

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：23791296

研究課題名(和文)サルコイドーシスにおけるB細胞およびBAFFの異常と単球の関与

研究課題名(英文)The abnormality of B cell and BAFF associated with monocytes in patients with sarcoidosis

研究代表者

植田 郁子(UEDA, Ikuko)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80452100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：サルコイドーシス患者の血中BAFF濃度を測定し、臨床症状との相関について検討した。患者の血清中BAFF濃度は健常人と比べ有意に上昇し、BAFFの血中濃度が高い患者では、皮膚と眼症状が有意に高頻度に見られること、BAFFの濃度と病勢を反映するアンギオテンシン転換酵素、リゾチームに正の相関がみられることから、BAFFの血中濃度がサルコイドーシスの疾患活動性のマーカーとなりうることが示唆された。ヒト単球を単離しIFN- $\gamma$ で刺激したところ、膜型BAFFの発現及び可溶性BAFFの分泌が誘導された。さらに肉芽腫におけるBAFFの局在を免疫組織染色により検討したところ、類上皮細胞がBAFFを発現していた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine serum levels of B-cell-activating factor (BAFF) and its clinical association in patients with sarcoidosis.

Serum BAFF levels were significantly elevated in sarcoidosis patients when compared to healthy controls. The frequencies of skin and eye involvement were significantly higher in patients with elevated serum BAFF than in those patients with normal levels. Serum BAFF levels were correlated with serum levels of ACE, lysozyme, and IFN-gamma. Immunostaining of anti-BAFF in the skin revealed BAFF expression by epithelioid cells of granuloma. In vitro, IFN-gamma induced membrane-bound BAFF expression on monocytes and secretion of soluble BAFF by isolated monocytes. In conclusion, serum BAFF levels can be used as a surrogate marker of disease activity in sarcoidosis patients. Increased BAFF may be related to the pathogenesis of sarcoidosis.

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：サルコイドーシス BAFF B細胞 単球

### 1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスは、肺、リンパ節、皮膚、眼、心臓、筋肉など全身諸臓器に乾酪壊死のない類上皮細胞肉芽腫が形成される全身性の肉芽腫性疾患で、現在でもその原因は不明であるが、疾患感受性のある宿主が環境中のなんらかの抗原物質(起因体)に曝露されて Th1 タイプの過敏性免疫反応が誘導されることが示されている(Curr Opin Rheumatol.12:71-6,2000)。一方で、サルコイドーシス患者において、しばしば高グロブリン血症がみられること、および血中に免疫複合体が増加していることが知られており(Chest. 74:261-4, 1978)、B細胞がサルコイドーシスの病態に関わっていることが予測されるが、B細胞の異常に関する詳細な検討はこれまでにほとんどない。

B-cell activation factor of the TNF family (BAFF)は1999年に同定された腫瘍壊死因子(TNFスーパーファミリー)に属する分子であり(J Exp Med. 189:1747-1756, 1999)、これまでに BAFF 欠損マウスや BAFF レセプターノックアウトマウスでは濾胞B細胞数が著明に減少することからB細胞の生存に必須の分子とされている。逆に BAFF-トランスジェニック(Tg)マウスが種々の自己抗体を産生し、全身性自己免疫疾患像を示したことから(J Exp Med. 190:1697-710, 1999, J Clin Invest.109:59-68, 2002)、BAFFの過剰産生がB細胞の自己寛容の破綻に深く関与することが明らかとなっている。またヒトでは関節リウマチ(RA)や全身性エリテマトーデス(SLE)などの膠原病患者の血中 BAFF 濃度が高値を示し、疾患活動性ならびに自己抗体価と有意に相関することが報告され(Arthritis Rheum.44:1313-1319,2001)、現在では BAFF を分子標的とした治療法が考案され、

RA患者やSLE患者を対象にそれらの生物学的製剤の臨床試験が行われている。

### 2. 研究の目的

これまでに、T細胞がサルコイドーシスの発症に必須であることが知られているが、B細胞についての検討は未だ少ない。そこで申請者はサルコイドーシス患者におけるB細胞の異常の有無に関する解析を行うことを目的とする。B細胞の数やそのサブセットの異常の有無と、B細胞の生存および成熟に重要な因子である、BAFFの異常の有無について検討する。BAFFは、T、Bリンパ球や単球、マクロファージ、好中球などから産生され、IFN- $\gamma$  やIFN- $\beta$ 、インターロイキン(IL)-10、CD40Lなどによって促進されていることが知られている。これまでにサルコイドーシス患者では、単球が活性化していることがわかっており、本研究では特にBAFF産生細胞の中で単球とB細胞との関係に着目し解析する。

### 3. 研究の方法

B細胞の生存・成熟に必須である BAFF の血中濃度を ELISA で測定し、血中 BAFF 濃度と臨床症状やさらに病勢の指標である ACE やライソザイムとも比較し、重症度や活動性との関係の有無を検討する。Hep-2細胞を用いた間接蛍光抗体法による自己抗体出現の頻度と血中 BAFF 値との相関の有無について検討する。

単球からの BAFF の産生の有無についてサイトカイン刺激した単球を BAFF の抗体で染色し、細胞表面の BAFF の発現をフローサイトメトリーで検討する。さらに培養上清中の BAFF の濃度について ELISA で測定する。

サルコイドーシス患者の末梢血中のB細胞の絶対数と頻度、B細胞のサブセットのう

ち、ナイーブB細胞、メモリーB細胞、形質細胞のうち、いずれのサブセットが増加しているかをフローサイトメトリーにて検討する。

#### 4. 研究成果

【サルコイドーシス患者におけるB細胞の絶対数と頻度およびサブセットの異常の検討】抗CD19抗体で末梢血細胞を染色し、フローサイトメトリーで検出した。サルコイドーシス患者と正常人を比較したところ、末梢血中のB細胞の絶対数や頻度に差はみられなかった。次にCD19、CD27の染色パターンによりナイーブB細胞、メモリーB細胞、形質細胞の頻度を算出した。サルコイドーシス患者では正常人と比較して、ナイーブB細胞の頻度が高く、メモリーB細胞の頻度が低いことがわかった。

【サルコイドーシス患者におけるB細胞のフェノタイプの解析】B細胞の表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより測定した。共刺激分子であるCD80、CD86、細胞死(アポトーシス)を媒介するCD95、その他ケモカインレセプターであるCXCR3、CXCR4について、陽性細胞の頻度や、その発現量の違いを比較したが、サルコイドーシス患者と健常人において差はみられなかった。

【サルコイドーシス患者における血中BAFF濃度の測定、血中BAFF濃度と臨床症状や疾患活動性との相関の有無についての検討】B細胞の生存や分化に必須であるBAFFの血中濃度をELISA法で測定した。サルコイドーシス患者血清中のBAFFは健常人と比較して有意に上昇していた。BAFF濃度と臨床症状との相関について検証したところ血清中BAFF濃度上昇群で皮膚症状と眼症状が高率にみられた。また、これまでにサルコイドーシス患者で病勢と相関する指標として用

いられている血中Angiotensin converting enzyme値やLysozyme値を測定したところ、BAFF濃度と有意に相関しており、血清中BAFF濃度が疾患の活動性を反映することがわかった。

【サルコイドーシス患者における自己抗体の頻度】これまでにBAFFの過剰発現により、B細胞の自己寛容が破綻し、自己抗体が産生されることが示唆されている。サルコイドーシスでHEp-2細胞を基質とした間接蛍光抗体法により、血中の自己抗体の陽性の頻度を測定したところ、患者26人中17人(65%)で陽性となった。しかし自己抗体の出現と血中BAFF濃度には相関がなかった。

【サイトカインによる単球からのBAFFの産生の有無についての検討】BAFFはリンパ球や単球、その他上皮系細胞などから産生され、IFN- $\gamma$ やIL-10などのサイトカインの刺激により促進されることが知られている。サルコイドーシスにおいて単球が活性化していることから、特に単球によるBAFFの産生を検討した。末梢血中から単離した単球をIFN- $\gamma$ やIL-10、IL-4などのサイトカインで刺激し、蛍光標識したCD14およびBAFFを認識する抗体を用いて染色したところ、IFN- $\gamma$ による刺激でBAFFの発現が上昇し、さらに培養上清中のBAFFの濃度も上昇していた。

【サルコイドーシス患者皮膚組織におけるBAFFの発現の有無】サルコイドーシス患者では血中BAFF濃度が上昇していることから、サルコイドーシスの皮膚組織におけるBAFFの発現を免疫染色にて確認した。サルコイドーシスでみられる肉芽腫を構成するCD68陽性類上皮細胞においてBAFFの発現が確認された。浸潤するリン

パ球においても、その少数に BAFF の発現がみられた。

【単球またはサルコイドーシス患者血清由来のBAFFがB細胞の生存に与える影響の有無についての検証】健常人から単離した単球をIFN- $\gamma$ を用いて刺激した後、B細胞と共培養して検討した。B細胞の数に変化があるかを検討したが、刺激後の細胞と刺激していない細胞との共培養においてB細胞の数に差は見られなかった。

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 1 件)

**Elevated serum BAFF levels in patients with sarcoidosis: association with disease activity.**

Ueda-Hayakawa I, Tanimura H, Osawa M, Iwasaka H, Ohe S, Yamazaki F, Mizuno K, and Okamoto H

*Rheumatology*. 52(9):1658-66, 2013

査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者 植田 郁子 (UEDA, Ikuko)  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80452100

(2)研究分担者 該当なし  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者 該当なし  
( )

研究者番号：