

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08392

研究課題名(和文) SLEの自己抗体産生における脾臓Marginal zone-B細胞の役割

研究課題名(英文) The role for splenic marginal zone-B cells in autoantibody production in systemic lupus erythematosus

研究代表者

町田 豪 (Machida, Takeshi)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80583632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウスの脾臓Marginal zone-B(MZ-B)細胞の役割に着目し、同マウスの自己抗体産生ならびに腎炎病態への関与を示すべく、MZ-B細胞を特異的に欠損するSLEモデル(MRL/lpr系統)マウスを作製して解析を行った。MZ-B欠損MRL/lprマウスでは、野生型と比較して、10週齢から24週齢までIgM、IgG3クラスの抗dsDNA抗体価が低値であり、全個体で腎系球体の病変が認められなかった。以上の結果から、MRL/lprマウスのMZ-B細胞は、同マウスの自己免疫性病態、特に抗dsDNA抗体産生と糸球体腎炎の病態形成に関与することが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)の病態には、自己抗体を産生するB細胞が重要な役割を担うが、感染防御などに必要なB細胞を温存しながら悪性のB細胞亜集団を抑制する治療戦略が求められている。本研究では学術的位置づけとして、SLEの自己抗体産生と腎炎病態において、末梢B細胞の亜集団の1つである脾臓Marginal zone-B(MZ-B)細胞が関与することを明確に実証した研究である。また社会的立場づけとしては、SLEの治療における免疫抑制という副作用の可能性を低減させる新たな治療戦略の標的としてMZ-B細胞の可能性を提示した研究である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine the involvement of the marginal zone-B (MZ-B) cells, which is isolated from lupus-prone mice, in autoantibody production and development of lupus-like nephritis using lupus-prone MRL/lpr mice. We generated the genetically-modified mice lacking MZ-B cells specifically, designated MZ-B-deficient MRL/lpr mice, and analyzed the mice pathophysiologically. Interestingly, the MZ-B-deficient MRL/lpr mice showed reduced levels of serum anti-dsDNA IgM and IgG3 compared to wild-type littermates, while serum anti-dsDNA IgG levels were similar in the two strains. Furthermore, all individuals of the MZ-B-deficient MRL/lpr mice did not exhibit severe glomerular lesions, while few individuals of the wild-type littermates showed glomerular inflammatory lesions. Taken together, it was strongly suggested that the MZ-B cells of lupus-prone mice are significantly involved in anti-dsDNA antibody production and development of lupus-like glomerulonephritis in lupus-prone MRL/lpr mice.

研究分野：免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス Marginal zone-B細胞 抗dsDNA抗体 糸球体腎炎 MRL/lprマウス IFN- $\gamma$  受容体 TLR7

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は、細胞の核タンパク質成分などを認識する自己抗体(抗 dsDNA 抗体、抗 Sm 抗体など)の産生を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。自己反応性 B 細胞により産生された自己抗体は、対応する自己抗原と抗原抗体複合体を形成し、全身の諸臓器へと沈着することでループ腎炎に代表される重篤な臓器障害を引き起こす。そのため、SLE の治療法の開発分野では、B 細胞関連分子を標的とする生物学的製剤の開発が進められてきた。しかし、これらの抗 B 細胞療法はいずれも有効例を一部認めるのみで、従来の免疫抑制剤やステロイド療法と比較して著明な有効性を示すものは得られていない(臨床リウマチ,28:97-105,2016)。一方、これらの抗 B 細胞療法は全 B 細胞を標的とするものであり、副作用としての免疫抑制効果に基づく感染症の発症例も一部認められた。以上より、SLE に対する有効な治療戦略を見出すためには、増悪に関わる B 細胞亜集団・特異的分子を新たに見出すことが必要であると考えられる。生体内には骨髄での初期分化から末梢リンパ組織での分化まで様々な分類の B 細胞亜集団が存在するが、SLE におけるそれらの個々の役割はほとんど解明されていない。

申請者らはこの点に着目し、SLE 様症状を自然発症するモデルである MRL/lpr マウスを用いて末梢 B 細胞亜集団の解析を行い、脾臓の CD21<sup>bright</sup>CD23<sup>-</sup> Marginal zone-B(MZ-B)細胞数の増加と、MZ-B 細胞中に抗 dsDNA 抗体産生能を持つ細胞が高頻度に出現することを見出した(Machida et al. Eur J Immunol, 46:935,2016)。SLE モデルマウスを用いた研究で、MZ-B 細胞の関与の可能性が少数ながら報告されているが(Eur J Immunol,30:356-365,2000; BMC Immunol,12:7,2011)、いずれもその関与または非関与を直接的に実証した研究ではなく、MZ-B 細胞の関与については未だ明確に定義されていない。

また、申請者らは、SLE モデルマウスの MZ-B 細胞では、非自己免疫性マウス系統と比較して、MZ-B 細胞上の IFN- 受容体 鎖(IFNGR1)の発現量が有意に高値であることを見出した。IFNGR1 は SLE モデルマウスの自己抗体産生および腎炎病態に強く関与することが知られており、欠損マウスではそれらの病態スコアが著明に低下する(J Immunol,158:5484-5491,1997; J Immunol,160:3713-3718,1998)。また、リガンドとなる IFN- はヒト SLE 患者の血中において高値を示すことが知られている(J Clin Immunol,13:58-67,1993; Arthritis Rheum,42:1644-1648,1999)。以上のことより、IFNGR1 欠損 SLE モデルマウスで見られる自己抗体値低下と腎炎病態軽減に、SLE モデルマウスで見られる MZ-B 細胞上の IFNGR1 高発現が関与している可能性を独自に見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、MZ-B 細胞を選択的に欠損する Mb1-Cre Notch2-flox コンディショナルノックアウト MRL/lpr マウスを作製し、MZ-B 細胞の病態形成への関与を実証することを目的とした。

また、自然免疫様の役割を持つとされる MZ-B 細胞は、SLE 病態に関与する TLR7、TLR9 を高発現している。TLR7/9 の SLE への関与は、形質細胞様樹状細胞における高発現が重要であると強く考えられているが、MZ-B 細胞を含む B 細胞での発現の重要性については明らかにされていない。本研究では、本 SLE 様病態における MZ-B 細胞内の TLR7、TLR9 高発現の役割と、そこに IFN- シグナルが関与するかどうかも検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1)使用マウス

MRL/MpJ-Fas<sup>lpr/lpr</sup>(MRL/lpr)マウス(Stock No. 000485)は、米国ジャクソン研究所から購入して用いた。IFNGR1-KO マウス(Stock No. 003288、ジャクソン研究所)、Mb1-Cre(PNAS,103:13789-13794,2006) C57BL/6 マウス、ならびに Notch2-flox(Immunity,18:675-685,2003) C57BL/6 マウスを MRL/lpr マウスに戻し交配することで、IFNGR1-KO MRL/lpr マウスならびに Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスを作製した。

#### (2)フローサイトメトリー

野生型、Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスから脾臓を採取して脾細胞を調製し、各種蛍光標識抗体を用いて BD FACSCantoII フローサイトメーターで解析した。

FACS Aria II フローサイトメーターを用いて、マウス脾臓から MZ-B 細胞、Follicular-B(F0-B)細胞を分離した。

#### (3)細胞移入実験

IFNGR1-KO MRL/lpr マウスをレシピエントとし、野生型 MRL/lpr マウスから分離した MZ-B 細胞の移入実験を行った。レシピエントマウスは、移入前に 400 mg/kg 体重のシクロホスファミドを腹腔内投与し、48 時間後に尾静脈注射により細胞移入を行った。

#### (4)ELISA

野生型、Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスにおいて、10 週齢から 24 週齢まで 2 週毎に採血を行い、血清を調製した。また、細胞移入後の IFNGR1-KO マウスにおいて、移入後 6 週まで 1 週毎に採血を行い、血清を調製した。これらの血清について、S1-nuclease-digested Calf thymus DNA をコートしたマイクロタイタープレートを用いて抗 dsDNA 抗体価を検出した。また、検出抗体には抗マウス総 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA 抗体を用い、各種アイソタイプの抗 dsDNA 抗体価を測定した。

野生型、Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスにおいて、12 週齢から 24 週齢まで 2 週毎に 1 日尿を行い、サンドイッチ ELISA 法にて尿中のアルブミン量を測定した。1 日あたりの尿量に換算することで、尿中アルブミン排泄量を mg アルブミン/day/mouse として算出した。

#### (5)腎の病理組織学的評価

24 週齢でマウスの腎臓を採取し、パラフィン切片の HE 染色を行った。また、凍結切片を作製して、抗 C1q、C3、各種 Ig アイソタイプ抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行い、顕微鏡観察した。

#### (6)細胞培養実験

野生型 MRL/lpr、IFNGR1-KO MRL/lpr、野生型 C57BL/6(非自己免疫)マウス脾細胞から分離した MZ-B 細胞、FO-B 細胞を、IFN- (IFNGR1 リガンド)、R-848(TLR7 リガンド)、CpG-ODN1826(TLR9 リガンド)存在下で培養し、培養上清中の抗 dsDNA 抗体価を ELISA で測定した。また、培養上清中の各種サイトカイン産生量を、Cytometric bead array で測定した。

## 4. 研究成果

本研究の主目的は、SLE モデルマウスの MZ-B 細胞が自己抗体産生ならびに腎炎病態に関与するかどうかを明らかにすることである。そのため、MZ-B 細胞欠損 SLE モデルマウスの解析を主軸として実験を行った。

戻し交配により作製した Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスについて、10 週齢で脾細胞を調製し、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、目的とする Mb1<sup>+/cre</sup> 且つ Notch2<sup>flox/flox</sup> の遺伝子型の個体では、MZ-B 前駆体細胞ならびに MZ-B 細胞の欠損が認められた。同マウスにおける濾胞 B 細胞、B-1 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、顆粒球、単球集団の細胞数は、同週齢の野生型と同等であった。以上の結果より、Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスは MZ-B 細胞を特異的に欠損するマウスであり、SLE に対する MZ-B 細胞の機能の解析に適切な表現型であることが実証された。

次に、Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスについて、10 週齢から 24 週齢まで 2 週毎に採血を行い、血清中の自己抗体価をモニタリングした。血清中の抗 dsDNA 抗体価を ELISA で調べた結果、抗 dsDNA 総 IgG 抗体価に差は認められなかったが、IgM クラスおよび IgG3 クラスの抗 dsDNA 抗体について、MZ-B 細胞欠損マウスで有意に低値であった。また、IgA クラスについても低値の傾向を示した。IgM クラスの自己抗体の役割については有力な証拠がないが、IgG3 クラスの自己抗体は、補体の活性化能も高く、SLE モデルマウスを用いた研究で炎症性病変の発症に重要な役割を担うことが多数報告されている。MZ-B 細胞は、本 SLE モデルマウスの病態において、IgG3 クラスの自己抗体の産生に重要な役割を担うのではないかと考えられた。

MZ-B 細胞の役割について、2 通りの実験を実施した。1 つめに、野生型 MRL/lpr マウスの MZ-B 細胞を分離し、IFNGR1 欠損 MRL/lpr マウスへの細胞移入実験を行った。その結果、MZ-B 細胞導入群にて、非細胞移入群と比較して、移入後 6 週まで抗 dsDNA IgM、IgG 抗体の有意な増加が認められた。MHC ハプロタイプ一致の観点から、非自己免疫マウス MZ-B 細胞を移入する系を実施できておらず、今後その結果と比較することで、より強い自己免疫性 MZ-B 細胞の関与を示すことができると考えられる。2 つめに、in vitro 実験での検討を行った。野生型および IFNGR1-KO MRL/lpr マウス、ならびに非自己免疫性である C57BL/6 マウスの脾臓から MZ-B 細胞、FO-B 細胞を分離し、IFN-、R-848、CpG-ODN1826 での刺激培養を行い、その培養上清における抗 dsDNA 抗体、サイトカインの産生パターンを評価した。その結果、MZ-B 細胞の培養上清において、TLR7/9 いずれの刺激によっても抗 dsDNA IgM 抗体の産生誘導と IL-10 産生誘導が認められたが、系統間での差は認められなかった。また、TLR7 刺激においては、抗 dsDNA IgG 抗体の産生誘導が認められたが、系統間での差は認められなかった。以上の結果より、MZ-B 細胞は SLE モデルマウスの自己抗体産生に関与するが、IFN- シグナルのメカニズムとは異なるメカニズムに位置する可能性が示唆された。また、B 細胞における TLR7 の発現が自己抗体産生に重要である可能性を新たに見出し、今後の研究課題を新たに提示した。

腎の病態解析として、野生型および Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスを用いて 12 週齢から 2 週毎に 24 週齢まで 1 日尿の採取を行い、尿中のアルブミン排泄量を評価した。その結果、Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスではいずれの個体もアルブミン排泄量は 0.1 mg/day/mouse 未満であり、腎炎をほとんど発症していないことが示唆された。一方、対照となる同腹仔の野生型マウスにおいてもアルブミン排泄量高値を示す個体が多く確認されなかった。24 週齢において腎を採取し、HE 染色による病理組織学的評価を行った結果、Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスでは 22 個体中で 1 個体たりとも腎系球体の炎症性病変を認めなかった。一方で、対照とな

る同腹仔の野生型マウスにおいては、同数の 22 個体中 8 個体において重度または軽度の糸球体炎症性病変を認めた。腎の尿細管間質領域については、両系統共に多くの個体で炎症性細胞の浸潤を認め、有意差は認められなかった。腎の凍結組織切片を用いて、補体 C1q、C3 の腎糸球体における沈着を評価した結果、いずれの系統においても同等の沈着が認められた。以上の結果から、MZ-B 細胞は、おそらく IgG3 クラスの自己抗体産生を担うことにより、本 SLE モデルマウスのループス様腎炎における腎糸球体病変の病態形成に強く関与することが示唆された。一方、尿細管間質領域の炎症については、申請者らが補体因子 MASP-1/3 欠損 SLE モデルマウスにおいてもそれらが間質性病変に関与していないことを示しており、自己抗体によって形成される抗原抗体複合体およびその臓器沈着に伴う補体活性化、すなわち Ⅲ型アレルギー反応の関与しない別のメカニズムに依存していることが強く示唆された。Mb1-Cre/Notch2-flox MRL/lpr マウスの腎炎病態評価においてはさらに解析を進める必要があると考えられる。

結論として、SLE モデルである MRL/lpr マウスの自己抗体産生および糸球体腎炎病態には MZ-B 細胞が関与する可能性が高いと考えられ、そのメカニズムは MZ-B 細胞における TLR7 の発現と IgG3 クラスの自己抗体産生を介するものである可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 2. Yasuharu Oguchi, Tetsuju Sekiryu, Yukinori Sugano, Akira Ojima, Tomoko Omori, Takeshi Machida, and Hideharu Sekine	4. 巻 195
2. 論文標題 Anaphylatoxin concentration in aqueous and vitreous humor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2020.108025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mika Takasumi, Tomoko Omori, Takeshi Machida, Yumi Ishida, Manabu Hayashi, Toshiyuki Suzuki, Yoshimi Homma, Yuichi Endo, Minoru Takahashi, Hiromasa Ohira, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine	4. 巻 34
2. 論文標題 A novel complement inhibitor sMAP-FH targeting both the lectin and alternative complement pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 6598-6612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201902475R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomoko Omori, Yasuharu Oguchi, Takeshi Machida, Yutaka Kato, Yumi Ishida, Akira Ojima, Kanako Itagaki, Hiroaki Shintake, Ryutaro Tomita, Akihito Kasai, Yukinori Sugano, Masashi Ogasawara, Hideharu Sekine, and Tetsuju Sekiryu	4. 巻 63
2. 論文標題 Evidence for activation of lectin and classical pathway complement components in aqueous humor of neovascular age-related macular degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmic Research	6. 最初と最後の頁 252-258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000503258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeshi Machida, Manabu Hayashi, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine	4. 巻 203
2. 論文標題 Response to comment on “Cutting Edge: Role of MASP-3 in the physiological activation of factor D of the alternative complement pathway”	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3091-3092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1901087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Manabu Hayashi, Takeshi Machida, Yumi Ishida, Yusuke Ogata, Tomoko Omori, Mika Takasumi, Yuichi Endo, Toshiyuki Suzuki, Masayuki Sekimata, Yoshimi Homma, Masahito Ikawa, Hiromasa Ohira, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine	4. 巻 203
2. 論文標題 Cutting Edge: Role of MASP-3 in the physiological activation of factor D of the alternative complement pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1411-1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Machida, Natsumi Sakamoto, Yumi Ishida, Minoru Takahashi, Teizo Fujita, and Hideharu Sekine	4. 巻 9
2. 論文標題 Essential Roles for Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease-1/3 in the Development of Lupus-Like Glomerulonephritis in MRL/lpr Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.01191	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 町田豪、関根英治
2. 発表標題 SLEモデルMRL/lprマウスの抗dsDNA抗体産生における脾臓辺縁帯B細胞の役割
3. 学会等名 Rheumatology Conference 2018
4. 発表年 2018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
---------	---------