

Title	自己免疫疾患の病変部位における自己抗体の産生機構の解明
Sub Title	Elucidation of the mechanism of production of autoantibodies at the lesion site of autoimmune diseases
Author	竹下, 勝(Takeshita, Masaru)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	抗ARS抗体症候群において、肺泡洗浄液検体6例と、偶然入手した唾液腺生検検体2例を収集し、病変部位で産生されていた抗体計200種類以上を作製し、その反応性を調べ、抗Jo-1抗体、抗EJ抗体、抗Ro52抗体等の自己抗体が相当の割合で含まれている事を確認した。更に抗原を用いた免疫染色で唾液腺局所における自己抗体産生を検証し、それらをまとめて論文化した。 シェーグレン病については、唾液腺生検検体のシングルセル解析・BCR/TCRレパトア同時解析の結果をまとめ、抗体プロファイル別に唾液腺に浸潤している細胞、クローナルに増殖している細胞、さらにそれらの細胞群でエンリッチしているパスウェイを明らかにした。 In anti-synthetase syndrome, we collected six bronchoalveolar lavage fluid samples and two salivary gland biopsy samples. We generated over 200 recombinant antibodies produced at the lesion sites and analyzed their reactivity, confirming that a substantial proportion consisted of known autoantibodies such as anti-Jo-1, anti-EJ, and anti-Ro52. Furthermore, immunohistochemistry using specific antigens verified local autoantibody production in the salivary glands. These findings were compiled and published. For Sjogren's disease, we analyzed single-cell and BCR/TCR repertoire data from salivary gland biopsies. Based on antibody profiles, we characterized the infiltrating cell populations, clonally expanded subsets, and the signaling pathways enriched in these groups, providing a comprehensive overview of the local immune landscape.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2022～2024 課題番号：22K08528 研究分野：リウマチ膠原病
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K08528seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 7 年 9 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K08528

研究課題名（和文）自己免疫疾患の病変部位における自己抗体の産生機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of production of autoantibodies at the lesion site of autoimmune diseases

研究代表者

竹下 勝（Takeshita, Masaru）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：10571135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：抗ARS抗体症候群において、肺胞洗浄液検体6例と、偶然入手した唾液腺生検検体2例を収集し、病変部位で産生されていた抗体計200種類以上を作製し、その反応性を調べ、抗Jo-1抗体、抗EJ抗体、抗Ro52抗体等の自己抗体が相当の割合で含まれている事を確認した。更に抗原を用いた免疫染色で唾液腺局所における自己抗体産生を検証し、それらをまとめて論文化した。

シェーグレン病については、唾液腺生検検体のシングルセル解析・BCR/TCRレパトア同時解析の結果をまとめ、抗体プロファイル別に唾液腺に浸潤している細胞、クローナルに増殖している細胞、さらにそれらの細胞群でエンリッチしているパスウェイを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのシェーグレン病の唾液腺や関節リウマチの肺病変で病変部位における自己抗体産生を報告してきたが、本研究の抗ARS抗体症候群でも同様であり、膠原病における本病態の普遍性が明らかになりつつある。また、抗ARS抗体症候群では罹患臓器と考えられていない唾液腺でも自己抗体産生が認められ、病変局所の解析により疾患の罹患分布を示すといった新たな方向性も示すことが出来た。さらにシェーグレン病の解析結果からは自己抗体によって局所で働くパスウェイが異なることが示唆され、疾患-血清中の自己抗体-病変部位で産生される自己抗体-病変部位の免疫応答の変化が一連のものとして病態理解の深化につながった。

研究成果の概要（英文）：In anti-synthetase syndrome, we collected six bronchoalveolar lavage fluid samples and two salivary gland biopsy samples. We generated over 200 recombinant antibodies produced at the lesion sites and analyzed their reactivity, confirming that a substantial proportion consisted of known autoantibodies such as anti-Jo-1, anti-EJ, and anti-Ro52. Furthermore, immunohistochemistry using specific antigens verified local autoantibody production in the salivary glands. These findings were compiled and published.

For Sjogren's disease, we analyzed single-cell and BCR/TCR repertoire data from salivary gland biopsies. Based on antibody profiles, we characterized the infiltrating cell populations, clonally expanded subsets, and the signaling pathways enriched in these groups, providing a comprehensive overview of the local immune landscape.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：自己免疫疾患 自己抗体 抗原特異性 シェーグレン病 炎症性筋疾患 シングルセル解析

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性自己免疫疾患の代表例である関節リウマチの治療は、生物学的製剤の登場により著しい進歩を遂げたものの、病変部位で高発現している分子や細胞群を抑える分子標的対症療法に留まっていた。病態の根本原因には対処できておらず、ドラッグフリー寛解が得られる患者は一部に留まり、抗体製剤などの高価な薬剤の継続的な投与が必要となる例も多い。シェーグレン病、炎症性筋疾患などのその他の疾患では明確な分子標的が定まっておらず、治療は汎免疫抑制療法であり、感染症を始めとする薬剤の副作用が問題となっている。これらの問題に対処するためには、疾患の根治を目指す治療法の開発が重要であり、その為には自己免疫病態の解明が必須であると考えられた。

自己免疫疾患患者の特徴の一つに血清中の自己抗体の出現がある。自己抗体の種類の判別により、疾患の表現型や治療反応性を含めた予後まで推測でき、臨床上非常に有用である。特定の自己抗体は特定の自己免疫疾患で特異的に認められ(例えば、抗 SSA 抗体→シェーグレン病)、各疾患は特定の臓器に病変が出現する(例えば、シェーグレン病→唾液腺)ため、自己抗体の出現と特定の臓器障害の間に何らかの関連が存在する事は間違いない。また、関節リウマチ患者に出現する抗 CCP 抗体の研究等から、自己抗体は発症の数年前から陽性化する事が分かっており、疾患のごく初期の自己免疫の発生に関わっていることが示唆される。一方で、抗体としての機能には不明な点が多い。全身性自己免疫疾患で出現する自己抗体の対応抗原は全身の細胞に広範に発現している核内分子、もしくは細胞内分子である場合が多く、標的分子に発現部位特異性が乏しく、かつ抗体が直接アクセスできないため、臓器障害への関連の有無は明らかでない。

なぜ特定の自己抗体を持つ患者が、抗体の標的分子との関連に乏しい特定の臓器に障害を起こすのか?という問題に未だ答えはない。この問題を逆にすると、なぜ特定の臓器に病変が出現する全身性自己免疫疾患患者に、特定の自己抗体が出現するのか?と言い換えられる。申請者らは過去の研究により、シェーグレン病の唾液腺病変、関節リウマチ・混合性結合組織病・シェーグレン病の肺病変などの一部の疾患の一部の臓器において、浸潤したリンパ球によって疾患特異的な自己抗体が高効率に産生されていることを明らかにした。このことは自己抗体産生と障害臓器が直接何らかの関連がある事を示唆しており、このような直接病変部位を詳細に解析する研究が疾患最上流の自己免疫病態の解明に有効な手掛かりをもたらすと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では炎症性筋疾患の中の抗 ARS 抗体症候群についても同様の解析を行い、病変臓器における自己抗体産生の広がりを探索するとともに、シェーグレン病という同じ疾患に異なる2種類の抗体、すなわち抗 SSA 抗体と抗セントロメア抗体、が出現することに着目し、抗体が異なると病変部位の病態まで異なるのかどうか、という点を解析することで、疾患-自己抗体-臓器病変の関連について明らかにすることを目指した。

前者の対象疾患である抗 ARS 抗体症候群は、特に自己抗体の出現様式に特徴がある。抗 ARS 抗体はグループ名であり、具体的には希なものも含め、Jo-1、EJ、PL-7、PL-12、KS、OJ、Zo、Ha の8種類のアミノアシル tRNA 転移酵素に対する抗体が含まれ、それぞれ相互に排他的であり、さらにそれぞれの抗体陽性の患者は若干の頻度の差はあれ筋炎、間質性肺炎、皮膚症状の3症状を認めることが知られる。各アミノアシル tRNA 転移酵素に対する自己抗体は交差反応せず、つまり免疫系が認識する際に必要な構造上の共通点に乏しいにも関わらず、疾患の表現型が共通であり、何らかの共通の機序に基づいて自己抗体と自己免疫疾患が発生していると考えられている点も本研究の対象とした重要な点である。肺病変に Jo-1 抗原特異的な CD4T 細胞が存在し、肺胞洗浄液に抗 Jo-1 抗体が含まれているという他の研究者からの報告もあるため(Feria et al, Arthritis Rheumatol, 2020)、肺で抗 ARS 抗体が産生されている事は確からしいが、その他の抗 ARS 抗体に関してはほとんど報告がない。そのため、抗 ARS 抗体陽性患者の肺胞洗浄液を収集し、別々の種類の抗 ARS 抗体を持つ患者検体の免疫反応の点から見た共通点を調べ、どのような機構で自己抗体ができるのかを検討する。さらに本疾患のうち、抗 Jo-1 抗体の対応抗原である Histidyl-tRNA 合成酵素はグランザイム B により切断を受け、N 末端断片が CCR5 に結合しケモカイン様に作用するとの報告もあり(Howard et al, J Exp Med, 2002)、自己抗原の翻訳後修飾と自己抗体のエピトープとの関連も詳細に検討することとした。

後者の対象疾患であるシェーグレン病は6-7割の患者に抗 SSA 抗体が、1-2割の患者に抗セントロメア抗体が出現し、両方を同時に持つ患者も存在する事が知られる。両抗体とも、陽性患者では唾液腺の障害は共通して認められるが、前者は高 IgG 血症、リンパ節腫脹、腺外症状の頻度が高く、後者はレイノー現象、手指硬化の頻度が高く、腺症状以外は別の臨床像を呈する。抗 ARS 抗体症候群が別々の自己抗体で類似の臨床像を呈するのに対し、シェーグレン病では同じ唾液腺の障害があるが背後の病態は異なると考えられる。そのため、それぞれの抗体が陽性の患者の唾液腺を対象として病変局所のシングルセル解析を行う事で、自己免疫プロファイルが異なると病変部位のリンパ球の動態が異なるのかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では(1)抗ARS抗体症候群の病変局所における抗体の反応性解析 (2)抗SSA抗体陽性、および抗セントロメア抗体陽性のシェーグレン病の病変部位の遺伝子発現解析の2つのテーマで実験を実施した。

(1) 抗ARS抗体症候群の病変局所における抗体の反応性解析

間質性肺炎を合併した抗ARS抗体症候群患者に対し、気管支鏡検査を行い肺胞洗浄液を採取する症例を研究にリクルートし、臨床検査の残余を研究用として収集した。肺胞洗浄液中のCD19+sIgD-CD27+CD38^{high}の抗体産生細胞をFACS AriaIIIを用いてシングルセルソートし、Smartseq2法を用いてシングルセルcDNAを作製した。各cDNAからPCR法により抗体のH鎖、L鎖の変換領域の配列を増幅し、発現ベクターに組み込み、哺乳類細胞を用いてモノクローナルリコンビナント抗体として産生、精製した。同疾患で口腔乾燥に対して2次性シェーグレン病の合併の有無を調べるために口唇生検検査を受ける方がいたため、2名分の唾液腺の残余を研究用に収集し、同様にそこから抗体を作製した。各抗体のpolyreactivity、自己抗原への反応性、抗体のsomatic hypermutationの有無、somatic hypermutationをゲノム配列に戻した際の抗体の反応性の変化について検証した。唾液腺においてはOCT包埋ののち凍結切片も作製し、抗CD138抗体及びGFP癒合自己抗原を用いて自己抗体産生細胞の有無を検討した。

(2) 抗SSA抗体陽性、および抗セントロメア抗体陽性のシェーグレン病の病変部位の遺伝子発現解析

抗SSA抗体陽性、抗セントロメア抗体陽性、両抗体陽性のシェーグレン病患者、およびコントロールとしてシェーグレン病の分類基準を満たさない両抗体陰性の口腔乾燥症の患者の唾液腺検体を収集し、細切・コラゲナーゼ処理を行ったのち、CD45+のリンパ球とCD326+の唾液腺上皮をソーティングし、両者を混合の上でクロミウムを用いて遺伝子発現、TCR・BCR配列同時解析を実施した。抗体プロファイル別に唾液腺における細胞クラスターの割合や遺伝子発現差解析を行った。一部のBCR配列についてはリコンビナント抗体を作製して反応性を検証した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 抗ARS抗体症候群の病変局所における抗体の反応性解析

血清抗Jo-1抗体陽性患者と血清抗EJ抗体陽性患者の各3名のBALFから177種の抗体を作製し、反応性を検討した(図1)。それぞれ12~30%および50~62%が抗Jo-1抗体、抗EJ抗体、もしくは抗ARS抗体と同時に出現する事が知られている抗Ro52抗体であり、本疾患においても病変部位で自己抗体産生が行われていることが明らかになった。これらの自己抗体は自己抗原の様々な部位にエピトープを持ち、立体構造を認識する抗体もあった点、および、somatic hypermutationによる親和性成熟を起こし、抗原への親和性を向上させていた点から、病変部位で自己抗原分子全体に対して液性免疫応答が起きていることが明らかとなった。

さらに、同疾患で口腔乾燥症状も伴った2症例から唾液腺組織を得て、そこに浸潤した抗体産生細胞についても同様に解析した。想定外な事に、唾液腺由来の100種類の抗体にはシェーグレン症候群に特異的な抗Ro60抗体は含まれず、抗ARS抗体症候群に特異的なJo-1、EJ、Ro52に対する抗体が25~75%と高率に含まれていた。同結果は蛍光標識抗原を用いた免疫染色でも確認し、唾液腺でも肺と同様の免疫応答が起きていることが明らかになった(図2)。これまで唾液腺は抗ARS抗体症候群の罹患臓器と考えられておらず、唾液腺病変がある患者はシェーグレン症候群の合併と臨床的に診断されていたが、本結果からは抗ARS抗体

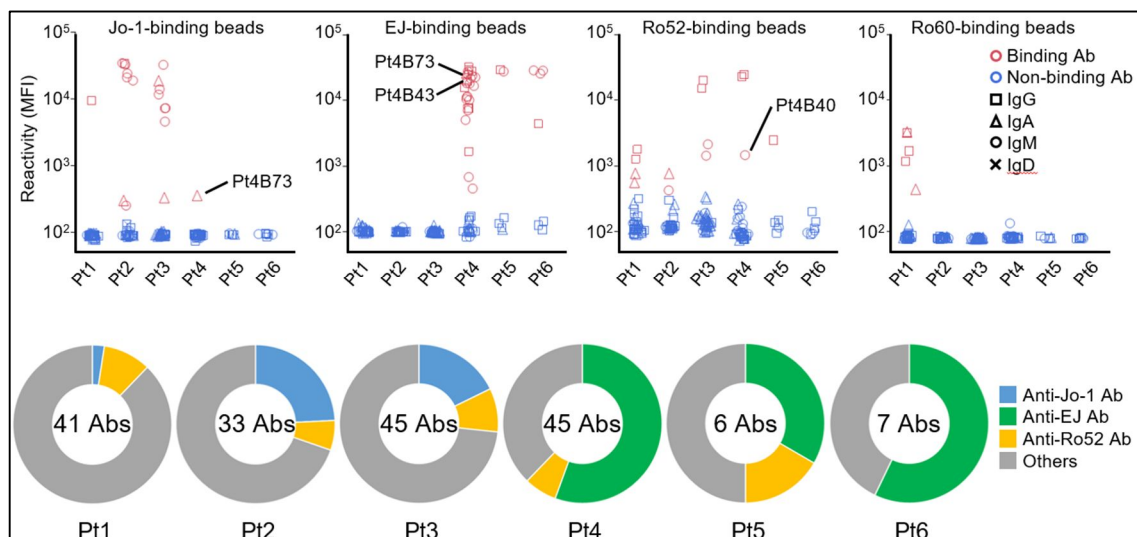


図1 血清抗Jo-1(Pt1-3)・抗EJ(Pt4-6)抗体陽性患者の病変部位の抗体の反応性

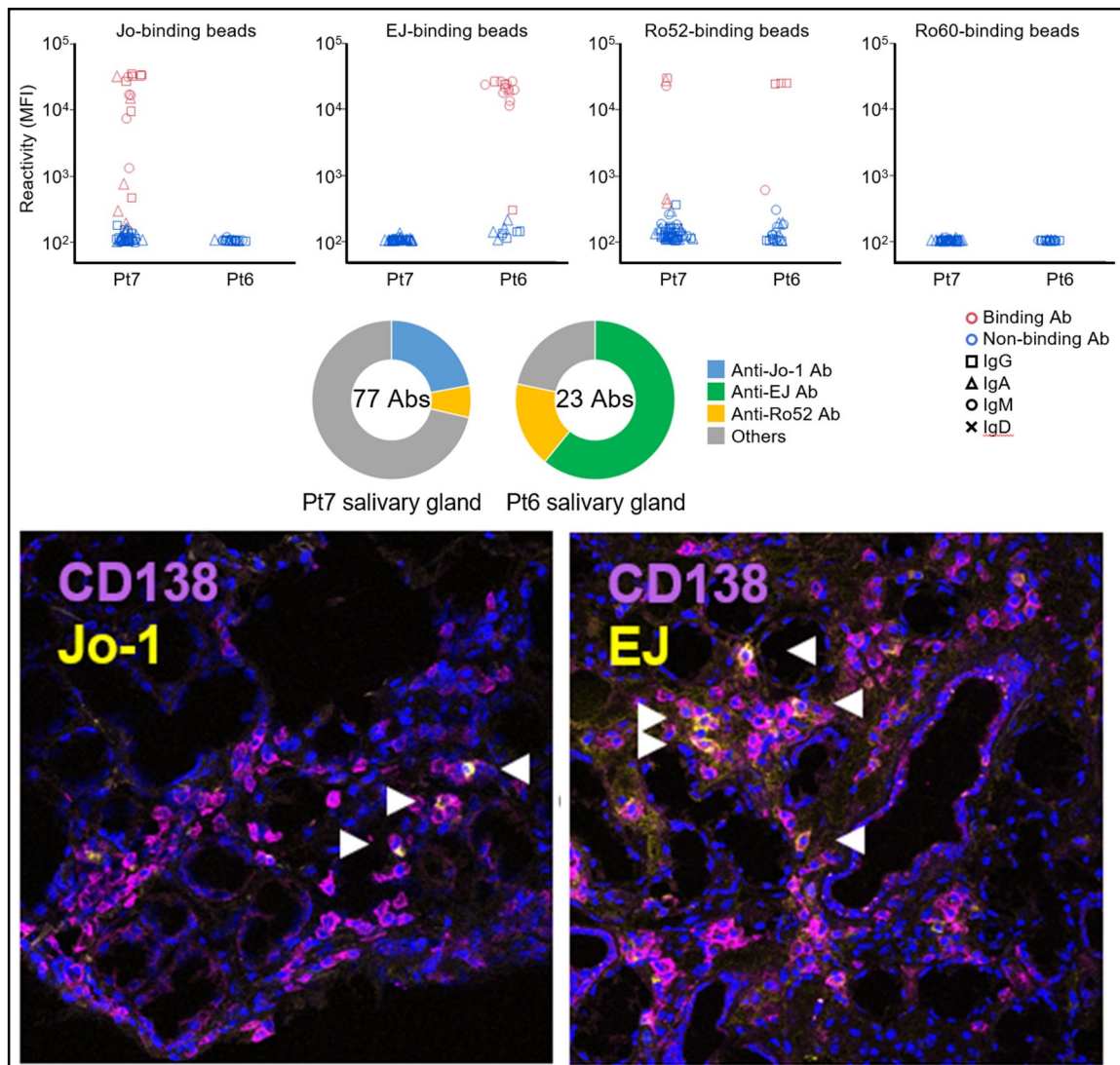


図2 血清抗 Jo-1(Pt7)・抗 EJ(Pt6)抗体陽性患者の唾液腺の抗体の反応性

症候群の病変として唾液腺にリンパ球浸潤を起こしている可能性が示唆された。

以上の結果は、病変部位に浸潤した B 細胞の主要標的が抗原特異的な自己抗体の対応抗原であることを直接的に証明し、さらに自己抗体の産生臓器の分布が自己免疫疾患における罹患臓器の分布に関して重要な知見を提供することを示唆した。

②抗 SSA 抗体陽性、および抗セントロメア抗体陽性のシェーグレン病の病変部位の遺伝子発現解析

シェーグレン病（抗 SSA 抗体陽性例 8 例、抗セントロメア抗体陽性例 4 例、両方陽性 4 例）および両方陰性の口腔乾燥症患者 8 例の唾液腺検体を収集し、シングルセル遺伝子発現・TCR/BCR レパトア同時解析を実施した。現在解析中ではあるものの、シェーグレン病で共通してクローナリティをもって拡大しているサブセットして GZMB+GNLY+CD8+T 細胞を同定し、さらにシェーグレン病の中の比較により抗セントロメア抗体陽性例の方が抗 SSA 抗体陽性例と比較して Tph 細胞や Treg 細胞を含む活性化 CD4+T 細胞が特徴的であることを明らかにした。サイトカインシグナル伝達も自己抗体プロファイルによって異なり、抗 SSA 陽性患者では活性化されたインターフェロンのシグネチャーが見られるのに対し、抗 CENT 陽性患者では TGF β シグナル伝達が亢進していた。これらの知見は病変局所で認められる自己抗体の種類と病変の特徴が連動していることを示していると考えられた。

(2)得られた成果位置づけと今後の展望

シングルセル解析・空間トランスクリプトーム解析の発展に伴い、様々な病変組織の解析結果が報告されているが、多くが細胞のサブセット変化、パスウェイの変化のみを対象としており、抗原特異性に踏み込んだ報告はほとんど認められない。少数例の抗原特異性を解析した報告はあるが、申請者のように数百という単位での報告はほぼ無く、また抗原特異性と遺伝子発現変化は多くの場合、別々の研究として行われている。現時点ではシングルセル解析等で得られる BCR/TCR の配列情報からは対応抗原の推測は不可能であり、各細胞が何に反応しているのかを調べるためにはタンパク質レベルでの実験が不可欠である。申請者らは疾患横断的に病変部位で

産生される自己抗体のプロファイルを進めており、これまでの所、ほとんどの組織でその疾患の特異抗体が産生されていることを明らかにした。さらに、同じ疾患の中でも抗体によって病態が異なることも明らかにしつつある。これらのアプローチは、病変部位で何が起きているのかといった通常のシングルセル解析・空間トランスクリプトーム解析で得られる結果が、どの様に形成されてくるのかというより上流からの病態形成に関して重要な情報をもたらす可能性がある。引き続き抗原特異性も含めた病態系プロセスを丁寧に解析することで、対応抗原の違いと病変部位のリンパ球動態の違いがどの様にリンクしているのかを明らかにし、より上流からの治療により幅広い症例で根治を目指せるよう研究を深化させたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshita Masaru, Suzuki Katsuya, Nakazawa Maho, Kamata Hirofumi, Ishii Makoto, Oyamada Yoshitaka, Oshima Hisaji, Usuda Satoshi, Tsunoda Kazuyuki, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 15
2. 論文標題 Disease-specific autoantibody production in the lungs and salivary glands of anti-synthetase syndrome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1265792
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2024.1265792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takeshita M, Inamo J, Suzuki K, Kaneko Y.
2. 発表標題 The antigen specificity of T cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome.
3. 学会等名 Gordon Research Conference 2025 Salivary Glands and Exocrine Biology（国際学会）
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 Inamo J, Takeshita M, Suzuki K, Tsunoda K, Usuda S, Kuramoto J, Moody J, Hon C-C, Ando Y, Yoshitake K, Mitsuyama S, Asakawa S, Kanai Y, Takeuchi T, Kaneko Y.
2. 発表標題 Dissection of salivary glands by single-cell analysis reveals sharedness and heterogeneity by autoantibody status in Sjogren's syndrome.
3. 学会等名 Gordon Research Conference 2025 Salivary Glands and Exocrine Biology（国際学会）
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 福井裕之、竹下勝、鈴木勝也、竹内勤、金子祐子
2. 発表標題 CyTOFを用いたシェーグレン症候群の病態を規定する末梢血細胞サブセットの探索
3. 学会等名 第11回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Masaru Takeshita, Yasushi Kondo, Yuko Kaneko.
2. 発表標題 Development of a rapid bead-based system for detecting diverse autoantibodies.
3. 学会等名 第68回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hiroyuki Fukui, Masaru Takeshita, Katsuya Suzuki, Tsutomu Takeuchi, Yuko Kaneko.
2. 発表標題 Mass cytometrical approach to reveals immune cell profiles associated with Sjogren 's syndrome
3. 学会等名 第68回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 竹下 勝、鈴木 勝也、中澤 真帆、金子 祐子
2. 発表標題 ARS抗体症候群の肺病変及び唾液腺病変における自己免疫応答の解析
3. 学会等名 第68回 日本リウマチ学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------