

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 19 日現在

機関番号：12102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791100
 研究課題名（和文） シェーグレン症候群での M3 ムスカリン作働性アセチルコリン受容体に対する免疫応答
 研究課題名（英文） Autoimmune response to M3 muscarinic acetylcholine receptor in Sjögren's syndrome
 研究代表者
 坪井 洋人（TSUBOI HIROTO）
 筑波大学・医学医療系・講師
 研究者番号：80580505

研究成果の概要（和文）：シェーグレン症候群（SS）における M3 ムスカリン作働性アセチルコリン受容体（M3R）に対する自己免疫応答の病態的意義を明らかにするため、1) 抗 M3R 抗体の SS に対する疾患特異性の検討、2) SS 患者における M3R 反応性 T 細胞の検出を行った。1) 疾患コントロールとして、関節リウマチ（RA）21 例、全身性エリテマトーデス（SLE）21 例、原発性胆汁性肝硬変（PBC）84 例、後天性無汗症 12 例の血清を用いて、M3R 合成ペプチド（N 末端、第 1・2・3 細胞外ループ）を抗原とした ELISA により、抗 M3R 抗体を測定した。N 末端に対する抗 M3R 抗体は、RA で 42.9%、SLE 28.6%、PBC 90.5%、後天性無汗症 16.7% の陽性率であった。第 1 細胞外ループは、それぞれ、33.3%、28.6%、72.6%、0% の陽性率であった。第 2 細胞外ループは、33.3%、57.1%、76.2%、0% の陽性率であった。第 3 細胞外ループは、33.3%、28.6%、69.0%、0% の陽性率であった。2) SS 3 例、健常人 3 例の PBMC を単離し、M3R 混合ペプチド（N 末端、第 1・2・3 細胞外ループ）で刺激し、IFN γ MACS cytokine secretion assay を用いて、IFN γ 産生 CD4 陽性 T 細胞を検出した。SS 患者のうち、1 例では、M3R 混合ペプチドに対して特異的に IFN γ を産生する CD4 陽性 T 細胞が検出された。一方健常人では検出されなかった。以上より抗 M3R 抗体の SS における疾患特異性は示せなかった。SS 患者で M3R 反応性 T 細胞の存在が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To clarify the pathogenic roles of autoimmune response to M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) in Sjögren's syndrome (SS), I examined 1) the disease specificity of anti-M3R antibodies in SS, and 2) the detection of M3R reactive T cells in SS. 1) Anti-M3R antibodies were examined by M3R peptides (N terminal, 1st, 2nd, 3rd extracellular loops) based ELISA in sera from rheumatoid arthritis (RA) (N=21), systemic lupus erythematosus (SLE) (N=21), primary biliary cirrhosis (PBC) (N=84), and acquired anhidrosis (AA) (N=12). Antibodies for N terminal were positive in 42.9% of RA, 28.6% of SLE, 90.5% of PBC, 16.7% of AA. Antibodies for 1st loop were positive in 33.3%, 28.6%, 72.6%, 0%, for 2nd loop, 33.3%, 57.1%, 76.2%, 0%, for 3rd loop, 33.3%, 28.6%, 69.0%, 0%, respectively. 2) PBMC isolated from SS (N=3) and controls (N=3) were stimulated with M3R mix peptides (N terminal, 1st, 2nd, 3rd extracellular loops). M3R reactive IFN γ producing CD4+T cells were detected by IFN γ MACS cytokine secretion assay in one SS, but not in controls. In conclusion, it was revealed that anti-M3R antibodies were not SS-specific, and M3R reactive T cells were detected in SS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：膠原病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病学

キーワード：シェーグレン症候群、M3 ムスカリン作働性アセチルコリン受容体、自己抗体、自己反応性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; SS) は唾液腺炎・涙腺炎を主体とし様々な自己抗体の出現がみられる自己免疫疾患である。SS は他の膠原病の合併がみられない一次性 SS と、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) や SLE (systemic lupus erythematosus; SLE) などの膠原病を合併する二次性 SS とに大別される。SS では外分泌腺へのリンパ球浸潤に加えて、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体、リウマトイド因子 (Rheumatoid factor; RF)、抗核抗体 (Anti-nuclear antibody; ANA) といった種々の自己抗体が検出される (Dawson L. et al. Arthritis Rheum. 2005; 52: 2984-2995)。また、SS の唾液腺・涙腺には CD4 陽性のヘルパー T 細胞が多数浸潤し、発症および病態形成にかかわるとされている。唾液腺局所に浸潤する T 細胞が認識する対応自己抗原と T 細胞エピトープについては、これまでに Ro/SS-A52kD タンパク、TCRBV6S7、HSP10/60、 α アミラーゼが同定されている (Sumida T. Mod Rheumatol 2000; 10: 193-198)。以上のように、SS では自己抗体と自己反応性 T 細胞が検出されているが、SS に特異的な病因抗体、ならびに自己反応性 T 細胞の病態形成における役割について、結論は得られていない。

近年、SS 患者において、外分泌腺に発現し、分泌に重要な役割を果たす M3 ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 (M3R) に対する自己抗体の存在が報告されている (Dawson L. et al. Arthritis Rheum. 2005; 52: 2984-2995)。我々のグループの先行研究では、M3R の第 2 細胞外ループの合成ペプチドを用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により、一次性 SS・二次性 SS (Naito Y. et al. Ann Rheum Dis. 2005; 64: 510-511) および若年発症 SS (Nakamura Y. et al. Ann Rheum Dis. 2008; 67: 136-137) において抗 M3R 抗体の存在を明らかにしている。また、magnetic activated cell sorting (MACS) cytokine secretion assay を用いて、SS 患者の末梢血リンパ球中に、M3R の第 2 細胞外ループの合成ペプチドによる抗原刺激に反応して、インターフェロン γ (IFN γ) を産生する M3R 反応性 T 細胞を検出した (Naito Y. et al. Ann Rheum Dis. 2006; 65: 269-271)。さらに最近になり、SS 患者では M3R の第 2 細胞外ループ以外の細胞外領域 (N 末端領域、第 1・第 3 細胞外ループ) を認識する抗 M3R 抗体も存在することを示した。ヒト唾液腺 (HSG) 細胞株を用いた in

vitro での機能解析の結果から、これらの抗 M3R 抗体は M3R アゴニスト刺激後の細胞内カルシウム濃度上昇を変化させ、唾液分泌に影響する可能性も示唆された。抗 M3R 抗体のカルシウム濃度上昇に対する影響は、抗体のエピトープにより異なる可能性も明らかにした (Tsuboi H. et al. Clin Exp Immunol. 2010; 162: 53-61)。

しかしながら、現時点では抗 M3R 抗体の SS における疾患特異性は明らかになっておらず、M3R の第 2 細胞外ループ以外の領域に反応する M3R 反応性 T 細胞の検討も行われていない。

2. 研究の目的

SS において、近年注目されている自己抗原である M3R に対する自己免疫応答の病態的意義を明らかにする。

(1) 抗 M3R 抗体の SS における疾患特異性を明らかにする。

(2) SS 患者の末梢血中において、M3R の第 2 細胞外ループ以外の領域にも反応する M3R 反応性 T 細胞の存在を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 疾患コントロールとして、関節リウマチ (RA) 21 例、全身性エリテマトーデス (SLE) 21 例、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 84 例、後天性無汗症 12 例の血清を用いて、M3R 合成ペプチド (N 末端、第 1・2・3 細胞外ループ) を抗原とした ELISA により、抗 M3R 抗体価を測定した。健常人 (HC) 42 例における抗体価の平均+2SD をカットオフとして、抗体陽性率を算出した。

(2) HC、SS 患者 (各 N=3) から、末梢血単核球 (PBMC) を採取した。M3R の 4 つの細胞外領域をコードする M3R 混合ペプチド (N 末端、第 1・第 2・第 3 細胞外ループ)、あるいは M5R ペプチド (第 3 細胞外ループ、control ペプチド)、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体 (positive control) を加え、PBMC を 24 時間刺激培養した。IFN γ MACS cytokine secretion assay を用いて、IFN γ 産生 CD4 陽性 T 細胞を分離し、フローサイトメトリー法により細胞数をカウントした。

4. 研究成果

(1) N 末端に対する抗 M3R 抗体は、RA で 42.9% (9/21 例)、SLE で 28.6% (6/21 例)、PBC で 90.5% (76/84 例)、後天性無汗症で 16.7% (2/12 例) の陽性率であった。第 1 細

胞外ループに対する抗 M3R 抗体は、それぞれ、33.3% (7/21 例)、28.6% (6/21 例)、72.6% (61/84 例)、0% (0/12 例) の陽性率であった。第 2 細胞外ループに対する抗 M3R 抗体は、それぞれ、33.3% (7/21 例)、57.1% (11/21 例)、76.2% (64/84 例)、0% (0/12 例) の陽性率であった。第 3 細胞外ループに対する抗 M3R 抗体は、それぞれ、33.3% (7/21 例)、28.6% (6/21 例)、69.0% (58/84 例)、0% (0/12 例) の陽性率であった。

以上の結果より、RA や SLE といった SS 以外の代表的膠原病においても、N 末端、第 1・2・3 細胞外ループに対する抗 M3R 抗体が検出されることが明らかとなった。SS での抗体陽性率は、N 末端領域 42.9% (18/42 例)、第 1 細胞外ループ 47.6% (20/42 例)、第 2 細胞外ループ 54.8% (23/42 例)、第 3 細胞外ループ 45.2% (19/42 例) であり (Tsuboi H. et al. Clin Exp Immunol. 2010; 162: 53-61)、SS と比較すると、RA や SLE における抗 M3R 抗体の陽性率は低い傾向であった。

一方で、M3R の発現が報告されている胆管上皮や汗腺を障害する PBC や後天性無汗症に関しても、抗 M3R 抗体の陽性率を検討した。PBC は胆管上皮に対する自己免疫応答が病態に関与すると考えられており、SS との合併も臨床的にしばしば認められる。大変興味深いことに、今回の検討で、PBC において高い陽性率で抗 M3R 抗体が検出されることが明らかとなった。PBC において、疾患特異的自己抗体とされている抗ミトコンドリア抗体は、対応抗原がユビキタスに発現しており、PBC の臓器特異性を説明できない。PBC における抗 M3R 抗体の存在は、PBC の臓器特異性に関与する可能性も示唆され、注目すべき知見である。今後 PBC における抗 M3R 抗体の病因的意義や、臨床像との関連について、解析を進めていく予定である。

(2) HC では、M3R 混合ペプチドに対して特異的に IFN γ を産生する CD4 陽性 T 細胞は検出されなかった。一方、3 例の SS 患者のうち、1 例 (SS3) では、M3R 混合ペプチドに対して特異的に IFN γ を産生する CD4 陽性 T 細胞が検出された (図 1)。しかしながら、平均値では HC と SS の間で M3R 反応性 IFN γ 産生 CD4 陽性 T 細胞の比率に有意差は認められなかった (図 2)。

今後は、M3R 反応性 IFN γ 産生 CD4 陽性 T 細胞が検出された SS 患者の PBCM を用いて、M3R の 4 つの細胞外領域 (N 末端、第 1・第 2・第 3 細胞外ループ) のうち、どの領域がドミナントエピトープであるかの解析を進めていく予定である。

さらに、近年 IL-17 を産生する Th17 が、種々の自己免疫疾患において、重

要な役割を果たすことが示されてきており、IL-17 MACS cytokine secretion assay を用いて、M3R 反応性 IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞の検出も行っていく方針である。

図1 M3R反応性T細胞の検出 HC (N=3)、SS (N=3)の比較

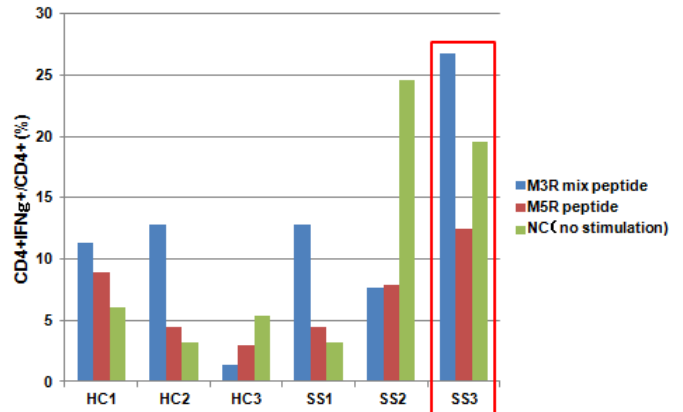
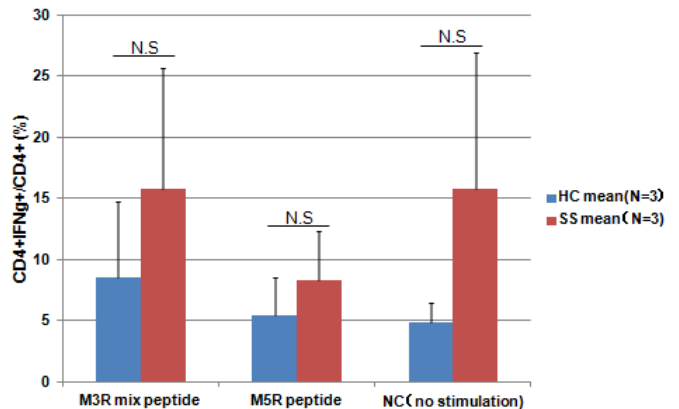


図2 M3R反応性T細胞の検出 HC、SS (各N=3)の平均値の比較



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 6 件)

1. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T.: Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjögren's syndrome in Japanese patients. *Mod Rheumatol*. 23:219-225, 2013. (査読あり)
2. Iizuka M, Tsuboi H, Matsuo N, Kondo Y, Asashima H, Matsui M, Matsumoto I,

Sumida T.: The crucial roles of IFN-g in the development of M3 muscarinic acetylcholine receptor induced Sjögren's syndrome-like sialadenitis. *Mod. Rheumatol.* 23:614-616, 2013. (査読あり)

3. Tsuboi H, Matsuo N, Iizuka M, Tsuzuki S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T.: Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related disease. *Arthritis Research and Therapy.* 14:R171, 2012. (査読あり)
4. Tsuboi H, Nakamura Y, Iizuka M, Matsuo N, Matsumoto I, Sumida T.: Generation and functional analysis of monoclonal antibodies against the second extracellular loop of human M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Mod. Rheumatol.* 22:264-271, 2012. (査読あり)
5. Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, Asashima H, Matsumoto I.: Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Mod. Rheumatol.* 2012 Nov 8. (査読あり)
6. Sumida T, Iizuka M, Asashima H, Tsuboi H, Matsumoto I.: Pathogenic role of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor immune response in Sjögren's syndrome. *Presse Med.* 41:e461-466, 2012. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. 坪井 洋人: 抗 M3 ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 (M3R) 抗体とシェーグレン症候群 (SS)、第 40 回日本臨床免疫学会総会、スポンサードシンポジウム自己抗体 (東京)、9 月 28 日、2012 年。
2. 坪井 洋人: 日本人シェーグレン症候群患者の診断における 3 つの診断基準の比較、第 21 回日本シェーグレン症候群学会、シンポジウム 2 (京都)、9 月 8 日、2012 年。

[その他]

ホームページ等:

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/rheumatology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 洋人 (TSUBOI HIROTO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 80580505

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし