTLA-4Ig が TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  を抑制し、抗サイトカイン抗体では抗 TNF $\alpha$ 抗体のみが他のサイトカインを制御することが判明した。また、JAK inhibitor, SN50 (NF $\kappa$ B inhibitor) を使って抑制実験を行ったところ、NF $\kappa$ B inhibitor で劇的に全てのサイトカインを抑制することができた。しかし、JAK inhibitor はまったく無効であった。これらのことより、これら抗原特異的なサイトカインの制御は NF $\kappa$ B を介して行われ、IFN $\gamma$  レセプターを介するシグナルの関与は否定的と考えられた。またこのモデルで発現亢進する 1 つの TNF $\alpha$  関連遺伝子 (TIF-X) に注目し、その分子が関節炎早期で RNA レベルでも蛋白レベルでも強発現すること、Exon3 を欠損した spliced variant がその関節炎時に出現すること、この分子に対するポリクローナル抗体が抗原特異的な IL-10 を誘導すること、さらに興味深いことに、ヒト RA 滑膜でもこの分子が同定されることを現在までに明らかにしている。今後この分子を介しての関節炎制御機構について深く検討していきたい。

## 5 自己評価:

ヒト抗 GPI 抗体の病因的意義の解析が第 1 の目標であったが、サルを使った解析や、媒介役としての Fc $\gamma$ RIIIa の遺伝子多型の解析でやや全貌が見えたと感じている。また、もう 1 つの目標はヒトの細胞、及びヒト型抗体を用いた疾患モデルの作製であった。しかし、実際は他動物の生体内での反応をヒト細胞で再現する難しさ、例えば

非常に RA 自体が heterogeneity の高い疾患であること、自分たちが考えていた以上に抗 GPI 抗体の陽性率が低かったこと、サンプルの供給源、つまり RA 患者からの定期的採血が困難であったことなどの理由が、解析研究を進めるにつれはつきりし、それを遂行する上での意義にも乏しさが出たことがあげられ、自分自身深く反省している。今後は GPI 免疫モデルで得られた知見をもう 1 度ヒトに還元しなおし、さきがけ研究で得られた成果をもとに、RA 自身の自己免疫応答を制御する機構を明らかにしたい。

#### 6 研究総括の見解:

本研究は、自己抗体誘導関節炎のメカニズムとその制御機構を解明することを目的とし、ヒト抗 GPI 抗体の病的意義の解析、ヒトの細胞およびヒト型抗体を用いた疾患モデルの作製を目標とした。結果としては一定の結論を得るに至らず、しかも他動物の生体内での反応をヒト細胞で再現することの難しさ、抗 GPI 抗体の陽性率が予想と違って高くなかったこと、サンプルの供給源が限定されていたこと等の理由から、今後は解析研究を遂行する意義が乏しいという考えに至った。今後は得られた成果について、もう一度作業仮説を立て直して研究を進めることを望む。

#### 7 主な論文等:

1. Muraki Y, Matsumoto I, Chino Y, Hayashi T, Suzuki E, Goto D, Ito S, Murata H, Tsutsumi A, Sumida T. Glucose-6-phosphate isomerase variants play a key role in the generation of anti-GPI antibodies. Possible mechanism of autoantibody production. *Biochem. Biophys. Research. Commun.* 2004; 323:518-522.
2. Suzuki T, Muraki Y, Yasukochi T, Zhang H, Kori Y, Hayashi T, Wakamatsu E, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumichika H, Sumida T, Matsumoto I. Intraarticular injection of IgG from anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive patients with rheumatoid arthritis induces synovitis in cynomolgus monkeys. *Autoimmunity Reviews* 2005; 4: 475-478.
3. Hayashi T, Matsumoto I, Muraki Y, Takahashi R, Chino Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Clinical characteristics of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2005; 15; 258-263.
4. Matsumoto I, Muraki Y, Yasukochi T, Zhang H, Kori Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Ikeda K, Sumichika H, Sumida T. The exploration of joint-specific immunoreactions on immunoglobulins G of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody-positive patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med* 2005; 16: 793-800.
5. Matsumoto I, Zhang H, Muraki Y, Hayashi T, Yasukochi T, Kori Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. A functional variant of Fcγ receptor IIIA is associated with rheumatoid arthritis in anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies-positive individuals. *Arthritis. Res. Ther.* 2005; 7: 1183-1188.
6. Kori Y, Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Hayashi T, Iwanami K, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Characterization of Th1/Th2 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*(in press)

#### 受賞 3 件

- 平成 14 年度難病医学研究財団 研究奨励賞(平成 15 年 1 月)
- 第 16 回日本内科学会奨励賞(平成 15 年 4 月)
- フラテ研究奨励賞(平成 17 年 2 月)

#### 招待講演 10 件

1. 第 10 回自己抗体と自己免疫 シンポジウム 自己抗体誘導性関節炎のメカニズムと制御 平成 15 年 3 月 8 日 経団連会館 経団連ホール
2. 第 2 回 Osteoimmunology Forum Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) を免疫して起きる関節炎—ヒト RA との接点 平成 17 年 3 月 12 日 東京ガーデンパレス
3. 21 世紀 COE プログラムシンポジウム 病態解明のフロンティア ユビキタスな蛋白に対する自己免疫関節炎—動物モデルとヒト関節炎との接点— 平成 17 年 3 月 19 日 京大会館
4. 第 49 回日本リウマチ学会総会 シンポジウム 自己免疫疾患発症の分子機構と制御 GPI 誘導性関節炎マウスの網羅的解析—ヒト抗 GPI 抗体陽性関節リウマチとの接点 平成 17 年 4 月 20 日 パシフィコ横浜
5. 第 33 回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム 自己抗体の産生機序と病原性 関節リウマチにおける自己抗体の産生機序と病原性 平成 17 年 10 月 28 日 京都