

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17916

研究課題名(和文) シェーグレン症候群患者B細胞亜群に特化した治療標的分子の探索

研究課題名(英文) The exploration of therapeutic target molecules for Sjogrens syndrome focusing on B cell subsets

研究代表者

武井 江梨子 (Takei, Eriko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40594643

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)：本研究は指定難病であるシェーグレン症候群(SS)のB細胞の機能亢進について、CD38highIgD+B細胞に焦点をおき、in vitroでの患者細胞の刺激培養やモデルマウスを用いた細胞の分化やそれに関わる分子発現を検証し、新規治療標的を見出すことを目的としている。本研究では患者末梢血CD38highIgD+B細胞の特徴付けと抗体産生能との相関および自己抗体産生モデルマウスにおけるCD38highIgD+B細胞の推移と自己抗体産生が関与することを見出した。これらの結果はCD38highIgD+B細胞から抗体を産生する形質細胞への分化の制御が新規治療法につながる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は指定難病であるシェーグレン症候群(SS)の病態の中心を担うB細胞の機能亢進について、CD38highIgD+B細胞に焦点をおいてその機序を明らかにすることを目的としている。SSは、慢性唾液腺炎や乾燥性角結膜炎に加えて全身性に多彩な病態を合併し、患者のQOLは生涯に渡り著しく害されるが、病態形成のメカニズムが不明であるため病態に沿った根治薬は存在しない。本研究はB細胞の亜群に焦点を絞っており、基礎研究として極めて独創性、新規性が高く、研究成果は根治薬のない免疫難病領域に有効性の高い新規治療薬を提供するというアンメットメディカルニーズに応えることを可能とし、社会的な貢献度も高い。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to demonstrate the possible involvement of CD38highIgD+B cells in the pathogenesis of Sjogren's syndrome (SS) by characterization of the cells from patients and autoimmune model mice, and consequently search novel therapeutic targets to treat SS. We found that expression levels of BAFF receptor (BR3) and IL-6 receptor were elevated in CD38highIgD+B cells of patients and that IgG production by SS B cells was enhanced upon the stimulation including BAFF as compared with healthy controls. In addition, proportion of CD38+IgD+ cells was decreased in splenocytes of MRL/lpr mice, autoimmune model mice, while the proportion of CD38+IgD- B cells and titer of anti-dsDNA antibody were increased with the progression of the disease. Our results indicate that CD38highIgD+ B cells highly react to BAFF and differentiate plasma cells to produce IgG and the pathways of differentiation of plasma cells from CD38highIgD+ B cells are promising therapeutic targets to treat SS.

研究分野：内科膠原病学 臨床免疫学

キーワード：シェーグレン症候群 B細胞 自己抗体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群(SS)は自己免疫疾患の一種で、厚生労働省により指定難病と定められている。SSの主な症状は、慢性唾液腺炎や乾燥性角結膜炎であるが、関節炎、慢性甲状腺炎、間質性肺炎など全身性に多彩な病態を合併する。これらの症状は患者のQOLを生涯に渡り著しく害するが、治療は対症療法に限られており、病態形成のメカニズムが不明であるため病態に沿った根治薬は存在せず、SSは代表的なアンメット・メディカルニーズのある疾患である。これまでの研究では、SSの病態にはB細胞の活性化による機能亢進が強く関与していると考えられている。実際にSS患者末梢血では、免疫グロブリン、抗SSA/SSB抗体などの自己抗体の血中濃度が高いことが報告されており、B細胞の機能亢進を制御できれば、SSの根治療法につながる可能性がある。研究代表者らのこれまでの研究において、SS患者末梢CD19+B細胞中のCD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞群の割合が健常人と比較して有意に高く、このB細胞分画の割合と血清IgG量、抗SSA/SSB抗体価、疾患活動性(ESSDAI: EULAR Primary Sjögren's syndrome disease activity index)とが有意な相関を示すことを証明した(図1、図2; Ishioka-Takei E. et al., Clin Immunol 187:85-91, 2018)。

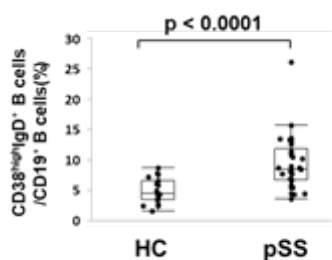


図1. CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞群の割合の比較

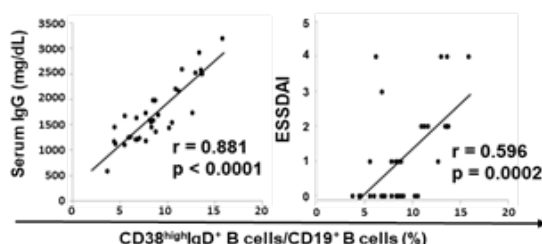


図2. CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞群の割合と臨床指標との相関

そして、pSS患者末梢CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞の割合は関節リウマチ患者や全身性エリテマトーデス患者と比較しても有意に高く(Tasaki S., Nature Comm 9:2755, 2018)、この特定のB細胞亜群がSS病態において重要な役割を担っている可能性が示された。これらの知見を総合すると、末梢CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞分画の増加はSSで特徴的にみられる免疫細胞サブセットの偏位であり、このB細胞亜群がSS病態において重要な役割を担っていると考えられる。そこで研究代表者らは、活性化されたCD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞は、唾液腺及び涙腺などの異所性胚中心へ浸潤し、形質細胞へ分化してIgG産生亢進へ寄与しているという独自の仮説を立てた(図3)。この機序の解明は病態形成機序に基づく有効性の高い治療法の開発につながると考えられる。

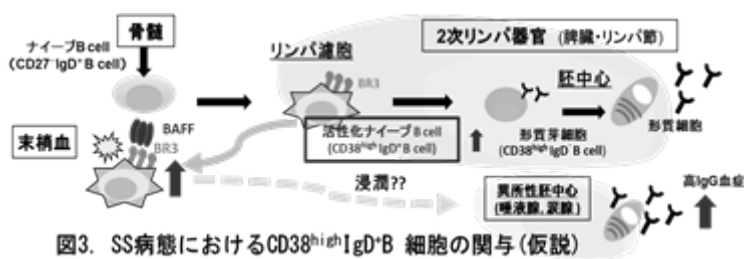


図3. SS病態におけるCD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞の関与(仮説)

### 2. 研究の目的

本研究は国の定める指定難病であるシェーグレン症候群(SS)の病態の中心を担うB細胞の亜群であるCD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞に焦点をあて、細胞の機能とSS病態における役割の詳細を明らかにし、そこに発現される分子の新規治療標的の探索を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)SS患者および健常人末梢血でのCD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞の特徴に関する検討

SS患者および健常人末梢血におけるCD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>細胞でのBAFF受容体(BR3)およびIL-6受容体(CD126)発現について、末梢血を用いたFACS法により解析した。解析にはVioBlue標識抗ヒトCD19抗体、FITC標識抗ヒトIgD抗体、PE標識抗ヒトBR3抗体、PE標識抗ヒトCD126抗体、PerCP-Cy5.5標識CD38抗体を用いた。

(2)SS患者および健常人末梢血B細胞からのIgG産生量の比較

SS患者および健常人末梢血単核球(PBMC)に対し、抗IgM抗体、抗CD40抗体、rhBAFF(recombinant human BAFF)、rhIL-21(recombinant human IL-21)による刺激を加え、96ウェル培養プレートにて7日間培養した。培養上清中のIgG量についてELISA法を用いて定量した。

(3)SS患者および健常人末梢血B細胞におけるクラススイッチ関連遺伝子発現

SS患者および健常人末梢血単核球(PBMC)に対し、抗IgM抗体、抗CD40抗体、rhBAFF(recombinant human BAFF)、rhIL-21(recombinant human IL-21)による刺激を加え、細胞におけるAICDA(Activation Induced Cytidine Deaminase)発現について定量PCR法を用いて解析した。

(4)自己抗体産生病態モデルマウスにおけるCD38<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>細胞の推移

自己抗体産生病態モデルとして MRL/lpr マウスおよび健常マウスとして使用した BALB/c より脾臓リンパ球を分離し、週齢に伴う脾臓 B 細胞での CD38+IgD+細胞群および CD38+IgD-細胞群の推移について FACS 法を用いて解析した。

解析には VioBlue 標識抗マウス CD138 抗体、FITC 標識抗マウス CD19 抗体、PerCP-Cy5.5 標識抗マウス IgD 抗体、APC 標識抗マウス CD38 抗体、APC-Cy7 標識抗マウス B220 抗体を用いた。

(5)免疫抑制剤投与自己抗体産生病態モデルマウスでの B 細胞解析

自己抗体産生病態モデルマウスである MRL/lpr マウスに対し、シクロホスファミド 50mg/kg で腹腔内投与 (3 回/週) を実施した。投与開始 9 週齢より 24 週間投与し、試験終了後に脾臓リンパ球の細胞分布について FACS 法を用いて解析した。CD38+IgD+B 細胞を活性化 B 細胞、CD38+IgD-細胞を形質芽細胞と形質細胞の総和と定義した。また経時的に尾採血より得た血清を使用して血清中抗 dsDNA 抗体について ELISA 法を用いて定量した。

#### 4. 研究成果

(1)SS 患者および健常人末梢血での CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup> B 細胞の BR3 および CD126 (IL-6R) 発現について末梢血を用いた FACS 解析により検討した。この結果、CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup> B 細胞における BR3 発現は SS 患者において発現が高い傾向にあり、さらに B 細胞の分化に重要な役割を果たす IL-6 受容体 (CD126) は有意な発現亢進が認められた (図 4)。これらの結果より、SS 患者で有意に増加している CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup> B 細胞は BAFF や IL-6 など B 細胞の分化増殖に関わるサイトカイン刺激の受容性が高い可能性が示唆された。

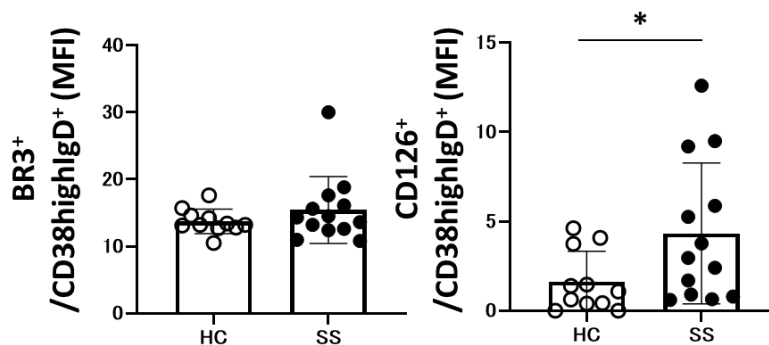


図4：末梢血CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>細胞におけるBR3およびCD126発現

(2)SS 患者および健常人末梢血単核球に対し、B 細胞に特化した刺激 (抗 IgM 抗体、抗 CD40 抗体、rhBAFF、rhIL-21) を加え、細胞からの IgG 産生を検討したところ、患者細胞からの IgG 産生は健常人と比較して有意に高値であることが明らかとなった (図 5)。

(3)B 細胞に特化した刺激を受けた SS 患者および健常人末梢血 B 細胞におけるクラススイッチ関連遺伝子 AICDA (Activation Induced Cytidine Deaminase) 発現について定量 PCR 法を用いて刺激による発現の変化を検討した。この結果、患者細胞での AICDA 発現が有意に亢進していることが明らかとなった (図 6)。これらの結果をまとめると、SS 患者では CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup> B 細胞が増加しており、これらの細胞は刺激を受けることによりクラススイッチ関連遺伝子の発現や IgG 産生機能を亢進する可能性が考えられる。

(4)自己抗体産生時における生体内での CD38+IgD+細胞の推移について自己抗体産生病態モデルマウス (MRL/lpr) を用いて検討した。MRL/lpr マウスは Fas/FasL 経路の欠損により、異常なり

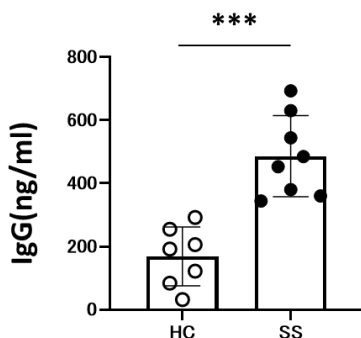


図5：刺激を受けた末梢血B細胞からのIgG産生

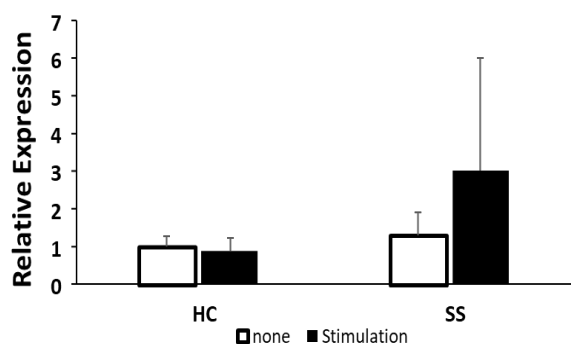


図6：刺激を受けた末梢血B細胞でのAICDA発現

ンパ球の増殖および  
週齢経過に伴う自己  
抗体価(抗 dsDNA 抗  
抗体価)の上昇が認め  
られる自己免疫疾患  
の自然発症病態モデ  
ルマウスとして知ら  
れている。MRL/lpr お  
よび BALB/c より 11、  
16、22 週齢時の脾臓  
よりリンパ球を分離

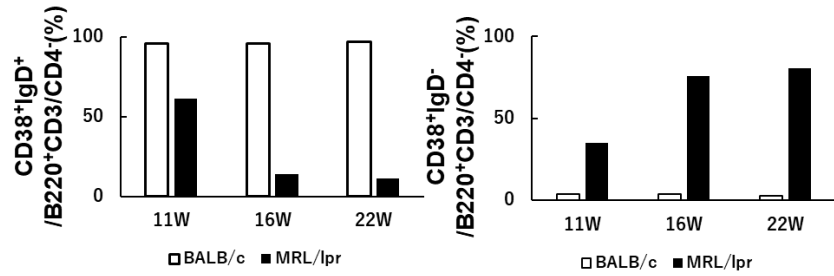


図7：MRL/lprおよびBALB/c脾臓リンパ球におけるCD38<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>細胞とCD38<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>細胞の推移

し、FACS 法により CD38+IgD+細胞と CD38+IgD-細胞(形質芽細胞+形質細胞)の推移を検討したところ、図7に示すように週齢に伴い CD38+IgD+細胞の減少と CD38+IgD-細胞の増加を認めた。これらに加えて 7、11、16 週齢での血清中抗 dsDNA 抗体価を測定したところ、週齢に伴う顕著な抗 dsDNA 抗体価の上昇が認められた(図8)。このことは CD38+IgD+細胞が CD38+IgD-細胞へと分化し、形質細胞の増加により抗体産量が増加したと考えられる。

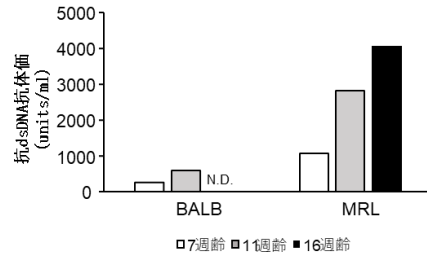


図8：MRL/lprおよびBALB/cマウスでの血清中抗dsDNA抗体価の推移

(5) 自己抗体産生機構における CD38+IgD+細胞の機能を検討するため、MRL/lpr マウスに免疫抑制剤として知られているシクロホスファミドを投与し

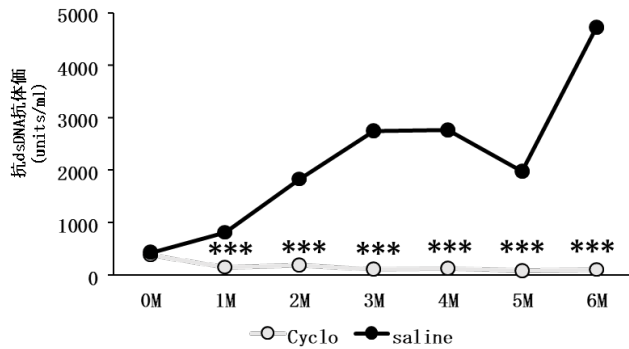


図9：シクロホスファミドのMRL/lpr血清中抗dsDNA抗体価上昇抑制効果

(50mg/kg 腹腔内投与 24 週間)、生理食塩水投与群との血清中抗 dsDNA 抗体価への影響と脾臓 B 細胞の特徴について比較検討を実施した。血清中抗 dsDNA 抗体は生食群と比較して顕著な上昇抑制を示した(図9)。さらに試験終了時のマウス脾臓 B 細胞を FACS 法を用いて解析したところ、顕著な形質細胞の減少と、CD38<sup>high</sup>細胞の増加が明らかとなった(図10)。シクロホスファミドにより形質細胞への分化が抑制され、前駆細胞が維持されていると考えられ

る。これらの結果より、形質細胞の分化を抑制することが自己抗体産生抑制につながり、CD38<sup>high</sup>細胞がその前駆細胞である可能性が示唆された。また、ヒトにおいても CD38<sup>high</sup>IgD+細胞の形質細胞への分化抑制が治療へとつながる可能性を示している。

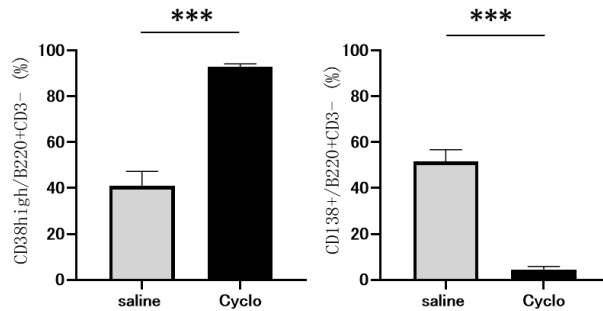


図10：シクロホスファミド投与によるCD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞の維持とCD138<sup>+</sup>(形質細胞)の減少

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 Yoshimoto Keiko, Suzuki Katsuya, Takei Eriko, Ikeda Yumi, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated expression of BAFF receptor, BR3, on monocytes correlates with B cell activation and clinical features of patients with primary Sjogren's syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-020-02249-1	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14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 吉本桂子、鈴木勝也、池田由美、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球におけるBAFFシグナルとイオンチャンネルのクロストーク機構の解析
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田由美、吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球ではTLR4シグナル経路の活性化がBAFF受容体発現亢進に寄与する
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Yumi Ikeda, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 BAFF-BAFF receptor, BR3, axis is involved in activation of monocytes via NF-κB pathways and assists B cell activation in patients with primary Sjogren's syndrome.
3. 学会等名 23rd APLAR Asia-Pacific League of Associations of Rheumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumi Ikeda, Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 Activation of signaling pathways of Toll-like receptor 4 promotes expression of BAFF receptor, BR3 in CD14+CD16+ human monocytes.
3. 学会等名 23rd APLAR Asia-Pasific League of Associations of Rheumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田由美、吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、竹内 勤、金子 祐子
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球でのBAFF受容体発現亢進におけるTLR4シグナルの関与
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Yumi Ikeda, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 Possible involvement of the voltage-gated sodium channel 1.7 in activation of BAFF signaling in monocytes of patients with primary Sjogren 's syndrome.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumi Ikeda, Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 Signaling pathways via Toll-like receptor 4 are involved in enhanced expression of BAFF receptor in CD14+CD16+ human monocytes.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本桂子、鈴木勝也、池田由美、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 シェーグレン症候群末梢血単球でのBAFF誘導IL-6産生機構におけるNav1.7チャンネルの関与
3. 学会等名 第29回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田由美、吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球でのBAFF受容体発現亢進にはTLR4シグナル経路が関与する
3. 学会等名 第29回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、池田由美、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球でのBAFF受容体発現亢進はB細胞活性化および臨床的特徴に關与する
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yumi Ikeda, Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 Signaling pathways via Toll-like receptor 4 are involved in elevated expression of BAFF receptor in monocytes.
3. 学会等名 22nd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武井江梨子、鈴木勝也、仁科 直、安岡秀剛、竹内 勤
2. 発表標題 間質性肺炎合併原発性シェーグレン症候群における臨床像の検討
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Yumi Ikeda, Eriko Takei, Tsutomu Takeuchi
2. 発表標題 ELEVATED EXPRESSION OF BAFF-RECEPTOR IN PERIPHERAL MONOCYTES PROMOTES B CELL ACTIVATION AND CORRELATES WITH CLINICAL MANIFESTATIONS OF PRIMARY Sjögren's Syndrome.
3. 学会等名 EULAR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉本桂子、鈴木勝也、武井江梨子、竹内 勤
2. 発表標題 原発性シェーグレン症候群患者末梢血単球でのBAFF受容体発現亢進とB細胞活性化の関与
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会・学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------