

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591447

研究課題名(和文)自己免疫疾患における病原性自己抗体の産生機序の解析

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of production of pathologic autoantibodies

研究代表者

廣畑 俊成(Hirohata, Shunsei)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90189895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患における病原性自己抗体の産生機序の解析にあたって、T細胞によるB細胞の抗体産生抑制機序の解明を行った。T細胞の活性化に伴って出現するCTLA-4分子がB細胞表面に存在するCD80/CD86分子を介して抑制シグナルを伝達するのではないかと仮説を立て、その検証を試みたが、抗体による阻害実験では確証に至らなかった。

一方固相化抗CD3抗体によるT細胞依存性のB細胞活性化のシステムにおいてIgG型の自己抗体が産生されるかについて検討を行ったが、抗DNA抗体・抗Sm抗体・抗RNP抗体のいずれも検出されなかった。IgM型抗DNA抗体のIgG型へのクラススイッチの誘導も出来なかった。

研究成果の概要(英文)：In order to delineate the mechanism of polyclonal B cell activation, we first explore the mechanism of suppression of B cell by activated T cells using the system with immobilized anti-CD3. Although it was suggested that interactions between CTLA4 on T cells and CD80/86 on B cells might involve in the suppression, we could not get direct evidence.

We also examined whether IgG type autoantibodies might be produced in cultures with immobilized anti-CD3 stimulated mitomycin C-treated T cells and B cells. However, none of IgG anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP were produced. Nor could we induce class switch of IgM anti-DNA to IgG anti-DNA with monocytes or alpha-interferon.

Further studies are required to investigate the mechanism of production of IgG anti-DNA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病アレルギー内科学

キーワード：自己抗体 Bリンパ球 Tリンパ球 抗CD3抗体 クラススイッチ CTLA4 CD80 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)に代表される自己免疫疾患においては、抗 DNA 抗体や抗 ENA 抗体などの種々の自己抗体が病態に深く関与する。従って、その産生機序を明らかにすることが病因および病態の解明のため重要である。

SLE などの膠原病においては特異的な自己抗体の上昇に加えて、多クローン性の高ガンマグロブリン血症が見られることから、自己抗体の産生機序としては、多クローン性の B 細胞活性化と抗原特異的な B 細胞の活性化の機序の両者が関与すると考えられる。

坂口らにより、Fox P3 陽性 CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞が免疫抑制作用を有することが近年発見された(調節性 T 細胞; Treg)。さらに、この Treg は、IL-2 依存性にその機能を発現すること、さらに、マクロファージとの直接接触によりその抗原提示能を抑制することが明らかにされている。一方、SLE 患者では、何らかの機序で、IgM 型の抗 DNA 抗体から IgG 型の病原性の高い抗 DNA 抗体への class switch と affinity maturation が生じていると考えられるが、未だその機序は不明である。

2. 研究の目的

これらの背景にたつて、本研究では、申請者がこれまで確立してきたヒト T 細胞依存性 B 細胞活性化のシステムを用いて、自己免疫疾患の病態の根幹をなす自己抗体産生機序を解明することを試みた。具体的には T 細胞による B 細胞活性化の調節不全による多クローン性 B 細胞活性化の機序と自己抗原特異的 B 細胞活性化の機序の 2 つの側面から解析を行なった。

3. 研究の方法

(1) 固相化抗 CD3 抗体刺激 CD4 陽性 T 細胞

の抗体産生抑制の分子メカニズムの比較検討

近年、制御性 T 細胞はその CTLA4 によりマクロファージ上の CD80 を介してマクロファージの機能を抑制することが示されている。そこで、CD4 陽性 T 細胞による B 細胞の抗体産生抑制において、CTLA4-CD80(CD86)の相互作用の果たす役割を検討する。

マイトマイシン C 処理 CD4 陽性 T 細胞(T4 mito)+B 細胞にマイトマイシン C 非処理 CD4 陽性 T 細胞(T4 control)を添加して、固相化抗 CD3 抗体存在下に 10 日間培養する。ここに、抗 CTLA4 抗体を添加し、抗体産生抑制効果がいかに変化するかを検討する。

CTLA4-Ig(アバタセプト)を T4 mito +B 細胞の培養に添加し、抗体産生に対する抑制効果の有無について検討する。さらに B 細胞の DNA ポリメラーゼ の発現に及ぼす影響についてもフローサイトメトリー及び RT-PCR(いずれも現有設備)を用いて検討する。

(2) 健常人末梢血リンパ球からの IgG 型自己抗体の in vitro での誘導

健常人より採取した末梢血より磁気ビーズにて CD4 陽性 T 細胞と B 細胞を精製する。CD4 陽性 T 細胞はマイトマイシン C で処理する(T4 mito)。T4 mito と B 細胞を固相化抗 CD3 抗体存在下で 10 日間培養し、IgM 型抗 DNA 抗体、IgG 型抗 DNA 抗体の産生を ELISA にて検討する。この際、単球由来の B 細胞刺激因子である BAFF(Blys)および同一健常人ドナーから得た単球、樹状細胞を添加し、その効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 固相化抗 CD3 抗体刺激 CD4 陽性 T 細胞の抗体産生抑制の分子メカニズムの比較検討

病原性自己抗体の産生機序の解析にあたって、T 細胞による B 細胞の抗体産生抑制

機序の解明をまず行った。CTLA4-Ig であるアバタセプトが単球のアポトーシスを誘導する事を見いだした(図1)。

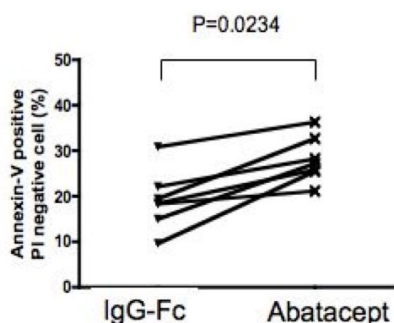


図1 アバタセプトによる活性化単球のアポトーシス誘導

以上の結果に基づき、T細胞の活性化に伴い出現するCTLA-4分子がB細胞表面に存在するCD80/CD86分子を介してアポトーシスを誘導する抑制シグナルを伝達するのではないかという仮説を立て、その検証を試みた。

検証にあたり固相化抗CD3抗体によるT細胞依存性のB細胞活性化のシステムを用いた。このシステムでは、T細胞は強力な抗体産生抑制作用を発揮して、その抑制能はT細胞をmitomycin C(MMC)で処理すると消失する。このシステムにてMMC非処理のT細胞(conT)存在下抗CTLA4抗体を添加するとIgM産生が約2倍増加した(表1)。

	IgM (ng/mL)		IgG (ng/mL)	
	MOPC	anti-CD152	MOPC	anti-CD152
	10	10	10	10
	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml
B+MMCT	15726	9142	5190	1726
B+conT	1051	1923	472	603

またT細胞をMMC処理するとIgMの産生は増加したが、その際にT細胞のCTLA4の発現も有意に低下していた。ただCTLA4/Tg融合蛋白であるアバタセプトは、末梢血B細胞をStaphylococcus aureus(SA)とIL-2にて刺激した際のIgM産生をむしろ増強した。また、MMC非処理T細胞(conT)をMMC処理T細胞(MMCT)とB細胞の培養に加えた際に見られるIgM産生抑制に対して、抗CTLA4抗体は有意な影響を及ぼさなかった(表2)。また抗CTLA4抗体は固相化抗CD3抗刺激MMC処理T細胞とB細胞の培養における免疫グロブリン産生はむしろ抑制した。

	IgM (ng/mL)		IgG (ng/mL)	
	MOPC	anti-CD152	MOPC	anti-CD152
	10	10	10	10
	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml
B50k				
+MMCT100k	8096	4208	6724	4006
+conT10k				
B50k				
+MMCT100k	1878	339	1346	615
+conT30k				
B50k				
+MMCT100k	130	59	62	0
+conT100k				
B50k	36556	21962	25112	17402
+MMCT100k				

以上の結果は、CTLA4はB細胞の活性化に対しても、また活性化B細胞の免疫グロブリン産生の抑制にも関与している可能性を示唆している。この点において、CTLA4はCD154と類似の役割を果たす可能性があると考えられる(Hirohata S: The role of CD40-CD40 ligand

interactions in suppression of human B cell responsiveness by CD4+ T cells. *Cell Immunol*, 182: 20-28, 1997). 今後は CTLA4 欠損 T 細胞などを作製して、B 細胞に対する作用を検証してゆく必要があると考えられた。

(2) 健常人末梢血リンパ球からの IgG 型自己抗体の *in vitro* での誘導

一方固相化抗 CD3 抗体による T 細胞依存性の B 細胞活性化のシステムにおいて IgG 型の自己抗体が産生されるかについて検討を行ったが、抗 DNA 抗体・抗 Sm 抗体・抗 RNP 抗体のいずれも検出されなかった。IgM 型の抗体については抗 DNA 抗体のみ検出された。抗 DNA 抗体について、その IgG 型へのクラススイッチが *in vitro* で誘導できるか検討を行ったが、マクロファージやその産生する I 型アルファインターフェロンを添加しても、免疫グロブリンの産生は増加させたものの、IgG へのクラススイッチを惹起する事が出来なかった。従って、IgG 型の自己抗体産生の惹起のメカニズムの解明に当たっては今後更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Hirohata S, Yanagida T, Tomita T, Yoshikawa H. Increased generation of pre-plasmacytoid dendritic cells in bone marrow of rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 査読有 2014 May;24(3):443-7. doi: 10.3109/14397595.2013.843759.

Kimura M, Nagai T, Matsushita R, Hashimoto A, Miyashita T, Hirohata S. Role of FK506 binding protein 5 (FKBP5) in osteoclast differentiation. *Mod*

Rheumatol. 査読有 2013 Nov;23(6):1133-9. doi: 10.1007/s10165-012-0809-4.

Hirohata S, Tomita T, Yoshikawa H, Kyogoku M. TNF inhibitors induce discoid fibrosis in the sublining layers of the synovium with degeneration of synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 査読有 2013 Oct;33(10):2473-81. doi: 10.1007/s00296-013-2743-y.

Yoshio T, Okamoto H, Hirohata S, Minota S. IgG anti-NR2 glutamate receptor autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus activate endothelial cells. *Arthritis Rheum*. 査読有 2013 Feb;65(2):457-63. doi: 10.1002/art.37745.

Hirohata S, Kikuchi H. Changes in biomarkers focused on differences in disease course or treatment in patients with neuro-Behçet's disease. *Intern Med*. 査読有 2012;51(24):3359-65. https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/51/24/51_51.8583/article

Suzuki F, Kubota T, Miyazaki Y, Ishikawa K, Ebisawa M, Hirohata S, Ogura T, Mizusawa H, Imai T, Miyasaka N, Nanki T. Serum level of soluble CX3CL1/fractalkine is elevated in patients with polymyositis and dermatomyositis, which is correlated with disease activity. *Arthritis Res Ther*. 査読有 2012 Mar 6;14(2):R48. doi: 10.1186/ar3761.

Hirohata S, Kikuchi H, Sawada T, Nagafuchi H, Kuwana M, Takeno M, Ishigatsubo Y. Clinical characteristics of neuro-Behçet's disease in Japan: a

multicenter retrospective analysis. Mod Rheumatol. 査読有 2012 Jun;22(3):405-13. doi: 10.1007/s10165-011-0533-5.

Hashimoto A, Endo H, Kondo H, Hirohata S. Clinical features of 405 Japanese patients with systemic sclerosis. Mod Rheumatol. 査読有 2012 Apr;22(2):272-9. doi: 10.1007/s10165-011-0515-7.

Hashimoto A, Tejima S, Tono T, Suzuki M, Tanaka S, Matsui T, Tohma S, Endo H, Hirohata S. Predictors of survival and causes of death in Japanese patients with systemic sclerosis. J Rheumatol. 査読有 2011 Sep;38(9):1931-9. doi: 10.3899/jrheum.100298.

Hirohata S, Nagai T, Asako K, Tomita T, Yoshikawa H. Induction of type B synoviocyte-like cells from plasmacytoid dendritic cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Clin Immunol. 査読有 2011 Sep;140(3):276-83. doi: 10.1016/j.clim.2011.04.008.

Arinuma Y, Kikuchi H, Aramaki K, Kyogoku M, Hirohata S. Histopathological analysis of cerebral hemorrhage in systemic lupus erythematosus complicated with antiphospholipid syndrome. Mod Rheumatol. 査読有 2011 Oct;21(5):509-13. doi: 10.1007/s10165-011-0420-0.

Hirohata S. Anti-ribosomal P antibodies and lupus nephritis. Clin Exp Nephrol. 査読有 2011 Aug;15(4):471-7. doi: 10.1007/s10157-011-0462-9.

[学会発表](計 13 件)

Hirohata S, Arinuma Y, Yoshio T: Blood-brain barrier damages and intrathecal synthesis of anti-NMDA

receptor NR2 antibodies in diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. 77th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, San Diego, 2013.10.28

Tono T, Arinuma Y, Nagai T, Tanaka S, Hirohata S: Differential effects of TNF inhibitors, anti-IL-6 receptor antibody and CTLA4-Ig on human monocytes. 77th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, San Diego, 2013.10.28

Nagai T, Tomita T, Yoshikawa H, Hirohata S: Enhanced expression of mRNA for triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. 77th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, San Diego, 2013.10.26

Arinuma Y, Kikuchi H, Ogawa E, Wada T, Nagai T, Tanaka S, Hirohata S: Brain MRI findings in patients with diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. FRI0327. EULAR 2013, Madrid, 2013.6.14

廣畑俊成：招請講演 5 膠原病および膠原病類縁疾患に伴う神経障害。第 110 回日本内科学会講演会（東京）2013.4.14
Hirohata S, Arinuma Y, Ogawa E: Cerebrospinal fluid IL-6 and anti-NMDA receptor NR2 antibodies as surrogate markers for CNS disease activity in SLE. 76th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Washington DC, 2012.11.14

Ogawa E, Arinuma Y, Hirohata S: Serum anti-N-methyl-D-aspartate receptor

subunit 1 antibodies are elevated in SLE. 76th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Washington DC, 2012.11.11

Hirohata S, Yoshikawa H, Yanagida T, Tomita T. Increased differentiation of pre-plasmacytoid dendritic cells in the bone marrow of rheumatoid arthritis. 15th Congress of APLAR, Dead Sea, Jordan, 2012.9.11

Hirohata S, Kikuchi H, Sawada S, Nagafuchi H, Kuwana M, Takeno M, Ishigatsubo Y: Cyclosporine-related and cyclosporine-unrelated acute neurological events in Behcet's disease. 15th International Conference on Behcet's disease. Yokohama, 2012.7.14

Kikuchi H, Kimura Y, Asako K, Takayama M, Kono H, Ono Y, Hirohata S: Infliximab therapy for Chronic progressive Neuro-Behcet's disease: A 6-year follow-up study. EULAR 2012.6. Berlin, THU212, 2012.6.14

Hirohata S, Yanagida T, Tomita T, Yoshikawa H: Enhanced expression of mRNA for interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha in CD34+ cells of the bone marrow in osteoarthritis. 75th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Chicago, Arthritis Rheum 61(Suppl.10): No.1771, 2011.11.7

Hashimoto A, Endo H, Matsui T, Tohma S, Tanaka S, Hirohata S: The risk of cancer in Japanese patients with systemic sclerosis. 75th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Chicago, 2011.11.7

Hoshi K, Tanaka S, Wada T, Tanaka J, Nagai T, Hirohata S: Retrospective

analysis of the efficacy and tacrolimus in rheumatoid arthritis: suggestive synergistic effects with methotrexate. 75th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, Chicago, 2011.11.6

〔図書〕(計3件)

Hirohata S: Neurological and neuropsychological manifestations in Behcet's syndrome. In: Emmi L, ed. Behcet's syndrome, Rare diseases of the immune system. Springer Verlag Italia. Milan. pp.229(pp.83-96), 2014.

Hirohata S: Role of bone marrow in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Harjacek M, ed. Challenges in Rheumatology. InTech, Rijeka, Croatia. pp.190(pp.27-40), 2011.

廣畑俊成:「今日の臨床検査 2013-14」, 櫻林郁之介 監修、矢富裕、廣畑俊成、山田俊幸、石黒厚至 編集、南江堂、pp. 654, 2013.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.khp.kitasato-u.ac.jp/SKA/kougen/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣畑 俊成 (HIROHATA, Shunsei)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 90189895

(2) 研究分担者

永井 立夫 (NAGAI, Tatsuo)
北里大学・医学部・講師
研究者番号: 60365947