論文の内容の要旨

論文題目

HSP70 によるシトルリン化自己抗原への免疫応答誘導と自己免疫性関節炎への関与

指導教官　　山本　一彦　教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学アレルギーリウマチ学専攻

庄田　宏文

関節リウマチは自己免疫の異常による、持続する炎症性関節炎を特徴とする疾患である。関節リウマチ患者においては、様々な自己抗体が検出されることがわかっているが、特に抗環状シトルリン化ペプチド(CCP)抗体が高い特異度で検出され、HLA-DR4 陽性患者で特に陽性率が高い。抗 CCP 抗体は炎症関節のシトルリン化フィブリンなどのシトルリン化抗原と反応し、炎症を増悪させると考えられている。また抗 CCP 抗体は関節炎発症前から出現していることが知られており、関節リウマチ患者における自己免疫寛容の破綻は、関節炎発症に先立って生じていると考えられている。また抗 CCP 抗体は結核患者にも出現することが報告されており、抗 CCP 抗体出現のひとつの機序として、MHC classⅡである HLA-DR4 に提示される結核菌由来の抗原の関与が推定されている。今回の研究では *Mycobacterium* 種から哺乳類全般に極めて相同性の高い heat shock protein (HSP) 70 の一種である BiP に注目し、シトルリン化抗原に対する抗体の出現機序および関節リウマチの病態への関与を研究した。

まず、マウスにおいて、*Mycobacterium* HSP70 (MycHSP70)の感作による免疫反応、特に自己抗原に対する反応を検討した。C57BL/6 マウスに MycHSP70 を免疫したところ、抗 BiP 抗体、抗 citrullinated BiP (citBiP)抗体が出現した(図 1)。更に抗 CCP 抗体の出現(図

2)、抗シトルリン化フィブリノーゲン抗体の出現も観察され、シトルリン化された自己抗原への免疫応答誘導が観察された。次に抗体産生を助ける CD4 陽性 T 細胞における免疫反応を検討した。MycHSP70 免疫後のマウス由来の脾臓 CD4 陽性 T 細胞は citBiP に対する強い増殖反応を示す一方、BiP に対しては増殖を示さなかった(図 3)。このことより、MycHSP70 の感作により、まず CD4 陽性 T 細胞の citBiP に対して免疫応答が誘導され、その結果 BiP やその他のシトルリン化抗原への抗体産生へと進展する機序が推測された。そこで、MycHSP70 免疫により citBiP への免疫反応が生じる機序を明らかにするため、citBiP 由来のシトルリン化ペプチドを用意し、CD4 陽性 T 細胞のエピトープを検索した。RA においては、HLA-DR4 保因者の場合に抗 CCP 抗体陽性の関節リウマチが発症しやすいことが知られており、HLA-DR4 に提示されるシトルリン化エピトープの重要性が示唆されている。HLA-DR4 トランスジェニックマウスを用いて、HLA-DR4 に提示させる citBiP 由来のシトルシン化ペプチドを検索した。免疫された抗原の一部は樹状細胞内でシトルリン化されて抗原提示されていることが報告されており、BiP, MycHSP70 を HLA-DR4 トランスジェニックマウスに免疫し、脾臓 CD4 陽性 T 細胞の citBiP 由来シトルリン化ペプチドに対する増殖反応を調べたところ、MycHSP70 と BiP で比較的相同性の高い C 端側のペプチドに対して、両群において強い反応が検出された。また MycHSP70 で免疫した場合、C 端側においてアルギニンのままのペプチドと比較し、シトルリン化ペプチドに対する反応が強くみられた。この結果から、MycHSP70 免疫により、citBiP 由来のシトルリン化ペプチドに対する CD4 陽性 T 細胞の反応が誘導されることが改めて証明された。この C 端側のシトルリン化ペプチドは、BiP と MycHSP70 の相同性が高いことより、MycHSP70 の感作による自己抗原への T 細胞反応の誘導には、抗原のシトルリン化による反応の増強に加えて、この領域の分子相同性(molecular mimicry)が関与していることが推測された。またシトルリン化抗原に対する抗体は関節炎を増悪させることが報告されており、MycHSP70 免疫による実験的関節炎への影響を検討した。予め MycHSP70 を免疫したマウスに、コラーゲン抗体誘発性関節炎を誘導したところ、コントロールと比較して有意な関節炎の増悪

が観察された。更に、予め MycHSP70 を免疫したマウスに、II 型コラーゲンを免疫してコラーゲン誘発性関節炎を誘導したところ、この系においても MycHSP70 の免疫により関節炎が有意に悪化した(図 4)。またこれらの関節炎マウスで、血清抗体価を測定したところ、抗 CCP 抗体価の陽性率の上昇がみられた。これらの結果より、MycHSP70 の免疫による関節炎の増悪の機序として、ひとつには MycHSP70 の免疫によって誘導されたシトルリン化自己抗原に対する免疫反応が関与していると考えられた。

次に、関節リウマチ患者において、citBiP に対する免疫反応が観察されるかを検討した。まず、citBiP に対する抗体価を測定したところ、関節リウマチ患者において健常人より有意に抗 citBiP 抗体価の上昇がみられた（図 5)。抗 citBiP 抗体の関節リウマチ診断における感度は 58%, 特異度 95%であり、抗 BiP 抗体と比較して関節リウマチ患者に特異的であった。更に、抗 citBiP 抗体価は抗 CCP 抗体価と有意な相関がみられたのに対して、抗 BiP 抗体価は抗 CCP 抗体価との相関はみられなかった。実際にヒト BiP 由来のシトルリン化ペプチドを作成し、自己抗体のエピトープを検索したところ、アルギニンのままのペプチドに対する抗体価と比較して有意に抗体価が上昇するシトルリン化ペプチドが同定された。次に、抗 BiP 抗体価および抗 citBiP 抗体価と、微生物由来の HSP70 に対する抗体価との相関を調べたところ、MycHSP70 に対する抗体価と抗 citBiP 抗体価に特に強い相関がみられた(図 6)。このことより、ヒトの関節リウマチ患者においても、citBiP に対する自己抗体の出現に、微生物由来の HSP70 の感作が関与していることが推測された。

最後に関節リウマチ患者において、HSP70 に対する T 細胞反応性を検討した。関節リウマチ患者においては抗 CCP 抗体が高い特異度で出現し、抗 CCP 抗体陽性の関節リウマチはより重症になることが知られている。抗 CCP 抗体が出現するためには、その産生を助ける CD4 陽性 T 細胞の存在が推定されており、関節リウマチの病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、HLA-DR4 陽性の関節リウマチ患者の末梢血単核細胞が、citBiP に反応するかを検討した。RA 患者の HLA-DRB1 を遺伝学的にタイピングし、

HLA-DRB1*0405 保因者の末梢血単核細胞を分離したうえで、citBiP と培養し増殖反応を調べた。その結果、HLA-DRB1*0405 陽性関節リウマチ患者由来の末梢血単核細胞は、BiP および citBiP に対して増殖反応が認められたが、citBiP に対する増殖反応の方が強かった。これより、HLA-DR4 陽性の関節リウマチ患者の末梢血中には、シトルリン化自己抗原である citBiP に増殖反応を示す CD4 陽性 T 細胞が存在することが示された。一方、HLA-DRB1*0405 陰性関節リウマチ患者においては、BiP および citBiP への T 細胞反応は弱く、差も認められなかった。

以上の検討より、関節リウマチ患者の一部において、シトルリン化された自己抗原である citBiP に対する免疫反応が、抗原特異的な獲得免疫系を司る T 細胞および B 細胞において生じていることが証明された。また、citBiP への免疫応答が生じる機序としては、微生物由来の MycHSP70 に対する強い感作により、citBiP に相同性の高いシトルリン化エピトープが抗原提示され、シトルリン化抗原に反応する CD4 陽性 T 細胞の増殖を誘導するという機序が、マウスモデルによる検討より考えられた。関節リウマチの発症には、遺伝的要因と環境要因の両方が関与していると考えられているが、今回の検討の結果より、環境要因である *Mycobacterium* 種への感作と、抗原のシトルリン化による抗原性の増強が、抗 CCP 抗体陽性関節リウマチ発症のひとつの要因であると考えられた。