

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08452

研究課題名（和文）B細胞遺伝子発現に基づく病原性形質芽細胞を標的としたSLEの新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapies targeting pathogenic plasmablasts in SLE based on gene expression of B cell subsets

研究代表者

藤井 博司 (Fujii, Hiroshi)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：30531321

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）：本研究の目的は、末梢血形質芽細胞におけるSLE患者と健常人間での発現変動遺伝子とB細胞培養系の発現変動遺伝子の比較に基づき、それらを標的とする薬剤を探索することにより、SLEの形質細胞を特異的に標的とする治療法の開発につなげる。病原性B細胞の特徴的な遺伝子発現を検討するためにナイーブB細胞から病原性、非病原性B細胞の誘導系の樹立を試み、各阻害剤を用いて病原性B細胞刺激系に選択的な治療法の探索を行った。In vivoのマイクロアレイでSLEの形質芽細胞に特異的に上昇が認められたCDC7の阻害薬TAK-931により病原性B細胞刺激系においてより強く抑制される傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナイーブB細胞から非病原性B細胞の誘導系の樹立を試みた。培養開始後、適切なタイミングでIL-2, IL-6, IL-10, IL-21を加えることでTLRリガンドを用いずに形質芽細胞を誘導する系を樹立することに成功した。本系を用いて各種阻害剤による分化、分裂の阻害効果を検証した。CDC7の阻害薬により病原性、非病原性B細胞刺激系において、共に形質芽細胞への分化抑制が認められ、病原性B細胞刺激系においてより強く抑制される傾向が認められた。CDC7の阻害剤がSLEの病原性B細胞特異的な治療薬になる可能性が示され、加えて本培養系が病原性B細胞特異的な薬剤のスクリーニングの系となりうる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a treatment that specifically targets the plasmablasts in systemic lupus erythematosus (SLE) by comparing the differentially expressed genes in peripheral blood plasmablasts between SLE patients and healthy individuals with those in a B-cell culture system, and by identifying drugs that target these genes. We attempted to establish induction systems for pathogenic and non-pathogenic B cells from naive B cells to examine characteristic gene expression in pathogenic B cells, and searched for selective treatments in the pathogenic B cell stimulation system using various inhibitors. In the pathogenic B cell stimulation system, the inhibitor TAK-931, which specifically targets CDC7—an enzyme that was found to be upregulated specifically in SLE plasma cells in in vivo microarray studies—showed a strong tendency to suppress differentiation to plasmablasts.

研究分野：膠原病学

キーワード：全身性エリテマトーデス 形質芽細胞

1. 研究開始当初の背景

SLE は抗 DNA 抗体をはじめとする自己抗体介在性に組織病変が引き起こされる自己免疫疾患であり、その病態には B 細胞から形質細胞への分化/活性化異常が関与している。形質芽細胞は、リンパ組織内で刺激された活性化 B 細胞と骨髄内で抗体を産生する形質細胞の間に位置づけられており、末梢血中に出現し、抗体産生能と細胞分裂能を有している。SLE 患者由来の形質芽細胞は抗 DNA 抗体産生細胞を含むことも示されており、治療標的となる可能性があるが、SLE 患者と健常人の形質芽細胞の違いについては不明な点が多い。申請者は、SLE の形質芽細胞を標的とした新規治療法を開発するために、SLE 患者と健常人由来の末梢血単核球 (PBMC)より分離した形質芽細胞の遺伝子発現の比較解析をマイクロアレイにて行った。健常人と比較し、SLE 形質芽細胞で 1452 個の遺伝子が有意に上昇していることを見出しており、SLE 患者における形質芽細胞異常、治療標的候補としての重要な知見を得ていた。なかでも CDC7 は SLE 形質芽細胞に特異的に上昇しており、病原性 B 細胞に選択性の高い治療標的となりうる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトナイーブ B 細胞から形質芽細胞へ分化する in vitro の系を樹立し、TLR リガンドを用いない刺激と TLR9 リガンドを用いた刺激により誘導された形質芽細胞について、RNA seq を施行し DEGs (differentially expressed genes) を抽出する。すでに解析済みである SLE 患者と健常人末梢血形質芽細胞における DEGs (Akita et.al. *Front Immunol*, 2021) と比較し、SLE 形質芽細胞のなかでも抗核酸抗体産生形質芽細胞を標的とする治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) ヒトナイーブ B 細胞から抗体産生細胞への in vitro 分化系の樹立

In vitro 抗 DNA 抗体産生 B 細胞刺激モデルとして、ヒトナイーブ B 細胞を末梢血より分離し、細胞分裂標識蛍光試薬 (CTV; Cell Trace Violet) で染色後に、各種サイトカインと共に 抗 IgG/IgM 抗体 (BCR を刺激)、抗 IgG/IgM 抗体 + CpG (TLR9 を刺激) で刺激後、抗 IgG/IgM 抗体 + R848 (TLR7) で刺激、抗 IgG/IgM 抗体 + CD40L で刺激した。培養開始後 7 日目で、フローサイトメリーにより細胞表面マーカー (CD27, CD38)、細胞分裂 (CTV)、細胞死 (7AAD)、IgM の発現について解析を行った。

(2) 抗体産生細胞分化における CDC7 阻害薬の効果

1 で樹立した系に、CDC7 阻害薬である TAK-931 を加え、細胞分化、細胞死について解析を行った。

(3) 細胞分裂と分化の違いによる DEG の解析

1 の系において、細胞分裂 (++)、CD27 (+) 細胞分裂 (++)、CD27 (-)、細胞分裂 (+)、CD27 (-) をフローサイトメリーにて分離し、RNA seq で遺伝子発現量の解析を行った。

4. 研究成果

(1) B 細胞分裂における TLR 刺激の共刺激分子としての役割

ナイーブ B 細胞は BCR 単独にて細胞分裂はほとんど起こらないが、CD40L、CpG、R848 を加えることにより細部分裂が誘導された (図 1)。これらのことから、B 細胞の活性化において、TLR の刺激が CD40 への刺激同様、共刺激分子として作用すること明らかになった。

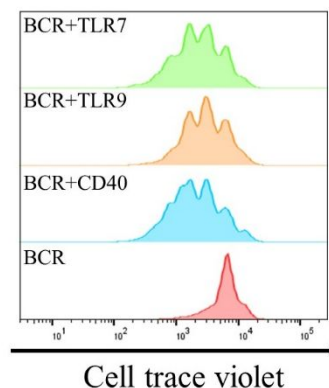


図1 In vitroでのB細胞の分裂 (day5)

(2) ナイーブ B 細胞から CD27(+)抗体産生細胞への分化系の樹立

健康人由来ナイーブ B 細胞を day0 より刺激開始し、順次サイトカインを加えていくことにより(図 2)、day7 で、7-8 回細胞分裂の後、CD27 陽性細胞に分化する細胞群が出現した(図 3)。また、これらの細胞は細胞内に IgM 発現の上昇が認められ、抗体産生細胞に分化していると考えられた(図 4)。

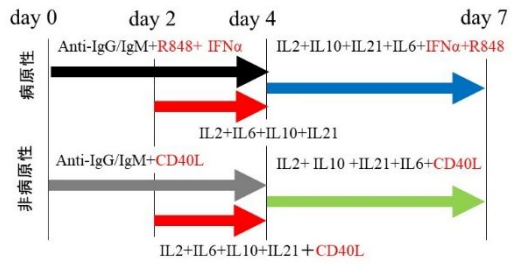


図2 ナイーブB細胞から抗体産生細胞への分化プロトコール

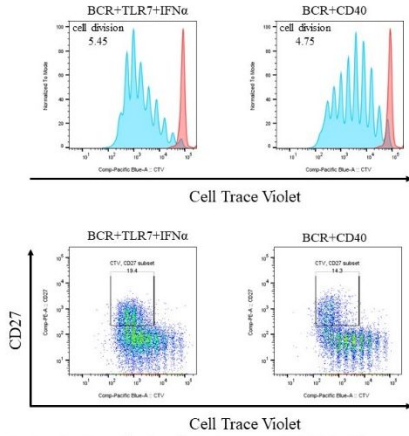


図3 ナイーブB細胞からCD27陽性細胞への分化

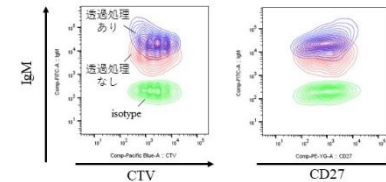


図4 ナイーブB細胞からIgM強陽性細胞への分化

(3) CDC7 阻害薬の CD27 陽性細胞への分化抑制効果

CDC7 阻害薬である TAK-931 は TLR の刺激ありの分化誘導系において、特異的に CD27 陽性細胞への分化を抑制した(図 5)。このことから CDC7 は病原性 B 細胞の分化を選択的抑制する可能性がある。

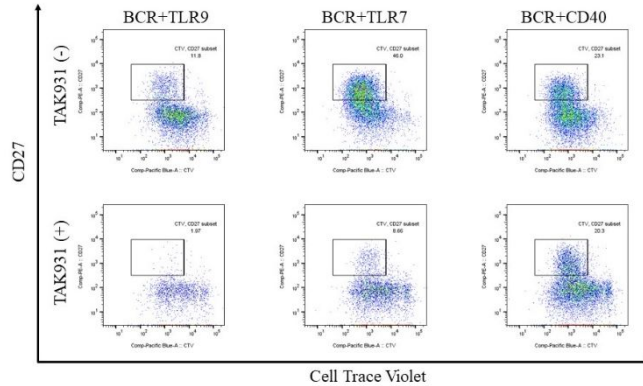


図5 CDC7阻害薬によるCD27陽性細胞への分化抑制

(4) B 細胞分裂、分化の各段階における DEGs の解析

研究方法(3)に記載した細胞分を FACS にて細胞ソーティングを行うことができた(図 6)。各々の遺伝子発現を RNA seq で解析中である。

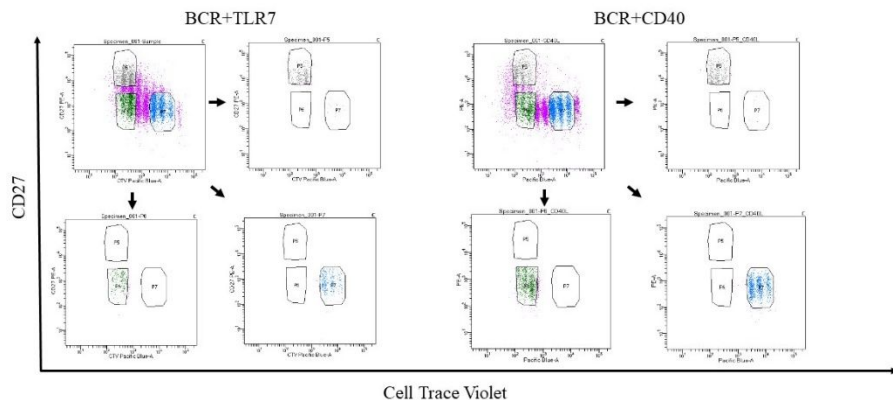


図6 細胞分裂、CD27の発現に基づく細胞ソーティング

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 Yasaka Ken, Yamazaki Tomohide, Sato Hiroko, Shirai Tsuyoshi, Cho Minkwon, Ishida Koji, Ito Koyu, Tanaka Tetsuhiro, Ogasawara Kouetsu, Harigae Hideo, Ishii Tomonori, Fujii Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Phospholipase D4 as a signature of toll-like receptor 7 or 9 signaling is expressed on blastic T-bet ⁺ B cells in systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 200-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-023-03186-5	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ken Yasaka
2. 発表標題 Phospholipase D 4 positive B cells are toll-like receptor-stimulated, potentially autoreactive, and expanded ones in systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------