

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591640

研究課題名(和文) 全身性強皮症患者および線維化モデルマウスにおける制御性B細胞の解析

研究課題名(英文) The role of regulatory B cell in systemic sclerosis and cytokine-induced fibrosis models

研究代表者

竹原 和彦 (TAKEHARA, KAZUHIKO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50142253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：制御性B細胞はIL-10産生を介して過剰な免疫反応や炎症を抑制する。全身性強皮症のPBMC中のIL-10産生B細胞の頻度を解析したところ、健康人で平均11%、強皮症は6%と有意に減少していた。次に制御性B細胞が存在しないCD19欠損マウスを使用しサイトカイン誘導性線維化モデルマウスにおける産生制御性B細胞の機能解析をした。野生型マウスとCD19欠損マウスにサイトカイン誘導性線維化モデルを誘導したところ、両者間に有意差はなかった。以上より、制御性B細胞はサイトカイン誘導性線維化モデルマウスでその役割が少ないことから、線維化病態促進への関与は少なく、強皮症の発症に深く関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Regulatory B cells that produce IL-10 are an important role for negative immune response. The frequency of regulatory B cell in PBMC from 28 systemic sclerosis patients and 24 healthy controls were examined. The frequency of regulatory B cell in PBMC was decreased in systemic sclerosis patients compared to healthy controls. Next, the role of regulatory B cell in the cytokine induced fibrosis model was examined using lack of regulatory B cell mice (CD19 deficient mice). There was no significant difference between wild type mice and CD19 deficient mice. These results suggest that decreased regulatory B cell may contribute to pathogenesis of systemic sclerosis, although regulatory B cell does not affect the development of fibrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：IL-10 B細胞 全身性強皮症

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は抗核抗体に代表される自己免疫現象を背景に、皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管病変によって特徴づけられる膠原病である。これまでに全身性強皮症患者の病態にはB細胞の活性化や分化の異常が示されている (Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. *Arthritis Rheum* 50:1918-27,2004)。また、B細胞の強力な活性化因子である血清BAFF濃度が全身性強皮症患者において上昇しており、皮膚硬化の重症度と相関していることが示されている (Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. *Arthritis Rheum* 54: 192-201, 2006)。さらに、全身性強皮症の動物モデルマウスであるTight skin(Tsk)マウスの皮膚硬化の進展にはB細胞の異常活性化が重要であり (Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Sato S 他 5 名. *J Clin Invest* 109:1453-62,2002)、抗CD20抗体による発症早期からのB細胞除去療法が、Tskマウスの皮膚硬化を有意に抑制することが示されている (Hasegawa M, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Takehara K, Sato S 他 7 名, *Am J Pathol.* 169(3): 954-966. 2006)。以上より、全身性強皮症患者ならびに強皮症モデルマウスの病態および線維化においてB細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

自己免疫疾患におけるB細胞の重要性は、関節リウマチ患者においてリツキサン® (抗CD20抗体) によるB細胞除去療法が予想以上の治療効果を挙げたことから、全世界で脚光を浴びるようになった。B細胞は長らく抗体産生能ばかりが注目されていたが、抗体産生のみならず抗原提示能、サイトカイン産生、T-B細胞相互作用を介して免疫反応を促進することが示され(Lipsky PE. *Nat Immunol* 2001, 2:764-766)、自己免疫疾患におけるB細胞の重要性が飛躍的に高まることとなった。その後、自己免疫疾患に対するB細胞除去療法の適応疾患は急速に拡大され、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、皮膚筋炎、天疱瘡、ANCA関連血管炎、特発性血小板減少性紫斑病など枚挙に暇がない。さらに近年、全身性強皮症に対するB細胞除去療法が複数報告され、治療効果が認められたとの報告も散見される。しかしながら、B細胞除去療法が自己免疫疾患に対して必ずしも有益でない症例も報告されており、リツキサン®投与後に多発性硬化症の再発が誘導された症例や尋常性乾癬を発症した症例などが存在する。この理由としては、B細胞が自己免疫や炎症を促進する作用だけではなく、抑制する作用も併せ持っているため、B細胞除去療法により自己免疫現象を増悪させた可能性が考えられる。この相反するB細胞集団は、“悪玉”と“善玉”B細胞の概念で理解されている。“悪玉”B細胞はeffector B細胞と呼ばれ、T細胞の活性化作用をもち、自己免疫や炎症を促進する働きがある。一方、“善玉”B細胞は制御性B細胞

と呼ばれ自己免疫や炎症を抑制する働きがある(DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. *Ann N Y Acad Sci.*1183:38-57. 2010)。これまで、多発性硬化症や全身性エリテマトーデスのモデルマウスにおいてeffector B細胞と制御性B細胞の作用が詳細に解析されており、病早期のB細胞除去療法は病勢を悪化させ、反対に病後期のB細胞除去療法は病勢を抑制する効果が認められている。その治療効果はそれぞれの病期におけるeffector B細胞と制御性B細胞のバランスによることが示された。さらに最近、B細胞除去療法の効果が有望視されていた全身性エリテマトーデスのPhase II/IIIの臨床試験が当初の治療目的に達せず失敗に終わったが、この原因として制御性B細胞の影響が推測される。今後、自己免疫疾患に対するB細胞除去療法に当たってはRegulatory/Effector B細胞のバランスを考慮に入れること重要である。

制御性B細胞はIL-10を特異的に産生するB細胞亜集団と定義され、IL-10の産生により過剰な免疫反応や炎症を抑制する。近年、IL-10産生制御性B細胞がCD1d^{high}CD5⁺の表現型を有し (Yanaba K, Fujimoto M, 他 5 名. *Immunity* 28, 639-650. 2008) 炎症反応および自己免疫反応の抑制に非常に重要であることが示されている (Matsushita T, Fujimoto M, 他 3 名. *J Clin Invest* 118:3420-30. 2008; Matsushita T, 他 3 名. *J Immunol.* 85:2240-52. 2010)。さらに、ヒトでもIL-10産生制御性B細胞の存在が確認されており (Matsushita T et al in preparation)、さまざまな炎症性疾患や自己免疫疾患への関与が示唆されている。今後、全身性強皮症患者でもB細胞除去療法が行われることが予想されるが、全身性強皮症の病態ならびに線維化における制御性B細胞の役割を充分熟知しておくことは必要不可欠である。さらに、将来的には全身性強皮症や線維化疾患に対する制御性B細胞を用いた治療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

B細胞は抗体産生のみならず、抗原提示能やサイトカイン産生、T-B細胞相互作用を介して免疫反応に非常に重要である。近年、B細胞は均一な細胞集団ではなく“悪玉”B細胞 (effector B細胞)と“善玉”B細胞(制御性B細胞)に大別されて考えられるようになってきた。特にIL-10産生制御性B細胞は、炎症反応および自己免疫反応の抑制に非常に重要であることがマウス実験で明らかとなっている。しかしながら、線維化におけるIL-10産生制御性B細胞の役割については未だ明らかとなっていない。本研究では、サイトカイン誘導性線維化モデルマウスを用いてIL-10産生制御性B細胞の役割を解明するのが目的である。さらに、ヒトにおけるIL-10産生制御性B細胞の測定法を開発し、全身性強皮症患者におけるIL-10産生制御性B細胞の解析を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 我々がすでに確立したサイトカイン誘導性線維化モデルマウスを使用し、線維化における IL-10 産生制御性 B 細胞の役割を検討する。方法として、IL-10 産生制御性 B 細胞を遺伝的に欠く CD19 欠損マウスと野生型マウスに TGF- β を皮下投与し線維化の程度を評価する。

(2) ヒトにおける IL-10 産生制御性 B 細胞の測定方法ならびにフェノタイプ の同定を行い、全身性強皮症患者における IL-10 産生制御性 B 細胞の増減について解析を行う。

4. 研究成果

(1) サイトカイン誘導性線維化モデルマウスにおける IL-10 産生制御性 B 細胞の機能解析には CD19 欠損マウスを使用した。CD19 欠損マウスは IL-10 産生制御性 B 細胞が存在しないため、制御性 B 細胞の機能解析に有用である。野生型マウスと CD19 欠損マウスにサイトカイン誘導性線維化モデルを誘導したところ、両者の間に有意な差は認められなかった。次に制御性 B 細胞の機能を *in vitro* で解析した。制御性 B 細胞とマクロファージを共培養したところ線維化を促進する IL-6 の産生がマクロファージで低下していた (図 1)。

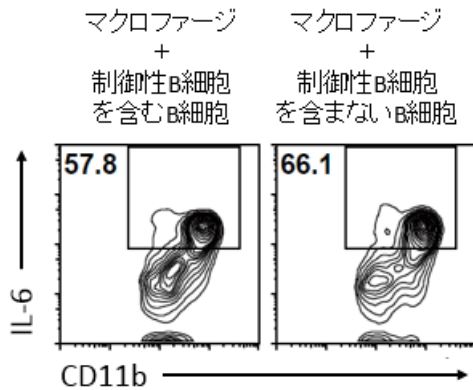


図 1

(2) ヒトにおける IL-10 産生制御性 B 細胞の測定法の開発ならびにフェノタイプ同定 IL-10 産生性制御性 B 細胞の誘導には、CD40 シグナルと Toll like receptor の刺激が重要であることが明らかとなっているので、ヒトでも同様に CD40 刺激と各種 Toll like receptor にて刺激した。5 時間では約 0.7% の IL-10 産生 B 細胞を認めた。48 時間の培養ではより多くの IL-10 産生 B 細胞が認められ、CpG がもっとも効果が強く、IL-10 産生 B 細胞が約 8%、LPS がその次に効果が強く約 4% 認めた。よって制御性 B 細胞の測定には CD40L と CpG にて 48 時間培養が至適条件と判明した (図 2)。B 細胞の表面に発現している分子を解析し、CD 24 と CD 27 が IL-10 陽性と陰性で発現が大きく違っており、IL-10 産生 B 細胞は CD 24 high CD 27+ のフェノタイプを有していることが明らかとなった (図 3)。

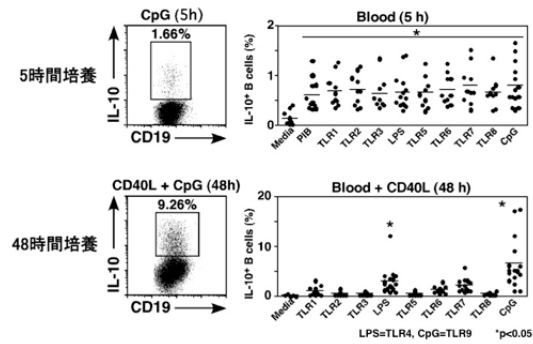


図 2

次に実際に CD24^{high}CD27⁺ の B 細胞が IL-10 を産生しているかを確認した。CD24^{high}CD27⁺ の分画と CD24^{lo}CD27⁻ の分画を FACS にて分離し 48 時間培養後の結果を図 3 下段に示したが、CD24^{high}CD27⁺ のポピュレーションが IL-10 を産生していることが確認された。

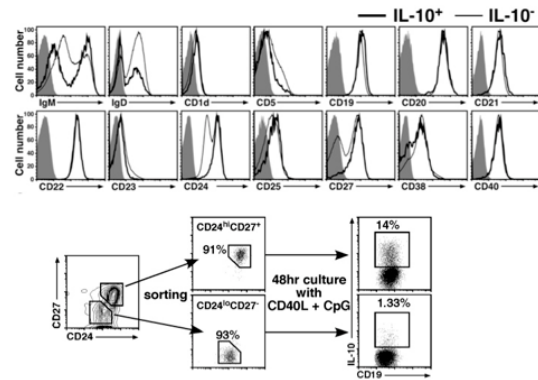


図 3

全身性強皮症患者における制御性 B 細胞の検討。健康人 24 人、全身性強皮症 24 人、皮膚筋炎 3 人、尋常性天疱瘡/落葉状天疱瘡、2 名の PBMC 中の IL-10 産生 B 細胞と CD24^{hi}CD27⁺ B 細胞の頻度を解析した。結果は、IL-10 産生 B 細胞は健康人で平均 11%、強皮症は 6% と有意に減少していた (図 4)。

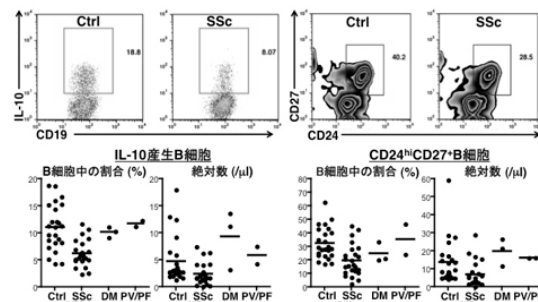


図 4

一方、症例数が非常に少ないものの皮膚筋炎 (DM: dermatomyositis) や天疱瘡 (PV/PF: pemphigus vulgaris/pemphigus foliaceus) では、ほぼ正常であった (図 4)。IL-10 産生 B 細胞と同様に CD24^{hi}CD27⁺ B 細胞は健康人と比較して、全身性強皮症で有意に減少していた。次に皮膚硬化の重症度別に解析を行った。皮膚硬化が高度である diffuse cutaneous SSc (dcSSc) の方がより制御性 B 細胞が減少して

いることが予想されたが、結果は逆で、limited cutaneous SSc (lcSSc)の方がより減少している傾向に有った(図5)。また、制御性B細胞

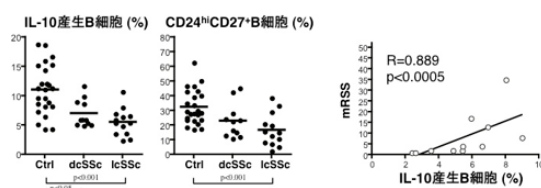


図5

と mRSS に正の相関を認めた。また、他の臓器病変との相関は認めなかった(図5)。制御性B細胞は免疫反応を抑制する作用を有することより、自己トレランスの維持に重要であることが推測される。本研究にて全身性強皮症では制御性B細胞が減少していることが判明した。制御性B細胞の減少により自己トレランスが破綻し、全身性強皮症の発症に関与した可能性が考えられる。しかしながら、制御性B細胞は重症度とは相関しておらず、また線維化マウスモデルにおいて線維化に対する抑制効果を認めないことより、制御性B細胞は発症後の病態促進作用への関与は少なく、その発症により深く関与してい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 18 件)

1. Autoantibodies to RuvBL1 and RuvBL2: a novel systemic sclerosis-related antibody associated with diffuse cutaneous and skeletal muscle involvement. Kaji K, Fertig N, Medsger TA Jr, Satoh T, Hoshino K, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Lucas M, Schnure A, Ogawa F, Sato S, Takehara K, Fujimoto M, Kuwana M. Arthritis Care Res (Hoboken). 2014 Apr;66(4):575-84. doi: 10.1002/acr.22163. {査読有り}
2. A crucial role of L-selectin in C protein-induced experimental polymyositis of mice. Oishi K, Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Okiyama N, Dernedde J, Weinhart M, Haag R, Tedder TF, Takehara K, Kohsaka H, Fujimoto M. Arthritis Rheumatol. 2014 Mar 18. doi: 10.1002/art.38630. {査読有り}
3. The clinical characteristics of

juvenile-onset systemic sclerosis in Japanese patients. Hatta Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Takehara K. Mod Rheumatol. 2014 Mar;24(2):377-9. doi: 10.3109/14397595.2013.854073. {査読有り}

4. Serum adhesion molecule levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicentre, prospective, observational study. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, Inoue K, Ishikawa O, Kawaguchi Y, Kuwana M, Ogawa F, Takahashi H, Tanaka S, Sato S, Takehara K. PLoS One. 2014 Feb 6;9(2):e88150. doi: 10.1371/journal.pone.0088150. eCollection 2014. {査読有り}
5. High incidence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis patients with anti-centriole autoantibodies. Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Ueda-Hayakawa I, Sato S, Takehara K, Fujimoto M. Mod Rheumatol. 2013 Oct 25. {査読有り}
6. B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. Jin G, Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Le Huu D, Ishiura N, Naka K, Hirao A, Takehara K, Fujimoto M. J Allergy Clin Immunol. 2013 Jun;131(6):1674-82. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.044. Epub 2013 Mar 25. {査読有り}
7. FTY720 ameliorates murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease by promoting expansion of splenic regulatory cells and inhibiting immune cell infiltration into skin. Huu DL, Matsushita

- T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M. Arthritis Rheum. 2013 Jun;65(6):1624-35. doi: 10.1002/art.37933. {査読有り}
8. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF, Fujimoto M. Blood. 2013 Apr 18;121(16):3274-83. doi: 10.1182/blood-2012-11-465658. {査読有り}
 9. Autoantibodies to small ubiquitin-like modifier activating enzymes in Japanese patients with dermatomyositis: comparison with a UK Caucasian cohort. Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Kaji K, Asano Y, Ogawa F, Yamaoka T, Fujikawa K, Tsukada T, Sato K, Echigo T, Hasegawa M, Takehara K. Ann Rheum Dis. 2013 Jan;72(1):151-3. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201736. Epub 2012 Jul 26. {査読有り}
 10. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, Fujimoto M, Takehara K. Arthritis Rheum. 2012 Nov;64(11):3726-35. doi: 10.1002/art.34643. {査読有り}
 11. Anti-NXP2 autoantibodies in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies: possible association with malignancy. Ichimura Y, Matsushita T, Hamaguchi Y, Kaji K, Hasegawa M, Tanino Y, Inokoshi Y, Kawai K, Kanekura T, Habuchi M, Igarashi A, Sogame R, Hashimoto T, Koga T, Nishino A, Ishiguro N, Sugimoto N, Aoki R, Ando N, Abe T, Kanda T, Kuwana M, Takehara K, Fujimoto M. Ann Rheum Dis. 2012 May;71(5):710-3. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200697. {査読有り}
 12. Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcription intermediary factor 1 family proteins. Fujimoto M, Hamaguchi Y, Kaji K, Matsushita T, Ichimura Y, Kodera M, Ishiguro N, Ueda-Hayakawa I, Asano Y, Ogawa F, Fujikawa K, Miyagi T, Mabuchi E, Hirose K, Akimoto N, Hatta N, Tsutsui K, Higashi A, Igarashi A, Seishima M, Hasegawa M, Takehara K. Arthritis Rheum. 2012 Feb;64(2):513-22. doi: 10.1002/art.33403. {査読有り}
 13. Investigation of prognostic factors for skin sclerosis and lung function in Japanese patients with early systemic sclerosis: a multicentre prospective observational study. Hasegawa M, Asano Y, Endo H, Fujimoto M, Goto D, Ihn H, Inoue K, Ishikawa O, Kawaguchi Y, Kuwana M, Muro Y, Ogawa F, Sasaki T, Takahashi H, Tanaka S, Takehara K, Sato S. Rheumatology (Oxford). 2012 Jan;51(1):129-33. doi: 10.1093/rheumatology/ker333. {査読有り}
 14. Host-derived MCP-1 and MIP-1 α regulate protective anti-tumor immunity to localized and metastatic B16 melanoma. Nakasone Y, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Yanaba M, Sato S, Takehara K, Hasegawa M. Am J Pathol. 2012 Jan;180(1):365-74. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.005. {査読有り}
 15. Inducible costimulator (ICOS) and ICOS ligand signaling has pivotal roles in skin wound healing via cytokine production. Maeda S, Fujimoto M, Matsushita T,

- Hamaguchi Y, Takehara K, Hasegawa M.
Am J Pathol. 2011 Nov;179(5):2360-9. doi:
10.1016/j.ajpath.2011.07.048. {査読有り}
16. Association between nail-fold capillary findings and disease activity in dermatomyositis. Mugii N, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Horie S, Yahata T, Inoue K, Someya F, Fujimoto M, Takehara K. Rheumatology (Oxford). 2011 Jun;50(6):1091-8. doi: 10.1093/rheumatology/keq430. {査読有り}
17. Use of serum clara cell 16-kDa (CC16) levels as a potential indicator of active pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. Hasegawa M, Fujimoto M, Hamaguchi Y, Matsushita T, Inoue K, Sato S, Takehara K. J Rheumatol. 2011 May;38(5):877-84. doi: 10.3899/jrheum.100591. {査読有り}
18. Clinical correlations with dermatomyositis-specific autoantibodies in adult Japanese patients with dermatomyositis: a multicenter cross-sectional study. Hamaguchi Y, Kuwana M, Hoshino K, Hasegawa M, Kaji K, Matsushita T, Komura K, Nakamura M, Kodera M, Suga N, Higashi A, Ogusu K, Tsutsui K, Furusaki A, Tanabe H, Sasaoka S, Muro Y, Yoshikawa M, Ishiguro N, Ayano M, Muroi E, Fujikawa K, Umeda Y, Kawase M, Mabuchi E, Asano Y, Sodemoto K, Seishima M, Yamada H, Sato S, Takehara K, Fujimoto M. Arch Dermatol. 2011 Apr;147(4):391-8. doi: 10.1001/archdermatol.2011.52. {査読有り}

[学会発表] (計 4 件)

1. Takehara K (招待) : T Cyclosporine-Therapy in localized scleroderma. 3rd World Congress on Systemic Sclerosis, Feb.6 2014, Roma Italy : Ergife Palace Hotel & Conference Center
2. 竹原和彦 : 特別発言～膠原病を診る若手

医師の育成を目指して～ : 第 111 回日本皮膚科学会総会 (招待講演)、2012 年 06 月 01 日～2012 年 06 月 03 日 京都国際会館

3. 竹原和彦 : アトピー性皮膚炎診療が楽しくなる～小児における実践治療を中心に～ : 第 25 回近畿小児科学会 (招待講演)、2012 年 3 月 11 日 キャンパスプラザ京都
4. 竹原和彦 : びまん型全身性強皮症に対する IVIG の二重盲検比較試験 : 第 39 回日本臨床免疫学会総会、2011 年 9 月 15 日 京王プラザホテル

[図書] (計 1 件)

1. 竹原和彦 : アトピー性皮膚炎診療が楽しくなる! Q&A で考える実践治療、南江堂、2011, p1-212

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等:なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹原 和彦 (TAKEHARA, Kazuhiko)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号 : 50142253

(2)研究分担者

長谷川 稔 (HASEGAWA, Minoru)
福井大学・医学部・教授
研究者番号 : 50283130

(3)研究分担者

松下 貴史 (MATSUSHITA, Takashi)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号 : 60432126