

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07825

研究課題名(和文) 血友病Aインヒビター産生応答を制御する脾臓免疫ニッチの同定

研究課題名(英文) Identification of the splenic plasma cells niche that regulate inhibitor production in mice with hemophilia A

研究代表者

小田 朗永(Oda, Akihisa)

奈良県立医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80547703

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)：血友病A治療におけるFVIII補充療法は、約30%の重症患者で抗FVIII中和抗体(インヒビター)を発生させる。インヒビターが発生すると薬剤効果が無効化され、患者のQOLの低下に大きな影響を与える。申請者は高力価インヒビター産生の約80%が脾臓で担われており、また無脾臓症のFVIII欠損マウスではインヒビター産生が顕著に減少する事を明らかにした。さらに、IgGプラズマ細胞は脾臓の赤脾髄に確認でき、同じく赤脾髄に局在する細胞サブセットと隣接して局在していた。インヒビターを有するFVIII KOマウスの脾臓細胞を免疫不全マウスへ移植した所、IgGプラズマ細胞は再び脾臓の赤脾髄へ再配置された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血友病研究はAAVベクターを用いたFVIII長期発現を可能にする遺伝子治療、またはバイスペシフィック抗体(BsAb)薬の研究が主流となり、補充療法インヒビター産生機序の研究は下火傾向にある。理由は両研究においてインヒビター克服の可能性が示されたからであるが、遺伝子治療被験者数はまだ少数であり、BsAb抗体薬は十分な止血能を有していない事から、破綻性出血時には補充療法を必要とする場合がある。即ちインヒビター問題は未解決である。本研究は一貫してインヒビター産生応答の解明に取り組む。そして抗FVIII免疫応答プロセスを制御する脾臓免疫ニッチという視点から、新規細胞療法候補を当該研究分野へ提供する。

研究成果の概要(英文)：Hemophilia A (HA) is a hereditary bleeding disorder caused by defects in endogenous factor (F)VIII. Approximately 30% of patients with severe HA treated with FVIII develop neutralizing antibodies (inhibitors) against FVIII, which render the therapy ineffective. We observed that the enhanced inhibitor production correlates with increased FVIII specific plasma cells especially in the spleen. When splenectomized or congenitally asplenic FVIII-KO mice were treated with LPS+rFVIII, the serum inhibitor levels decreased by approximately 80%. Furthermore, the transplanted plasma cells were preferentially recruited to the spleen, where they were retained and inhibitors were produced. Interestingly, plasma cells interacted with some splenic cell subset in red pulp of spleen. Taken together, these results suggest that spleen is a critical site for the development and enhancement of FVIII-PCs.

研究分野：免疫学

キーワード：脾臓 微小環境 血友病A 抗FVIII中和抗体 インヒビター

1. 研究開始当初の背景

血友病A治療における凝固第8因子 (FVIII) 補充療法は、約30%の重症患者で抗FVIIIに対する中和抗体 (インヒビター) を発生させる。インヒビターが発生すると薬剤投与が無効化され、患者のQOLの低下、mortalityに大きな影響を与える。近年、インヒビター存在下でも止血効果を発揮するバイスペシフィック抗体・エミシズマブが開発され、血友病A治療にパラダイムシフトを起した。しかしエミシズマブの凝固活性は弱く (~15%)、抜歯や外科的手術等の強い出血にはやはりFVIII製剤が必要となる。「インヒビター」の問題は、未だに克服すべき課題である。

血友病A補充療法によるインヒビター産生応答プロセスは、1stステップ: 投与されたrFVIIIの保持と胸腺非依存性応答、2ndステップ: rFVIII特異的免疫応答の開始、3rdステップ: FVIII特異的記憶細胞・プラズマ細胞の形成とインヒビター産生に区分できる (図1)。Anti-CD11a抗体とAnti-CD49dによる辺縁帯B (MZB) 細胞除去 (Blood, 130(23):2559, 2017年) やクロドロン酸投与によるマクロファージ (MΦ) 除去 (J Thromb Haemost, 7(11)-1816, 2009年) といった抗原提示や輸送に関わる細胞群や適応免疫応答に関わる anti-CD4 抗体によるヘルパーT細胞除去 (Blood Adv, 22:3(20):3099, 2019年) によってインヒビター産生の有意な減少が示されている。この様にインヒビター産生応答に関与する細胞・バイオマーカーを同定し標的とする細胞療法への応用展開が当該分野の潮流である。3rdステップのプラズマ細胞制御法は未だ報告されていない。

2. 研究の目的

本申請研究は、インヒビター産生応答プロセスにおける脾臓微小環境 (ニッチ) の関与を細胞・分子レベルで明らかにする事を目的としている。そして脾臓ニッチからのインヒビター産生制御法の開発を目指す。

3. 研究の方法

インヒビター産生プロセスにおける脾臓微小環境の関与

FVIII欠損マウス、Tlx1欠損マウス (無脾臓症を呈する。) へのFVIII製剤またはリポポリサッカライド (LPS) 投与によるインヒビター産生誘導系を用いて、抗FVIII抗体をELISA法にて、中和活性をBethesda法を用いて決定する。各リンパ組織における抗FVIII-IgGプラズマ細胞はエリスポット法を用いて算出した。IgGプラズマ細胞は、FVIII欠損マウスの脾臓の凍結切片を作製し免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

インヒビター産生の増強機序の解析

申請者らは、リポサッカライド (LPS) を用いたインヒビター増強誘導系 (図2-A) を確立し、脾臓でのインヒビター産生細胞、即ちFVIII特異的IgGプラズマ細胞 (FVIII-PCs) の増加とインヒビター増強が正に相関する事

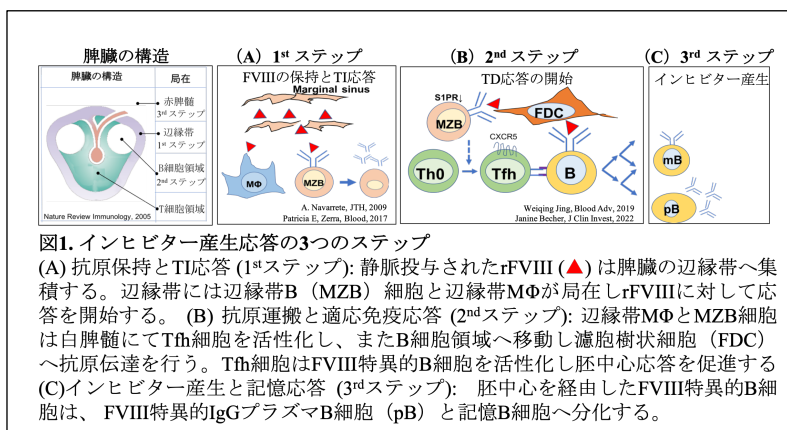


図1. インヒビター産生応答の3つのステップ (A) 抗原保持とTI応答 (1stステップ): 静脈投与されたrFVIII (▲) は脾臓の辺縁帯へ集積する。辺縁帯には辺縁帯B (MZB) 細胞と辺縁帯MΦが局在しrFVIIIに対して応答を開始する。(B) 抗原運搬と適応免疫応答 (2ndステップ): 辺縁帯MΦとMZB細胞は白脾髄にてTfh細胞を活性化し、またB細胞領域へ移動し濾胞樹状細胞 (FDC) へ抗原伝達を行う。Tfh細胞はFVIII特異的B細胞を活性化し胚中心応答を促進する (C) インヒビター産生と記憶応答 (3rdステップ): 胚中心を経由したFVIII特異的B細胞は、FVIII特異的IgGプラズマ細胞 (pB) と記憶B細胞へ分化する。

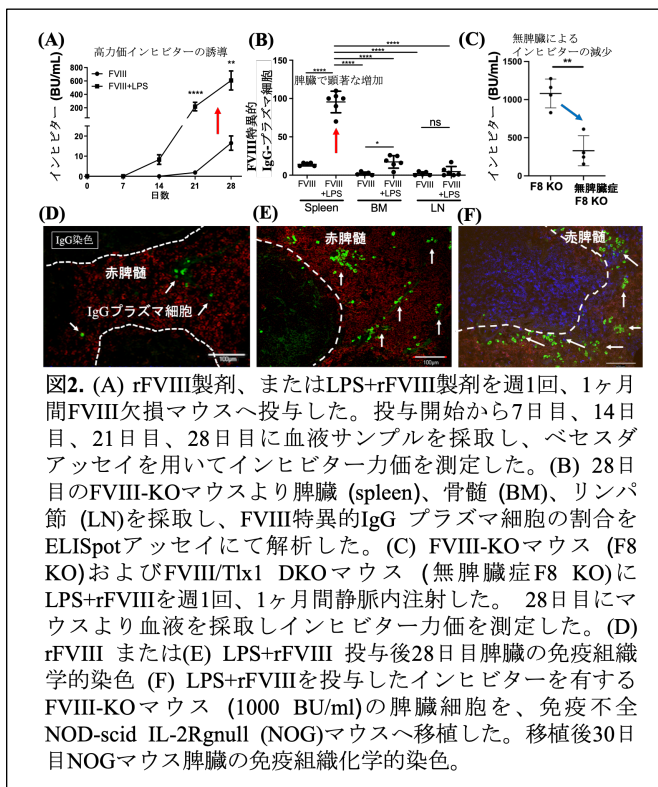


図2. (A) rFVIII製剤、またはLPS+rFVIII製剤を週1回、1ヶ月間FVIII欠損マウスへ投与した。投与開始から7日目、14日目、21日目、28日目に血液サンプルを採取し、ベセスダアッセイを用いてインヒビター力価を測定した。(B) 28日目のFVIII-KOマウスより脾臓 (spleen)、骨髄 (BM)、リンパ節 (LN) を採取し、FVIII特異的IgGプラズマ細胞の割合をELISpotアッセイにて解析した。(C) FVIII-KOマウス (F8 KO) およびFVIII/Tlx1 DKOマウス (無脾臓症 F8 KO) にLPS+rFVIIIを週1回、1ヶ月間静脈内注射した。28日目にマウスより血液を採取しインヒビター力価を測定した。(D) rFVIII または(E) LPS+rFVIII 投与後28日目脾臓の免疫組織学的染色 (F) LPS+rFVIIIを投与したインヒビターを有するFVIII-KOマウス (1000 BU/ml) の脾臓細胞を、免疫不全NOD-scid IL-2Rgnull (NOG)マウスへ移植した。移植後30日目NOGマウス脾臓の免疫組織学的染色。

(図 2-B)、逆に脾臓高出は高力価インヒビターの約80%を減少させる事を示した (図 2-C)。従って高力価インヒビターは主に脾臓で増加したFVIII-PCs によって産生される事を明らかにした。さらにPCsは脾臓赤骨髄に局在し (図 2-D)、LPS 刺激によるPCs 増殖も赤骨髄で生じていた (図 2-E)。興味深い事に、PCs を含む脾臓細胞を免疫不全レシピエントマウスへ尾静脈より移植すると、骨髄ではなく脾臓赤骨髄へ再生着した (図 2-F)。これはPCs を脾臓へリクルート・保持させる微小環境 (プラズマ細胞ニッチ) の存在可能性を示している。本成果は2022年度の日本血栓止血学会及び日本免疫学会学術集会にて報告し、2023年にThrombosis researchへ受理された。

現在、脾臓の赤骨髄に局在する細胞サブセットがインヒビター産生細胞と共局在し、インヒビター産生に関与している事を見出している (未発表)。このインヒビター産生との相互作用のメカニズムについて更に解析中である。本研究は、「プラズマ細胞ニッチとは何か?」という核心をなす学術的問いを紐解く知見に繋がるものと確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shota Sonobe, Masahiro Kitabatake, Atsushi Hara, Makiko Konda, Noriko Ouji-Sageshima, Chiyoko Terada-Ikeda, Ryutaro Furukawa, Natsuko Imakita, Akihisa Oda, Maiko Takeda, Shiki Takamura, Satoki Inoue, Steven L Kunkel, Masahiko Kawaguchi, Toshihiro Ito	4. 巻 60(1)
2. 論文標題 THE CRITICAL ROLE OF THE HISTONE MODIFICATION ENZYME SETDB2 IN THE PATHOGENESIS OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 137-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000002145.	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 Shoichiro Saito, Masahiro Kitabatake, Noriko Ouji-Sageshima, Tatsuro Ogawa, Akihisa Oda, Tomoko Nishimura, Tatsuki Nishioka, Satoki Fushimi, Atsushi Hara, Shigeyuki Shichino, Makiko Kumamoto, Shigeto Hontsu, Takeshi Kawaguchi, Satoshi Ueha, Noriyoshi Sawabata, Shigeo Muro, Kouji Matsushima, Toshihiro Ito	4. 巻 69 (3)
2. 論文標題 Angiopoietin-like 4 Is a Critical Regulator of Fibroblasts during Pulmonary Fibrosis Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 328-339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2022-03040C.	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 Akihisa Oda, Shoko Furukawa, Masahiro Kitabatake, Noriko Ouji-Sageshima, Shota Sonobe, Kaoru Horiuchi, Yuto Nakajima, Kenichi Ogiwara, Ryo Goitsuka, Midori Shima, Toshihiro Ito, Keiji Nogami	4. 巻 3848
2. 論文標題 The spleen is the major site for the development and expansion of inhibitor producing-cells in hemophilia A mice upon FVIII infusion developing high-titer inhibitor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thrombosis research	6. 最初と最後の頁 00077-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2023.03.003.	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 Yuto Nakajima, Masahiro Takeyama, Akihisa Oda, Naruto Shimonishi, Keiji Nogami	4. 巻 25; 7(8)
2. 論文標題 Factor VIII mutated with Lys1813Ala within the factor IXa-binding region enhances intrinsic coagulation potential	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood advances	6. 最初と最後の頁 1436-1445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008187.	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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小田朗永, 古川晶子, 北畠正大, 王寺典子, 高橋利一, 荻原建一, 伊藤利洋, 嶋緑倫, 野上恵嗣
2. 発表標題 Induction of anti-factor VIII immune response in hemophilia A mouse model retaining humanized immune system.
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小田朗永, 古川晶子, 北畠正大, 王寺典子, 堀内薫, 笹井香那, 下西成人, 中島由翔, 荻原建一, 武山雅博, 伊藤利洋, 嶋緑倫, 野上恵嗣
2. 発表標題 in vitro培養系による抗FVIII応答の誘導
3. 学会等名 第45回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akihisa Oda, Masahiro Kitabatake, Noriko Ouji-sageshima, Toshikazu Takahashi, Toshihiro Ito, Keiji Nogami
2. 発表標題 Generation of the novel humanized mice with hemophilia A
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小田朗永, 古川晶子, 北畠正大, 王寺典子, 高橋利一, 能村卓慈, 武山雅博, 伊藤利洋, 嶋緑倫, 野上恵嗣
2. 発表標題 ヒト化免疫血友病マウスの作製
3. 学会等名 第44回血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihisa Oda, Masahiro Kitabatake, Toshihiro Ito, Keiji Nogami
2. 発表標題 Anti-FVIII antibody secreting plasma cells persist in the spleen for extended periods of time in mice with hemophilia A after recombinant FVIII treatment.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田朗永, 中島由翔, 下西成人, 北畠正大, 伊藤利洋, 野上恵嗣
2. 発表標題 血友病Aインヒビター産生細胞の脾臓における動態
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	野上 恵嗣 (Keiji Nogami) (50326328)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究 分担者	北畠 正大 (Masahiro Kitabatake) (60457588)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	

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
---------	---------