

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790828

研究課題名 (和文) 多発性硬化症の病態における B 細胞の役割の解析

研究課題名 (英文) Analyses of B cell in multiple sclerosis

研究代表者

中島 一郎 (NAKASHIMA ICHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50333810

研究成果の概要 (和文)：多発性硬化症および視神経脊髄炎の末梢血 B 細胞を IL-6、BAFF、IL-10、IL-15 などのサイトカインで刺激することによって、抗体産生細胞への分化と IgG 産生亢進が認められた。多発性硬化症の B 細胞からはオリゴクローナルバンドの生成が再現でき、視神経脊髄炎の B 細胞からは抗アкваポリン 4 抗体の産生が認められた。さらに、抗体産生に BAFF が重要な役割を担っていることが確認された。

研究成果の概要 (英文)：By stimulating with cytokines, peripheral B cells of multiple sclerosis produced oligoclonal IgG bands while B cells of neuromyelitis optica produced anti-aquaporin-4 antibodies. Serum BAFF level was indicated as an important factor for antibody production in these diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
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・神経内科学

キーワード：脳神経疾患、多発性硬化症、B 細胞

1. 研究開始当初の背景

これまでに多発性硬化症における B 細胞に関連した報告はあるものの病態解明に直接結びつくものはない。多発性硬化症の髄液あるいは病変では IgG の産生が亢進しており、髄液でオリゴクローナルバンドが陽性で、IgG インデックスが上昇する。我々は、髄液中で増加している IgG サブクラスは IgG1 であり、髄液 IL-10 濃度と IgG インデックスの相関が

認められることを報告した。多発性硬化症の病変では IgG の沈着、補体の沈着が認められ、IgG が病態に関与している可能性があるものの、特異的抗原は見出されていない。抗体を産生するプラズマブラストや形質細胞が多発性硬化症髄液中で増加しており、抗体産生が髄腔内で生じていることは明らかである。また、これらの抗体産生細胞はクローナル細胞増幅と体細胞超変異を示していることや、多

発性硬化症患者の髄膜に胚中心をもつ異所性リンパ濾胞を認めることもあることなどから、B細胞が中枢神経内の持続的な抗原刺激によって分化していることが示唆されている。しかしながら、ミエリン関連タンパク（MOGやMBPなど）に対する抗体などの自己抗体が血清あるいは髄液中に認められるという報告はあるものの、髄液中に増加しているIgGは普遍的なウイルス抗原などに非特異的な反応を示しやすいと言われている。

一方、視神経脊髄炎では、末梢血中の抗アクアポリン4抗体が病態に関与している可能性が指摘されており、抗アクアポリン4抗体の産生メカニズムの解明が治療法に繋がる可能性がある。

中枢神経内の活性化したアストロサイトがIL-6やIL-15、BAFFなどのサイトカインを産生ないし分泌すると報告されている。これらのサイトカインはリンパ球などの免疫細胞に影響を与えていると考えられる。また、活性化したミクログリアからもIL-6やTNF α 、IL-10などのサイトカインが分泌され、種々の免疫細胞に影響を与えていると考えられている。グリア細胞から分泌されるこれらのサイトカインはいずれも多発性硬化症の病変部位において産生が亢進していることが報告されており、活性化したグリア細胞由来のサイトカインが少なからず病態に関与していることが示唆される。

病変部位で増加したグリア細胞由来のサイトカインがB細胞に与える影響についてはこれまでに報告がない。B細胞は通常T細胞からのCD40を介した刺激と抗原によるB細胞受容体を介した刺激によって活性化し、抗体産生細胞へと分化するが、Toll様受容体9型（TLR9）などを介した刺激によりT細胞非依存性、抗原非依存性に活性化、増殖、抗体産生が認められると報告されている。

B細胞には、抗体産生細胞に分化して抗体を産生する働きに加え、CD80やCD86を介して他の細胞（T細胞、NK細胞など）の活性化に必要な補助シグナルを提供したり、抗原提示を行ったりしている。また、サイトカイン（ロイコトリエン、TNF α などの炎症性サイトカインやIL-10などの抑制性サイトカイン）を分泌し、他の免疫細胞の調整に働くことも報告されている(4)。こうした働きがどの程度多発性硬化症の病態に関わっているかは現在のところ、全く分かっていない。

これまでの我々の研究において健常人の末梢血B細胞をグリア細胞由来のサイトカイン（IL-6、IL-10、IL-15、BAFF）で刺激すると、T細胞非依存性、抗原非依存性に抗体産

生細胞に分化し、IgGを分泌することが分かっている。したがって、多発性硬化症や視神経脊髄炎の病変内では活性化したグリア細胞から産生されるサイトカインの刺激でT細胞非依存性、抗原非依存性にIgGを産生する機序が働いている可能性が高く、多発性硬化症の髄液中に増加しているIgGや視神経脊髄炎の病態に関わる抗アクアポリン4抗体の一部はこうして産生されたIgGの可能性が高い

2. 研究の目的

多発性硬化症および視神経脊髄炎の末梢血B細胞をin vitroの刺激培養することによってその性状を明らかにし、これら疾患におけるB細胞の役割を明らかにすることを目的とした。また、視神経脊髄炎の抗アクアポリン4抗体の産生機序を明らかにする目的で、視神経脊髄炎の末梢血B細胞からの自己抗体産生の有無を解析した。

3. 研究の方法

多発性硬化症および視神経脊髄炎の末梢血CD19陽性細胞表面上のIgG、IgM、IgD、CD5、CD27、CD38、CD40、CD38、CD72、CD80、CD86、CD267（TACI）、CD268（BAFF-R）などの抗原分子産生の陽性頻度や産生強度をフローサイトメトリー（FACSCalibur）を用いて解析し、末梢血B細胞の活性化状態を比較した。治療による影響の解析も行った。

多発性硬化症患者由来のCD19陽性細胞を96穴細胞培養プレート上に撒き、CO₂インキュベーター内で無血清培地（X-Vivo®）を用いて培養し、IL-4、IL-6、IL-10、IL-15、IL-21、BAFFなどのサイトカインのリコンビナントタンパクで刺激を行った。14日間培養後の上清を遠心フィルターを用いて濃縮し、等電点電気泳動にて電気泳動を行い、オリゴクロナルバンドの検出を行った。

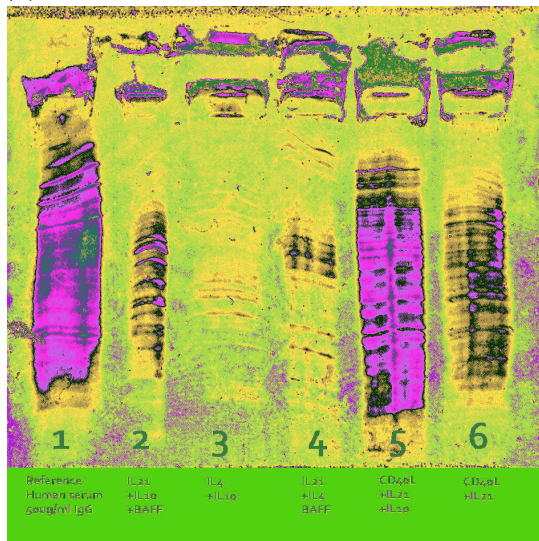
視神経脊髄炎患者由来のCD19陽性細胞を96穴細胞培養プレート上に撒き、CO₂インキュベーター内で無血清培地（X-Vivo®）を用いて培養し、IL-6、IL-10、IL-15、BAFFなどのサイトカインやCpG-ODNなどのToll様受容体リガンドのリコンビナントタンパクで刺激を行った。14日間培養後の上清を用いて抗アクアポリン4抗体の検出を間接蛍光抗体法を用いて行った。

末梢血B細胞の除去を目的としたリツキシマブ（抗CD20抗体）を投与した視神経脊髄炎患者の抗アクアポリン4抗体価と血清BAFF値を測定し、抗アクアポリン4抗体産生におけるBAFFの役割を推察した。

4. 研究成果

視神経脊髄炎の末梢血において、多発性硬化症と比較して有意な CD5 の発現亢進が認められた。CD5 は自然免疫に関わる腸管 B 細胞に主に発現している抗原で、CD5 陽性 B 細胞は B1 細胞とも呼ばれ、自己免疫疾患との関連が指摘されている。視神経脊髄炎における自己免疫異常が多発性硬化症とは異なることを示していると考えられた。また、ステロイド治療により CD5 陽性 B 細胞の割合は低下し、治療による CD5 陽性 B 細胞の減少が末梢血 B 細胞を *in vitro* で 14 日間刺激培養し、等電点電気泳動したところ、BAFF を含むサイトカイン刺激で、多発性硬化症髄液中で見られるオリゴクローナルバンドの形成が認められた (図 1)。このことから、多発性硬化症で見られる髄液オリゴクローナルバンドは、B 細胞が T 細胞非依存性、抗原非依存性にサイトカインなどの刺激によって産生した IgG によって構成されている可能性が示唆された。つまり、従来多発性硬化症の髄液中で増加している IgG はミエリンなどの傷害を引き起こす働きを持つと考えられていたが、非特異的に増加した低親和性の IgG である可能性が強く示唆された。

図 1.



視神経脊髄炎の末梢血 B 細胞を、IL-6、IL-10、IL-15、BAFF の 4 種類のサイトカインで刺激することによって、抗体産生細胞 (プラズマブラスト) への分化と、著明な IgG 産生亢進が認められた。培養上清を用いて、間接蛍光抗体法で抗アクアポリン 4 抗体を検出したところ、血清抗体価が 128 倍以上の患者 B 細胞から抗アクアポリン 4 抗体の産生が検出された。

リツキシマブの投与を受けた視神経脊髄炎では、投与直後に血清 BAFF 値の上昇に伴って抗アクアポリン 4 抗体価の一過性の上昇を認めた。リツキシマブによる急激な末梢血 B 細胞の消滅が BAFF 値の増加をもたらしたものと考えられるが、抗アクアポリン 4 抗体の産生に BAFF が重要な役割を果たしていることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Nakashima I, Takahashi T, Cree BA, Kim HJ, Suzuki C, Genain CP, Vincent T, Fujihara K, Itoyama Y, Bar-Or A. Transient increases in anti-aquaporin-4 antibody titers following rituximab treatment in neuromyelitis optica, in association with elevated serum BAFF levels. *J Clin Neurosci* (2011), doi:10.1016/j.jocn.2010.12.011 (in press) 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- 鈴木千尋、中島一郎、他. 末梢血 B 細胞培養系を用いた免疫抑制剤による自己抗体産生抑制効果の検討. 第 52 回日本神経学会、2011 年 5 月 19 日、名古屋
- 高井良樹、中島一郎、高橋利幸、三須建郎、藤原一男、糸山泰人. 視神経脊髄炎における経口ステロイド剤の再発予防効果. 第 22 回神経免疫学会、2010 年 9 月 16 日、東京
- 中島一郎、高橋利幸、クリー・ブルース、三須建郎、藤原一男、バーオール・アミット、糸山泰人. NMO の rituximab 治療における抗 AQP4 抗体価の変動と BAFF の関連について. 第 22 回神経免疫学会、2010 年 9 月 16 日、東京
- 中島一郎、他. NMO の rituximab 治療における抗 AQP4 抗体価の変動と血清 BAFF の関連について. 第 51 回日本神経学会、2010 年 5 月 20 日、東京
- Lebeurrier N, Nakashima I, et al. Influence of Glial Factors on B Cell Biology: Implication in Multiple Sclerosis Pathogenesis. 62nd annual meeting of American Academy of Neurology, 2010. 04. 13, Toronto
- Nakashima I, Takahashi T, et al. Anti-aquaporin 4 autoantibodies increase transiently after rituximab treatment in neuromyelitis optica: an association with B-cell activating factor. 25th Congress of

the European Committee for the Treatment
and Research in Multiple Sclerosis,
2009.09.10, Dusseldorf, Germany

7. Suzuki C, Nakashima I, et al.
Anti-Aquaporin-4 Antibody Production from
Peripheral B Cells in Neuromyelitis Optica.
61st annual meeting of American Academy of
Neurology, 2009.04.30, Seattle

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 一郎 (NAKASHIMA ICHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 50333810