

# ユビキタスな自己抗原に対する免疫応答による関節炎発症機構

研究課題名：自己抗体誘導性関節炎のメカニズムとその制御機構の解明

松本 功

筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻 臨床免疫学 講師

## はじめに

関節リウマチ (RA) は世界で有病率の最も高い自己免疫疾患であるが、病因については不明点が多い。昨今、炎症性サイトカイン、特に腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) を抑える生物製剤が RA に認可され、有効率の高さが実証されている。しかしながら、根本的な自己免疫応答をリセットさせるには至らず、病態の更なる解明が待ち望まれている。また、RA 動物モデルとしてはヘテロな疾患であることを象徴するように、多くのものが知られている。その中で、我々の出発点である K/BxN 関節炎モデルでは、解糖系酵素 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) に対する自己抗体が単独で関節炎を惹起する。ユビキタスな抗原であるはずの GPI だが、関節局所では軟骨表面や滑膜表面に局在しており、局所での免疫複合体活性化が関節炎を誘導することが判明している。また、抗体誘導性関節炎のエフェクター機序解析はこのマウスを介して飛躍的に進んだと考えられ、補体第二経路や、Fc $\gamma$ RIII が重要であることが解明され、Fc $\gamma$ RIII, C5aR を保持する細胞群であるマクロファージ、好中球、肥満細胞などが病態に必須である。これら主にマウス抗 GPI 抗体を介して判明した自己抗体の病因性について図の枠内に記す。これらのことより、関節特異的抗原に対する免疫応答とは別の、ユビキタスな抗原により誘導される関節炎が存在する。実際、この抗原 GPI を特定種のマウスに免疫することによって関節炎を惹起できる。また、RA 患者においても頻度は 15% であるが、この抗 GPI 抗体が重度な RA 患者に高頻度に同定されている。これら 2 種のモデルマウスより得られた知見と、ヒト RA、特に抗 GPI 抗体陽性患者と比較解析し、共通の pathway を探索することにより真の関節炎の病態解明、及び新規治療法の開拓を模索している。

## 研究結果と考察

### I. ヒト RA での抗 GPI 抗体—病因性に関して

RA ではリウマトイド因子、抗 CCP 抗体など多くの自己抗体が頻出し、抗 CD20 抗体が奏功することより、病態に直接関与している可能性が指摘されている。マウスで関節炎原性が証明されている抗 GPI 抗体は、RA 患者において約 15% と頻度は低い、陽性患者においては関節炎の病勢を反映しており、関節外症状を伴う重度の RA に陽性者が多い。ただし、その他の関節炎でも同定できることがあり、病因性についていくつかの検討を行った。マウスに直接ヒト型抗 GPI 抗体を投与しても、今までのところ関節炎は惹起できていない。そこで、我々は抗 GPI 抗体を含む IgG を、遺伝的に我々に近いと考えられるサル指関節内に直接投与したところ、IgG の軟骨表面への沈着、C5a レセプターを保持する細胞群の流入に伴う滑膜炎が観察された。これらのことより抗 GPI 抗体を含む RA 患者血清 IgG が軟骨表面に直接沈着し、単独で弱い滑膜炎を起こすことができるが、関節炎を起こすには十分でないことが考えられた。

自己抗体と炎症性サイトカイン、あまりつながりが無いように思われる 2 つの分子だが、RA ではどのような関係にあるのだろうか。関節炎原性がありうると考えられる抗 GPI 抗体を保持していても関節炎が起きない健常人 (HS) では、炎症性サイトカインにつなげる分子に異常があるのではないかと考え、抗 GPI 抗体陽性 HS9 人 (158 人中) に着目した。ではなぜこれらの人は関節炎を起こさないのだろうか? K/BxN マウスの抗 GPI 抗体移入の遺伝子解析により、protective な因子は Fc $\gamma$  レセプター、C5 が推測されている。われわれはヒトでアフィニティーの変化が起こるポリモルフィズムがすでに同定されている 2 つの刺激性 Fc $\gamma$  レセプター (Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F、Fc $\gamma$ RIIa-131H/R) に注目し、そのポリモルフィズムを比較検討した。187 人の RA (うち 23 人が抗 GPI 抗体陽性)、158 人の HS (うち 9 人が抗 GPI 抗体陽性) のゲノムより RFLP 法を用いてポリモルフィズムを解析したところ、Fc $\gamma$ RIIIa においては抗 GPI 抗体陽性 HS では 9 人中 8 人がアフィニティーの弱い 158F のホモであった。一方、抗 GPI 抗体陽性 RA 患者では 158V を持つ患者が 6 割をしめ、有意差をもって抗 GPI 抗体陽性健常人に 158F が多いことが検定された ( $p=0.019$ )。しかしながら、Fc $\gamma$ RIIa にはこのような傾向が全く認められなかった。さらに、高親和性の Fc $\gamma$ RIIIa-158V/V の homozygous の RA 患者、HS に注目して比較解析すると、ヒト GPI、ウサギ GPI 両者に対して、明らかに反応性の違いが見られた ( $p=0.0027$ ,  $p=0.0015$ )。一方抗 GPI 抗体陰性群の RA、HS の比較では差が認められなかった。これらのことより Fc $\gamma$ RIIIa-158F は関節炎原性抗体の防御因子であることが考えられ、この遺伝子多型により関節炎原性抗体から逃れている可能性が示唆された。実際、

Fc $\gamma$ RIIIaはマウス抗 GPI 抗体の解析より、自己抗体の関節腔内への流入、及び関節内での免疫複合体の活性化に寄与していることが判明しているため、この遺伝子多型が2箇所関節炎に関与していることを示唆した(図)。

関節炎と自己抗体をつなげるその他の分子、特に獲得免疫を担うT細胞はどのようなものであろうか。抗 GPI 抗体強陽性患者(RA 15人、SLE 4人、HS 4人)に着目し、MACS サイトカイン分泌アッセイで GPI 反応性 Th1/Th2 細胞の同定を試みた。RA 患者では15人中7人より GPI 反応性 IFN $\gamma$  産生 T 細胞が、4人より IL-4 陽性 T 細胞が同定され、それら患者は HLA-DR \*0405 ないしは \*0901 を保持していた。SLE や HS ではこれら GPI 反応性 T 細胞は殆ど同定できず、これらのことより HLA-DR \*0405 ないしは \*0901 RA 患者群において、関節炎抗原抗体の産生に Th1/Th2 タイプの自己反応性 T 細胞が関与している可能性が示唆された。また、コントロール群での HLA-DR は一定の傾向がなく、抗 GPI 抗体産生に直接関わる要素は少ないと考えられた。

## II. ヒト RA での抗 GPI 抗体—産生機序に関して

抗 GPI 抗体が認識する抗原 GPI は、すべての細胞内に存在する解糖系酵素であり、また細胞外サイトカイン AMF/neuroleukin/maturation factor として機能しており、自己免疫疾患や抗体産生への関与が報告されている。GPI には 24 の変異型が存在し、非球状赤血球性溶血性貧血症との関連が指摘されている。我々は、抗 GPI 抗体陽性者における抗原 GPI の変異について検討した。抗 GPI 抗体陽性および陰性 RA 患者、陽性および陰性 HS 各 5 名の末梢血単核球より GPI 全長 cDNA をクローニングし、塩基配列を比較した。すると、39 種類の欠損変異型 cDNA が得られ、欠損変異型 GPI cDNA の保持率は、抗 GPI 抗体陽性健常人において (31.5% : 23/73)、陰性者 (6.4% : 5/78) と比較して有意に高かった ( $p < 0.001$ )。また抗 GPI 抗体陽性 RA 患者 (28.6% : 22/77) では、陰性者 (1.6% : 1/63) と比べて有意に高かった ( $p < 0.0001$ )。これらのことから、欠損変異型 GPI の存在により、epitope spreading などの機序により GPI に対する自己抗体が産生されている可能性が示唆された。

## III. GPI 免疫モデルでの解析—B 細胞及び免疫グロブリンの重要性

ヒトリコンビナント GPI を DBA/1 マウスに免疫すると 100% 関節炎を発症する。同様に native rabbit GPI 抗原を免疫しても関節炎が起きることから、GPI に対する免疫応答が DBA/1 マウスにおいて関節炎と関与しているのは確実である。RA における GPI に対する免疫応答の意義をさらに理解する為に、本研究ではもう 1 つの GPI 依存性モデルである DBA/1 マウスの GPI 免疫関節炎モデルを中心に検討を進めた。現在までの検討では、GPI 免疫関節炎マウスの血清や、IgG 成分だけでは関節炎が転移できていない。また、Fc $\gamma$ R を欠損したマウスに GPI を免疫しても関節炎は発症しないが、抑制性の Fc $\gamma$ RIIIb を欠損したマウスでは関節炎が悪化する。この GPI 免疫マウスでの B 細胞の役割はどのようなのであろうか？ まず細胞移入により関節炎が転移できるかどうかを確認するために、SCID マウスに GPI 免疫マウス脾臓細胞を抗原 GPI とともに腹腔内投与した。すると関節炎がわずか 3 日で転移できることが明らかになった。さらにこれらの免疫担当細胞で関節炎に重要なものを同定するため CD19 陽性 B 細胞、CD4 陽性 T 細胞を MACS で depletion すると関節炎の発症が起きなくなる。よってこれらの細胞群が関節炎発症に重要であることが明らかになった。

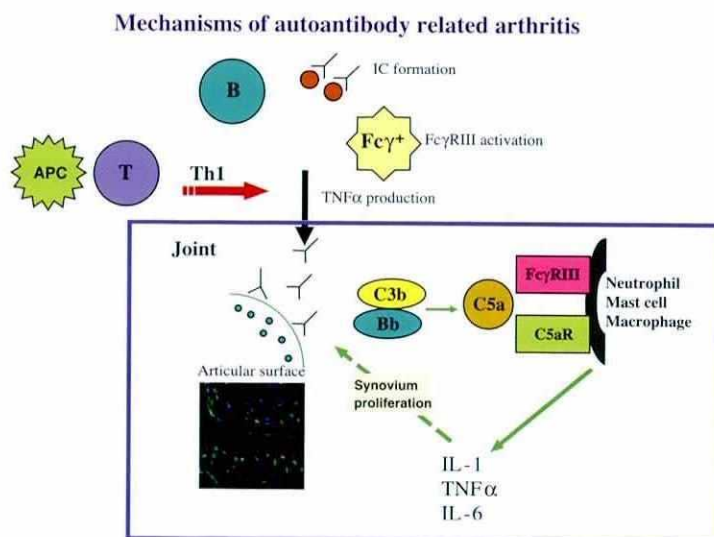
## IV. GPI 免疫モデルでの解析—TNF $\alpha$ 依存性関節炎での制御機構

このモデルは TNF $\alpha$  依存性が大変強く、TNF antagonist ではほぼ完全に関節炎が抑制できる。厚生省研究班で、生物製剤で着目されている抗 TNF $\alpha$  抗体の治療抵抗性 RA 患者では、IFN inducible gene の発現が亢進していることがつきとめられ、サイトカイン同士の相互関係に注目が集まっている。我々は GPI 免疫関節炎発症直後の脾臓細胞より CD4 陽性細胞を分離し、マイトマイシン処理した抗原提示細胞を GPI とともに培養し、抗原特異的に産生されるサイトカインを Cytometric Beads Array (CBA) システムを用いて比較解析した。対照としては関節炎抵抗性 C57Bl/6 マウスを用いた。すると関節炎マウスの脾臓細胞を用いた検討では抗原特異的に TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  が産生された。これらのサイトカインは関節炎発症に重要な意味を持っていると考えられるが、これらのサイトカインの hierarchical な関係や、細胞内シグナルで重要な pathway はどのようなのであろうか。抗原特異的な炎症性サイトカインを抗原刺激で誘導後、共刺激分子の抗体 (抗 CD40L 抗体、抗 ICOS 抗体、CTLA-4I g など) や抗サイトカイン抗体 (抗 TNF $\alpha$  抗体、抗 IFN $\gamma$  抗体、抗 IL-12 抗体など) を用いてこれらサイトカインの抑制実験を行った。すると共発現分子では CTLA-4I g が TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  を抑制し、抗サイトカイン抗体では抗 TNF $\alpha$  抗体のみが他のサイトカインを制御することが判明した。また、JAK inhibitor、SN50 (NF $\kappa$ B inhibitor) を使って抑制実験を行ったところ、NF $\kappa$ B inhibitor で劇的に全てのサイトカインを抑制することができた。しかし、JAK inhibitor はまったく無効であった。これらのことより、これら抗原特異的なサイトカイン

の制御はNFκBを介して行われ、IFNγレセプターを介するシグナルの関与は否定的と考えられた。現在このモデルで発現亢進する1つのTNFα関連遺伝子に注目し、その分子を介しての関節炎制御を検討している。

## 今後の展望

RA患者において、抗CD20抗体や、現在最も強力な治療である抗サイトカイン療法が注目されているが、RA発症機構の中で重要な自己抗体、及び炎症性サイトカイン（特にTNFα）のリンクはまだまだ不明点が多い。これらを動物モデルとの共通点を見出すことにより病態を詳細に明らかにし、つなぎ役としての分子を同定することにより、疾患治療を目指したRA特異的治療の開発を目指したい。



## 主要論文リスト

Matsumoto I, Lee DM, Mansky RG, Sumida T, Hitchon CA, Schur PH, Anderson RJ, Coblyn SJ, Weinblatt ME., Brenner M, Duclos B, Pasquali JL, Gabalawy HE, Mathis D, Benoist C. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 944-954.

Muraki Y, Matsumoto I, Chino Y, Hayashi T, Suzuki E, Goto D, Ito S, Murata H, Tsutsumi A, Sumida T. Glucose-6-phosphate isomerase variants play a key role in the generation of anti-GPI antibodies. Possible mechanism of autoantibody production. *Biochem. Biophys. Research. Commun.* 2004; 323:518-522.

Suzuki T, Muraki Y, Yasukochi T, Zhang H, Kori Y, Hayashi T, Wakamatsu E, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumichika H, Sumida T, Matsumoto I. Intraarticular injection of IgG from anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive patients with rheumatoid arthritis induces synovitis in cynomolgus monkeys. *Autoimmunity Reviews* 2005; 4: 475-478.

Hayashi T, Matsumoto I, Muraki Y, Takahashi R, Chino Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T.: Clinical characteristics of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies positive Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2005; 15: 258-263.

Matsumoto I, Muraki Y, Yasukochi T, Zhang H, Kori Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Ikeda K, Sumichika H, Sumida T. The exploration of joint-specific immunoreactions on immunoglobulins G of anti-glucose-6-phosphate isomerase antibody-positive patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med* 2005; 16: 793-800.

Matsumoto I, Zhang H, Muraki Y, Hayashi T, Yasukochi T, Kori Y, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. A functional variant of Fcγ receptor IIIA is associated with rheumatoid arthritis in anti-glucose-6-phosphate isomerase antibodies-positive individuals. *Arthritis. Res. Ther.* 2005; 7: 1183-1188.

Kori Y, Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Hayashi T, Iwanami K, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. Characterization of Th1/Th2 type, glucose-6-phosphate isomerase reactive T cells in the generation of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* (in press)