

氏名	浅島 弘充		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第	7852	号
学位授与年月	平成 28年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	The anergy induction of M3 muscarinic acetylcholine receptor-reactive CD4+ T cells suppresses experimental sialadenitis-like Sjögren's syndrome (M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体反応性 CD4+T 細胞のアナジー誘導によるシェーグレン症候群様唾液腺炎マウスモデルの抗原特異的制御)		
主査	筑波大学教授	博士 (医学)	武川 寛樹
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	渋谷 和子
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	森島 祐子
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	萩原 正大

## 論文の内容の要旨

### (目的)

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; SS) は慢性唾液腺炎を主徴とする自己免疫疾患であるが、根治的治療法はない。近年、SS の自己抗原として唾液腺に高発現し唾液分泌に重要な役割を果たす M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3R) が注目されている。M3R の細胞外領域をコードした混合ペプチドを M3R 欠損マウスに免疫し、その脾細胞を Rag1 欠損マウスに移入することで SS 類似の唾液腺炎が発症する (M3R induced sialadenitis; MIS)。本マウスモデルは、M3R 反応性 T 細胞が唾液腺炎の発症に重要であること、IFN- $\gamma$  や IL-17 といったサイトカインが病態形成に関与することが示されている。一方、TCR 結合部のアミノ酸を置換した変異ペプチド (altered peptide ligand; APL) は、T 細胞の機能抑制を誘導する。今回、MIS を用いて M3R 反応性 T 細胞のエピトープを明らかにし、APL を用いた抗原特異的制御法の構築を目的とした。

### (対象と方法)

1) M3R 混合ペプチド (N1、N2、N3、1<sup>st</sup>、2<sup>nd</sup>、3<sup>rd</sup>) を免疫した M3R<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞を各ペプ

## 審査様式 2 - 1

チドで刺激し、サイトカイン産生を測定した。

- 2) N1、1<sup>st</sup>ペプチドを免疫した M3R<sup>+</sup>マウス脾細胞を Rag1<sup>+</sup>マウスに移入し、唾液腺炎発症を検討。
- 3) 1)および2)で T 細胞エピトープであると示唆された N1 および 1<sup>st</sup>ペプチドの APL を各々作製し、準至適濃度下で CD11c<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>細胞と共培養した。培養上清中のサイトカイン産生を測定した。
- 4) 抑制性 APL の候補である 1<sup>st</sup>-APL、N1-APL を MIS に投与し、唾液腺炎への影響を評価した。
- 5) 唾液腺炎の発症を抑制した N1-APL7 投与群における頸部リンパ節中の CD4<sup>+</sup>細胞を単離し、発現上昇分子を探索した。
- 6) N1-APL7 投与群における頸部リンパ節を単離し、M3R 混合ペプチド培養下で exogenous IL-2 を加え、細胞増殖能を検討した。
- 7) アナジー関連分子の発現を N1-APL7 と CD11c<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>細胞との共培養下で検討した。

### (結果)

- 1) N1、1<sup>st</sup>ペプチドに対する M3R 反応性 T 細胞から IFN- $\gamma$ 、IL-17 の有意に高い産生がみられた。
- 2) N1、1<sup>st</sup>ペプチドを単独免疫した M3R<sup>+</sup>マウスの脾細胞を移入した Rag1<sup>+</sup>マウスで、唾液腺炎の発症が確認された。
- 3) N1 で 7 種類(N1-APL1-7)、1<sup>st</sup> で 8 種類(1<sup>st</sup>-APL1-8)の APL を作製した。N1-APL5、6、7 との共培養で IFN- $\gamma$ 産生が有意に抑制された。また、1<sup>st</sup>-APL8 で IL-17 産生が有意に抑制された。
- 4) N1-APL7 投与で唾液腺炎の発症が有意に抑制された。
- 5) N1-APL7 投与群の頸部リンパ節中 CD4<sup>+</sup>細胞は PBS 投与群と比較して有意に Early Growth Response 2 (Egr-2)の発現が高かった。
- 6) N1-APL7 投与群の頸部リンパ節は exogenous IL-2 の添加により M3R 混合ペプチド培養下での細胞増殖が促進された。
- 7) Itch, Cbl-b, Grail といったアナジー関連分子の発現が上昇した。

### (考察)

本研究内容は、SS という根治的治療薬に乏しい自己免疫疾患の治療薬開発の一助として有用であるのみならず、TCR 親和性の違いが抗原特異的 T 細胞に与える影響を解析するうえでも重要な成果と考える。今後、TCR 親和性が T 細胞に与える影響を詳細に解析することで、抗原特異的治療法の開発の一助になると期待する。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

シェーグレン症候群の原因として M3R に注目し、M3R 誘導唾液腺炎のマウスモデルを作製、発症機序と変異ペプチドによる治療効果を調べた研究である。重要な所見であり、多くのデータからの解析は高く評価される。予備審査での指摘事項にも真摯に対応しており、全体として良くまとまっている。現在、シェーグレン症候群に対する M3R の関与は 50%ぐらいと推定されており、抗 M3R 抗体はヒトにおいても高値を示すが、抗体が高いこととシェーグレン症候群の主体と考えられている T 細胞由来の細胞性免疫との関連性についてはまだ不明であり、今後の解析が必要である。

## 審査様式 2 - 1

またこの研究成果を実際にヒトで応用する場合、ヒトにおいてどのように変異ペプチド(APL)を探索していくのか、どのように投与していくのか等、将来ヒトでの解析の必要性が望まれた。

平成 27 年 12 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。