

論 文 概 要

Suppression of glucose-6-phosphate-isomerase induced arthritis
by oral administration of transgenic rice seeds expressing
altered peptide ligands of glucose-6-phosphate-isomerase.

(GPIのアミノ酸変換ペプチドを発現させた遺伝子導入米の経口

○ 論 文 題 目 投与によるGPI誘導関節炎の抑制)

○ 指 導 教 員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 住田孝之 教授

(所 属) 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏 名) 廣 田 智 哉

目 的：

Glucose-6-Phosphate-Isomerase (GPI)は関節炎を自然発症する K/BxN マウスの自己抗原として同定されており、ヒト GPI の T 細胞エピトープを含むペプチド(hGPI₃₂₅₋₃₃₉)を DBA/1J マウスに免疫することでヒトの関節リウマチ類似の GPI 誘導関節炎(GPI-induced arthritis: GIA)を発症する。

MHCクラスII分子に結合するアンカーモチーフを保持したまま T細胞エピトープのアミノ酸の一部を変換したペプチドはAltered peptide ligand (APL)として知られ、APLは自己免疫疾患に対する抗原特異的治療の確立に有用と考えられている。実際、hGPI₃₂₅₋₃₃₉ のアミノ酸配列の一部を変換したAPLコンストラクト (APL1~APL20) を設計した先行研究において、APL12(AA: IWYINCFGCETHAML→AA: IWYINCFACETHAML)との共免疫でGIAが抑制されることが報告されている。さらに、APLを米穀に発現させることにより、保存性の向上、非侵襲的かつ定期的な投与の実現が期待できる。

本研究は、GPI の APL12 を米穀に発現させ、GIA に対する経口予防投与の抑制効果を明らかにすることを目的とする。

対象と方法：

- 1) グルテリンタンパクと連結させた APL12 コンストラクトをキヌアカ米に遺伝子導入した APL12 発現米(APL12-TG) を作成し、栽培・収穫した APL-12TG に APL12 コンストラクトが発現していることを Immunoblot で確認した。
GIA を誘導前、DBA/1J マウスに APL12-TG あるいはコントロールとして hGPI₃₂₅₋₃₃₉ 発現米(hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG)、非遺伝子導入米(Non-TG)を 7 日間 (day -7~-1) 経口投与した。hGPI₃₂₅₋₃₃₉ を免疫して GIA を誘導後に以下の検討を行った。
- 2) 関節炎の重症度を重症度スコア(clinical score)、day14 の足関節の組織像を HE 染色による関節組織スコア(histological arthritis score)で評価した。
- 3) day14 における脾臓・単径リンパ節・腸間膜リンパ節の GPI 刺激下での IL-17 産生を ELISA で評価した。
- 4) day28 における血清抗 GPI IgG 抗体産生を ELISA で評価し、単径リンパ節の mRNA 発現を定量 PCR で評価した。
- 5) day14 における脾臓・腸間膜リンパ節の CD4⁺ T 細胞の mRNA 発現を定量 PCR で評価した。
- 6) day14 における脾臓の CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の Foxp3 発現をフローサイトメトリーで評価した。
- 7) day14 における脾臓の CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の GITR 発現をフローサイトメトリーで評価した。

結 果：

- 1) 栽培・収穫した APL12-TG で APL12 ペプチドが発現していることを Immunoblot で確認した。
- 2) day10, 12, 14, 16 において、APL12-TG 群の関節炎の重症度は Non-TG 群より有意に抑制された($P<0.05$)。APL12-TG 群と hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群の重症度には有意差を認めなかった。
APL12-TG 群の足関節組織の炎症細胞浸潤は Non-TG 群より有意に抑制された($P<0.05$)。APL12-TG 群と hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群の炎症細胞浸潤には有意差を認めなかった。
- 3) APL12-TG 群および hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群の脾臓・単径リンパ節では、GPI 刺激下での IL-17 産生は Non-TG 群より有意に抑制された ($P<0.05$)。APL12-TG 群と hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群の IL-17 産生には有意差を認めなかった。
腸間膜リンパ節の IL-17 産生は 3 群間で有意差を認めなかった。
- 4) APL12-TG 群の血清抗 GPI IgG 抗体産生は Non-TG 群より有意に抑制された ($P<0.05$)。APL12-TG 群と hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群の抗体産生には有意差を認めなかった。
APL-TG 群の単径リンパ節における BAFF mRNA 発現は Non-TG 群より有意に抑制された ($P<0.05$)。APL12-TG 群と hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群の BAFF mRNA 発現には有意差を認めなかった。その他、BLIMP1、IRF4、IL-6、IL-21、BCL6 の mRNA 発現は 3 群間で有意差を認めなかった。
- 5) APL12-TG 群の脾臓の CD4⁺T 細胞における GITR mRNA 発現は、hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群および Non-TG 群より有意に上昇していた($P<0.05$)。その他、FOXP3、CTLA4、IL-10、PDCD1、EGR2 の mRNA 発現は 3 群間で有意差を認めなかった。
- 6) APL12-TG 群の脾臓における CD4⁺CD25⁺T 細胞の Foxp3 発現レベル(mean fluorescence intensity: MFI)は Non-TG 群より有意に上昇していた($P<0.05$)。APL12-TG 群と hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群の Foxp3 発現には有意差を認めなかった。
- 7) APL12-TG 群の脾臓における CD4⁺CD25⁺T 細胞の GITR 発現レベル(MFI)は、Non-TG 群および hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群より有意に上昇していた($P<0.05$)。

考 察：

APL12-TG の経口予防投与による GIA の抑制効果が示唆された。抑制効果の機序として、次の 3 つが考えられた。

1 つ目は、APL12-TG の経口投与による CD4⁺ T 細胞上の Foxp3 発現と GITR 発現の上昇の可能性である。Foxp3 発現と GITR 発現は免疫系の抑制能と関連し、GITR を介した共刺激は制御性 T 細胞の成熟・維持を促し、IL-10 産生を増加させるとの報告がある。制御性 T 細胞の GITR を介した CD4⁺CD25⁺ T 細胞上の Foxp3 発現の増強が、APL12-TG による GIA の抑制に寄与した可能性が考えられる。

2 つ目は、APL12-TG の経口投与による IL-17 産生の低下の可能性である。関節炎や腸炎のマウスモデルでは制御性 T 細胞による Th17 細胞の抑制が報告されている。制御性 T 細胞の活性化と Th17 細胞の抑制が、APL12-TG による GIA の抑制に寄与した可能性が考えられる。

3 つ目は、APL12-TG の経口投与による抗 GPI IgG 抗体産生の低下の可能性である。本研究では単径リンパ節における BAFF mRNA 発現の有意な抑制を認めている。制御性 T 細胞数とメモリー B 細胞数は逆相関し、制御性 T 細胞は B 細胞の活性化・維持を抑制することが報告されている。制御性 T 細胞による B 細胞の抑制を介した抗 GPI IgG 抗体産生の低下が、APL12-TG による GIA の抑制に寄与した可能性が考えられる。

また、本研究では hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG の経口予防投与も、足関節組織の炎症細胞浸潤と IL-17 産生、抗 GPI IgG 抗体産生を Non-TG より有意に抑制した。これらの hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG による抑制機序としては経口免疫寛容の関与が考えられる。

一方で、APL12-TG 群の脾臓における CD4⁺CD25⁺T 細胞の GITR 発現は hGPI₃₂₅₋₃₃₉-TG 群より有意に上昇しており、制御性 T 細胞における GITR 発現の上昇は経口免疫寛容より APL によって強く誘導される可能性が示唆された。

結 論：

GPI の APL12-TG の経口予防投与による GIA の抑制効果が示唆された。

その抑制機序として、APL12-TG の経口予防投与が、脾臓の制御性 T 細胞 における Foxp3 および GITR 発現の上昇、所属リンパ節の BAFF 発現の低下を介して、IL-17 産生、血清 抗 GPI IgG 抗体産生を低下させた可能性が考えられた。