

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591170

研究課題名（和文）自己免疫疾患における自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とした治療法の開発

研究課題名（英文）The development of new therapeutic approaches to autoantibody-producing RP105-negative B cells in autoimmune diseases

研究代表者

小荒田 秀一（KOARADA SYUICHI）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50304887

研究成果の概要：自己免疫疾患において自己抗体産生 B 細胞は病態で重要である。自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療法は有用であるが、実際の方法は確立されていない。RP105 陰性 B 細胞は、自己抗体を産生し自己免疫病態に深く関与している。同細胞を治療標的とするために特異的に発現する分子の同定を試みた。自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とすることで病的細胞に限定した効果的かつ安全な治療法が開発できると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・内科学

キーワード：(1)膠原病学

1. 研究開始当初の背景

最近、抗 CD20 抗体 (リツキシマブ) が、全身性エリテマトーデス (SLE) や関節リウマチなどの難治性自己免疫病態で高い有効性を示すことが報告され、B 細胞を標的とした治療法が有用であることが証明されている。抗 CD20 抗体による治療は、高い有効性を示すが、それでもなお、再発例や無効例も存在する。また、抗 RNP 抗体、抗 Sm 抗体、抗 SS-A 抗体などの核タンパク質に対する自己抗体が原因となっている病態には治療効果が乏しいとされている (Edwards JCW, Best Prac Reseach Rheum 2006)。CD20 は、実際の抗体産生細胞である形質細胞には発現していないことから、自己抗体産生細胞の除去が不完全である可能性もあると考えられる。また、全ての B 細胞を除去することで免疫力低下などの副作用の問題もある。自己抗体産生 B 細胞のみを標的とし、正常 B 細胞に影響を与えない治療法が理論上は最も理想的である。しかしながら、ヒトでは自己抗体産生 B 細胞に特異的な細胞表面マーカーは同定されていないため、自己抗体産生 B 細胞のみを標的とした治療法の開発は困難であった。

RP105 は、分子量 105kD の Toll like receptor (TLR) の一員で、正常の成熟 B 細胞表面に発現し、B 細胞活性化に関与している。我々は、以前、SLE などの自己免疫疾患で、RP105 分子の発現が消失した B 細胞 (RP105 陰性 B 細胞) が出現することを見出した (Koarada S. et al., Arthritis Rheum 1999) (Koarada S. et al. J Rheumatol 2005)。また、RP105 陰性 B 細胞は病因に深く関与する抗 ds-DNA 抗体を産生する自己反応性 B 細胞であることを証明した (Kikuchi Y et al. Arthritis Rheum 2002)。そこで、自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞のみに特異的に発現している分子を同定することで、自己抗体産生 B 細胞自体を標的とした治療法が樹立できると考えられる。

RP105 分子は、グラム陰性菌由来の lipopolysaccharide (LPS) を認識し、生体感染防御に関与している。RP105 分子を刺激すると、B 細胞は活性化され激しい細胞増殖がひきおこされる。RP105 刺激と抗原認識が同時に行われると B 細胞はアポトーシスに陥る。これは、過剰な免疫反応を終息させる役割があると推定される。すなわち、RP105 分子は B 細胞の生と死の制御を行っていると考えられる。また、自己抗原に対しては、RP105

分子と自己抗原刺激が同時に入ることにより、自己反応性 B 細胞の除去や自己免疫寛容に関与している可能性も考えられる。

一方で、自己免疫疾患で B 細胞上の RP105 が欠損した場合、感染症に対する B 細胞の反応が減弱し易感染性につながると考えられる。また、RP105 陰性 B 細胞が病因性自己抗原により刺激されると、RP105 が存在しないため、アポトーシスは誘導されず、自己抗原刺激によって自己反応性 B 細胞のクローン拡大が起こり、最終的に自己免疫病態につながる可能性が考えられる。

これまでの研究から、RP105 陰性 B 細胞は SLE などの自己免疫疾患で増加しており、抗 DNA 抗体をはじめとする自己抗体の産生細胞であることが示されている。また、RP105 陰性 B 細胞は、高度に活性化された B 細胞サブセット群に属していることが示唆されるが、詳細なフェノタイプ検討では、これまで知られている B 細胞サブセットのいずれにも属さない新たなサブセットを形成している。

RP105 陰性 B 細胞は、自己抗体を産生するエフェクター細胞であり、同細胞に特異的に発現する分子を標的として、自己免疫疾患の治療を行える可能性がある。

2. 研究の目的

自己免疫疾患において最近、B 細胞を標的とした治療法が有用であることが証明されている。自己免疫疾患における B 細胞異常の中でも、自己抗体産生 B 細胞は病態形成の重要な部分を占めている。したがって自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療は理論上、最も有用な方法の一つである。しかし、自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療法は未だ確立されていない。そこで、SLE などの自己免疫疾患で出現する自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的として、病的細胞に限定した有効かつ安全な治療法が開発できないかを検討する。

3. 研究の方法

①自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞特異的な新規分子の同定

自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とした細胞除去療法を考慮する場合、標的細胞に RP105 分子は発現していないため、RP105 陰性 B 細胞に特異的に発現する細胞表面分子の同定が必要となる。

そこで、RP105 陰性 B 細胞と RP105 陽性 B 細胞をセルソーターにて分離・精製した。細胞の純度を確認した後に、それぞれの細胞分画より、mRNA を抽出した。両細胞間で発現が異なる分子を DNA マイクロアレイ法にて同定した。

②自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞に特異的に発現している既知分子の解析

①の研究により得られた、既知候補分子について、解析を進めた。この際に、既知分子を標的とした治療への応用を図るとともに、自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞の誘導や活性化、維持機構の解明を試みた。この過程でも、自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞の出現や維持に重要ではあるが、必ずしも RP105 陰性 B 細胞膜上に発現していない因子や他の免疫担当細胞と相互作用を有する因子にも着目して解析を進めた。

4. 研究成果

正常の B 細胞は RP105 を発現していたが、SLE 患者では、RP105 の発現が消失 (=RP105 陰性 B 細胞) した B 細胞が出現していた (Koarada S. et al Arthritis Rheum 1999)。また、RP105 陰性 B 細胞数は SLE の疾患活動性と相関し、疾患活動性マーカーとして有用であった。RP105 陰性 B 細胞は、正常 B 細胞に比し、糖質ステロイドによるアポトーシス感受性が高かった。また、RP105 陰性 B 細胞は、抗 DNA 抗体の産生を行い、RP105 陰性 B 細胞が自己抗体産生細胞であることを報告した (Kikuchi Y. et al. Arthritis Rheum 2002)。

RP105 陰性 B 細胞が増加する自己免疫疾患は、SLE 以外に、シェーグレン症候群 (Koarada S. et al. Rheumatology 2001) および皮膚筋炎 (Kikuchi Y. et al. Ann Rheum Dis 2001) があることを示した。また、抗核抗体陰性 SLE の患者は、通常の血清学的診断が困難であるが、末梢血 RP105 陰性 B 細胞の増加がみられ、同 B 細胞の解析が診断に有用であることを報告した (Koarada S. et al. J Rheum 2005)。また、シェーグレン症候群では、唾液腺組織での RP105 陰性 B 細胞の重要性を報告した (Kikuchi Y. et al. Clin Exp Rheumatol 2008)。

同研究では、上記のように RP105 陰性 B 細胞が果たしている自己免疫疾患での役割を明確とした。その結果、RP105 陰性 B 細胞を標的とした免疫学的除去が自己免疫疾患の治療に有用であり、臨床応用へ向けた治療の可能性を示唆する成果が得ら

れた。

自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とした細胞除去療法を考慮する場合、標的細胞に RP105 分子は発現していないため、RP105 陰性 B 細胞に特異的に発現する細胞表面分子の同定が必要となる。まず、RP105 陰性 B 細胞と RP105 陽性 B 細胞をセルソーターにて分離・精製した。細胞の純度を確認した後に、それぞれの細胞分画より、mRNA を抽出した。両細胞間で発現が異なる分子を DNA マイクロアレイ法にて同定した。第一段階として、最も差のある分子の上位から 50 分子程度について検討を進め、RP105 陰性 B 細胞特異的抗原を同定した。今後、当該分子の RP105 陰性 B 細胞上での発現、構造決定などが必要となるため、抗原分子に対する特異的抗体を作成した。

同定分子の情報および作成された抗体は、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法、FACS 解析や in vitro における RP105 陰性 B 細胞の特異的除去実験への応用ができる基礎的な研究成果が得られ、今後の新規治療法の開発につながる基盤となる成果が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Koarada S, Tsuneyoshi N, Haruta Y, Tada Y, Mitamura M, Inoue H, Ohta A, Fukudome K, Nagasawa K: Effect of disease activity and corticosteroids on serum levels of soluble endothelial cell protein C receptor in patients with systemic lupus erythematosus. Mod Rheumatol. 2008 Dec 10. [Epub ahead of print]
2. Hayashi S, Tanaka M, Kobayashi H, Nakazono T, Satoh T, Fukuno Y, Aragane N, Tada Y, Koarada S, Ohta A, Nagasawa K: High-resolution computed tomography characterization of interstitial lung diseases in polymyositis /dermatomyositis. J Rheumatol 2008; 35: 260-269.
3. Kikuchi Y, Koarada S, Nakamura S, Yonemitsu N, Tada Y, Haruta Y, Morito F, Ohta A, Miyake K, Horiuchi T, Nagasawa K: Increase of

RP105-lacking activated B cells in the peripheral blood and salivary glands in patients with Sjogren's syndrome. Clin Exp Rheumatol 2008;26:5-12.

4. Tada Y, Koarada S, Morito F, Mitamura M, Inoue H, Suematsu R, Ohta A, Miyake K, Nagasawa K: Toll-like receptor homolog RP105 modulates the antigen-presenting cell function and regulates the development of collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 2008;10:R121.

5. Tada Y, Fukuoka M, Mitamura M, Koarada S, Suematsu R, Inoue H, Ohta A, Nagasawa K: Nocardiosis in adult-onset Still's disease and vasculitis syndrome. Am J Med Sci 2008; 336: 77-80.

6. Yamaguchi K, Iwakiri R, Hara M, Kikkawa A, Fujise T, Ootani H, Shimoda R, Tsunada S, Sakata H, Ushiyama O, Koarada S, Tada Y, Nagasawa K: Fujimoto K. Reflux esophagitis and helicobacter pylori infection in patients with scleroderma. Inter Med 2008;47:1555-1559.

7. 小荒田秀一, 長澤浩平: TNF阻害剤薬とメモリーB細胞機能. リウマチ科 2008;40:190-195.

8. Haruta Y, Koarada S, Tada Y, Mitamura M, Ohta A, Fukuoka M, Hayashi S, Nagasawa K: High expression of Toll-like receptor 4 on CD14+ monocytes in acute infectious diseases. Scand J Infect Dis. 2007;39(6-7):577-83.

9. 小荒田秀一, 長澤浩平: SLEの発症機序と新たな治療法の探索-SLEにおけるRP105陰性B細胞の意義. リウマチ科 (0915-227X)38: 113-120(2007.08)

[学会発表] (計20件)

1. Tada Y, Koarada S, Ohta A, Nagasawa K: American College of Rheumatology Scientific Meeting (米国リウマチ学会議) Toll-like receptor homolog RP105 attenuates the development of collagen-induced arthritis. サ

ンフランシスコ 2008/10/24-29.

2. 小荒田秀一, 菊池裕治, 多田芳史, 中村誠司, 米満伸久, 春田善男, 末松梨絵, 三田村未央, 井上久子, 大田明英, 堀内孝彦, 長澤浩平: 第17回日本シェーグレン症候群研究会 シェーグレン症候群における末梢血および唾液腺組織におけるRP105 陰性B細胞の解析. 岐阜. 2008/9/19-20. 第17回日本シェーグレン症候群研究会プログラム抄録集72.

3. 小荒田秀一, 多田芳史, 末松梨絵, 三田村未央, 井上久子, 大田明英, 長澤浩平: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウム. 関節リウマチにおけるCD4+T細胞のサイトカイン産生能と治療反応性予測. 札幌. 2008/4/20-23. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 第17回国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集503.

4. 小荒田秀一, 多田芳史, 末松梨絵, 井上久子, 三田村未央, 大田明英, 長澤浩平: 第36回日本臨床免疫学会総会. 全身性エリテマトーデス(SLE)における自己抗体産生RP105陰性B細胞のフェノタイプ解析. 東京. 2008/10/17-18. 日本臨床免疫学会誌31:302.

5. 小荒田秀一, 多田芳史, 末松梨絵, 三田村未央, 井上久子, 大田明英, 長澤浩平: 第105回日本内科学会総会. 全身性エリテマトーデス(SLE)における自己抗体産生RP105 陰性B細胞の臨床的意義. 東京. 2008/4/11-13. 日本内科学会雑誌97:216.

6. 井上久子, 末松梨絵, 三田村未央, 小荒田秀一, 多田芳史, 大田明英, 長澤浩平: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウム. 抗セントロメア抗体陽性シェーグレン症候群についての検討. 札幌. 2008/4/20-23. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集282.

7. 井上久子, 多田芳史, 小荒田秀一, 三田村未央, 末松梨絵, 大田明英, 長澤浩平: 第17回日本シェーグレン症候群研究会. 抗セントロメア抗体陽

- 性シェーグレン症候群についての検討—抗SS-A抗体陽性群と陰性群の比較. 岐阜. 2008/9/19-20. 第17回日本シェーグレン症候群研究会 プログラム抄録集 89.
8. 松浦江美, 大田明英, 末松梨絵, 三田村未央, 井上久子, 小荒田秀一, 多田芳史, 長澤浩平: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウム 強皮症患者におけるストレス適応についての基礎的研究. 札幌. 2008/4/20-23. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 407:2.
9. 三田村未央, 末松梨絵, 井上久子, 小荒田秀二, 多田芳史, 大田明英, 鐘江大, 長澤浩平: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウム. 成人スチル病患者におけるガリウムシンチグラフィー所見の検討. 札幌. 2008/4/20-23. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 421.
10. 末松梨絵, 多田芳史, 三田村未央, 井上久子, 小荒田秀一, 大田明英, 長澤浩平: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウム サイトメガロウイルス(CMV)抗原血症を呈した膠原病患者の臨床的検討. 札幌. 2008/4/20-23. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 329.
11. 多田芳史, 末松梨絵, 三田村未央, 井上久子, 小荒田秀一, 大田明英, 長澤浩平: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウム セロトニン受容体拮抗剤塩酸サルボグレラートのレイノー現象および血小板活性化に対する効果. 札幌. 2008/4/20-23. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会・第17回国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 407.
12. 小荒田秀一, 多田芳史, 末松梨絵, 三田村未央, 井上久子, 大田明英, 長澤浩平: 第36回九州リウマチ学会関節リウマチにおける生物製剤治療前の in vitro サイトカイン解析と抗TNF α 製剤の有効性との関連に関する検討. 佐賀. 2008/9/6-7. 第36回九州リウマチ学会 プログラム抄録集 40.
13. 多田芳史, 小荒田秀一, 三田村未央, 井上久子, 末松梨絵, 大田明英, 長澤浩平: 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第16回国際リウマチシンポジウム 「RP105分子のコラーゲン関節炎における作用の解析」 横浜. 2007/4/26-29. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第16回国際リウマチシンポジウム プログラム集 381.
14. 小荒田秀一, 末松梨絵, 三田村未央, 井上久子, 多田芳史, 大田明英, 長澤浩平: SLEにおけるステロイド投与が血管内皮機能に与える影響—ステロイド投与による可溶性内皮プロテインC受容体(sEPCR)の変動に関する検討. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第16回国際リウマチシンポジウム. 横浜. 2007/4/26-29. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第16回国際リウマチシンポジウム プログラム集 256.
15. 三田村未央, 末松梨絵, 井上久子, 小荒田秀二, 多田芳史, 大田明英, 長澤浩平, 鐘江大: 成人スチル病(AOSD)30例の治療についての検討: 特にシクロスポリンA(CyA)の有効性について. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第16回国際リウマチシンポジウム. 横浜. 2007/4/26-29. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第16回国際リウマチシンポジウム プログラム集 336.
16. 長澤浩平, 小荒田秀一, 堀内孝彦, 末松栄一: ワルファリンとスタチンによるステロイド性大腿骨頭壊死の予防研究. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業平成19年度第一回班会議研究成果報告会. 京都. 2007/7/7. 平成19年度第一回班会議研究成果報告会プログラム集 7.
17. 多田芳史, 小荒田秀一, 大田明英, 長澤浩平: Toll-like レセプターホモログRP105はコラーゲン関節炎の発症を抑制する. 第37回日本免疫学会総会・学術集会. 東京. 2007/11/20-22. 第37回日本免疫学会総会・学術集会抄録集 133.
18. 長澤浩平, 小荒田秀一: 自己免疫疾患におけ

る自己抗体産生B細胞を標的とした治療の開発.
厚生労働省免疫アレルギー疾患予防・治療事業,
免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療
に関する研究. 東京. 2007/12/6.

19. Tadano RS, Ohta A, Morito F, Mitamura M,
Haruta Y, Koarada S, Tada Y, Nagasawa K:
Anti-fibrotic effects of hepatocyte growth
factor on scleroderma fibroblasts and analysis
of its mechanism. Professor Leroy EC Memorial
International Workshop on Scleroderma. Tokyo
2007/5/18～5/20.

20. 小荒田秀一, 三田村未央, 末松梨絵, 井上久
子, 多田芳史, 大田明英, 長澤浩平: SLEにおける
CD4+T細胞の細胞分裂とTh1/Th2 サイトカインバラ
ンスの関係の検討. 第 30 回日本臨床免疫学会.
大阪. 2007/10/19～20. 日本臨床免疫学会会誌
30: 318.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小荒田秀一 (KOARADA SYUICHI)

(佐賀大学医学部・助教) 研究者番号 : 50304887

(2) 研究分担者

多田芳史 (TADA YOSHIFUMI)

(佐賀大学医学部・講師) 70284627

長澤浩平 (NAGASAWA KOHEI)

(佐賀大学医学部・教授) 00108721