

ANCA 関連血管炎モデルにおける pathogenic 抗体レパトアの同定と regulatory 抗体の開発

伊勢 渉

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 分化制御研究室

【研究の背景】

ANCA 関連血管炎には、顕微鏡的多発血管炎、多発血管炎性肉芽腫症、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症が含まれるが、いずれも難病に指定されており、これら 3 つの病気による医療費受給者証交付数は、2016 年度には 1 万件を越えている。疾患が認知されてきたこともあって、患者数が高齢者を中心に急速に増えている。しかしステロイドをはじめとした非特異的かつ強力な免疫抑制剤が使用されており、より良い治療法の確立が強く求められている。

ANCA 関連血管炎においては、抗 CD20 抗体を用いた B 細胞除去療法が効果的であること、また患者において抗体産生細胞数の増加が認められることから、B 細胞が pathogenic 細胞の一つとして重要である。しかし ANCA の標的抗原である myeloperoxidase (MPO) に対する抗体価は必ずしも病態スコアと相関しないことから、病態を鋭敏に反映し、再燃を予測できるバイオマーカーの同定が求められている。

【目 的】

本研究では ANCA の標的抗原である MPO 特異的抗体レパトアから pathogenic レパトアを同定し、その腎炎誘導機序を明らかにすることを目的とした。また pathogenic 抗体に糖鎖修飾を導入することで、疾患を抑制する regulatory 抗体を開発することも目指した。

【方 法】

(1) MPO 欠損マウスを MPO で繰り返し免疫し、抗 MPO ポリクローナル IgG 抗体を得た。(2) MPO を免疫されたマウスの脾臓細胞から B 細胞ハイブリドーマを樹立し、MPO に対する結合性を ELISA や細胞内染色 (FACS) により評価することで、抗 MPO モノクローナル抗体を複数樹立した。(3) 抗 MPO ポリクローナル IgG 抗体やモノクローナル抗体を C57BL/6 マウスに投与し、血管炎 (糸球体腎炎) 誘導能を評価した。(4) レトロウイルス感染系を用いて ST6Gal1 および ST6Gal2 遺伝子を樹立した B 細胞ハイブリドーマに導入した。これにより抗 MPO モノクローナル抗体にシアル酸を付加することを試みた。

【結 果】

(1) MPO 免疫マウスの脾臓細胞から B 細胞ハイブリドーマを 100 以上樹立した。リコンビナント MPO に対する結合性を ELISA で評価し、10 個のモノクローナル抗体を得た。次に好中球の細胞内 MPO に対する結合性を FACS で検討し、3 つのモノクローナル抗体が強い結合性を示した。(2) LPS を前投与したマウスに、抗 MPO ポリクローナル IgG 抗体、あるいは抗 MPO モノクローナル IgG 抗体を投与したところ、マイルドな糸球体腎炎が観察された。(3) 抗 MPO モノクローナル IgG 抗体を産生する B 細胞ハイブリドーマに ST6Gal1 および ST6Gal2 遺伝子をレトロウイルスを用いて導入した。ST6Gal1 と ST6Gal2 を共発現する B 細胞ハイブリドーマを樹立し、現在シアル酸付加モノクローナル抗体を大量に調製しているところである。

【考 察】

抗 MPO ポリクローナル抗体の投与により糸球体腎炎が誘導できることから、pathogenic な抗 MPO 抗体が存在することは示唆されていた。本研究では MPO を免疫したマウスから初めて抗 MPO モノクローナル抗体を樹立し、単独のモノクローナル抗体で糸球体腎炎を誘導できることを示すことができた。今後はこのような pathogenic 抗 MPO 抗体のエピトープや親和性を詳細に解析することで、抗体の pathogenicity を規定する要因を明らかにしていく予定である。

また以前のコラーゲン誘導性関節炎モデルの研究において、関節炎誘導性 pathogenic モノクローナル抗体にシアル酸を付加することで、pathogenicity が減弱するだけでなく、関節炎を抑制する機能を持つようになることを示した (Ohmi, Ise et al. Nat. Commun. 2016)。ANCA 関連血管炎においても、シアル酸付加抗体が抑制性抗体として機能するのではないかと考えた。シアル酸を付加した Pathogenic 抗 MPO 抗体の準備が整ったので、今後これら抗体の pathogenicity や抑制活性を生体内で検討していく予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究には以下の臨床的意義があると考えられる。最初に ANCA 関連血管炎の新たな診断法につながる可能性である。従来のポリクローナル抗 MPO 抗体価は、臨床スコアとの相関が乏しいことが知られていた。本研究で樹立した pathogenic モノクローナル抗体のエピトープを同定することで、病態や再発を予測可能な診断法の開発が期待できる。次に、新たな抗体療法の開発へつながる可能性である。pathogenic 抗体にシアル酸を付加することで regulatory 抗体へ変換することに成功すれば、その免疫抑制機構を解明することで新たな治療ターゲットの創出につながる可能性がある。本研究成果を臨床の現場に生かすために今後一層の努力をしていくつもりである。

【参考・引用文献】

Ise W, Kurosaki T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. Immunol Rev. 2019 Mar;288(1):64-74.
Ohmi Y, Ise W, Harazono A, Takakura D, Fukuyama H, Baba Y, Narazaki M, Shoda H, Takahashi N, Ohkawa Y, Ji S, Sugiyama F, Fujio K, Kumanogoh A, Yamamoto K, Kawasaki N, Kurosaki T, Takahashi Y, Furukawa K. Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. Nat Commun. 2016 Apr 5;7:11205.