

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590215

研究課題名(和文)重症筋無力症患者における末梢性免疫寛容誘導に基づくオーダーメイド療法

研究課題名(英文)Induction of Peripheral immune tolerance in Myasthenia Gravis Patients

研究代表者

田中 祥子(Tanaka, Sachiko)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50328556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：重症筋無力症(MG)は、アセチルコリンレセプター(AChR)に対する抗体が生じ、神経筋伝達が遮断される。分子標的薬によるB細胞除去療法を行うことにより、末梢免疫寛容が破たんする可能性も考えられる。本研究では、MG患者末梢血単核細胞を用い、B細胞活性化因子(BAFF)および抑制性サイトカインであるIL-10産生制御性B(Breg)細胞の測定を行った。MG患者B細胞では重症症例ほどBreg細胞の割合が顕著に低く、BAFFおよびIL-10受容体の発現と抗ACh-R抗体価との関連が認められた。MG患者末梢免疫寛容の誘導においてBAFFシグナルの制御とIL-10産生の促進が有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease which caused by producing anti-ACh-R antibody in plasma cells which was differentiated from B cells. In this study, we showed on B cell activating factor -receptor (BAFF-R) was highly expressed on CD19+ B cells in MG patients. We also evaluated the percentage of IL-10+ regulatory B (Breg) cells on B cells. In the MG patients, the frequency of Breg cells was lower than those in healthy subjects. There was a significant correlation between the expression levels of IL-10-R on B cells and the changing rate of anti ACh-R antibody titer in plasma. From these results, we suggest that BAFF attenuate to activate B cells and stimulate production of anti ACh-R antibody in MG patients. On the other hand, IL-10 affected B cells to suppress the secretion of the autoantibody. In conclusion, induction of peripheral immune tolerance would be useful for MG patients by suppression of BAFF production and induction of IL-10.

研究分野：薬理学

キーワード：重症筋無力症 制御性B細胞 B細胞活性化因子 免疫寛容 IL-10

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (MG) は、神経筋接合部のアセチルコリンレセプター (ACh-R) に対する抗体が生じ、この抗体により神経筋伝達がブロックされる。自己免疫寛容は胸腺内で確立される。しかしながら、MG 患者では胸腺腫などの異常を合併する症例が過半数を占める。MG は治療として胸腺摘出術が行われる唯一の自己免疫疾患である。MG では、T 細胞依存的に B 細胞が活性化し、自己抗体を産生する形質細胞へと分化する。

自己・非自己に対する免疫応答は、末梢ナイーブ CD4⁺T 細胞から分化誘導されるエフェクター T 細胞によって決定されている。エフェクター T 細胞は IFN- γ などを産生する 1 型ヘルパー T (Th) 細胞、インターロイキン (IL) -4, IL-10などを産生する 2 型 Th 細胞、IL-17 を産生する Th17 細胞などに分類され、それぞれ細胞性免疫、液性免疫あるいは炎症応答の誘導に重要な役割を担っている。このような免疫応答は様々なフィードバック機構によって制御され、免疫学的恒常性が維持されている。これらの破綻が自己免疫疾患を引き起こすと考えられている。

免疫学的恒常性の維持には免疫寛容が重要な役割を担っており、その機序は中枢性免疫寛容と末梢性免疫寛容に分けられる。中枢性免疫寛容には胸腺での負の選択による自己反応性 T 細胞のクローン除去が関与する。この選択を免れた自己反応性 T 細胞が末梢に存在することによって、自己免疫疾患が引き起こされると考えられている。一方、末梢性免疫寛容にはクローン除去やアナジー (不応答) とともに制御性 T (Treg) 細胞による能動的抑制が関与している。胸腺において分化誘導される内在性 Treg 細胞は、転写因子であるフォークヘッドボックスタンパク質 3 (Foxp3) を特異的に発現しており、末梢 CD4⁺T 細胞の 5 ~ 10% を占める。その生成には、胸腺の上皮細胞や樹状細胞などの抗原提

示細胞に発現する MHC クラス II 分子への高親和性と共刺激が重要であると考えられている¹。しかしながら、種々の刺激で末梢ナイーブ T 細胞から分化誘導される誘導性 Treg 細胞が存在することが明らかとされている。MG においても自己反応性 T 細胞の活性化を制御する Treg 細胞の数あるいは機能の異常が、その発症および病態に関与することが知られている。申請者らの研究の成果から、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞が増加する MG 患者では免疫抑制薬物療法によって高い治療効果が得られることが明らかとなった²。

B 細胞は、抗体産生のみならず抗原提示あるいはサイトカイン産生など種々の役割を有している。したがって、自己免疫疾患患者の B 細胞における内在的な異常により、自律的に自己抗体産生をきたす可能性が考えられる。抗 CD20 抗体であるリツキサンによる B 細胞除去療法が MG 治療に有用であるという報告がなされている³が、抗体産生細胞である形質細胞は CD20 を発現していないなどの問題点も挙げられる。TNF ファミリー分子である B-cell activation factor belonging to the TNF family (BAFF) は、末梢 B 細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしており、形質細胞においてもその受容体が発現している。BAFF の過剰産生によっても、B 細胞の自己免疫寛容が破綻する⁽⁴⁾。BAFF に対する完全ヒト型モノクローナル抗体製剤は、全身性エリテマトーデス治療薬として 2011 年 3 月に FDA からの承認を得ている。

近年、制御性 B (Breg) 細胞という概念が提唱されており、この Breg 細胞は IL-10 産生を介して抗原特異的に T 細胞の活性化を抑制する⁵。制御機序としては、T 細胞からのサイトカイン産生抑制や Treg 細胞の誘導が考えられている。IL-10 受容体は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞において高発現している。したがって IL-10 は、こ

これらの細胞における抗原提示能に影響を及ぼすことで免疫応答の制御に関与している可能性が考えられる。SLE 患者 B 細胞においては CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} 細胞が IL-10 を産生することが報告されている⁶。しかしながら MG 患者における Breg 細胞に関する報告はなく、治療薬の影響についても不明である。

2. 研究の目的

MG は、神経筋接合部の ACh R に対する抗体が生じ、この抗体により神経筋伝達がブロックされる。T 細胞依存的に B 細胞が活性化し、自己抗体を産生する形質細胞へと分化する。このため免疫抑制薬物療法として、T 細胞を標的とした治療が行われる。副腎皮質ステロイド (GC) の漸増漸減療法が第一選択であるが、GC 減量時に症状が悪化する症例や、副作用のため GC 治療を継続できない症例が数多く存在する。GC で十分な治療効果が得られない症例あるいはその副作用によって GC による継続治療が困難な症例においては、その代替薬としてカルシニューリン阻害薬が用いられる。しかしながら、治療薬を選択する際の明確な指標がないことから、MG における治療アルゴリズムは未だ確立されていない。MG において細胞表面抗原に対する分子標的薬を用い、B 細胞を除去する治療の有用性が検討されている。しかしながら、B 細胞を除去することにより自己免疫寛容が破たんする可能性も考えられる。以上のような背景を基に、MG 患者における個別化免疫抑制薬物療法の推進に向けて、B 細胞の活性化あるいは抑制機能を評価することによる治療効果予測の可能性について検討を行った。

3. 研究の方法

MG 患者の末梢血単核細胞 (PBMC) における Treg 細胞および Breg 細胞の比率を測定し、治療効果との関連について検討した。東京医科大学病院神経内科を受診中の MG 患者 100 名を対象とした。文書によるインフォー

ムドコンセントが得られた患者に対し、平成 24 年、25 年および 26 年において、12 ヶ月ごとに血液の採取を行った。PBMC を分取し、以下の実験を行った。治療効果の判定は、採血日から 3~4 ヶ月後に行った。比較対照として、健常者 PBMC を用いた。

Treg 細胞の測定

これまでの申請者らの研究の成果から、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞が増加する MG 患者では GC 治療によって十分な治療効果が得られることが明らかとなった²。当該年度は、免疫抑制薬物療法を行っていない軽症の患者あるいは GC に加えてカルシニューリン阻害剤による治療を行っている MG 患者を中心に、臨床症状の改善との関連について検討を行った。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の測定はフローサイトメトリー法を用い、CD4⁺細胞における CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 細胞の割合を指標とした。

Breg 細胞の測定

健常者あるいは MG 患者における制御性 B 細胞の測定を行い、その数あるいは機能に関して比較を行った。フローサイトメトリー法を用いて CD19⁺ CD24^{high}CD38^{high} 細胞を測定し、CD19⁺細胞中の割合を算出した。また機能を評価するために、Breg 細胞内の IL-10 産生量をフローサイトメーターで測定した。

Breg 細胞特異的マーカーの探索

BAFF による Breg 細胞の誘導に関する報告があることから、BAFF-R 受容体の発現を調べた。さらに B-cell-maturation antigen (BCMA) や transmembrane activator and calcium modulator and cytophilin ligand interactor (TACI) などの BAFF-R サブタイプの受容体についても同様の検討を行った。次に B 細胞における BAFF シグナルが関連する転写因子の中から、Breg 細胞に恒常的に高発現している特異的マーカーの探索を行った。

自己抗体の測定

血漿あるいは血清を用いて、抗 ACh-R 抗体価の測定を行った。さらに MG の重症度との関連が報告されている筋特異的チロシンキナーゼ (MUSK) 抗体やカリウムチャネル kv1.4 抗体についても測定を行った。

治療応答性の評価

QMG スコア、MG composite および MGFA post intervention status など臨床

においても汎用されている重症度スコアを用いた。さらにSF-36やGHQ-28などのQOL評価を行い、精神症状から治療の有用性を評価した。いずれも診療の一環として、研究協力者である医師（複数名）が行った。

4. 研究成果

(1) MG 患者 B 細胞における BAFF シグナルと病態あるいは治療効果との関連

本研究では、まず自己反応性 B 細胞の増殖に関与するとされている BAFF に着目し、病態との関連について検討を行った。この結果、血漿中 BAFF 濃度および CD19+B 細胞における BAFF-R 発現量は、いずれも抗 ACh-R 抗体価と有意な相関を示した。

通常、細胞膜上に存在する膜結合型 BAFF は、プロテアーゼにより切り離され、BAFF 受容体と結合する。BAFF 受容体には、TACI、BCMA および BAFF-R の 3 つのサブタイプがある。MG 患者 CD19+B 細胞においては、BAFF-R が BCMA あるいは TACI と比較し有意に高値を示すことを確認した。さらに、BAFF-R 発現率と抗アポトーシス作用を示すことが明らかとされている Bcl-2 発現率との間に有意な正の相関がみられた ($p=0.005$)。以上の結果から、MG 患者 B 細胞における BAFF シグナルが BAFF-R を介し、抗アポトーシス作用を示す可能性が示唆された。

(2) MG 患者 B 細胞における BAFF シグナルとアポトーシスとの関連

近年、Toll 様受容体 9 番 (TLR9) の活性化が自己免疫疾患の発症にも関連することが明らかとされている。我々の検討において、CD19+ B 細胞における TLR9 発現率が重症度の指標である QMG スコアと有意な負の相関を示すことが明らかとなった ($p=0.0015$)。そこで最終年度である平成 26 年度は CpG-ODN を用いて TLR9 を刺激し、同様の検討を行った。この結果、TLR9 刺激による膜結合型 BAFF 発現率の上昇が認められた ($p=0.0144$)。しかしながら、BAFF-R ある

いは Bcl-2 発現に及ぼす影響はみられなかった。

(3) MG 患者 B 細胞における Breg 細胞の割合と病態との関連

IL-10 や TGF- β など抑制性サイトカインを産生する B 細胞の亜集団、すなわち制御性 B (Breg) 細胞が自己反応性 T 細胞の活性化の抑制に関与するものと考えられている。したがって、B 細胞における Breg 細胞の割合を測定することによって、患者個々の末梢における獲得免疫系の評価や治療効果の予測が可能となることが考えられる。そこで我々は Breg 細胞が MG の病態あるいは治療効果に及ぼす影響について検討を行った。MG 患者群では健常者群と比べて CD19+B 細胞における IL-10+CD24+CD38+ Breg 細胞の割合が顕著に低値を示した ($p=0.0063$)。MGFA クラス 0 群 ($n=10$) に比べてクラス I 群 ($n=25$) および II 群 ($n=26$) では、その割合が有意に低値を示した ($p=0.0001$ および $p=0.0003$) ことから、重症の MG 患者ほど CD19+B 細胞における Breg 細胞の割合が低下していることが明らかとなった。さらに、Breg 細胞が T 細胞に及ぼす影響についても検討を行った。CD19+B 細胞における Breg 細胞の割合と末梢 CD4+T 細胞における CD25+Foxp3+制御性 T (Treg) 細胞の割合との間に有意な正の相関を認めた ($p=0.006$) ことから、Breg 細胞が T 細胞の活性化制御に関与している可能性が考えられた。Breg 細胞の割合と抗 ACh-R 抗体価との間には有意な相関はなかったが、CD19+B 細胞における IL-10 産生量と抗 ACh-R 抗体価変化率との間には、有意な負の相関が認められた ($p=0.00139$)。一方、IL-10 受容体 (IL-10R) の発現は T 細胞、抗原提示細胞と比較して B 細胞で有意に高値を示すことが明らかとなった ($p=0.0038$ および $p=0.0048$)。さらに治療効果の指標となる抗 ACh-R 抗体価変化率との間に有意な正の相関が認められた。

(4) 結語

本研究結果から, MG 患者において BAFF が B 細胞の活性化および自己抗体産生に関与していることが明らかとなった。一方, 抑制作用を有する IL-10 が B 細胞に作用し, 自己抗体産生が制御される可能性が示唆された。以上の結果から, MG 患者の末梢免疫寛容の誘導において BAFF 産生の制御とともに IL-10 産生を促進させる治療が有用であると考えられた。

引用文献

1. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 299: 2003; 1057-1061.
2. Masuda M, Matsumoto M, Tanaka S, Nakajima K, Yamada N, Ido N, Ohtsuka T, Nishida M, Hirano T, Utsumi H. Clinical implication of peripheral CD4+ CD25+ regulatory T cells and Th17 cells in myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol*. 225: 2010; 123-131.
3. Lebrun C, Bourg V, Tieulie N, Thomas P. Successful treatment of refractory generalized myasthenia gravis with rituximab. *Eur J Neurol*. 16: 2009; 246-250.
4. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*. 189: 1999; 1747-1756.
5. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique

CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 28: 2008; 639-650.

6. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 32: 2010; 129-140.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

田中 祥子 井上 文 増田 眞之 内海 裕也 平野 俊彦重症筋無力症患者における BAFF シグナル制御を標的とした新たな免疫抑制療法の可能性に関する検討 *臨床薬理の進歩* 査読無 30, 2015, 60-64.

Ito S, Masuda M, Tanaka S, Takagi M, Tanaka C, Yamada N, Nakajima K, Akashi T, Hirano T, Utsumi H. Low-dose glucocorticoid therapy complements the pituitary-adrenocortical system and reduces anxiety and insomnia in myasthenia gravis patients. *Clin Neuropharmacol*. 査読有 35, 2012, 30-36.

〔学会発表〕(計3件)

田中 祥子, 増田 眞之, 落合 有美香, 河合 奈々江, 黒江 里歌, 井上 文, 伊藤 傑, 相澤 仁志, 明石 貴雄, 恩田 健二, 杉山 健太郎, 平野 俊彦重症筋無力症患者における制御性 B 細胞と治療効果との関連第 35 回日本臨床薬理学会学術総会 2015 年 12 月 4 日 ひめぎんホール 愛媛県 松山市

田中 祥子, 増田 眞之, 山本 真実子,
落合 有美香, 前野 朱美, 恩田 健二,
杉山 健太郎, 大塚 敬男, 伊藤 傑,
明石 貴雄, 内海 裕也, 平野俊彦 重
症筋無力症患者における B 細胞活性化因
子と治療効果との関連 33 回日本臨床薬
理学会学術総会 2013 年 11 月 28 日沖縄
コンベンションセンター 沖縄県 那覇
市

Sachiko Tanaka, Takao Akashi,
Suguru Itoh, Masayuki Masuda,
Hiroya Utsumi, Chiho Kasahara,
Yumika Ochiai, Mamiko Yamamoto,
Hironori Takeuchi, Sakae Unezaki
and Toshihiko Hirano Low-dose
glucocorticoid therapy complement the
pituitary-adrenocortical system and
reduce anxiety and insomnia in
myasthenia gravis patients. The 72th
World Congress of Pharmacy and
Pharmaceutical Sciences
The Amsterdam RAI Exhibition
Convention Centre Amsterdam, 2012
年 10 月 3 日 Holland

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 祥子 (TANAKA, Sachiko)
東京薬科大学・薬学部・医療薬学科・臨床
薬理学教室
研究者番号: 50328556

(2) 研究協力者

増田 眞之 (Masuda, Masayuki)
井上 文 (Inoue, Aya)
伊藤 傑 (Ito, Suguru)
相澤 仁志 (Aizawa, Hitoshi)