

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive
Th17 cells
in primary Sjögren's syndrome

(シェーグレン症候群における M3 ムスカリン作動性
アセチルコリン受容体反応性 Th17 細胞の解析)

2 0 2 0

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

安部 沙織

目次

1. 略語.....	5
2. 研究背景.....	7
2.1. シェーグレン症候群（Sjögren's syndrome : SS）の臨床的特徴と課題.....	7
2.2. SS の病態と CD4 ⁺ T 細胞の役割.....	7
2.3. M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体.....	9
2.4. SS における M3R に対する自己免疫応答.....	9
3. 目的.....	11
4. 方法.....	12
4.1. 対象.....	12
4.2. M3R 合成ペプチドと HLA-DRB1 に基づく T 細胞エピトープの推定.....	12
4.3. IL-17 産生細胞検出 ELISpot.....	13
4.4. T 細胞エピトープの推定.....	14
4.5. CD4 ⁺ T 細胞と樹状細胞の共培養による M3R 反応性 Th17 細胞の検出.....	14
4.6. HLA-DR ブロッキング.....	15
4.7. M3R 反応性 Th17 細胞のサイトカイン産生能の評価.....	15
4.8. M3R 反応性 Th17 細胞の分離.....	16
4.9. M3R 反応性 Th17 細胞と口唇唾液腺浸潤 T 細胞に対する TCR シーケンス解析...16	
4.10. 抗 M3R 抗体.....	17

4.11. 統計解析.....	17
5. 結果.....	19
5.1. 患者背景.....	19
5.2. ELISpot による M3R 反応性 IL-17 産生細胞の検出.....	19
5.3. M3R AA83-95 ペプチド反応性 IL-17 産生細胞の検出.....	20
5.4. M3R 反応性 Th17 細胞の検出.....	21
5.5. M3R 反応性 Th17 細胞のサイトカイン産生能の評価.....	21
5.6. 末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞と唾液腺浸潤 T 細胞の TCR レパトワ解析.....	22
5.7. M3R 反応性 Th17 細胞と抗 M3R 抗体の関連性.....	23
5.8. M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者と陰性患者間での臨床像の比較.....	24
6. 考察.....	25
7. 結論.....	32
8. 謝辞.....	33
9. 出典.....	34
10. 参考文献.....	35
11. 図表.....	41

1. 略語

AA; amino acid

ACR/EULAR; American College of Rheumatology/ European League against Rheumatism

CDR; complementarity-determining region

DCs; dendritic cells

ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay

ELISpot; Enzyme-linked immunospot assay

ESSDAI; EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index

GWAS; genome-wide association study

HLA; human leukocyte antigen

HS; healthy subjects

IgG4-RD; IgG4-related disease

IL-17; interleukin-17

LSG; labial salivary gland

MHC; major histocompatibility complex

M3R; M3 muscarinic acetylcholine receptor

M5R; M5 muscharinic acetylcholine receptor

PBMCs; Peripheral blood mononuclear cells

PVDF; Polyvinyl-difluoride

pSS; primary Sjögren's syndrome

SS; Sjögren's syndrome

TCR; T cell receptor

Th1; T helper 1 cell

Th17; T helper 17 cell

Tfh; follicular T helper cell

2. 研究背景

2.1. シェーグレン症候群（Sjögren's syndrome : SS）の臨床的特徴と課題

シェーグレン症候群（Sjögren's syndrome : SS）は、唾液腺、涙腺の慢性炎症を特徴とする原因不明の自己免疫疾患であり [1]、国の難病に指定されている。基本的には唾液腺、涙腺の慢性リンパ球性炎症による乾燥症状が主症状となるが、一部の患者においては乾燥症状のみでなく全身性の何らかの臓器病変や検査値異常を示すことが知られている [2]。関節リウマチや全身性エリテマトーデスに合併することも知られ、他の膠原病の合併がみられない一次性 SS（primary Sjögren's syndrome : pSS）と他の膠原病に合併する二次性 SS として大別されている。本邦の患者数は約 68,000 人であり、平均年齢は 60.8 ± 15.2 歳、男性/女性の比率は 1/17.4 と女性に多い疾患である。現在の治療法としては、病因や発症機序が完全に解明されていないために、ドライアイに対しては点眼療法、涙点プラグ挿入術など、そして口腔乾燥症に対しては M3R (M3 Muscarinic acetylcholine receptor: M3R) アゴニスト、人工唾液などといったような乾燥症状に対する継続的な対症療法が主となっている。効果的な根治療法は未確立であり、疾患特異的な治療法の確立が重要課題である。

2.2 SS の病態と CD4⁺T 細胞の役割

SS では外分泌腺へのリンパ球浸潤に加えて、リウマトイド因子が 50%以上、抗核抗体が約 80%以上の症例で陽性となり、他にも抗 SS-A/Ro、SS-B/La 抗体をはじめとして抗 M3R 抗体、抗 α -フォドリン抗体など多彩な自己抗体産生が認められる [3]。免疫組織学

的には唾液腺炎の炎症初期に CD4 陽性 T 細胞の浸潤を優位に認め、病期が進展するとリンパ球浸潤の進展と共に B 細胞の割合が増加する [4] ことが知られている。また浸潤 CD4 陽性 T 細胞サブセットのうち、1 型ヘルパー T 細胞 (Th1 細胞)、濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞)、そして近年 17 型ヘルパー T 細胞 (Th17 細胞) の関与が明らかにされており [5]、一次性 SS (primary SS : pSS) 患者の唾液腺において CD4⁺ T 細胞におけるインターロイキン 17 (interleukin-17 : IL-17) の増加が報告されている [6]。末梢血中においても CD4⁺CD45RA⁻Foxp3⁻CXCR5⁺CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁺で定義された Th17 細胞の割合が、中等度以上の疾患活動性を呈する pSS 患者群で健常人と比較し有意に増加しており、末梢血中の循環 Th17 細胞と疾患活動性の関与が示唆されている [7]。ただし、依然としてこれら Th17 細胞の役割、および抗原特異性に関しては不明な点が多い。

一方、唾液腺浸潤 T 細胞の T 細胞受容体 (T cell receptors : TCR) レパトワ解析により、特定の T 細胞クローンの増加が示され、SS の病態として自己抗原特異的な T 細胞の関与が示唆されている [8]。近年のゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study : GWAS) でもヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen : HLA) を含むヒト主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex : MHC) が疾患感受性遺伝子として報告されており [9、10]、HLA により提示された自己抗原と特異的な TCR による相互作用が pSS の病態に深く関わっている可能性が示唆されている。さらに CD4 陽性 T 細胞サブセットに関連した報告としては、pSS 患者における唾液腺浸潤 Th17 細胞のシングルセル解析により抗原特異性を決定する重要な部分である相補性決定領域 (Complementarity determining region: CDR) 3 α

領域の偏りを認めることが示され [11]、抗原特異的な Th17 細胞のクローナルな増殖が生じている可能性が考えられる。ではこの様な抗原特異的 T 細胞が認識する自己抗原は何なのか？SS における自己抗原の候補は既に複数知られており、これまでに Ro/SS-A52kD タンパク、HSP10/60、 α アミラーゼが同定されている [12] が、未だ自己反応性 T 細胞の病態形成における役割については結論が得られていない。

2.3. M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体

M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3 Muscarinic acetylcholine receptor: M3R) は近年報告された SS 患者における自己抗原の候補の中の一つである [13]。ムスカリン受容体は 7 回細胞膜貫通構造を持つ G 蛋白共有型受容体であり、4 つの細胞外領域 (N 末端領域、第 1、第 2、第 3 細胞外ループ) と 7 つの膜貫通領域を有する (図 1A.)。5 種類のサブタイプ (M1R-M5R) が存在することが知られており [14]、その中でも M3R は SS の主たる標的臓器である外分泌腺に高発現し、唾液・涙液分泌に重要な役割を果たす [3]。M3R のアゴニストであるアセチルコリンが M3R に結合すると、M3R が活性化し、G タンパク、ホスホリパーゼ C、inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP3) および IP3 受容体を介して細胞内 Ca 濃度上昇を引き起こす。そして、その結果として唾液分泌が生じることが知られている (図 1B.) [3]。

2.4. SS における M3R に対する自己免疫応答

M3R に対する自己免疫応答としては、当研究室における先行研究において、SS 患者の末梢血中に M3R の 4 細胞外領域に対する抗 M3R 抗体が存在すること [15]、および M3R 反応性 IFN γ 産生 Th1 細胞の存在が報告されていること [16] から、SS 病態における M3R 抗原への自己免疫応答の関与が示唆されている。マウスモデルにおいても、M3R に対する自己免疫応答により SS 類似の唾液腺炎が発症することが確認され [17]、その病態として M3R 反応性 Th1 細胞、および Th17 細胞が唾液腺炎の発症に関与することが明らかとなった [18, 19]。

これらの当研究室における先行研究の結果から、M3R に対する自己免疫応答が SS の病態に関与すること、そして M3R 反応性 Th1 細胞、Th17 細胞が唾液腺炎の発症に関与することが示唆されるが、これまでに SS 患者において M3R 反応性 Th17 細胞の存在は未だ報告がない。

3. 目的

本研究では、pSS 患者における末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞の検出とその臨床的意義の解析を目的とした。具体的には以下 4 つの目的を明らかにするために研究を進めた。

第一に、pSS 患者において Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISpot)法を用いて末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞の検出を行い、T 細胞エピトープの同定を行うことを目的とした。第二に、検出された M3R 反応性 Th17 細胞の IFN- γ 、IL-17 産生能の解析を目的とした。

第三に、末梢血中で同定された M3R 反応性 Th17 細胞と唾液腺浸潤 T 細胞における重複 T 細胞クローンの存在を明らかにすることを目的とした。最後に、M3R 反応性 Th17 細胞陽性患者と陰性患者における臨床的意義の解析を目的とした。

4. 方法

4.1. 対象

本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、実施した。また「膠原病類縁疾患患者検体を用いた新規バイオマーカー及び治療標的分子探索に関する研究」として筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得た（H24-164）。全ての対象者から、本研究へ参加する前にインフォームド・コンセントを得た。本研究では 10 例の pSS 患者、10 例の健常者、疾患群コントロールとして 5 例の IgG4 関連疾患患者(IgG4-related disease : IgG4-RD)を対象とした。pSS 患者は旧厚生省 SS 改訂診断基準（1999 年）[20]、およびアメリカリウマチ学会/欧州リウマチ学会（ACR/EULAR）による 2016 年分類基準 [21] を満たし、他の膠原病合併がなく、免疫抑制治療の介入がない者を対象とした。IgG4-RD 患者は厚生労働省 IgG4 関連疾患包括診断基準 2011 年 [22] を満たす者を対象とした。健常者は膠原病やリウマチ性疾患を含む慢性疾患や、悪性腫瘍の既往がなく、薬物治療を受けていない者を健常者と定義した。全ての対象者は HLA 研究所（京都、日本）にて HLA-DRB1 を検査し、pSS 患者については HLA-DQA1、 DQB1 も検査した。

4.2. M3R 合成ペプチドと HLA-DRB1 に基づく T 細胞エピトープの推定

M3R ペプチド全長（計 590 アミノ酸）に対して、12-20 アミノ酸配列で合成されるペプチドがそれぞれに 4-5 アミノ酸重複する様、45 種類に分けて M3R ペプチドを合成した（表 1）。GWAS により疾患感受性遺伝子の一つとして HLA-DRB1 が報告されていることから

[9、10]、M3R ペプチド全長のうち、対象者の HLA-DRB1 タイプに基づきそれぞれ HLA 結合能が高いと推定されるペプチドを選択した。HLA-DRB1 タイプに基づいた HLA 結合能の推定、および T 細胞エピトープの推定は Immune Epitope Database (<http://www.iedb.org/>) で行った。データベース上に選択された T 細胞エピトープの候補ペプチドは 15 アミノ酸から構成され、これらを IC₅₀ 値に基づきランク付けし、上位 10 位のペプチドが全て含まれる様、各対象者それぞれに刺激に用いる M3R ペプチドを選定した (表 2-4)。

4.3. IL-17 産生細胞検出 ELISpot

pSS 患者 ($n=10$)、IgG4-RD 患者 ($n=5$)、健常人 ($n=10$) より採取した末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cell : PBMC) は、複数の検体をまとめて検査するために一時凍結保存され、融解後に使用した。PBMC を融解後、IL-17 特異的モノクローナル抗体が固相表面に固定化された PVDF (Polyvinyl-difluoride) 膜の 96 ウェルマイクロタイタープレート (Merck Millipore) に、10 %ウシ胎児血清と 1 %ペニシリン含有 RPMI 培地で懸濁した PBMC を加え、それぞれの対象者毎に選定された M3R ペプチド上位 10 位を含有する混合ペプチド (各 10 mg/ml) を添加した。37 °Cで 40 時間培養後細胞を除去し、検出用のサイトカイン抗体を添加することにより、サイトカイン産生細胞をスポットとして可視化し、スポット数による抗原刺激に反応したサイトカイン産生の評価を行った。1 %PHA 刺激を陽性コントロール、無刺激を陰性コントロール、M5 ムスカリンアセチルコリン受容体 (M5R) の第 3 細胞外ループ刺激をコントロール刺激として同様に評価した。スポット数のカウン

トは ImmunoSpot S6 ENTRY (Shaker Heights, OH, USA) を使用し自動計測した (図 2)。

4.4. T 細胞エピトープの推定

M3R 混合ペプチドの刺激に反応し IL-17 産生細胞を認めた対象者に関して、HLA-DRB1 タイプに基づき選定された上位 10 ペプチドの混合ペプチドを 1 種類毎に分けて刺激を行い、どのペプチドに反応して IL-17 を産生しているかを調べた。合成ペプチドは 12-20 アミノ酸で構成され、反応を示したペプチド内に T 細胞エピトープが含まれると想定された。前述した ELISpot 法と同様に、PBMC を 40 時間 M3R ペプチドと共に刺激培養し、IL-17 産生細胞を評価した。

4.5. CD4⁺T 細胞と樹状細胞の共培養による M3R 反応性 Th17 細胞の検出

方法 4.3.、4.4.で検出された M3R 反応性 IL-17 産生細胞が、Th17 細胞(CD4⁺IL-17⁺細胞)であるかどうかを確かめるため、単離した CD4⁺ T 細胞と単球から誘導した樹状細胞を共培養し、方法 3.4.で同定した T 細胞エピトープを含むと想定される M3R ペプチドで刺激培養後に IL-17 産生細胞検出 ELISpot を施行した。培養に用いた樹状細胞は対象者自己末梢血中の CD14⁺ 単球細胞より誘導した。誘導法は次の通りである。まず PBMC 中より CD14⁺ 細胞を CD14 陽性細胞単離キット (Miltenyi Biotec)にて単離した。次に単離した CD14⁺ 細胞を GM-CSF (100 ng/ml)、IL-4 (10 ng/ml)含有培地で培養し、培養開始後 5 日目に LPS (3 µg/ml)、IL-4 (20 ng/ml)、TNF-α (10 ng/ml)を添加し、計 8 日間培養後に回収をした。回収

後、樹状細胞への分化は HLA-DR (Biolegend)、CD80 (Biolegend)、CD11c (Biolegend)の発現に関して、フローサイトメトリーを用いて確認した (図 3)。誘導分化した樹状細胞は、CD4⁺ T 細胞単離キット (Miltenyi Biotec)を用いて PBMC より単離した CD4⁺ T 細胞と共に、5:1 の比率で共培養に用いた。単離した CD4⁺ T 細胞は培養開始前に 6 時間以上 37 °C の 5 %CO₂ 条件下のインキュベータで安定化させ、その後樹状細胞と CD4⁺ T 細胞の共培養を開始し、前述した T 細胞エピトープを含むと想定される M3R ペプチドで刺激 40 時間後、前述と同様に IL-17 産生細胞を評価した。

4.6. HLA DR ブロッッキング

同定された M3R 反応性 Th17 細胞における抗原認識の HLA-DR 依存性を評価するため、方法 4.3.で陽性であった患者のうち 3 例を対象に、抗 HLA-DR 抗体を用いて M3R 刺激後の IL-17 産生を評価した。抗 HLA-DR 抗体 (Biolegend)、またはアイソタイプコントロール抗体 (Biolegend)は、共に 10 µg/ml の濃度で誘導分化した樹状細胞に M3R ペプチド刺激 30 分前に添加した。樹状細胞への抗体添加 30 分後、前述と同様に単離した CD4⁺ T 細胞、および M3R ペプチドと共に共培養を開始し、40 時間後に IL-17 産生細胞を評価した。

4.7. M3R 反応性 Th17 細胞のサイトカイン産生能の評価

検出された M3R 反応性 Th17 細胞の IFN- γ 、IL-17 産生能を評価するため、フローサイトメトリーを用いたサイトカイン産生能の評価を行った。PBMC を rhIL-2 (20 IU/ml)および

rhIL-7(10 ng/ml)含有培地で、10 µg/ml の M3R 反応性 Th17 細胞の T 細胞エピトープと推定されるペプチド(M3R AA83-95)、もしくはコントロールペプチド (HLA-DRB1 から推定した HLA 結合能が高いと推定される M3R 反応性 Th17 細胞の T 細胞エピトープ以外の M3R ペプチド) と共に 8 日間培養を行った後に評価した。培養 8 日目の評価 12 時間前に PBMC を前述した各 M3R ペプチドを用いて再刺激し、サイトカイン産生細胞検出キット (Miltenyi Biotec) を用いて CD4⁺ T 細胞からの IFN-γ、IL-17 産生の評価を行った (図 4)。キットに含まれる IFN-γ、IL-17 に対する抗体、および抗 CD4 抗体 (Biolegend)、7-AAD (Biolegend) で染色し、FACS Verse (Becton Dickinson) を用いて解析を行った。ゲーティング方法は図 5 の通りに行った。

4.8. M3R 反応性 Th17 細胞の分離

前述した方法と同様に、M3R ペプチドと共に 8 日間培養後、サイトカイン産生細胞検出キット (Miltenyi Biotec) を用いて CD4⁺ IL-17⁺細胞をフローサイトメトリーにて検出した。この方法により、SH800S セルソーター (SONY) を用いて M3R 反応性 Th17 細胞のソーティングを行った。

4.9. M3R 反応性 Th17 細胞と口唇唾液腺浸潤 T 細胞に対する TCR シーケンス解析

末梢血中の M3R 反応性 Th17 細胞は方法 3.8.を用いて分離、TRIzol を用いて RNA 抽出を行った。口唇唾液腺のサンプルは、シェーグレン症候群の診断時に施行された口唇唾液腺

生検の残余分を RNA later (Invitrogen) で-30℃に保存し、TRIzol を用いて RNA 抽出を行った。イムノジェネティクス社において、TCR シーケンス、各サンプル間での重複レパトワ解析を行った。方法としては、細胞試料から RNA を抽出し、相補的 DNA を合成後、TCR 遺伝子を PCR 増幅して定量し、次世代シーケンサーを用いて TCR レパトワ解析を行なっている。PCR 増幅法では Adaptor-ligation PCR 法が用いられ、5'末端にアダプターを結合し、アダプタープライマー と 3'側の定常領域に設定したプライマーを用いて PCR 法を利用した。同一の TCR レパトワの定義は、Variable (V) 領域、Joining (J) 領域、CDR3 の配列が一致すること、とした。

4.10. 抗 M3R 抗体

M3R の各細胞外領域に対する抗 M3R 抗体は、ELISA 法を用いて当研究室の既報 [15] の方法を参考に測定した。まず 96 well plate を用いて抗原ペプチド (M3R 細胞外 4 領域の合成ペプチド、およびコントロールペプチドとして SGSG 配列を反復したペプチド)を plate に固相化し、血清を添加後、抗ヒト IgG 抗体 (Alkaline Phosphatase ラベル)を加えたのち、基質 (p-ニトロフェニルリン酸タブレットとアルカリホスファターゼ)を添加して発色させた。ARVO プレートリーダー (PerkinElmer) を用いて吸光度を測定した。3 well を用いて平均値を算出し、2 回以上の実験結果で確認した。

4.11. 統計解析

検定は両側検定を用い、結果は $p < 0.05$ である時に統計学的に有意であるとした。Mann-Whitney U 検定、Kruskal-Wallis 検定は、それぞれ 2 群、あるいは 3 群以上の対応のない連続変数を比較する時に用いた。Cochran-Armitage 検定は、カテゴリーデータを比較する時に用いた。偽陽性を補正するため、Benjamini-Hochberg 法を用いて補正 p 値を算出した。欠損したデータは multiple imputation 法を用いて補正した。

5. 結果

5.1. 患者背景

本研究では 10 例の pSS 患者、10 例の健常者、5 例の IgG4-RD 患者を対象とした。平均年齢は pSS 患者で 59.8 ± 20.9 歳、健常者で 44.7 ± 11.4 歳、IgG4-RD 患者で 60.8 ± 10.0 歳と有意差を認めなかった。また HLA-DRB1 ジェノタイプにも差を認めなかった。

性別に関しては pSS 患者と健常者間で有意差は認めなかったが、女性に好発する SS と男性に好発する IgG4-RD という各疾患の発症における性差の特徴により、pSS と IgG4-RD 患者間では性差に有意差を認めた。(表 5)

5.2. ELISpot による M3R 反応性 IL-17 産生細胞の検出

末梢血中の M3R 反応性 Th17 細胞を検出するため、HLA-DRB1 に基づき選定された M3R ペプチドの混合ペプチドで PBMC を刺激培養し、IL-17 産生細胞検出 ELISpot アッセイを行った。その結果、pSS 患者 10 例中 5 例において、無刺激条件下で認めたスポット数と比較して M3R 混合ペプチド刺激後に認めたスポット数の有意な増加を認めた (pSS 患者 : 5/10 例、50%) (図 6、7A)。その一方で、健常人 10 例、および IgG4-RD 患者 5 例においては、全ての症例において同様の検討で M3R 混合ペプチド刺激後に有意なスポット数の増加を認めなかった (図 6、7B、7C)。以上より、この検討により HLA-DR に関連した M3R 反応性 IL-17 産生細胞を末梢血中に検出することができ、その検出率は pSS 患者において健常者と比較し有意に高率である ($p=0.03$) ことが明らかとなった (図 6、7)。

5.3. M3R AA83-95 ペプチド反応性 IL-17 産生細胞の検出

5.2.の結果より、M3R 反応性 IL-17 産生細胞が検出された pSS 患者において、M3R ペプチドのどの領域が IL-17 産生細胞の引き金となっているかを調べることにした。そのため結果 5.2. で用いた M3R 混合ペプチドを、12-20 アミノ酸で合成される M3R ペプチド 1 種類毎に分けて刺激を行い同様の検討を行った。その結果、対象 pSS5 例全ての患者において、M3R AA83-95 領域のペプチド刺激後に無刺激条件下のスポット数と比較して有意なスポット数の増加を認め、このことから M3R AA83-95 が末梢血中 M3R 反応性 IL-17 産生細胞の刺激となっていることが明らかになった（図 8）。また 5 例中 HLA-DRB1 09:01/15:01 を持つ 1 例（pSS8）に関しては、M3R AA83-95 に加えて AA 76-87 刺激後にも有意なスポット数の増加を認めた。M3R AA76-87 と AA83-95 は 7 アミノ酸の重複があるため、pSS8 においては M3R AA76-95 領域の M3R ペプチドが IL-17 産生細胞の刺激となっていると考えられた。M3R AA76-87 に関しては、刺激後のスポット数に有意な差を認めなかったものの、HLA-DRB1 15:01 が pSS8 と共通している pSS3 に関しても刺激後のスポット数に増加傾向を認めていた。以上の結果から、末梢血中で検出された M3R 反応性 IL-17 産生細胞は主として M3R AA83-95 領域のペプチドに反応して IL-17 を産生することが明らかとなり、AA83-95 と結合能が高いと推定された HLA-DRB1 15:01 を含む複数の HLA-DRB1 ジェノタイプが関与することがわかった。

5.4. M3R 反応性 Th17 細胞の検出

末梢血中の IL-17 産生は、CD8⁺ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、自然リンパ球などを含め、Th17 細胞 (CD4⁺ IL-17⁺ 細胞) 以外にも様々な種類の細胞に由来することが知られている [23]。そのためこれまでに検出された末梢血中 M3R 反応性 IL-17 産生細胞が Th17 細胞であるのかどうかを確認するため、単離した CD4⁺ T 細胞と単球より誘導した自己由来樹状細胞を抗原提示細胞として、M3R AA83-95 ペプチドとの共培養後、IL-17 産生細胞検出 ELISpot 法により Th17 細胞の存在を評価した。M3R 反応性 IL-17 産生細胞陽性 pSS 患者 5 例中 3 例で検討を行った。その結果、検討された pSS3 例全ての患者において M3R ペプチド刺激後は無刺激と比較して有意なスポット数の増加を認め、M3R 反応性 Th17 細胞の存在が示された (図 9A、B)。次にこれらの M3R 反応性 Th17 細胞における HLA-DR 依存性を確認するため、同 pSS 患者 3 例において HLA-DR ブロッキング後に M3R 反応性 Th17 細胞のサイトカイン産生評価を同様に行った。すると、抗 HLA-DR 抗体存在下において、アイソタイプ抗体条件と比較して有意なスポット数の減少を認めた (図 10A、B)。これらの結果により、末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞は、少なくとも一部で HLA-DR に依存した M3R ペプチド認識により、サイトカイン産生が誘導されていることが示された。

5.5. M3R 反応性 Th17 細胞のサイトカイン産生能の評価

これまでに pSS における M3R 反応性 IFN- γ 産生 Th1 細胞の存在が報告されており [16]、今回検出された M3R 反応性 Th17 細胞の T 細胞エピトープと推定される M3R ペプチド刺

激による IFN- γ 産生能を明らかにするため、M3R AA83-95 反応性 Th17 細胞の IL-17 産生能、および IFN- γ 産生能を共に評価した。M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者 5 例中 3 例 (pSS1、3、5) で検討を行った。PBMC を M3R AA83-95 ペプチドと共に 8 日間培養後、サイトカイン産生細胞検出キット (Miltenyi Biotec) を使用してサイトカイン産生能を評価した。その結果、ELISpot アッセイの結果から推測された通り、M3R AA83-95 ペプチドの存在により無刺激下条件と比較し IL-17 産生 CD4⁺ T 細胞の有意な増加を認めた (図 11A、B)。さらに増加を認めたのは IL-17 単独陽性細胞のみでなく、IL-17 と IFN- γ 両者を産生する CD4⁺ T 細胞も M3R AA83-95 ペプチドにより有意な増加を認め、この現象は M3R コントロールペプチド刺激下では認められなかった。一方で Th1 細胞と考えられる IFN- γ 単独陽性細胞は M3R AA83-95 ペプチド刺激後に無刺激と比較し有意な増加を認めたが、その増加は M3R コントロールペプチド刺激後にも同様に認められる結果であった。以上の結果より、今回 ELISpot 法により同定された M3R 反応性 Th17 細胞には、M3R AA83-95 ペプチド刺激により IL-17 のみを産生する細胞、および IL-17 と IFN- γ 両者を産生する細胞が混在するということが明らかになった。

5.6. 末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞と唾液腺浸潤 T 細胞の TCR レパトワ解析

M3R は唾液腺に発現する受容体であるという背景から、今回末梢血中で検出された M3R 反応性 Th17 細胞と同一クローンの T 細胞が炎症局所である口唇唾液腺に存在するのかわかを調べた。同一クローンの存在は、次世代シーケンサーを用いた TCR シーケンスによ

る TCR レパトワ解析を行い、重複クローンの有無を調べた。なお T 細胞クローンは、V(D)J 遺伝子再構成と CDR3 配列が一致することとし、末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞と唾液腺局所に浸潤した T 細胞の間で重複した同一 T 細胞クローンの存在を解析した。解析は末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS5 例中 1 例 (pSS9) で行った。その結果、末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞 (図 12A) と重複する同一の T 細胞クローンは、唾液腺浸潤 T 細胞で検出された T 細胞クローンのうち約 10%程度存在することが明らかになった (図 12B、表 6)。さらにそれぞれの部位における T 細胞クローンの頻度の解析により、M3R 反応性 Th17 細胞で優位な T 細胞クローンは唾液腺で優位な T 細胞クローンと一致しないということが示され、それぞれの部位における T 細胞クローンの頻度が一致しないことが明らかとなった (図 12C)。これらの結果より、末梢血中で検出された M3R 反応性 Th17 細胞と同一 T 細胞クローンが唾液腺に存在すること、ただし優位な T 細胞クローンはそれぞれの部位において異なること、が示された。

5.7. M3R 反応性 Th17 細胞と抗 M3R 抗体の関連性

自己反応性 Th17 細胞が唾液腺の B 細胞浸潤に関与するという既報 [17] に基づき、M3R 反応性 Th17 細胞の存在と M3R 反応性 B 細胞応答との関連性を調べるため血清中の抗 M3R 抗体を測定した。その結果、pSS 患者 ($n=10$)、IgG4-RD 患者 ($n=5$)、そして健常者 ($n=10$) の間で、M3R 各細胞外領域に対する抗 M3R 抗体の陽性率に有意な差は認められなかった (図 13)。ただし M3R 反応性 Th17 細胞陽性患者 ($n=5$) と陰性患者 ($n=5$) を比較すると、

M3R 第 2 細胞外領域、第 3 細胞外領域の 2 領域に対する抗体価が M3R 反応性 Th17 細胞陽性患者において有意に高いことが明らかになった (図 14)。

5.8. M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者と陰性患者間での臨床像の比較

M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者 ($n=5$) と陰性 pSS 患者 ($n=5$) の間で臨床パラメーターの比較を行った (表 7)。サンプル数の小ささから補正 p 値を用いた検討では有意な差は認めなかったものの、興味深いことに疾患活動性を評価する ESSDAI (EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index: ESSDAI) が M3R 反応性 Th17 細胞陽性患者で陰性患者と比較し高い傾向にあった。年齢、口唇唾液腺生検病理組織像、Schirmer テスト、耳下腺造影検査、Saxon テスト、ESSDAI の各評価項目、そして抗 M3R 抗体以外の免疫学的評価項目に関しては 2 群間で有意な差を認めなかった。また HLA-DR ジェノタイプに関しても有意な差は認めなかったが、陽性患者 5 例中 3 例で HLA-DRB1 15:01 を保有しており、HLA-DQ ジェノタイプに関しては 01:02 保有率が陽性患者群において有意に高いことがわかった (表 8)。

6. 考察

これまでに pSS の病態における Th17 細胞の関与に関しては複数の報告があるが、抗原特異的 Th17 細胞の関与に関する報告は未だない。そこで今回、末梢血中で M3R 反応性 Th17 細胞を同定し、その同一 T 細胞クローンが唾液腺浸潤 T 細胞に存在していることを初めて明らかにした。また M3R 反応性 Th17 細胞の IFN- γ 産生能も明らかとし、その存在が pSS における疾患活動性、および抗 M3R 抗体と関与する可能性を示した (図 15)。本研究により、pSS と M3R 反応性 Th17 細胞に関して以下に述べる 3 つの知見を得ることができた。

第一に、末梢血中の M3R 反応性 Th17 細胞の存在について、今回の報告では 10 例中 5 例と 50% の pSS 患者に認めることを明らかにした。この頻度は M3R 反応性 Th1 細胞の頻度が 9 例の SS 患者中 4 例 (44.4%) であるという既報と類似していた [16]。M3R 反応性 Th1 細胞に関する報告では、M3R AA213-237 反応性 IFN- γ 産生細胞の存在と、その陽性患者において HLA-DRB1 09:01 保有率が最も高かったということが報告されている。一方で、今回同定された M3R 反応性 Th17 細胞は M3R AA83-95 に反応し、HLA-DRB1 15:01 保有率が最も高いという結果であった。この HLA-DRB1 15:01 は興味深い報告のあるアレルの一つであり、抗糸球体基底膜抗体型腎炎 (Goodpasture 症候群) との関連性 [24] や、多発性硬化症 [25] との関連性が報告されている。HLA-DRB1 15:01 のペプチド収容溝に結合するアンカーペプチドに関しても報告があり、P1 ポケットには疎水性で分岐鎖アミノ酸であるロイシン、バリン、イソロイシンなどを要し、P7 にはさらに疎水性のアミノ酸であるメ

チオニン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニンなどを要することが知られている [26]。

今回同定された M3R 反応性 Th17 細胞の T 細胞エピトープと推定される M3R ペプチド AA83-95 もバリン、イソロイシン、ロイシンといった疎水性のアミノ酸を複数有し、AA81 から始まるアミノ酸配列 (VTIIGNILVIVSFKV) のうち、AA81 の (V) が P1 に該当すると想定すると、AA87 の (I) が P7 に該当する様に想定される。このことから、AA83-95 が主な T 細胞エピトープと同定されたが、pSS8 において M3R AA76-85 においても反応を示したことにに関して、部分的なアンカーペプチドの合致を認めることによる可能性が示唆された。

この様な特定のペプチドへの反応性に HLA-DRB1 の関与が示唆される一方で、pSS における HLA クラス II 単独のアレルが病態に直接寄与する可能性は低いとされており、DR に加えて DQ ジェノタイプも SS における遺伝的背景に関わっていることが報告されている [27]。HLA-DQ に関しては、今回 M3R 反応性 Th17 細胞と HLA-DQA1 01:02 の関係性が示され、さらには DRB1 15:01、DQA1 01:02、DQB1 06:02 ハプロタイプが M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者 5 例中 3 例に共通していた。このハプロタイプに関しては SS において Ro 抗原単独に反応する患者群 [28] や、重症筋無力症におけるアセチルコリン受容体 α 鎖の特定部分のペプチドに反応する患者群 [29] との関連が報告されており、特異的なペプチドへの反応性に関与することが示唆されることから、M3R AA83-95 に対する特異的な反応性とも関与がある可能性が推察される。このような特異的自己抗原への反応性と HLA の関連性に関しては、今後もよりサンプルサイズの大きな対象で検討していく必要がある

と考える。

第二に、M3R 反応性 Th17 細胞と臨床像の関連に関して明らかにした。M3R 反応性 Th17 細胞陽性患者は、疾患活動性指標である ESSDAI スコアが高い傾向を認めた。一方で腺症状と関連する指標となる口唇唾液腺病理組織像の Greenspan grade や唾液腺造影検査の stage、そして Schirmer テスト、Saxon テストといった分泌能の指標に関しては関連性が認められなかった。これまでに M3R を標的とした自己免疫応答が腺症状を引き起こすことはマウスモデルを用いて明らかにされていることから [17]、今回の検討に対する結果は予想と反するものであった。しかしこの結果と合致する報告も複数あり [7、30]、末梢血中の Th17 細胞が腺症状のみでなく疾患活動性と関連することはこれまでも示唆されていた。これらの報告も踏まえ今回の結果から考察される SS 病態においては、自己抗原特異的な Th17 細胞は局在により病態への異なる影響があることが想定される。炎症局所に局在する Th17 細胞は、腺症状、つまり発症早期の局所における炎症と関連することが示唆されているが [6、31]、末梢血中の M3R 反応性 Th17 細胞を含む抗原特異的 Th17 細胞は腺外臓器病変と関連する可能性がある。今回報告した TCR レパトワの結果でも、口唇唾液腺局所と末梢血中では優位な T 細胞クローンの頻度が異なっており、抗原特異的 Th17 細胞の局在における機能や増殖能の違いを疑わせる。これらの可能性を証明し、実際に SS の病態において自己抗原特異的な Th17 細胞がどのような役割を担うかについては、今後 M3R 反応性 Th17 細胞に関する機能解析を進めていく必要がある。

第三に、M3R 反応性 Th17 細胞の存在と第 2・第 3 細胞外領域に対する抗 M3R 抗体価の

関連性を示した。抗 M3R 抗体の陽性率に関しては有意な関連性は認められなかったが、M3R 反応性 Th17 細胞陰性 pSS 患者 5 例においては 1 例も抗 M3R 抗体陽性患者はおらず、M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者 5 例においては 60% (3/5 例) で陽性であったことから、サンプルサイズが小さいために、有意な差が検出できなかった可能性も考えられる。これまでに Th17 細胞は胚中心の形成や B 細胞活性化に関与することが報告されており [32]、それは SS のマウスモデルにおいても Th17 細胞の移入によって抗体産生の増強が認められたという *in vivo* の結果 [31] から確認されている。さらに、類似した Th17 細胞による B 細胞活性化に関する報告は、M3R に対する自己免疫応答が誘導する SS 病態類似マウスモデル (M3R 誘導性 SS マウスモデル) においても認められている [19]。これらの既報による Th17 細胞の役割は、今回我々の結果を説明する根拠となり、抗原特異的な Th17 細胞が抗原特異的 B 細胞応答を活性化する可能性が示唆されている。加えて M3R の細胞外領域は大きく 4 領域に分けられ、その中でも第 2 細胞外ループに対する抗体が最も陽性率が高かった。この第 2 細胞外領域は、アゴニストが M3R へ結合した際の活性化に重要な役割を担うことが報告されており [33]、この領域に対する抗体は機能性の抗体であることが明らかになっている [15]。これらを考慮すると、M3R 反応性 Th17 細胞は、M3R 反応性 B 細胞応答活性化に関与し、抗 M3R 抗体、特に機能性の抗体である M3R 第 2 細胞外領域に対する抗体の産生に関与することで、SS の病態形成に関与している可能性が想定された。

最後に、M3R 反応性 Th17 細胞による IFN- γ 産生能を明らかにした。SS 病態においては IFN- γ 産生異常を背景に認め [34]、これまでに M3R 反応性 IFN- γ 産生 Th1 細胞の存在が報

告されている [16]。また近年 Th17 細胞は、その可塑性から IL-17 産生のみでなく IFN- γ も産生することが報告されている [35]。今回検討された *in vitro* の系における M3RAA 83-95 ペプチド特異的な反応では、IL-17 産生のみでなく、IL-17 と IFN- γ を共に産生する IFN- γ 産生 Th17 細胞も有意な増加を認め、それは IFN- γ 単独産生細胞には認められない結果であった。IFN- γ 単独産生細胞は、Th17 細胞と違って可塑性のない特徴を持つ Th1 細胞であると考えられ [35]、それゆえ今回検出された IL-17 と IFN- γ を共に産生する細胞は IFN- γ 産生 Th17 細胞由来であると予測される。この事からは、M3RAA 83-95 領域のペプチドは、IFN- γ 産生 Th17 細胞も含めた Th17 細胞を特異的に誘導するペプチドと考えられ、Th1 細胞が複数のペプチドに反応する結果とは異なることが明らかにされた。IFN- γ 産生 Th17 細胞に関しては、近年炎症性腸疾患や、多発性硬化症、関節リウマチといった自己免疫疾患に関与するといった報告が複数あり [36、37、38]、その機能的特徴の一つとして、B 細胞活性化に関与するといった報告がある [39]。SS では、IFN- γ 産生 Th17 細胞が口唇唾液腺に増加していることが SS マウスモデル [40]、およびヒト [41] でも知られている。これらの報告からも、今回検出された M3R 反応性 IFN- γ 産生 Th17 細胞を含む Th17 細胞が SS の病態に関与していることが示唆されるが、具体的にどのような役割を担うかに関しては引き続き詳細な解析が今後必要である。

以上より、特定の HLA class II ハプロタイプと関連した M3R の特定領域に反応する Th17 細胞の存在が明らかとなり、その臨床的意義に関して考察した。そして今回得られた知見に対する将来的な臨床応用の可能性として 2 点が挙げられると考える。1 点目は、診断マーカ

ーとして **M3R** 反応性 **Th17** 細胞の存在を確認することであり、特に今回示唆されている腺外病変合併との関連性が今後より明確化される際には、腺外病変発症予測因子としての臨床応用ができる可能性を挙げる。腺外病変は **pSS** 患者の約 **25%**で認められ [2]、腺病変と比較し患者の **QOL** や身体機能スコア、そして死亡リスクに関連することが多い。しかし腺外病変の発症を明確に予測できる診断マーカーは未だ解明されておらず、その候補として **M3R** 反応性 **Th17** 細胞の存在が検討される可能性がある。2 点目は、**M3R** 反応性 **Th17** 細胞を有する患者群において、それが治療標的となり得る可能性を挙げる。今回 **M3R** 反応性 **Th17** 細胞の存在と疾患活動性、および **M3R** 反応性 **B** 細胞活性化との関連性が示唆されたことから、**M3R** 反応性 **Th17** 細胞を治療標的とすることで疾患活動性や **SS** で認められる **B** 細胞活性化病態への改善へ繋がる可能性があるかもしれない。既に当研究室の先行研究で、抗原特異的な治療戦略として **M3R** のアナログペプチド (**Altered peptide ligand; APL** : 抗原ペプチド上のアミノ酸の一部を、**MHC** クラス II 分子には結合するが、**TCR** には不完全にしか結合しないように置換した部分アゴニスト) を用いて **M3R** 反応性 **T** 細胞の機能を抑制する方法により、**M3R** 誘導性 **SS** マウスモデルにおける唾液腺炎が抑制されることが明らかとなっており [42]、**M3R** 反応性 **Th17** 細胞を有する患者群においては有効な治療法である可能性が示唆される。さらには、**Th17** 細胞の転写因子である **ROR γ t** のアンタゴニスト (**A213**) 投与においても **M3R** 誘導性 **SS** マウスモデルにおける唾液腺炎は抑制され [43]、抗原非特異的な治療戦略の有効性も期待される。このように、今回の知見も含めて今後も **SS** における抗原特異的 **T** 細胞の機能解析を進めることで、それらをターゲットとした治療開発につ

なかる可能性があると考えている。

7. 結論

pSS 患者において、末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞を検出し、その存在が抗 M3R 抗体、および疾患活動性の上昇と関連する可能性があることを明らかにした。末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞中には、IFN- γ 産生能を持ち合わせる Th17 細胞も存在することも明らかとなり、炎症局所である唾液腺浸潤 T 細胞クローンの約 10% に末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞と同一クローンが存在していた。これは、M3R 反応性 Th17 細胞の存在、およびその臨床的意義を示した初めての報告である。

8. 謝辞

本研究と論文作成にあたり、ご指導を頂きました住田孝之先生（筑波大学医学医療系膠原病リウマチアレルギー内科学名誉教授）、松本功先生（筑波大学医学医療系膠原病リウマチアレルギー内科学准教授）、坪井洋人先生（筑波大学医学医療系膠原病リウマチアレルギー内科学講師）に心から感謝申し上げます。

また、TCR シーケンス解析の実施にあたりご協力を頂きました七野成之先生（東京理科大学）、統計学的解析にご協力を頂きました野間久史先生（統計数理研究所）に深謝致します。

最後に、検体の提供にご協力を頂きました筑波大学附属病院の患者様方、ならびにスタッフの皆様心より感謝申し上げます。

9. 出典

本学位論文では JCI insight. 5(15):135982, 2020 (doi: 10.1172/jci.insight.135982.) に掲載された論文の内容を、The American Society for Clinical Investigation 社の規定にしたがって再利用している。

10. 参考文献

1. Adamson TC 3rd, Fox RI, Frisman DM, Howell FV. Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjögren's syndrome using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983;130:203-8
2. Tsuboi H, et al. Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjögren's syndrome in Japan. *Mod Rheumatol* 2013;24:464-470
3. Dawson L, Tobin A, Smith P, Gordon T. Antimuscarinic antibodies in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2005;52:2984-95
4. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 2010;34:400-7
5. Verstappen GM, Corneth OBJ, Bootsma H, Kroese FGM. Th17 cells in primary Sjögren's syndrome: Pathogenicity and plasticity. *J Autoimmun* 2018;87:16-25
6. Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18 *J Immunol* 2008;181:2898-906
7. Verstappen GM, et al. Attenuation of follicular helper T cell-dependent B cell hyperactivity by abatacept treatment in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2017;69:1850-61

8. Sumida T, Kato T, Hasunuma T, Maeda T, Nishioka K, Matsumoto I. Regulatory T cell epitope recognized by T cells from labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 1997;40:2271-3
9. Li Y, et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies a susceptibility locus for primary Sjögren's syndrome at 7q11.23. *Nat Genet* 2013;45:1361-1365
10. Fang K., Zhang K. & Wang J. Network-assisted analysis of primary Sjögren's syndrome GWAS data in Han Chinese. *Sci Rep* 2015;5:188855
11. Voigt A, Bohn K, Sukumaran S, Stewart CM, Bhattacharya I, Nguyen CQ. Unique glandular ex-vivo Th1 and Th17 receptor motifs in Sjögren's syndrome patients using single-cell analysis. *Clin Immunol* 2018;192:58-67
12. Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Hirota T, Asashima H, Matsumoto I. The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjögren's syndrome: A critical review. *J Autoimmun* 2014;51:44-50
13. Sumida T, et al. T cells and autoantigens in Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol* 2000;10:193-8
14. Bonner TI, et al. The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.* 1989;12:148-51
15. Tsuboi H, et al. New epitopes and function of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2010;162:53-61

16. Naito Y, et al. Altered peptide ligands regulate muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005;65:269-71
17. Iizuka M, et al. Pathogenic role of immune response to M3 muscarinic acetylcholine receptor in Sjögren's syndrome-like sialoadenitis. *J Autoimmun.* 2010;35:383-9
18. Iizuka M, et al. The crucial roles of IFN- γ in the development of M3 muscarinic acetylcholine receptor induced Sjögren's syndrome-like sialadenitis. *Mod Rheumatol* 2013;23:614-6.
19. Iizuka M, et al. M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive IL-17 producing T cells promotes development of Sjögren's syndrome like sialadenitis. *Mod Rheumatol* 2015;25:158-60
20. Fujibayashi T, Sugai S, Miyasaka N, Hayashi Y, Tsubota K. Revised Japanese criteria for Sjögren's syndrome (1999): Availability and validity. *Mod Rheumatol* 2004;14:425-34
21. Shiboski CH, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: a consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis* 2017;76:9-16.
22. Umehara H, et al. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod Rheumatol* 2012;22:21-30.
23. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 family of cytokines in health and disease.

Immunity 2019 50:892-906

24. Ooi JD, et al. The HLA-DRB1*15:01-restricted Goodpasture's T cell epitope induces GN. *J Am Soc Nephrol.* 2013;419-31
25. Dobson R, et al. A risk score for predicting multiple sclerosis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0164992
26. Vogt AB, et al. Ligand motifs of HLA-DR5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol*, 1994;153:1665-73
27. Lessard CJ, et al. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjögren's syndrome. *Nat Genet.* 2013;45:1284-92
28. Rischmueller M, et al. HLA class II phenotype controls diversification of the autoantibody response in primary Sjögren's syndrome (pSS). *Clin Exp Immunol.* 1998;111:365-71
29. Deitiker PR, et al. Subtle differences in HLA DQ haplotype-associated presentation of AChR alpha-chain peptides may suffice to mediate myasthenia gravis. *Autoimmunity.* 2006;39:277-88
30. Verstappen GM, et al. B cell depletion therapy normalizes circulating follicular Th cells in primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.* 2017;44:49-58.
31. Lin X, et al. Th17 cells play a critical role in the development of experimental Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:1302-10
32. Mitsdoerffer M, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers.

Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(32):14292-7

33. Scarselli M, Li B, Kim SK, Wess J. Multiple residues in the second extracellular loop are critical for M3 muscarinic acetylcholine receptor activation. *J Biol Chem* 2007;282:7385-96
34. M. Voulgarelis, et al. Pathogenic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome, *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:529-37
35. R. Stadhouders, et al. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2018;87:1-15
36. Harbour S.N, et al. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 2015;112:7061-7066
37. Paroni M, et al. Recognition of viral and self-antigens by Th1 and Th1/Th17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:797-808
38. Nistala K, et al. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2010;107:14751-6
39. Annunziato F, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204:1849-1861
40. Wanchoo A, et al. Single-cell analysis reveals sexually dimorphic repertoires of Interferon- γ and IL-17A producing T cells in salivary glands of Sjögren's syndrome mice.

Sci Rep. 2017;7:12512

41. Nanke Y, et al. Detection of IFN- γ +IL-17+cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and Mikulicz's disease: Potential role of Th17 • Th1 in pathogenesis of autoimmune diseases. *Jpn J Clin Immunol*, 2016;39:473-477
42. Asashima H, et al. The anergy induction of M3 muscarinic acetylcholine receptor-reactive CD4+ T cells suppresses experimental sialadenitis-like Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:2213-25
43. Tahara M, et al. RORgt antagonist suppresses M3 muscarinic acetylcholine receptor-induced Sjögren's syndrome like sialadenitis. *Clin Exp Immunol.* 2017;187:213-224
44. Tsuboi H, et al. Generation and functional analysis of monoclonal antibodies against the second extracellular loop of human M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Mod Rheumatol.* 2012;22:264-271

11.図表

表 1. 合成 M3R ペプチド

n	AA	M3R 部位	n	AA	M3R 部位
1	1-20	NT	24	271-290	CL3
2	16-35	NT	25	286-305	CL3
3	31-50	NT	26	301-320	CL3
4	46-65	NT	27	316-335	CL3
5	61-72	NT-TM1	28	331-350	CL3
6	68-80	TM1	29	346-365	CL3
7	76-87	TM1	30	361-380	CL3
8	83-95	TM1-CL1	31	376-395	CL3
9	91-110	TM1-CL1-TM2	32	391-410	CL3
10	106-117	TM2	33	406-425	CL3
11	113-125	TM2	34	421-440	CL3
12	121-140	TM2-EL1	35	436-455	CL3
13	136-147	EL1-TM3	36	451-470	CL3
14	143-155	TM3	37	466-485	CL3
15	151-170	TM3-CL2	38	481-500	CL3-TM6
16	166-185	CL2-TM4	39	496-507	TM6
17	181-192	CL2-TM4	40	503-515	TM6-EL3
18	188-200	TM4	41	511-530	EL3
19	196-215	TM4-EL2	42	526-545	EL3-TM7
20	211-230	EL2-TM5	43	541-560	TM7-CT
21	226-245	EL2-TM5	44	556-575	CT
22	241-260	TM5-CL3	45	571-590	CT
23	256-275	CL3			

590 アミノ酸で構成される M3R 全長を 45 種類に分けて M3R ペプチドを合成した。各ペプチドは 12-20 アミノ酸で構成されており、前後のペプチドは 4-5 アミノ酸配列重複するように合成した。各ペプチドが M3R のどの部分に該当するかが右欄に記載されている。

n: ペプチド番号、AA: M3R 全長におけるアミノ酸配列番号、NT: N 末端、TM: 膜貫通部、CL: 細胞内ループ、EL: 細胞外ループ、CT: C 末端

表 2. 健常者 10 例における HLA-DRB1 タイピングと HLA に基づいた M3R ペプチドの選定

ID	性別	年齢 (歳)	HLA- DRB1	予想エピトープ(aa) : IC50 値(nM)	刺激に用いられた M3R ペプチド (aa)
健常者					
HS1	F	32	09:01/ 09:01	34-48:189.0, 192- 207:228.0, 219-245:103.0	2)16-35, 3) 31-50 18) 188-200, 19) 196-215, 20) 211-230, 21) 226-245
HS2	F	33	04:05/ 04:05	151-167:106.0, 216-236:7.0	15)151-170, 20) 211-230, 21) 226-245
HS3	F	35	09:01/ 09:01	34-48:189.0, 192- 207:228.0, 219-245:103.0	3) 31-50, 18) 188-200, 19) 196-215, 20) 211-230 21) 226-245
HS4	F	54	04:03/ 15:02	96-112:119.9, 122-142:103.1	9) 91-110, 10) 106-117, 12) 121-140, 13) 136-147
HS5	M	40	14:06/ 16:02	163-180:31.3, 202-219:45.2	15) 151-170, 16)166-185, 19) 196-215, 20) 211-230
HS6	F	62	09:01/ 08:03	34-48:189.0, 163- 180:108.0, 192-206:189.0, 219-244:103.0	3) 31-50, 15) 151-170, 16) 166-185, 18) 188-200, 19) 196-215, 20) 211-230, 21) 226-245
HS7	F	42	04:05/ 14:06	151-167:106.0, 216-236:7.0	15) 151-170, 20) 211-230, 21) 226-245
HS8	F	38	15:01/ 15:02	83-99:14.0, 122-141:81.0	8) 83-95, 9) 91-110, 12) 121-140, 13) 136-147
HS9	F	49	09:01/ 15:02	96-112:119.9, 122-142:103.1	9) 91-110, 10) 106-117, 12) 121-140, 13) 136-147
HS10	M	62	04:03/ 15:01	81-101:14.0, 158-173:189.7, 220-234:57.0	7) 76-87, 8) 83-95, 9) 91-110, 15) 151-170, 16) 166-185, 20) 211-230, 21) 226-245

全ての対象者に HLA-DRB1 タイピングを行い、Immune Epitope Database (IEDB) を用いて M3R ペプチド全長よりそれぞれの対象者について T 細胞エピトープと推定されるペプチドの候補を選択した。各ペプチドはアミノ酸 (aa) 番号で表記され、ペプチド番号は表 1. に示した。

aa : amino acid (アミノ酸) 番号、F : 女性、M : 男性

表 3. pSS 患者 10 例における HLA-DRB1 タイピングと HLA に基づいた M3R ペプチドの選定

ID	性別	年齢 (歳)	HLA- DRB1	予想エピトープ(aa) : IC50 値(nM)	刺激に用いられた M3R ペプチド (aa)
pSS 患者					
pSS1	F	80	04:10/ 13:02	84-100:78.0, 504-524:41.0	8) 83-95, 9) 91-110, 40) 503-515, 41) 511-530
pSS2	F	63	04:03/ 15:02	96-112:119.9, 122-142: 103.1	9) 91-110, 10) 106-117, 12) 121- 140, 13) 136-147
pSS3	F	61	08:03/ 15:01	81-101:16.0, 158-180:45.3	7) 76-87, 8) 83-95, 9) 91-110, 15) 151-170, 16) 166-185
pSS4	F	30	04:05/ 08:02	151-167:106.0, 216-236:7.0	15) 151-170, 20) 211-230, 21) 226- 245
pSS5	M	65	01:01/ 15:01	81-101:14.0, 158-180:25.2	7) 76-87, 8) 83-95, 9) 91-110, 15) 151-170, 16) 166-185
pSS6	F	45	04:05/ 08:03	164-180:14.0, 216-236:7.0	15) 151-170, 16) 166-185, 20) 211- 230, 21) 226-245
pSS7	F	22	04:05/ 08:02	151-167:106.0, 216-236:7.0	15) 151-170, 20) 211-230, 21) 226- 245
pSS8	F	79	09:01/ 15:01	81-101:14.0, 158-172:249.0, 219-234:57.0	7) 76-87, 8) 83-95, 9) 91-110, 15) 151-170, 16) 166-185, 20) 211- 230, 21) 226-245
pSS9	F	73	08:02/ 13:02	36-51:706.1, 84-101:7.8, 528-546:11.8	3) 31-50, 4) 46-65, 8) 83-95, 9) 91- 110, 42) 526-545, 43) 541-560
pSS10	M	80	01:01/ 08:03	67-83:9.0, 163-181:19.0, 461-476:275.0	5) 61-72, 6) 68-80, 7) 76-87, 15) 151-170, 16) 166-185, 36) 451- 470, 37) 466-485

aa : amino acid (アミノ酸) 番号、F : 女性、M : 男性

表 4. IgG4-RD 患者 10 例における HLA-DRB1 タイピングと HLA に基づいた M3R ペプチドの選定

ID	性別	年齢 (歳)	HLA- DRB1	予想エピトープ(aa)	刺激に用いられた M3R ペプチド (aa)
IgG4-RD 患者					
IgG4- RD1	F	72	09:01/ 15:01	81-101:14.0, 158- 172:249.0, 219-234:57.0	8) 83-95, 9) 91-110, 15) 151-170, 16) 166-185, 20) 211-230, 21) 226- 245
IgG4- RD2	M	60	04:05/ 08:02	151-167:106.0, 216-236:7.0	15) 151-170, 20) 211-230, 21) 226- 245
IgG4- RD3	M	51	12:02/ 13:02	82-100:7.8, 528-546: 11.8	7) 76-87, 8) 83-95, 9) 91-110, 42) 526-545, 43) 541-560
IgG4- RD4	M	70	01:01/ 01:01	66-86:9.0, 145-159:19.0, 193-207:19.0	5) 61-72, 6) 68-80, 7) 76-87, 14) 143-155, 15) 151-170, 18) 188- 200, 19) 196-215
IgG4- RD5	M	51	04:06/ 15:01	81-101:14.8, 158-173:25.2, 220-234:37.7	15) 151-170, 16) 166-185, 19) 196- 215, 20) 211-230

aa : amino acid (アミノ酸) 番号、F : 女性、M : 男性

表 5. 健常者 ($n=10$)、pSS 患者 ($n=10$)、IgG4 関連疾患患者 ($n=5$) における患者背景の比較

	健常者 ($n=10$)	pSS ($n=10$)	IgG4-RD ($n=5$)	p 値 (健常者 vs. pSS)	p 値 (IgG4-RD vs. pSS)
年齢 (歳)	44.7±11.4	59.8±20.9	60.8±10.0	0.16	0.87
性別 (男性/女性)	3/7	2/8*	4/1*	0.70	0.04
HLA DRB1 genotype					
01:01	0	2	2	0.24	0.40
04:03	2	1	0	0.50	0.66
04:05	4	3	1	0.50	0.59
04:06	0	0	1	1.00	0.33
04:10	0	1	0	0.50	0.66
08:02	0	3	1	0.11	0.59
08:03	1	3	0	0.30	0.28
09:01	4	1	1	0.17	0.56
12:02	0	0	1	1.00	0.33
13:02	0	2	1	0.24	0.71
14:06	2	0	0	0.24	1.00
15:01	2	3	2	0.50	0.55
15:02	4	1	0	0.17	0.66
16:02	1	0	0	0.50	1.00

IgG4-RD では pSS と比較して有意に男性が多かったが、他の患者背景に有意な違いは認められなかった。

年齢： Kruskal Wallis 検定。性別、HLA typing：フィッシャーの正確確率検定。

表 6. 末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞と唾液腺局所浸潤 T 細胞の TCR β レパトワ重複解析

順位	CDR3	V	D	J	末梢血 M3R Th17 頻度 ($\times 10^{-5}\%$)	LSG 頻度 ($\times 10^{-5}\%$)
1	TGTGCCAGCAGCATGACAGGGCTAAAGAACACTGAAGCTTTCTTT	TRB V9	TRB D1	TRB J1-1	9700	33.1
2	TGTGCCATCGATAGGACAGGGGGCCACTCTCAGCCCCAGCATTTT	TRB V10-3	TRB D1	TRB J1-5	5000	7.6
3	TGTGCCAGCAAGATCGGACCGACGAACACTGAAGCTTTCTTT	TRB V7-2	ND	TRB J1-1	800	1.2
4	TGTGCCAGCAGCTTCACAGGGAACACTGAAGCTTTCTTT	TRB V7-9	TRB D1	TRB J1-1	800	31.8
5	TGTGCCAGCAGATTAGTTCCTCTCGGACAGGGCAATCAGCCCCAGCATTTT	TRB V7-8	TRB D1	TRB J1-5	700	0.6

末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞における、唾液腺浸潤 T 細胞との重複クローン上位 5 位の CDR3 遺伝子配列、V(D)J 遺伝子名とその頻度を示した表である。頻度とは、それぞれの部位において検出されたクローン中の上位 5 位クロノタイプの割合が示されている。V、D、J 遺伝子名は international ImMunoGeneTics database (IMGT) に基づき記載した。

ND : Not Determined 、 LSG : Labial Salivary Gland : 口唇唾液腺

表 7. M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者と陰性 pSS 患者の臨床的指標の比較

	陰性 pSS (n=5)	陽性 pSS (n=5)	p 値	補正 p 値
年齢 (歳)	48.2±24.0	71.6±8.4	0.14	0.59
ESSDAI	2.8±1.7	8.0±4.3	0.01*	0.14
健康状態	0	1.2±2.6	0.31	0.62
リンパ節腫脹および リンパ腫	0	2.4±3.5	0.13	0.59
腺症状	0	0	ND	ND
関節症状	0.4±0.8	0.4±0.8	1.00	1.00
皮膚症状	0	0	ND	ND
肺病変	1.0±2.2	1.0±2.2	1.00	1.00
腎病変	0	0	ND	ND
筋症状	0	0	ND	ND
末梢神経障害	0	0	ND	ND
中枢神経障害	0	0	ND	ND
血液障害	0	0.4±0.8	0.31	0.62
生物学的所見	1.4±0.8	1.6±0.5	0.81	0.94
RF (U/ml)	17.0±9.9	39.8±39.8	0.24	0.62
ANA (times)	336±531.1	720±1057.9	0.58	0.80
IgG (mg/dl)	1819±356	2685±1045	0.17	0.59
IgM (mg/dl)	114±58	102±34	0.60	0.80
IgA (mg/dl)	286±26	355±150	0.60	0.80
口唇唾液腺病理 (grade)				
1	0	0		
2	1	1		
3	2	1	0.63	0.80
4	2	3		
Schirmer テスト (mm/5 分)	4.0±8.3	4.8±8.6	0.29	0.59
耳下腺造影検査 (stage)				
0	2	0		
1	2	2		
2	0	2	0.24	0.59
3	1	0		
4	0	1		
Saxon テスト (g/2 分)	2.3±2.7*	2.4±1.9	0.79	0.92

M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者と陰性 pSS 患者の臨床像の比較では、陽性患者において ESSDAI が高い傾向を認めたが、補正 p 値では有意な差を認めなかった。ESSDAI の各項目や、腺症状に関連する検査項目においても有意な違いを認めなかった。

た。

年齢、ESSDAI、ESSDAI の各項目、RF、ANA、IgG、IgM、IgA、Schirmer テスト、Saxon テスト： $*p<0.05$ （Mann-Whitney U 検定による）。口唇唾液腺生検病理組織像 Greenspan grade、耳下腺造影検査： $*p<0.05$ （コクランアーミテージ検定による）。補正 p 値は Benjamini-Hochberg 法を用いて算出した。

* M3R 反応性 Th17 細胞陰性 pSS 患者一例に欠損値があり、多重代入法（Multiple Imputation）により対処した。

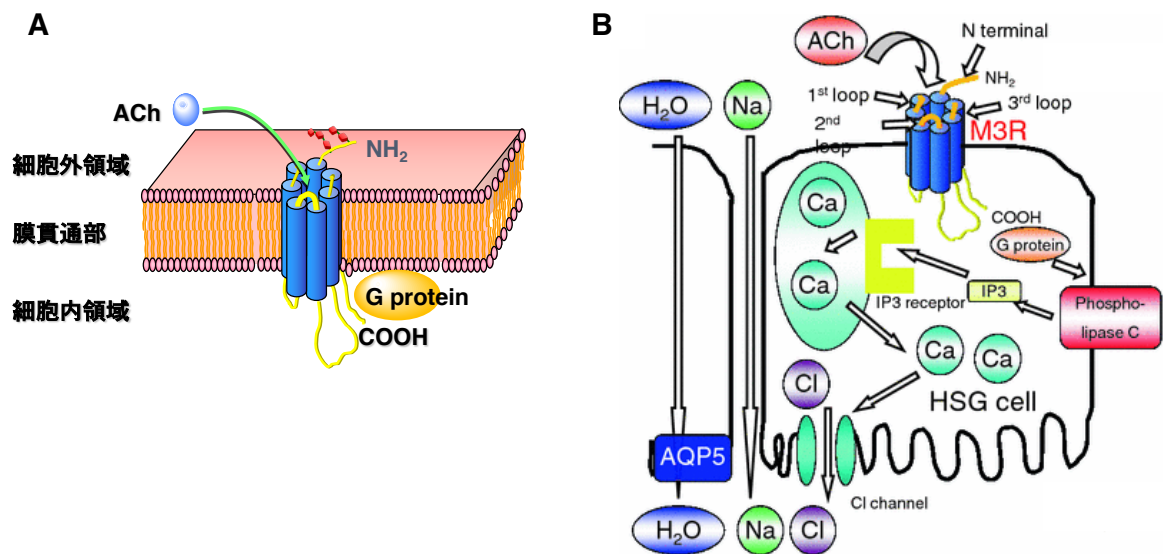
表 8. M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者と陰性 pSS 患者間における HLA ジェノタイプの比較

	Negative pSS (n=5)	Positive pSS (n=5)	p value
HLA-DRB1 genotype			
0101	1	1	1.00
0403	1	0	1.00
0405	3	0	0.21
0410	0	1	1.00
0802	2	1	1.00
0803	2	1	1.00
0901	0	1	1.00
1302	0	2	0.47
1501	0	3	0.21
1502	1	0	1.00
HLA-DQA1 genotype			
0101	1	1	1.00
0102	0	5	0.01*
0103	3	1	0.29
0301	3	3	0.68
0302	2	0	0.23
0401	1	0	1.00
HLA-DQB1 genotype			
0302	3	1	0.29
0303	0	1	1.00
0401	3	0	0.21
0402	0	1	1.00
0501	1	1	1.00
0601	3	1	0.29
0602	0	3	0.21
0604	0	1	1.00
0609	0	1	1.00

M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者において、HLA-DQA1 0102 保有率が有意に高かった。HLA-DRB1 ジェノタイプ、および DQB1 ジェノタイプには統計学的有意差は認められなかった。

* $p < 0.05$ (フィッシャーの正確検定法による)。

図 1. M3R の発現と機能

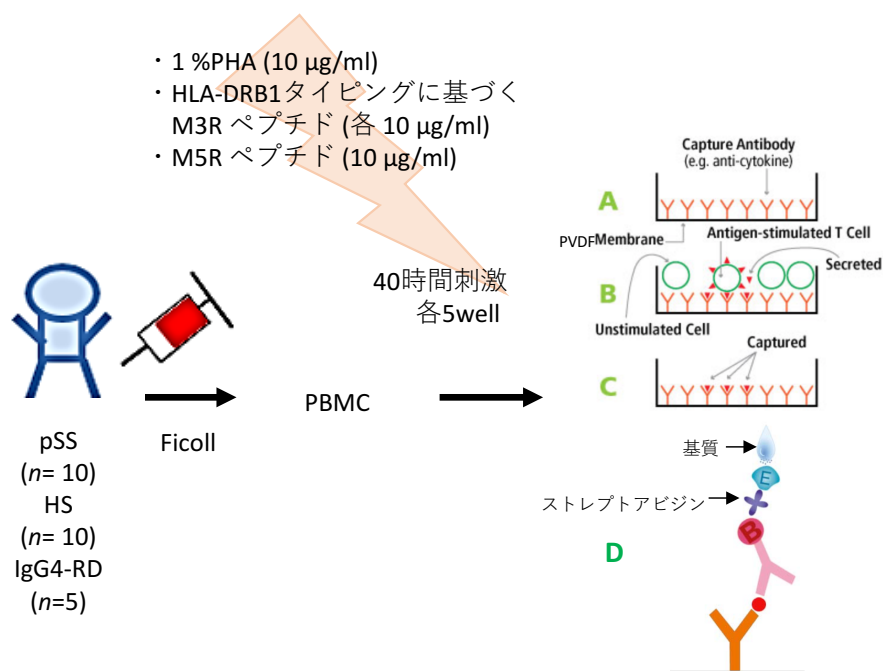


M3 ムスカリン作動性アセチルコリン 受容体 (M3R) は 7 回膜貫通ドメインをもつ分子量約 70kDa の G 蛋白共有型受容体である。

- A. M3R の構造を示す。細胞外領域に N 末端を有し、7 回膜貫通ドメインを有することから、細胞外領域は 4 領域 (N 末端、第一細胞外領域、第二細胞外領域、第三細胞外領域)、細胞内領域も 4 領域 (第一細胞内領域、第二細胞内領域、第三細胞内領域、C 末端) に大きく分けられる。[11]
- B. M3R の機能を示す。M3R は外分泌腺に高発現し、唾液・涙液分泌に重要な役割を果たす。M3R のアゴニストであるアセチルコリン が M3R に結合すると、M3R が活性化し、G タンパク、ホスホリパーゼ C、inositol1、4、5-triphosphate (IP₃) および IP₃ 受容体を介して細胞内 Ca 濃度上昇を引き起こす。そして、その結果として唾液分泌が生じる。[44]

Ach : アセチルコリン 、 HSG cell : ヒト唾液腺細胞

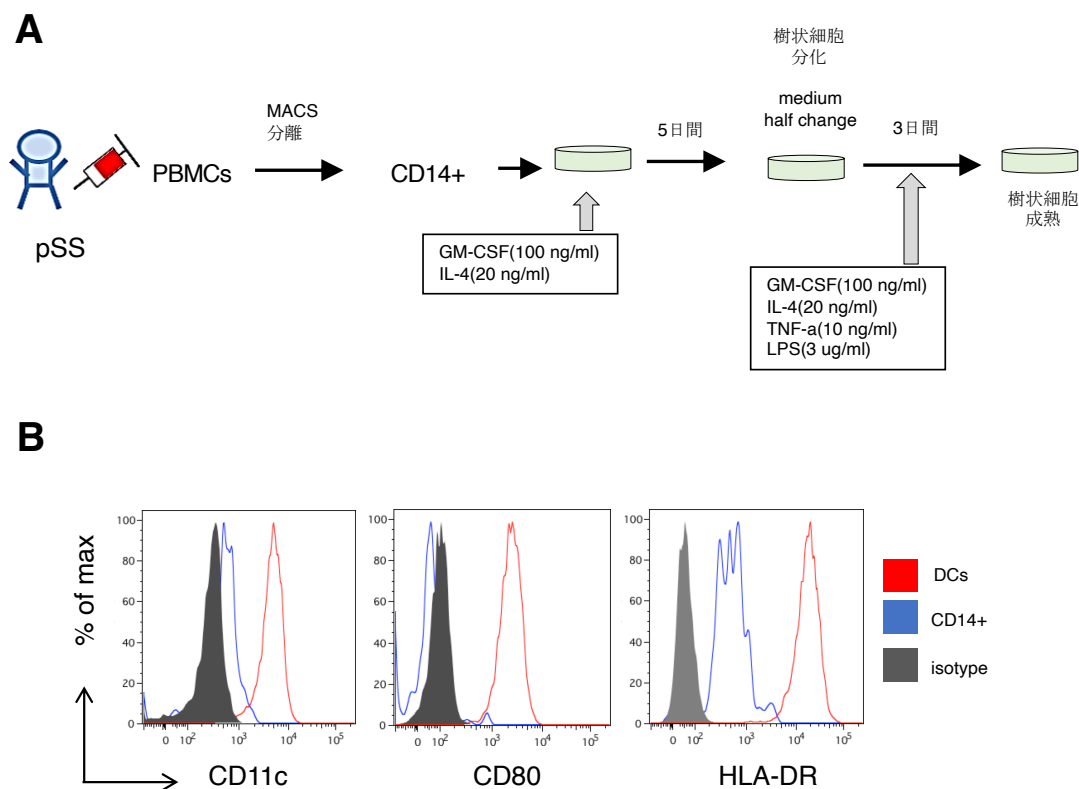
図 2. IL-17 産生細胞検出 ELISpot 法の模式図



pSS 患者 10 例、健常者 10 例、IgG4-RD 患者 5 例を対象に PBMC における M3R ペプチド刺激後 IL-17 産生細胞の検出を行なった。末梢血より PBMC を Ficoll 法により分離し、IL-17 特異抗体が固定化された well に PBMC と、HLA-DRB1 に基づき結合能が高いと推定された M3R ペプチドを添加後 40 時間刺激培養した。その後培養細胞を除去し、サイトカイン産生を酵素基質反応によりスポットとして可視化させ、スポット数の評価を行なった。PHA は陽性コントロール、M5R ペプチドはコントロールペプチド、刺激なし条件を陰性コントロールとした。

PBMC：末梢血単核細胞

図 3. 自己 CD14⁺単球からの樹状細胞分化誘導

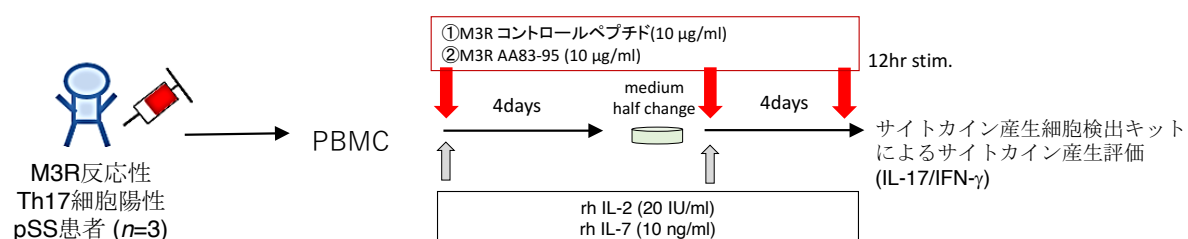


CD4⁺T 細胞と共培養に用いる抗原提示細胞として、同一患者由来の自己 CD14⁺単球より樹状細胞分化誘導を行った。

- A. 採取された PBMC より MACS を用いて CD14⁺細胞を分離し、GM-CSF、IL-4 存在下で 5 日間培養した。その後さらに TNF- α 、LPS を添加し 3 日間培養を行なった。
- B. 樹状細胞への分化は CD11c、CD80、HLA-DR の発現をフローサイトメトリーにて確認した。

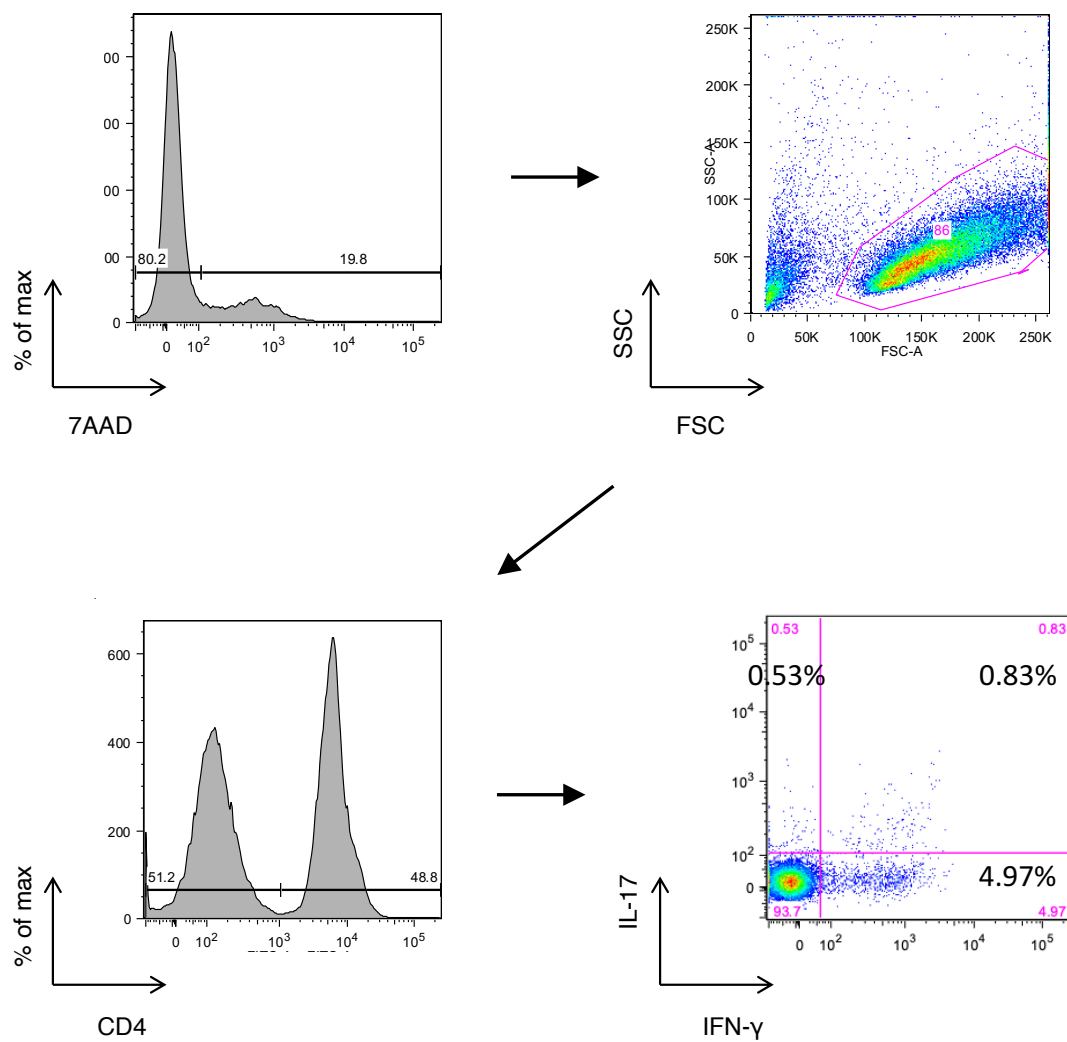
DCs : Dendritic cells

図 4. M3R 反応性 Th17 細胞のサイトカイン産生能評価



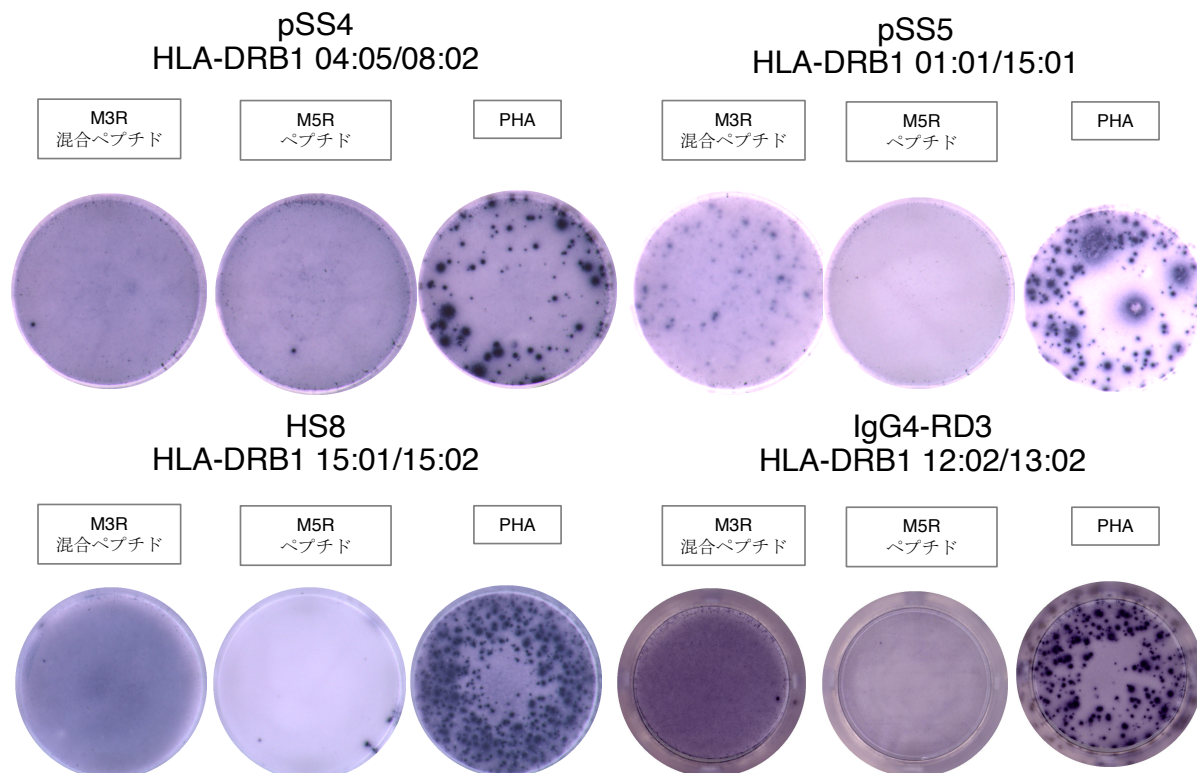
M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者 5 例中 3 例で M3R ペプチド刺激後のサイトカイン産生評価を行なった。PBMC を rh IL-2、IL-7 含有培地で M3R AA83-95 ペプチドにより 8 日間刺激培養後、評価 12 時間前に再度 M3R ペプチド刺激を行い、サイトカイン産生細胞検出キットによる IL-17/IFN- γ 産生能の評価を行なった。M3R コントロールペプチドとして、HLA-DRB1 に基づき HLA への結合能が高いと推定されたが、ELISpot 法による評価で IL-17 産生を誘導しなかったペプチドを刺激に用いた。

図 5. M3R AA83-95 刺激後 CD4+IL-17+/IFN- γ +細胞のフローサイトメトリーによる検出



ELISpot 法において M3R AA83-95 反応性 Th17 細胞が陽性であった pSS 患者 3 症例を対象に、PBMC を M3R AA83-95 ペプチドで 8 日間刺激培養後、フローサイトメトリーを用いて CD4+IL-17+/IFN- γ +細胞の検出を行なった。図 5.にフローサイトメトリーの検出に用いたゲーティング方法を示す。7AAD 死細胞除去染色を用いて死細胞をゲートアウトし、リンパ球ゲート内の CD4+細胞における IL-17 および IFN- γ 陽性細胞の比率を評価した。

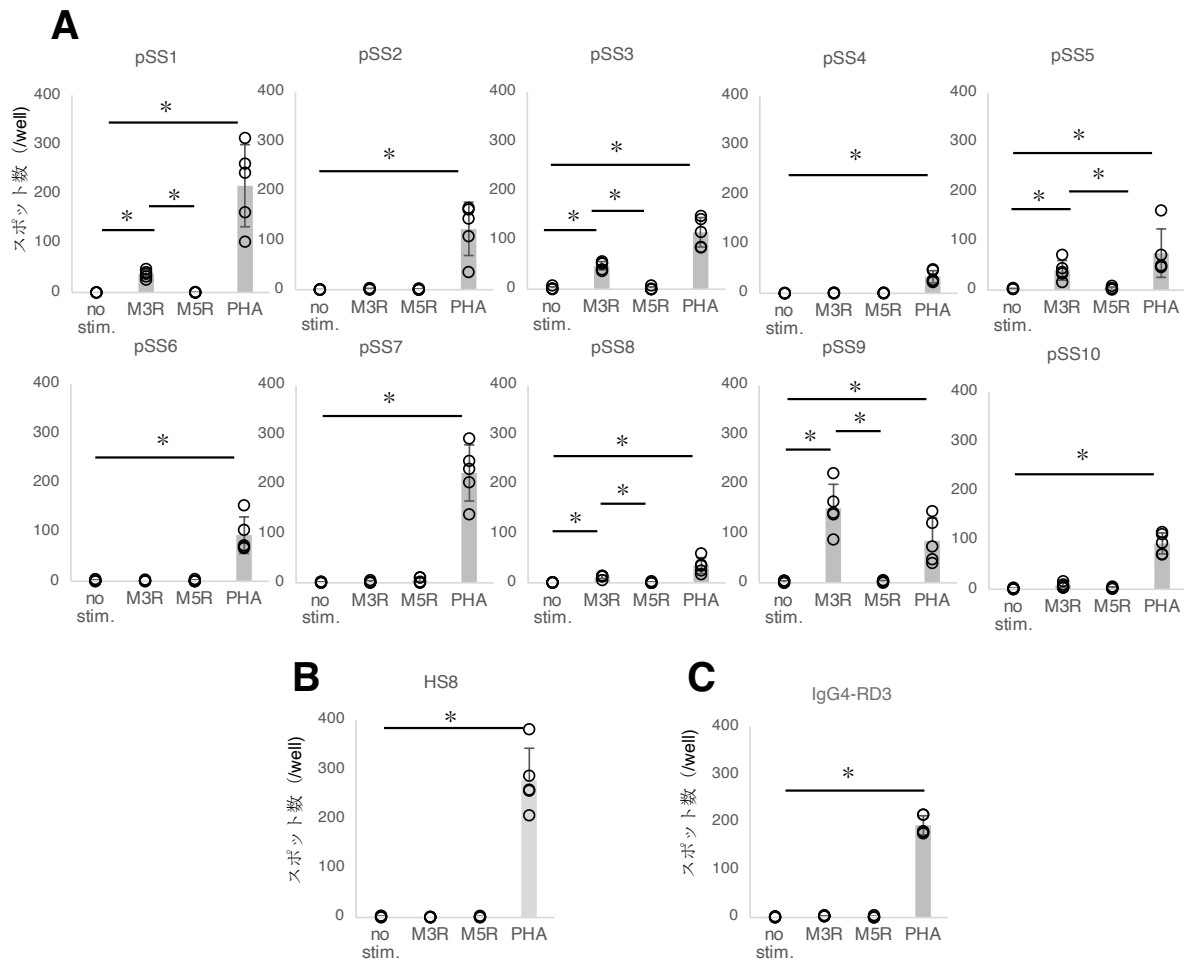
図 6. ELISpot 法による M3R 反応性 IL-17 産生細胞の検出



ELISpot 法を用いた M3R ペプチド刺激後 IL-17 産生細胞陰性 pSS 患者（pSS4）、陽性患者（pSS5）、健常者（HS8）、IgG4-RD 患者（IgG4-RD3）の代表 well 所見を示す。PBMC を HLA-DRB1 に基づき選定された M3R 混合ペプチドで刺激後、ELISpot により IL-17 産生細胞を検出した。各条件において 5well を検定し、検出されたスポット数の平均値を算出した。各 well のスポット数は ImmunoSpot S6 ENTRY を使用し自動計測した。各 well の左上数字は自動計測されたスポット数を示す。

M3R 混合ペプチド刺激後の well においてスポットの出現を認めない M3R 反応性 IL-17 産生細胞陰性患者（pSS4）と比較して、陽性患者（pSS5）では M3R 混合ペプチド刺激後にスポットが出現している。健常者、IgG4-RD 患者ではスポットが出現した症例は認められなかった。

図 7. M3R 反応性 IL-17 産生細胞の統計学的検定

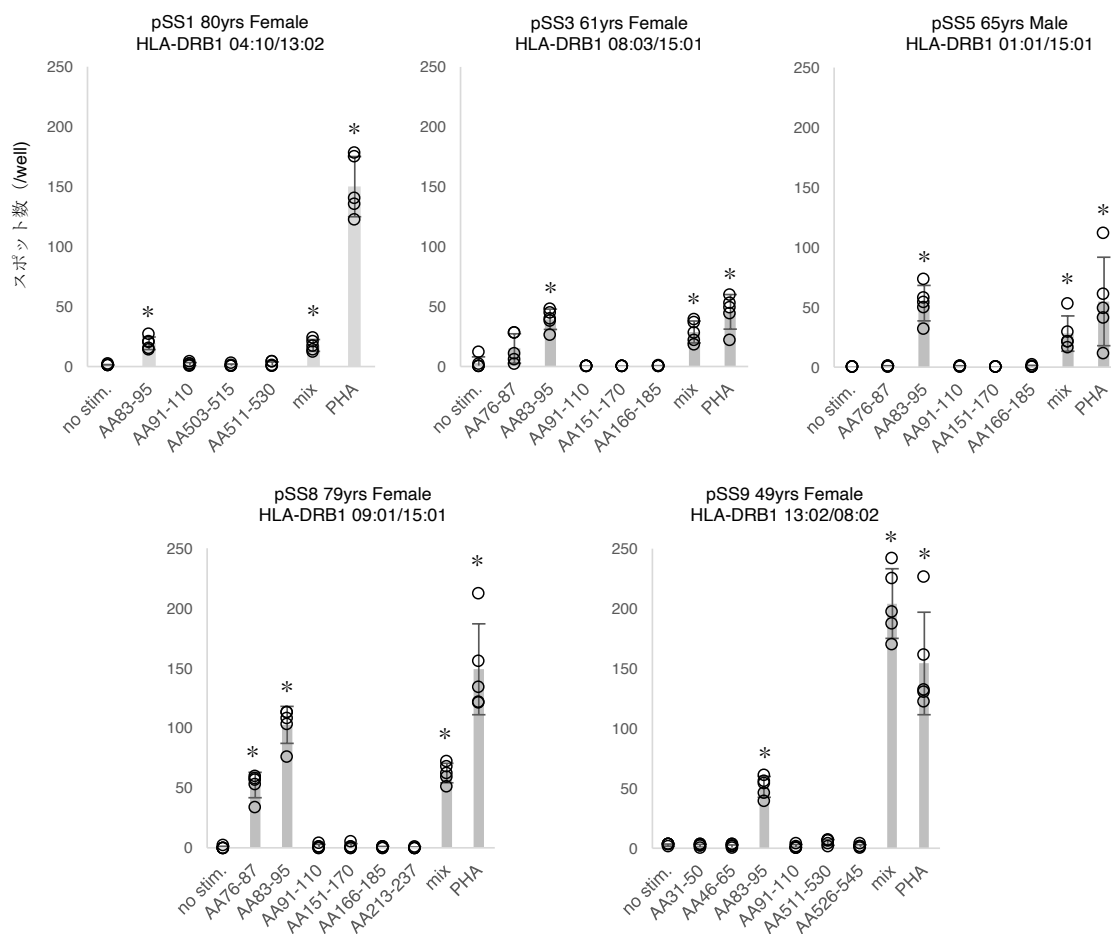


ELISpot 法による検定を施行した全 10pSS 患者、健常者の代表例、および IgG4-RD 患者の代表例についてスポット数の統計学的解析を行った。

- A. 各条件において 5well を検定し、その平均値を無刺激（陰性コントロール）条件、M5R ペプチド（コントロールペプチド）刺激条件、PHA 刺激（陽性コントロール）条件におけるスポット数の平均値と比較をした。pSS1、pSS3、pSS5、pSS8、pSS9 において、無刺激条件でのスポット数と比較して、M3R ペプチド刺激後のスポット数の有意な増加を認めた。
- B. 10 例の健常者について代表例を示す。健常者全 10 例において、無刺激条件と比較して M3R ペプチド刺激後に有意なスポット数の増加を認めた症例はいなかった。
- C. 5 例の IgG4-RD 患者について代表例を示す。IgG4-RD 患者全 5 例において、無刺激条件と比較して M3R ペプチド刺激後に有意なスポット数の増加を認めた症例はいなかった。

* $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis の検定法による)。

図 8. IL-17 産生誘導 M3R ペプチドの同定

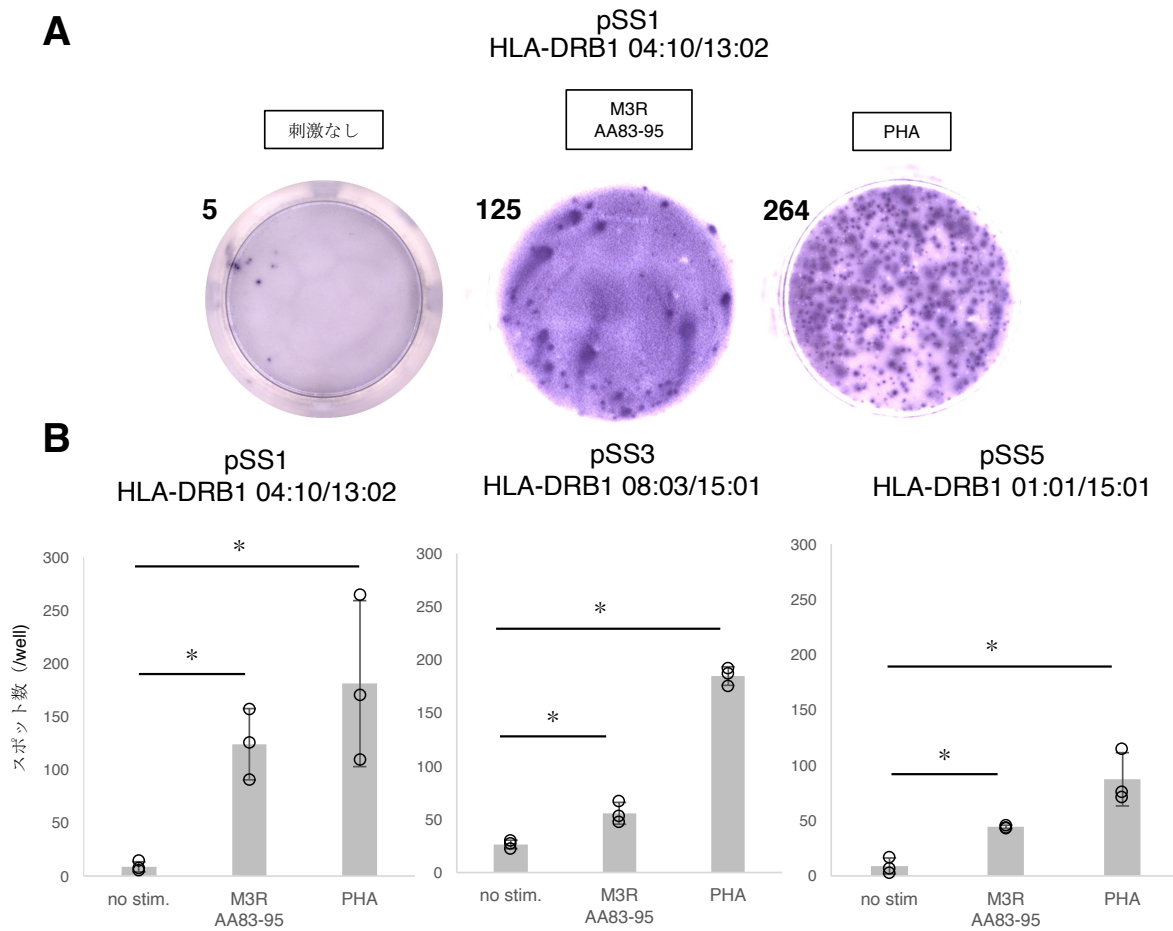


これまでの検定で M3R 混合ペプチド反応性 IL-17 産生細胞が陽性となった pSS10 例中 5 例に関して、刺激に用いた混合ペプチドのどの部分で IL-17 産生が誘導されるのかを調べるため、混合ペプチドを 12-20 アミノ酸で合成される M3R ペプチド(表 3)に分けて刺激を行い、同様の検討を行った。すると、全ての患者 (pSS1、3、5、8、9) において、M3R AA83-95 領域のペプチドを刺激後、無刺激条件と比較して有意なスポット数の増加を認めた。また pSS8 においては、M3R AA76-87 刺激後にも有意なスポット数の増加を認めた。このことから、M3R AA76-87 に M3R 反応性 Th17 細胞の T 細胞エピートが含まれることが想定された。

* $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis の検定法による)。

AA : アミノ酸番号、mix : 選定された M3R 混合ペプチド

図 9. M3R 反応性 Th17 細胞の存在



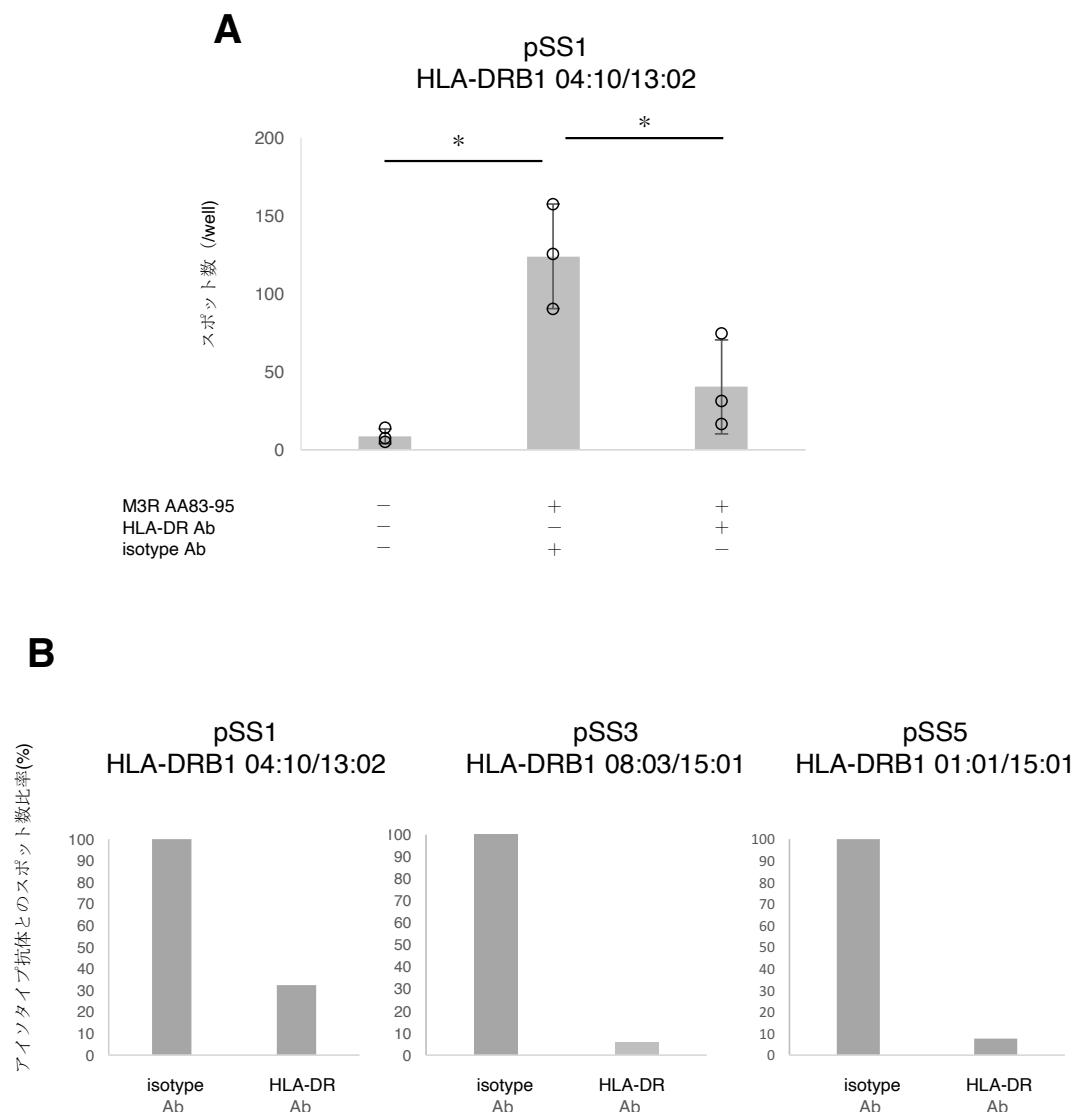
M3R 反応性 IL-17 産生細胞が Th17 細胞由来であるのかを確認するために、CD4⁺T 細胞と CD14⁺単球より誘導した樹状細胞の共培養条件において、IL-17 産生を誘導する主な M3R ペプチドである M3R AA83-95 刺激後の IL-17 産生能を評価した。M3R 反応性 IL-17 産生細胞陽性 pSS 患者 5 例中 3 例で検討を行なった。また各条件において 3well で検定を行なった。

- A. 検討された 3 症例中 1 症例の代表 well 写真を示す。M3R AA83-95 刺激後に CD4⁺T 細胞と樹状細胞の共培養条件においてもスポットの出現が認められた。
- B. 出現したスポット数を各条件で比較検定した。いずれの患者においても M3R AA83-95 刺激において、無刺激条件と比較して有意なスポット数の増加を認めた。

* $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis の検定法による)。

no stim. : 無刺激

図 10. M3R 反応性 Th17 細胞における HLA-DR 拘束性の評価

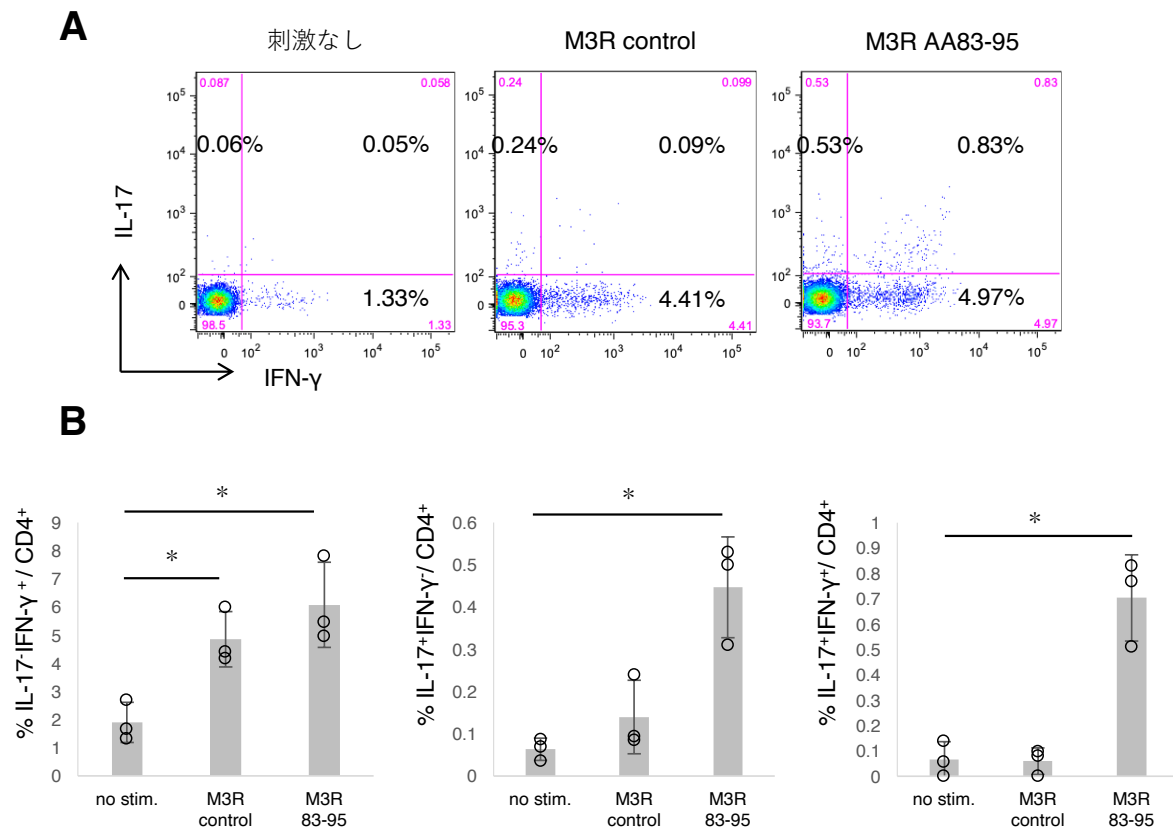


M3R 反応性 Th17 細胞の HLA-DR 拘束性を調べるため、CD4⁺T 細胞と樹状細胞共培養条件において HLA-DR ブロッキング抗体存在下の抗原刺激に対する IL-17 産生能を評価した。CD4⁺T 細胞は MACS を用いて単離し、CD14⁺ 細胞から分化誘導した樹状細胞と抗 HLA-DR 抗体を反応させた後に共培養を開始した。

- A. 検討した pSS3 症例中の代表例 1 例の結果を示す。M3R AA83-95 刺激条件において、アイソタイプ抗体存在下では無刺激条件と比較して有意なスポット数の増加を認めた。しかし M3R AA83-95 刺激による IL-17 産生細胞の誘導能は、抗 HLA DR 抗体存在下においては有意に低下を認め、無刺激条件と比較したスポット数の増加が認められなくなった。
- B. 検討した 3 症例において、抗 HLA-DR 抗体の存在によるスポット数の減少をアイソタイプ抗体存在下におけるスポット数と比較した。アイソタイプ抗体存在下でのスポット数を 100%とした時に、抗 HLA-DR 抗体存在下でのスポット数の比率を示している。

* $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis の検定法による)。

図 11. M3R AA83-95 反応性 IL-17/IFN- γ 産生細胞の評価

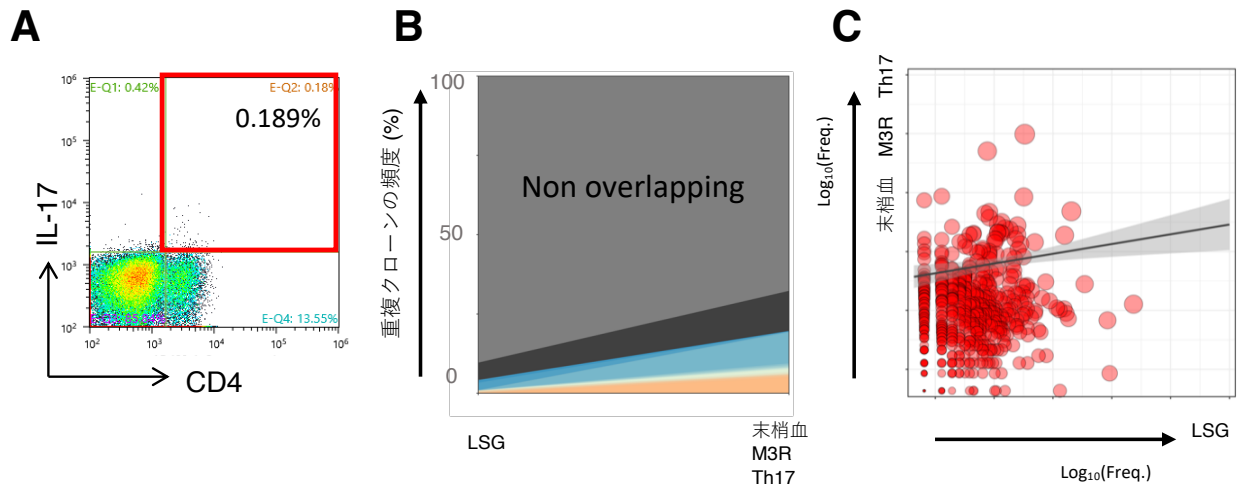


M3R AA83-95 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者 3 症例を対象に、M3R AA83-95 刺激後 CD4⁺ 細胞における IL-17、IFN- γ 産生能の評価を行なった。なお M3R コントロールペプチドとは、HLA-DRB1 に基づき HLA と結合能が高いと推定されたが ELISpot 法では IL-17 産生が確認できなかったペプチドをコントロールとして用いた。

- A. 3 症例中 1 例 (pSS5) の代表的な結果を示す。M3R AA83-95 刺激条件において、M3R コントロールペプチド刺激、および刺激なし条件と比較し、IL-17 産生細胞の増加が認められた。
- B. 3 症例 (pSS1、3、5) においてフローサイトメトリーによる結果を統計学的に解析した。CD4⁺ 細胞における IFN- γ 単独陽性細胞は、M3R AA83-95 刺激において無刺激条件と比較し有意な増加を認めたが、M3R コントロールペプチドにおいても増加を認めていた。一方、IL-17 単独陽性細胞、また IL-17+IFN- γ ⁺ 陽性細胞は無刺激条件と比較し有意な増加を認め、この変化は M3R コントロールペプチド刺激条件では認められなかった。

* $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis の検定法による)。

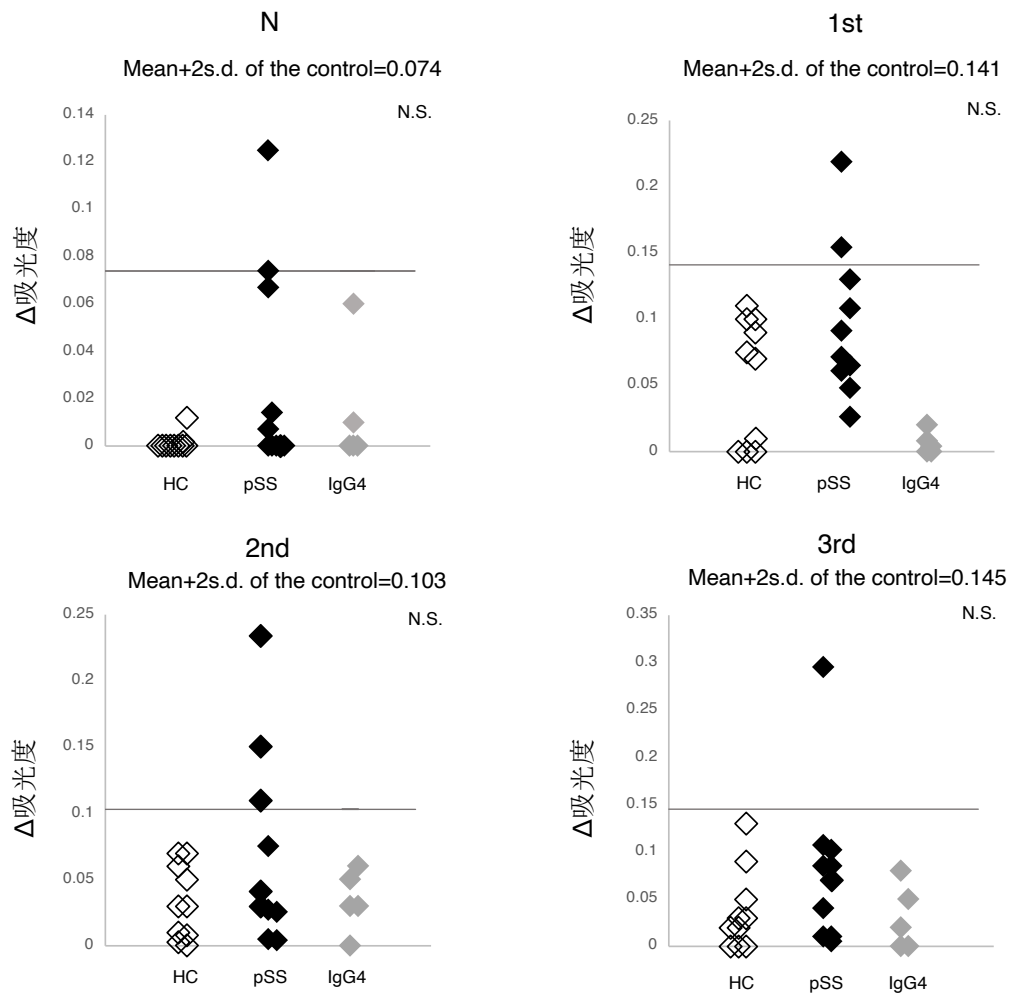
図 12. 末梢血中 M3R AA83-95 反応性 Th17 細胞と唾液腺浸潤 T 細胞間での TCR レパトワ重複の解析



末梢血中で検出された M3R 反応性 Th17 細胞と同一の T 細胞クローンが唾液腺に存在するかどうかを調べるため、末梢血中より分離した M3R 反応性 Th17 細胞と唾液腺浸潤 T 細胞の間で TCR シーケンスを施行した。M3R 反応性 Th17 細胞が陽性である pSS 患者 1 例 (pSS9) で検討をした。

- A. 図 5.と同様のゲーティングを用い、pSS9 末梢血中より M3R AA83-95 反応性 Th17 細胞をソーティングにより分離した (赤枠部分)。
- B. 分離した末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞と LSG 浸潤 T 細胞の間で重複 T 細胞クローンの頻度を解析した。灰色部分は重複を認めない T 細胞クローンの頻度であり、黒色、また色付き部分が重複 T 細胞クローンの頻度を示している。黒色は上位 20 クローン以下の重複クローンをまとめた頻度であり、色付き部分が上位 20 クローンの頻度となる。各色は各クローンを表している。末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞と重複する T 細胞クローンは LSG 浸潤 T 細胞中では約 10%存在していた。
- C. 重複クローンの各部位における頻度を比較した。それぞれの丸が各クローンを示しており、末梢血中 M3R 反応性 Th17 細胞で優位な T 細胞クローンと唾液腺に存在する優位な T 細胞クローンは異なることが示された。

図 13. 抗 M3R 抗体の評価

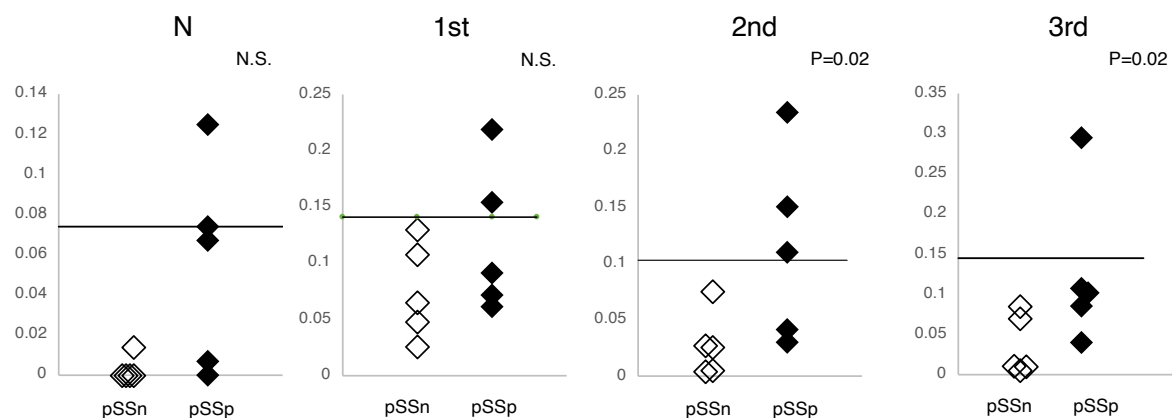


M3R の細胞外 4 領域に対する抗体を健常者 ($n=10$)、pSS 患者 ($n=10$)、IgG4-RD 患者 ($n=5$) で測定比較した。抗 M3R 抗体のカットオフ値は、健常者の平均値+2SD 値としている (黒線で表示)。

陽性率に統計学的な有意差は認められなかったものの、健常者および IgG4-RD 患者間では各領域に対する抗 M3R 抗体陽性症例は認められなかった。

N : N 末端、1st : 第 1 細胞外ループ、2nd : 第 2 細胞外ループ、3rd : 第 3 細胞外ループ、N.S. : 有意差なし (Kruskal-Wallis の検定法による)。

図 14. M3R 反応性 Th17 細胞陰性 pSS 患者と陽性 pSS 患者間での抗 M3R 抗体

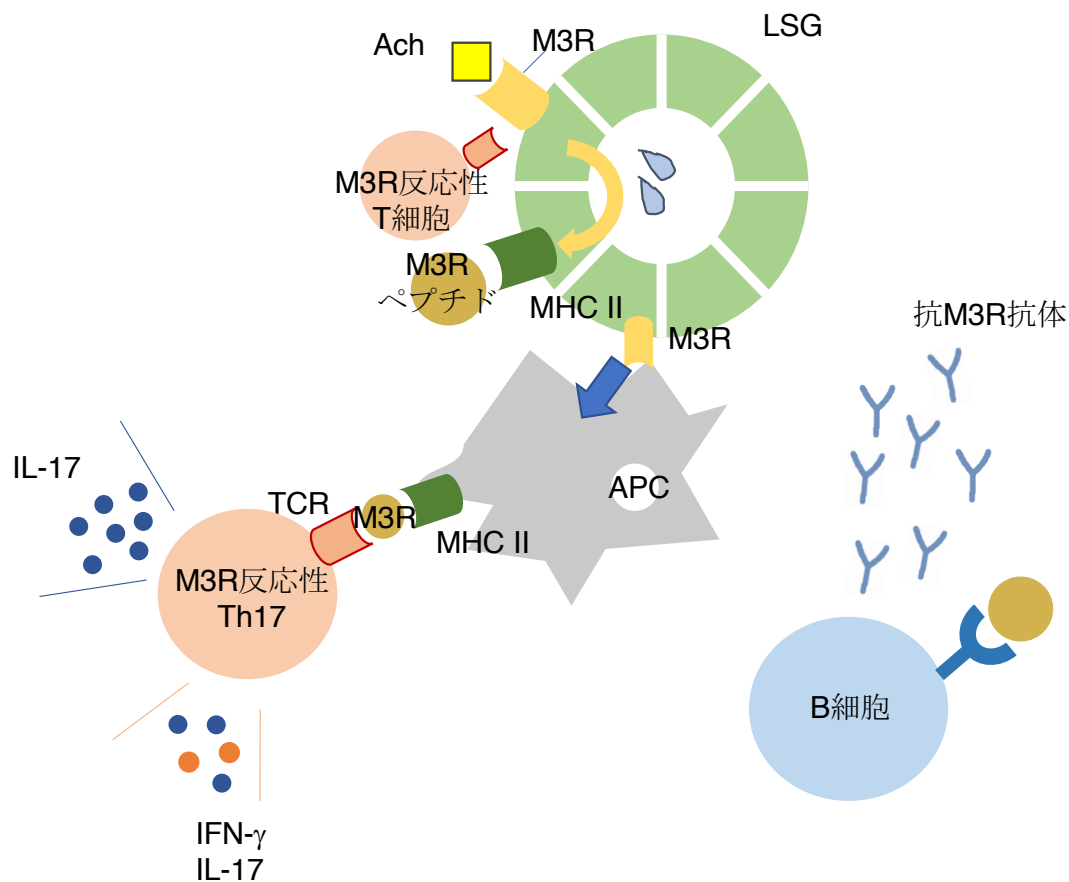


M3R 細胞外領域に対する抗体を M3R 反応性 Th17 細胞陰性 pSS 患者 ($n=5$) と陽性 pSS 患者 ($n=5$) 間で比較検討した。M3R 第 2 細胞外領域、第 3 細胞外領域に対する抗 M3R 抗体価が M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者において有意に高いことが示された (各 $p=0.02$)。

pSSn: M3R 反応性 Th17 細胞陰性 pSS 患者、pSSp: M3R 反応性 Th17 細胞陽性 pSS 患者

* $p<0.05$ (Mann-Whitney U 検定法による)。

図 15. pSS の病態形成における M3R 反応性 Th17 細胞の役割 (模式図)



M3R は唾液腺に発現する G 蛋白共有型受容体であり、今回 M3R に反応し IL-17 を産生する CD4⁺T 細胞、および IL-17/IFN- γ を産生する CD4⁺T 細胞が一部の pSS 患者末梢血中で検出された。これら M3R 反応性 Th17 細胞を有する pSS 患者では、HLA -DRB1 15:01、DQA1 01:02、DQB1 06:02 ハプロタイプを認める頻度が高い傾向にあり、特定の自己抗原に対する反応性を有する患者群の存在が考えられた。また HLA 抗原複合体と結合する TCR のレパトワ解析では、末梢血中で同定された M3R 反応性 Th17 細胞と同一 T 細胞クローンが、M3R の存在する炎症局所である口唇唾液腺においても、全浸潤 T 細胞クローンの約 10% の頻度で存在する事が明らかになった。しかし末梢血中と口唇唾液腺においては優位なクローンが異なっており、その部位における機能や増殖能は異なる可能性がある。臨床的には、M3R 反応性 Th17 細胞を有する患者群では ESSDAI が高い傾向にあり、また抗 M3R 抗体価が有意に高いことから M3R 反応性 B 細胞応答の活性化に参与する可能性が考えられた。

Ach : アセチルコリン、M3R : M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体、LSG : 口唇唾液腺、TCR : T 細胞受容体、APC : 抗原提示細胞、MHC II : 主要組織適合遺伝子複合体クラス II