

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591151

研究課題名（和文）シェーグレン症候群発症の分子機構：M3R に対する免疫応答解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism of Sjogren's syndrome：Immune response to M3R

研究代表者

住田 孝之 (SUMIDA TAKAYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：00183054

研究成果の概要：シェーグレン症候群(SS)の発症機序の解明、それに基づく抗原特異的治療の開発を目的として、ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 3 (M3R) に対する免疫応答を明らかにすることを目的とした。その結果、SS 患者末梢血中には多彩な B 細胞エピトープに対する抗 M3R 抗体が存在し、唾液分泌に対する機能は M3R 上の B 細胞エピトープにより異なる事が明らかになった。さらに、M3R ペプチドを免疫することにより SS に類似した唾液腺炎を発症するモデルマウスの作成に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：シェーグレン症候群、T 細胞、自己抗体、T 細胞エピトープ、アナログペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群(SS)は、口腔内乾燥感や乾燥性角結膜炎を主症状とする自己免疫疾患の一つであり、腺外所見として間質性腎炎などの全身の臓器病変も併発する。その病因として各臓器（唾液腺、涙腺、腎間質など）に浸潤した CD4 陽性 T 細胞による自己免疫反応が注目されている。この自己反応性 T 細胞の T 細胞レセプター(TCR)を解析すること、さらに、対応自己抗原を明らかにすることは、自己免疫疾患の発症機序を解明する上で重

要であると思われる。我々は、数の少ない自己反応性 T 細胞を解析するために分子生物学的戦略を用いて SS 患者の各臓器内浸潤 T 細胞の TCR 遺伝子を解析し以下の事実を明らかにしてきた。

(1) 口唇唾液腺、涙腺、腎間質に浸潤した T 細胞は、抗原を認識して増加している。

(2) 口唇唾液腺浸潤 T 細胞が認識する対応抗原は、臓器非特異的自己抗原として SS-A52kD、HSP10/60、唾液腺特異的自己抗原として  $\alpha$  アミラーゼとムスカリン作働性ア

セチルコリン受容体 (M3R) である。

特に M3R 分子は唾液腺上皮に特異的に発現しているばかりでなく、アセチルコリンの刺激により唾液を分泌する重要な受容体である。さらに、動物モデルでは、M3R に対する抗体が唾液腺分泌を障害するという報告がある。そこで、本研究では、SS 患者において M3R に対する免疫応答を解析することにより、SS における唾液腺破壊の発症機序の解明と、SS に対する新しい抗原特異的治療戦略の開発を目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究においては、次の三つを主目的とした。

- (1) SS 患者血清中に存在する抗 M3R 抗体の B 細胞エピトープの解析、対応抗原エピトープごとの唾液腺分泌に対する抗体機能解析をおこない、対応抗原と機能との関連性を明らかにする。
- (2) SS の疾患モデルとして、M3R 免疫唾液腺炎モデルマウスを新規に確立しその発症の分子機構を明らかにする。
- (3) (2) で樹立した SS モデル動物を用いて、M3R 反応性 T 細胞をアナジーに陥らせるアナログペプチドを選定し、抗原特異的な治療戦略を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) 抗M3R抗体の対応B細胞エピトープ解析：SS患者血清を用いて、M3RのN領域、細胞外第一、第二、第三ドメインに対する抗M3R抗体をELISA法にて解析した。

(2) M3R上のB細胞エピトープと機能：唾液腺上皮細胞由来細胞株 (HSG) を塩酸セビメリンで刺激し細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  増減をフォローサイトメトリーで測定する系を確立し、抗M3R抗体の唾液分泌に対する機能について検討した。

(3) SSのモデルマウスの樹立：C57BL/6 マウスバックのM3RノックアウトマウスにM3Rの各領域 (N、細胞外第一、第二、第三) をコードする合成アミノ酸を混合免疫し、20 日目に脾臓細胞をRag-1 ノックアウトマウスに細胞移入した。

(4) M3RのT細胞エピトープおよびアナログペプチド解析：3) で確立したM3R免疫唾液腺炎モデルマウスを用いてM3Rのアナログペプチドによる抗原特異的唾液腺炎制御法を確立する。そのために、M3Rの各領域をコードする合成ペプチドを個々に免疫して唾液腺炎を誘導するT細胞エピトープを同定する。次に、in vitroにおいてアナログペプチドを

合成した変異ペプチドから選定する。

## 4. 研究成果

(1) 抗M3R抗体の対応B細胞エピトープ解析：

M3RのN領域、細胞外第一、第二、第三ドメインの各ドメインに対する自己抗体が存在すること、同一患者において複数のB細胞エピトープがM3R分子上に存在すること、を明らかにした。

(2) M3R上のB細胞エピトープと機能：M3R第二ドメインに対する抗体は $\text{Ca}^{2+}$  influxを抑制し、N領域、第一ドメインに対する抗体は増強、第三ドメインに対する抗体は影響を与えない事が判明した。すなわち、対応B細胞エピトープにより自己抗体の機能が異なる事が明らかとなった。

(3) SSのモデルマウスの樹立：30 日目以降に単核球浸潤を中心とした唾液腺炎が認められた。浸潤細胞の主体はCD4+T細胞であり、SSの唾液腺炎に類似した組織像を呈していた。以上のように、2つのノックアウトマウスを組み合わせる事により、M3R免疫唾液腺炎モデルマウスを確立することに成功した。

本研究の独創的な点は、SS を自己免疫疾患としてとらえ、M3R 分子をターゲットとした免疫応答による唾液腺分泌障害の発症機構を分子レベルで解明した点である。さらに、M3R に対する T 細胞の免疫応答を、変異ペプチドを用いて抗原特異的に制御する治療戦略を開発する点である。

## 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 12 件)

1. Tanaka-Watanabe Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. B cells play a crucial role as antigen-presenting cells and collaborate with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis.: Clin. Exp. Immunol. 155:285-294, 2009. 査読有り
2. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Hom G, Graham RR, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J, Behrens TW, Sumida T,

- Tsuchiya N. Replication of the association between the C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* 60:553-8, 2009 査読有り
3. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase (GPI)-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 10:R130. Epub, 2008 査読有り
  4. Kawasaki A, Ito I, Hikami K, Ohashi J, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Koga M, Arinami T, Graham R R, Hom G, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens T W, Sumida T and Tsuchiya N.: Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of STAT1-STAT4 region. *Arthritis Res Ther* 10:R113. Epub, 2008 査読有り
  5. Kawaguchi Y, Wakamatsu E, Matsumoto I, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T., Hara M.: Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility. *Ann. Rheum. Dis.* Sep1. Epub 2008 査読有り
  6. Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Iwanami K, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Therapeutic effects of antibodies to TNF alpha and IL-6 and CTLA-4 Ig in mice with glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 10:R66. Epub, 2008 査読有り
  7. Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Ohnishi Y, I. Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Taniguchi M and Sumida T.: Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and-independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 22:369-374, 2008 査読有り
  8. Iwanami K, Matsumoto I, Watanabe Y, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T, Sumida T.: Crucial role of IL-6/IL-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate-isomerase. *Arthritis Rheum.* 58:754-763, 2008 査読有り
  9. Matsui H, Tsutsumi A, Sugihara M, Suzuki T, Iwanami K, Kohno M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Visfatin(pre-B cell colony-enhancing factor) gene expression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67:571-572, 2008 査読有り
  10. Nakamura Y, Wakamatsu E, Matsumoto I, Tomiita M, Kohno Y, Mori M, Yokota S, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: High prevalence of autoantibodies to muscarinic-3 acetylcholine receptor in patients with juvenile-onset Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 67 136-137, 2008 査読有り
  11. Sugihara M, Tsutsumi A, Suzuki E, Wakamatsu E, Suzuki T, Ogishima H, Hayashi T, Chino Y, Ishii W, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Effects of infliximab therapy on gene expression levels of TNF-alpha, TTP, TIA-1 and Hu antigen R in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56 2160-2169, 2007 査読有り
  12. Wakamatsu E, Nakamura Y, Matsumoto I, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: DNA microarray analysis of labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 66:844-845, 2007 査読有り
- [学会発表] (計 30 件)
1. Tanaka-Watanabe Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Minami R, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T.: TNF alpha induces human six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4 in rheumatoid synovium. *APLAR2008*

(Yokohama) 9月24日、2008

2. Wakamatsu E, Matsumoto I, Iizuka M, Tsuboi H, Nakamura Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T.: Induction of experimental autoimmune sialoadenitis using organ-specific autoantigen knockout mice. APLAR2008 (Yokohama) 9月26日、2008
3. Suzuki T, Handa S, Kose K, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Evaluation of anti-TNF biologics on rheumatoid arthritis using the new low-field extremity MRI and scoring system. APLAR2008 (Yokohama) 9月26日、2008
4. Ito I, Kawasaki A, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Ohashi J, Hom G, Graham R R, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Sumida T., Tsuchiya N.: Replication of the Association between C8orf13-BLK Region and Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population. 2008 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR (San Francisco) 10月26日、2008
5. Kawasaki A, Ito I, Hikami K, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Koga M, Arinami T, Graham R R, Hom G, Ohashi J, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Sumida T., Tsuchiya N.: Association of STAT4 polymorphisms with Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population. 2008 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR (San Francisco) 10月26日、2008
6. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Hayashi T, Sumida T.: Use of Laser Microdissection in the Analysis of Renal-infiltrating T cells in lupus nephritis. 2008 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR (San Francisco) 10月26日、2008
7. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Ota Y, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T., Hara M.: Muscarinic-3 Acetylcholine Receptor Autoantibody in Patients with Systemic Sclerosis. 2008 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR (San Francisco) 10月26日、2008
8. Inoue A, Matsumoto I, Iwanami K, Tanaka-Watanabe Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T.: Overexpression Of TNFalpha-induced-adipose Related Protein (TIARP) In Joints With Autoimmune Arthritis Mediated By Glucose-6-phosphate Isomerase. 2008 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR (San Francisco) 10月27日、2008
9. Yoshitaka T, Nakasa T, Inoue A, Okubo A, Takemoto F, Miyaki S, Nishida K, Ochi M, Ozaki T, Sumida T., Asahara H.: The Expression of MicroRNA-424 in Rheumatoid Arthritis. 2008 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR (San Francisco) 10月28日、2008
10. Tsuboi H, Matsumoto I, Wakamatsu E, Iizuka M, Nakamura Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T.: The Pathogenesis of Anti-M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Antibodies in Patients with Sjögren's Syndrome. 2008 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR (San Francisco) 10月28日、2008
11. Wakamatsu E, Matsumoto I, Iizuka M, Tsuboi H, Nakamura Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T.: Establishment Of New Murine Model For Sjogren's Syndrome Using M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice. 2008 ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR (San Francisco) 10月28日、2008
12. 住田 孝之: シェーグレン症候群の分子病態と治療戦略、第104回日本内科学会講演会 (大阪) 4月3日、2007
13. Kohno M, Tsutsumi A, Sugihara M, Matsui H, Suzuki T, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Expression of the Interleukin 17 (IL-17) Gene in Patients with Rheumatoid Arthritis(RA), The 2<sup>nd</sup> East Asian Group of Rheumatology Meeting(Korea) 5月19日、2007
14. Nakamura Y, Wakamatsu E, Matsumoto I, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Functional Analysis of Autoantibodies to Muscarinic M3 Acetylcholine Receptor in Patients with Sjögren's Syndrome The 2<sup>nd</sup> East Asian Group of Rheumatology Meeting(Korea) 5月19日、2007
15. Yoshiga Y., Goto D., Segawa S.,

- Matsumoto I., Ito S., Tsutsumi A., Sumida T.: NKT Cells are Novel Accelerator and Producer of IL-17 in the Pathogenesis of Collagen-induced Arthritis Focis2007 (San diego) 6 月 9 日、2007
16. Iwanam K., Matsumoto I., Watanabe Y., Inoue A., Mamura M., Goto D., Ito S., Tsutsumi A., Sumida T.: IL-6/T<sub>H</sub>-17 axis plays a crucial role in the generation of GPI-induced arthritis, Focis2007 (San diego) 6 月 9 日、2007
  17. Watanabe Y, Matsumoto I, Iwanami K, Inoue A, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Essential role of immunoglobulin G in the development of arthritis immunized by glucose -6- phosphate isomerase, Annual European Congress of RHEUMATOLOGY EULAR 2007 (Barcelona)、6 月 15 日、2007
  18. Suzuki T, Tsutsumi A, Matsui M, Kouno M, Sugihara M, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Promoter region polymorphism of the tristetraprolin(TTP) gene in patients with rheumatoid arthritis Annual European Congress of RHEUMATOLOGY EULAR 2007 (Barcelona)、6 月 15 日、2007
  19. Kobayashi T, Ito S, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, Narita I, Sumida T., Gejyo F, Yoshie H.: Functional gene polymorphisms in rheumatoid arthritis and periodontitis The 93rd. Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. (Washington DC) 10 月、2007.
  20. Kohno M, Tsutsumi A, Matsui H, Sugihara M, Mamura M, Suzuki T, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Expression of the Interleukin 17 Gene in Patients with Rheumatoid Arthritis. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 8 日、2007
  21. Suzuki T, Tsutsumi A, Sugihara M, Kohno M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.: Tristetraprolin(TTP) Gene Polymorphisms in Patients with Rheumatoid Arthritis and Healthy Individuals. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 8 日、2007
  22. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Sumida T.: Analysis of T Cells Infiltrating in Kidneys of MRL/lpr Mouse by Laser-Microdissection Method. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 8 日、2007
  23. Iwanami K, Matsumoto I, Watanabe-Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Crucial Role of IL-6/IL-17 Axis in the Generation of GPI-induced Arthritis. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 8 日、2007
  24. Goto D, Yoshiga Y, Segawa S, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: The Function of CD1d Variants in Patients with Autoimmune Disease. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 9 日、2007
  25. Tanaka-Watanabe Y, Matsumto I, Iwanami K, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: B Cell Have Crucial Role as Autoantibody Producers in Arthritis Mediates by Glucose-6-phosphate Isomerase. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 9 日、2007
  26. Matsumoto I, Iwanami K, Tanaka Y, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Therapeutic Effects of Tnf $\alpha$  Antagonist, IL-6 Antagonist and Ctla-4 Ig in Glucose-6-phosphate Isomerase Induced Arthritis. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 9 日、2007
  27. Furuya T, Matsumoto I, Tsuchiya N, Hakoda M, Ichikawa N, Yago T, Nanke Y, Sumida T., Kamatani N, Kotake S.: Anti-glucose-6-phosphate Isomerase, Anti-cyclic Citrullinated Peptide Antibodies and HLA-DRB1 Genotypes in Japanese Patients with Early Rheumatoid Arthritis. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 9 日、2007
  28. Wakamatsu E, Nakamura Y, Matsumoto I, Tsuboi H, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: New Murine Model for Sjogren's Syndrome Established by M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Immunization. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11

月 9 日、2007

29. Inoue A, Matsumoto I, Iwanami K, Tanaka-Watanabe Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Exploring the Role of TIARP (TNF $\alpha$  Induced Adipose Related Protein ) in Autoimmune Arthritis Mediated Driven by Glucose-6-phosphate Isomerase. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 10 日、2007
30. Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: A Novel Role For Natural Killer T Cells As Activators And Producers Of Interleukin-17 In The Pathogenesis Of Collagen-induced Arthritis. 2007ANNUAL SCIENTIFIC MEETING on the ACR(US)11 月 10 日、2007

〔図書〕（計 2 件）

1. 住田 孝之：シェーグレン症候群とは、やさしいシェーグレン症候群の自己管理、住田孝之編、医薬ジャーナル社、10-14、2008
2. 住田 孝之：Sjögren症候群、今日の診断基準 大田健、奈良信雄 編集、南江堂、646-648、2007

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

住田 孝之 (SUMIDA TAKAYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授  
研究者番号：00183054

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし