

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591352

研究課題名（和文）自己抗原特異的B細胞成熟分化段階におけるCD95誘導性細胞死システムの意義

研究課題名（英文）The role of CD95-induced apoptosis system in the maturation and differentiation stages of self-antigen specific B cells.

研究代表者

笠原 善仁（KASAHARA YOSHIHITO）

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：30204366

研究成果の概要（和文）：B細胞成熟発達段階でのCD95誘導性細胞死システムの機能的役割を明らかにするために、B細胞の細胞表面形質、B細胞レパートワ解析などを検討した。正常ヒトの感染症発症後4-7日後や自己免疫性疾患ではCD38陽性、IgD陰性、CD95陽性のメモリーB細胞、plasmablastと形質細胞を含むCD19陽性CD20陰性細胞の増加が認められた。自己免疫性疾患におけるB細胞発達段階でのCD95誘導性細胞死異常の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To examine the functional roles of CD95-induced apoptosis in B cell differentiation and maturation stages, B cell antigen expression and repertoire were analyzed. Increase of CD19-positive, CD20-negative cells including CD38 positive, IgD negative, CD95 positive memory B cells, plasmablast and plasma cells were found in circulation in patients with infection and autoimmune disease. These results indicated that anomaly of CD95-induced apoptosis systems in B cell maturation may relate to the pathogenesis of autoimmune disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：アポトーシス細胞死

1. 研究開始当初の背景

末梢リンパ組織にて活性化された自己抗原反応性リンパ球の排除や免疫制御を司る細胞死誘導システムの異常が自己免疫性疾患の発症病態へ関与することが指摘されて

いる。通常、成熟B細胞は種々の抗原特異的に活性化しクラススイッチし、リンパ組織においてcentroblast, centrocyte, メモリー細胞, plasma blast を経て形質細胞に分化するがCD95感受性となり、多くは細胞死により排除されるが、最終的に形質細胞

胞は骨髄に至り長期生存する。感染症やワクチンの後に plasmablast や形質細胞の一部はリンパ組織から骨髄に移動中に末梢血にも出現する (J. Immunol, 176:4042, 2006, Blood. 111:741, 2008) が、一過性のみ認められ、この過程には CD95 誘導性システムが関与することが示される (Immunity 14:181, 2001)。一方、SLE を始めとする自己免疫性疾患では持続的な活性化 B 細胞, plasmablast 形質細胞の末梢血への出現が認められる (J Immunol 165:5970, 2000, Arthr. Rheum, 58:1762, 2008)。

一方 SLE モデルマウスにおいて CD95, CD95 リガンド (CD95L) の細胞死誘導システムの破綻が見いだされ、ヒトにおいても CD95 遺伝子変異による細胞死欠損が肝脾腫、リンパ節腫大、自己免疫性血球減少、高 γ グロブリン血症等を示す自己免疫性リンパ球増殖症候群 (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: ALPS) の発症に至ること (Cell 81:935, 1995. Science 268:1347, 1995) から、自己免疫性疾患の発症における CD95 細胞死システムの関連が確認される。ALPS では著明に増加する TCR α β 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性ダブルネガティブ T 細胞が IL-10, TGF- β を強く産生し、自己抗原反応性 B 細胞がオリゴクローナルに活性化され、自己抗体産生に至ると考えられている。我々は ALPS 末梢血において同様の plasmablast や形質細胞の増加を見出し、自己抗原特異的活性化 B 細胞の抗体産生に至る成熟段階での細胞死の異常が自己免疫疾患の発症に関与する可能性が示唆される。近年遺伝子変異が見出されない III 型の ALPS 患者から CD95 遺伝子の somatic mutation (体細胞性変異) が見出され (N Engl J Med. 2004, 351:1409)、我々も難治性自己免疫性溶血性貧血の患者において CD95 遺伝子モザイク変異を見いだした。

以上より B 細胞の形質細胞までの成熟段階において CD95 システムを含む細胞死関連遺伝子の体細胞性変異が B 細胞のみ発生し、自己抗体産生から自己免疫疾患発症に至る可能性が想定される。

2. 研究の目的

感染あるいは抗原暴露後に出現するナイーブ、メモリー B 細胞や plasmablast,

形質細胞を正常なヒトと ALPS において、細胞表面形質, B細胞レパートワ解析, IgVH 鎖 CDR3 領域解析, somatic hypermutation を施行し、比較検討することで CD95/CD95L システムの B 細胞分化成熟段階での意義を明らかとすることを目的とする。さらに CD95 シグナル分子の germ line 変異を持たない自己免疫性疾患における B 細胞成熟分化段階の B 細胞分化段階の細胞亜群について同様の解析を行うとともに、細胞死誘導機構、特に CD95 シグナルの異常やシグナル分子の体細胞性変異の解析を行う。これらのことから生体内における免疫調節機構、特に未熟 B 細胞から形質細胞に至る抗体産生発達段階での CD95 誘導性細胞死システムの機能的意義と自己免疫性疾患の病態における CD95 システムの調節機構への関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) B細胞分化の程度と細胞死に関する解析

① 正常ヒトの感染症発症後あるいはワクチン接種後、ALPS, 自己免疫性疾患患者由来末梢血におけるナイーブ B 細胞, メモリー B 細胞, plasmablast, 形質細胞の細胞比率, 動態, 細胞表面形質の解析: 3-color フロウサイトメトリー法により、ナイーブ B 細胞, メモリー B 細胞, plasmablast, 形質細胞の細胞比率を CD19, CD20, CD38, IgD, CD27 を指標として解析し、その比率を検討すると共に他の抗原発現 (CD5, HLA-DR, CD95, CXCR3, CXCR4, CD21, CD31, CD138, 細胞内 IgG, A, M) の相違について解析する。

② 自然細胞死、細胞死誘導分子誘導性細胞死の解析: 無刺激あるいは CD95 抗体刺激による細胞死につき、①と同じ対象につき比較検討する。さらに CD95 誘導性細胞死や無刺激による細胞死を抑制するとされる IL-6, BAF, APRIL 添加による細胞死に対する作用の相違を検討する。

③ 各細胞亜群の無刺激状態における免疫グロブリン産性の比較: ①と同じ対象者のナイーブ B 細胞, メモリー B 細胞, plasmablast, 形質細胞における B 細胞レパートワ解析, IgVH 鎖 CDR3 領域解析, somatic hypermutation 解析を行う。

④ CD95 細胞死シグナル関連分子の遺伝子解析: 正常ヒトの感染症発症後あるいはワクチン接種後、自己免疫性疾患患者由来末梢血におけるナイーブ B 細胞, メモリー B 細胞, plasmablast, 形質細胞をそれぞれ分離し、各細胞亜群における CD95 およびシグナル分子 (FADD, caspase-8, caspase-10, caspase-3, cFLIP) について遺伝子解析を行う。

⑤ 自己免疫疾患に対する抗 CD20 抗体 (Ritu

ximab) 治療に伴う変化の解析：ヒトCD20抗原はpre B細胞の時点から発現し、成熟B細胞やmemory B細胞まで発現が認められるが、plasmablastや形質細胞に分化するとその発現が消失する。Rituximab治療は、CD20陽性悪性リンパ腫に対して開始されたが、近年では自己免疫性疾患に対してもその有効性が指摘されている。しかし、その有効性は一時的であるとの報告もあり自己抗体産生抑制に働くと考えられるが、CD20抗原陰性となったplasmablastや形質細胞には理論上細胞障害性は示さず、自己抗体産生形質細胞は残存する可能性が高く、これらの治療経過におけるplasmablastや形質細胞の変化を解析する。

4. 研究成果

正常ヒトの感染症発症後 4-7 日後にかけ、CD19 陽性 CD20 陰性の細胞亜群の増加が認められ、特に腸管感染症においてその増加が著しい傾向が認められた。この細胞亜群の細胞表面抗原発現を 3-color フローサイトメトリー法により解析すると、CD38 陽性、IgD 陰性、CD27、CD138 一部陽性であり、メモリー B 細胞、plasmablast、形質細胞を含む細胞であることが示唆された。時間経過とともにこの細胞亜群は末梢血から減少し消失することが確認され、さらに CD95 陽性であることからこの細胞亜群においては CD95 誘導性細胞死が強く関わっていることが示唆された。自己免疫性疾患患者由来末梢血においても一部の症例にて感染症の存在がないにもかかわらず、この細胞亜群の増加が確認され、B 細胞発達段階における CD95 誘導性細胞死の機能異常が存在する可能性が示唆された。

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 12 件)

1. Espinoza JL, Takami A, Yoshioka K, Nakata K, Sato T, Kasahara Y, Nakao S. Human microRNA-1245 downregulates the NKG2D receptor in NK cells and impairs NKG2D-mediated functions. *Haematologica*. 2012 Apr 4, in press (査読有)
2. Fukuda M, Nishimura R, Araki R, Kuroda R, Mase S, Nakagawa Y, Tone Y, Maeba H, Wada T, Kasahara Y, Yachie A. Monitoring of Epstein-Barr virus-infected cells by flow cytometer permits early diagnosis and evaluation of disease progression in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Rinsho Ketsueki*. 2012, (3):337-41. (査読有)
3. Sugihara S, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahara Y, Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Z, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, Amemiya S; Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT). HLA-class II and class I genotypes among Japanese children with type 1A Diabetes and their families. *Pediatr. Diabetes*, 2012 (1):33-44 (査読有)
4. M. Takagi, K Shinoda, J Piao, N Mitsuiki, M Takagi, K Matsuda, H Muramatsu, S Doisaki, M Nagasawa, T Morio, Y Kasahara, K Koike, S Kojima, A Takao, S Mizutani. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. 117(10):2887-90. 2011 (査読有)
5. M Inoue, Y Kasahara, M Akajima, T Toma, M Shimizu, S Koizumi, A, Yachie. Accelerated production of multiple cytokines and chemokines by Epstein-Barr virus-infected natural killer cells and T cells. *J. Juven Medical Soc*, 119(4):154-163, 2011. (査読有)
6. K Nomura, H Kanegane, K Otsubo, H Wakiguchi, Y Noda, Y Kasahara, T Miyawaki. Autoimmune lymphoproliferative syndrome mimicking chronic active Epstein-Barr virus infection. *Int J Hematol*, 93, 760-764, 2011. (査読有)
7. M Shimizu, T Yokoyama, K Yamada, H Kaneda, H Wada, T Wada, T Toma, K Ohta, Y Kasahara, A Yachie. Distinct cytokine profiles of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome with particular emphasis on the role of interleukin-18 in its pathogenesis. *Rheumatology*, 49(9):1645-53, 2010. (査読有)

8. Oe M, Okuwa M, Sanada H, Sugama J, Inagaki M, Kasahara Y, Tabata K, Nakagami G, Nishizawa T. :Difference of foot manifestations between young, adult, and bedridden elderly with diabetes: a cross-sectional observational study. *J. Soc. Nurs Practice* 22(1):19-27, 2010. (査読有)
 9. D. Kita, Y Hayashi, T Watanabe, A Korshunov, Von Deimling A, M Nakada, Y Kasahara, Zen Y, Hamada JI, Hayashi Y. Secondary anaplastic astrocytoma developing in a young adult with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Neuropathol Appl Neurobiol.* 10. 1111/j.1365-2990, 2010. (査読有)
 10. M Shimizu, T Yokoyama, K Yamada, H Kaneda, H Wada, T Wada, T Toma, K Ohta, Y Kasahara, A Yachie. Distinct cytokine profiles of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome with particular emphasis on the role of interleukin-18 in its pathogenesis. *Rheumatology*, 49(9):1645-53, 2010. (査読有)
 11. 河島尚志, 金兼弘和, 森雅亮, 今中啓之, 新庄正宜, 村田卓士, 笠原善仁, 谷口義弘, 杉田完爾, 宮脇利男. Hyper IgD and periodic fever syndrome in Japan. *J. Tokyo Med Univ.*, 68(2); 235-238, 2010. (査読有)
 12. Imashuku S, Azuma N, Kanegane H, Kasahara Y. M-protein-positive chronic active Epstein-Barr virus infection: features mimicking HIV-1 infection. *Int J Hematol.* 90(2):235-8, 2009. (査読有)
- [学会発表] (計10件)
1. 榊原康久, 和田泰三, 東馬智子, 谷内江昭宏, 笠原善仁, 八角高裕, 西眞範, 小原 收. 家族性血球貪食性リンパ組織球症2型の CD8+T 細胞における CD5発現低下. 第7回血球貪食症候群研究会, 2011年3月19日, ベルサール八重洲 (東京都)
 2. 佐藤 啓, 清水正樹, 上野 和之, 横山 忠史, 笠原 善仁, 谷内江昭宏. リツキシマブが有用であった難治性若年性皮膚筋炎の1例. 第20回日本小児リウマチ学会総会・学術集会, 2011年2月13日, 沖縄県市町村自治会館 (沖縄県)
 3. 和田泰三, 榊原康久, 東馬智子, 笠原善仁, 八角 高西 眞範, 小原 收, 谷内江昭宏. 家族性血球貪食性リンパ組織球症2型の CD8+T 細胞における CD5発現低下. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 平成22年度 班会議総会, 2011年1月21日, 九州大学医学部講堂 (福岡県)
 4. Kasahara Y, Nishida M, Yachie A. Analysis of cytokine, chemokine production by newly established EBV-positive NK or T cell lines. 第72回日本血液学会総会, 2010年9月25日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
 5. 川東庸子, 稲垣美智子, 多崎恵子 笠原善仁 1型糖尿病患者の血糖コントロール目標値の決め方と血糖自己測定の利用. 第81回日本糖尿病学会中部地方会, 2010年4月17日, 金沢大学医学類 (石川県)
 6. 笠原善仁, 西田巳香, 和田泰三, 岡島道子, 清水正樹, 谷内江昭宏. 慢性活動性EBV 感染症由来EBV 陽性NK/T 細胞株の特徴. 第41回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2009年11月14日, 福井市フェニックス・プラザ (福井県)
 7. 橋田暢子, 齊藤剛克, 太田邦雄, 笠原善仁, 谷内江昭宏. Danon 病の診断における, フローサイトメトリーを用いたLAMP-2 発現解析の有用性. 第51回日本先天代謝異常学会総会, 第8回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 2009年11月5日, 京王プラザホテル (東京都)
 8. 清水正樹, 梅暁子, 横山忠史, 和田泰三, 東馬智子, 笠原善仁, 谷内江昭宏. マクロファージ活性化症候群を合併した全身型若年性特発性関節炎におけるサイトカイン動態解析. 第19回日本小児リウマチ学会総会・学術集会, 2009年10月12日, 京都市サテライトパーク (京都府)
 9. 宮下健悟, 西田巳香, 岡島道子, 谷内江昭宏, 笠原善仁. 自然経過中に成長率の回復を認めたempty sella の一例. 第112回日本小児科学会学術集会, 2009年4月18日, 奈良県文化会館 (奈良県)
 10. 横山忠史, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏. 母親が未診断であった骨形成不全症V型の母子例. 第112回日本小児科学会学術集会, 2009年4月18日, 奈良県文化会館 (奈良県)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
笠原 善仁 (KASAHARA YOSHIHITO)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号: 30204366

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし