

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461686

研究課題名(和文) 全身性強皮症におけるregulatory B細胞の機能解析および新規治療法の開発

研究課題名(英文) The role of regulatory B cell in the pathogenesis of systemic sclerosis

研究代表者

松下 貴史 (Matsushita, Takashi)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：60432126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Regulatory B細胞(制御性B細胞)はIL-10産生を介して免疫反応を抑制する。制御性B細胞を遺伝的に欠くCD19欠損マウスを使用し、強皮症のマウスモデルであるSclerodermatous GVHDマウス(以下、強皮症マウス)を誘導した。CD19欠損マウスは野生型マウスと比べより重症の強皮症マウスを発症した。強皮症マウスに制御性B細胞と他のB細胞をそれぞれ骨髄移植と同日に移植したところ、制御性B細胞を移植した群では強皮症マウスの改善効果が認められた。また、強皮症患者では制御性B細胞が減少しており、病勢を反映していた。以上より制御性B細胞が強皮症の病態に抑制的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sclerodermatous cGVHD (Scl-cGVHD) is characterized by fibrosis and autoimmune features resembling those of systemic sclerosis (SSc). Transplantation of B10.D2 bone marrow and splenocytes into irradiated-BALB/c mice is an established model of human Scl-cGVHD. To examine the role of regulatory B cells (Breg cell) in Scl-cGVHD, CD19-deficient (CD19^{-/-}; lack of Breg cell) mice were used as donors or recipients in this model. CD19^{-/-} donors induced more severe Scl-cGVHD than wild-type donors. Adoptive transfer of Breg cells attenuated the augmented manifestations of CD19^{-/-} donor-induced Scl-cGVHD. The frequency of blood Breg cells was significantly lower in patients with SSc, and Breg cell levels inversely correlated with disease activity of SSc. These results suggest that decreased Breg cells contribute to the development of SSc.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 サイトカイン 制御性B細胞

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, et al. *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, et al. *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, et al. *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, et al. *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、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 regulatory 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, et al. *Ann N Y Acad Sci.*1183:38-57. 2010)。regulatory 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 regulatory B 細胞が CD1dhighCD5+ の表現型を有し (Yanaba K, et al. *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, et al. *J Clin Invest* 118:3420-30. 2008; Matsushita T, et al. *J Immunol.* 85:2240-52. 2010)。この regulatory B 細胞を制御する分子として CD19 が重要であり、CD19 を遺伝的に欠損したマウスでは regulatory B 細胞が欠損しているため炎症反応や自己免疫反応の増悪が認められる。全身性強皮症は皮膚硬化型慢性 GVHD (Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease, Scl-cGVHD) との共通点が知られている (Varga J, Abraham D. *Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder.* *J Clin Invest* 2007;117(3):557-67.)。B10.D2 (H-2d) マウスの骨髄を BALB/c (H-2d) マウスに移植することにより皮膚硬化型慢性 GVHD を誘導することができ、強皮症のモデルマウスとして有用である。

2. 研究の目的

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、皮膚や肺などの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関与していることが示されている。しかしながら全身性強皮症に対する有効な治療法は未だ確立されておらず、その開発が望まれる。近年、ヒトの全身性強皮症のマウスモデルとしてマイナー組織適合抗原不一致-骨髄移植による Sclerodermatous GVHD マウスが使われるようになってきており、強皮症の免疫異常を研究する良いモデルである。B 細胞に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重要な役割を果たす。さらに近年、IL-10 産生 regulatory B 細胞が同定され、自己免疫や炎症を抑制することが解明された。本研究は、Sclerodermatous GVHD マウスにおける regulatory B 細胞の役割を解明し、新規治療法の開発を目的としたものである。

3. 研究の方法

(1) マウス

レシピエントとして、BALB/c (H-2d) マウスないしは CD19 欠損 BALB/c (H-2d) マウスを使用した。ドナーとして、B10.D2 (H-2d) マウスないしは CD19 欠損 B10.D2 (H-2d) マウスを使用した。

(2) Scl-GVHD モデル

B10.D2 マウスから骨髄細胞(10x10⁶ 細胞)と脾臓細胞(10x10⁶ 細胞)を採取し、800 cGy 照射された BALB/c (H-2d) マウスに骨髄移植し、皮膚硬化型慢性 GVHD を誘導した。

(3) GVHD スキンスコア

以下のスコアリングシステムを用いた。

スコア 0=正常、スコア 1= 皮膚病変<1cm², スコア 2= 皮膚病変 1-2cm², スコア 3= 皮膚病変 2-5cm², スコア 4= 皮膚病変 5-10cm², スコア 5= 皮膚病変 10-15cm², スコア 6= 皮膚病変 15-20cm², スコア 7= 皮膚病変>20cm². 尻尾の皮膚病変は 0.4、耳や手足の皮膚病変を 0.3 とし、すべての合計点で示した。

(4) 病理組織学的検討

皮膚病変は H&E 染色、Masson ' s trichrome 染色にて評価した。病理組織学的スコアは epidermal morphology, dermal fibrosis, inflammation, subdermal fat, skin appendage number をそれぞれ 0-2 で評価した。

(5) 統計

全身性強皮症患者において IL-10 産生 regulatory B 細胞の絶対数および頻度を FACS にて測定し健常人と比較検討する。

倫理面への配慮: 患者からの血液サンプルの採取は、患者に研究の趣旨・内容を十分に説明のうえ同意を得られた方のみから行う。また得られた研究データによって人権侵害など不利益が起こらないよう、個人の特定がなされないように配慮する。

(6) 統計

全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で示した。有意差検定は Student ' s t test を使用した。

4. 研究成果

(1) 1 .CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD

CD19 欠損マウスは遺伝的に IL-10 産生 regulatory B 細胞を欠損しているため regulatory B 細胞の解析に有用である。CD19 欠損 B10.D2 マウス (ドナーマウス) および CD19 欠損 BALB/c マウス (レシピエントマウス) を作製し、皮膚硬化型慢性 GVHD モデルを誘導して regulatory B 細胞の役割を解析した。CD19 欠損 B10.D2 マウスの骨髓および脾臓を、放射線照射された BALB/c マウスに移入したところ (ドナー由来の regulatory B 細胞だけが欠損している) コントロール群に較べより重症の皮膚硬化型慢性 GVHD を発症した (図 1)。一方、B10.D2 マウスの骨髓および脾臓を、放射線照射された CD19 欠

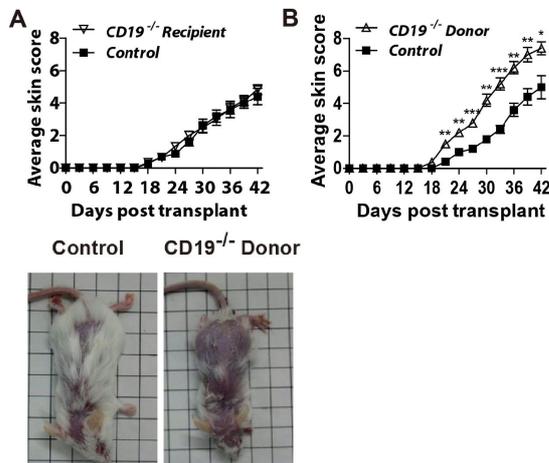


図 1

損 BALB/c マウスに移入した場合は (レシピエント由来の regulatory B 細胞だけが欠損している) コントロール群と較べ有意差がなかった。以上の結果より、皮膚硬化型慢性 GVHD マウスの抑制機序においてドナー由来の regulatory B 細胞が重要であることが示された。

(2) CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD の病理組織学的検討

コントロール群と CD19 欠損ドナー群の皮膚硬化型慢性 GVHD の背部皮膚および肺での線維化を組織学的に検討したところ CD19 欠損ドナー群では IL-10 産生 regulatory B 細胞が存在しないため炎症反応および線維化の抑制作用が減弱し、より高度な線維化が認められた (図 2)。

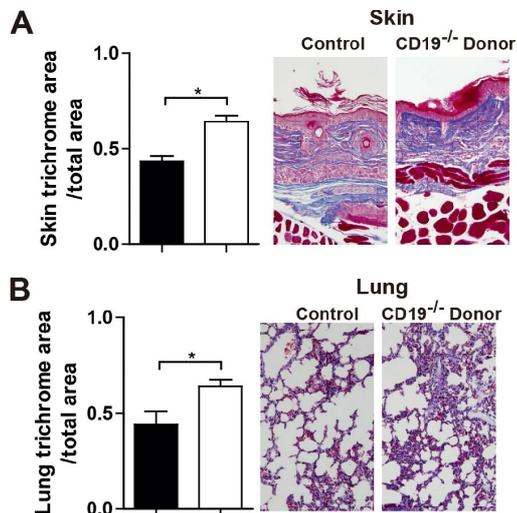


図 2

(3) Regulatory B 細胞移入による CD19 欠損マウスにおける皮膚硬化型慢性 GVHD に対する効果

CD19 欠損 B10.D2 マウスをドナーとして使用 (ドナー由来の regulatory B 細胞だけが欠損している) した皮膚硬化型慢性 GVHD マウスに regulatory B 細胞 (CD1dhiCD5+ B 細胞) と他の B 細胞 (CD1dloCD5- B 細胞) をそれぞれ骨髓移植と同日に移植したところ、regulatory B 細胞 (CD1dhiCD5+ B 細胞) を移植した群では皮膚硬化型慢性 GVHD の改善効果が認められた (図 3)。しかしながら、骨髓移植後 21 日目に regulatory B 細胞 (CD1dhiCD5+ B 細胞) を移植しても、皮膚硬化型慢性 GVHD の改善効果は認めなかった。以上の結果より、regulatory B 細胞は皮膚硬化型慢性 GVHD の発症早期において抑制効果を有していること、さらには慢性 GVHD に対する regulatory B 細胞を用いた治療の可能性が示された。

(4) 皮膚硬化型慢性 GVHD における regulatory B 細胞の抑制機序の解明

Regulatory B 細胞を T 細胞と共培養し解析した。Regulatory B 細胞と CD4+T 細胞の共培養の実験系にて、regulatory B 細胞は CD4+T 細胞

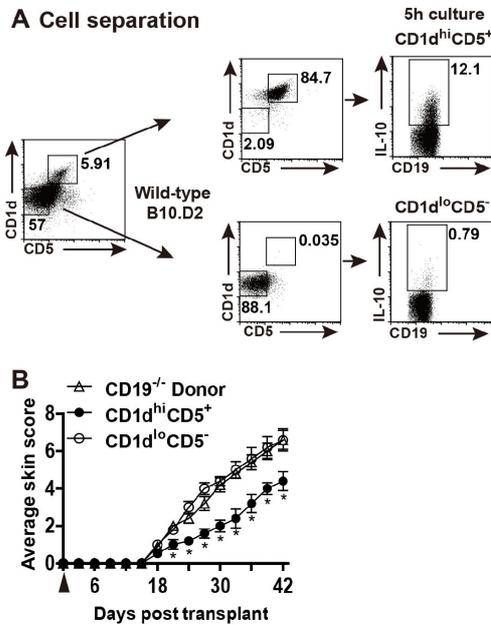


図3

胞の細胞増殖抑制効果は認めないものの、サイトカイン産生能 (IFN-) を有意に抑制した。

(5) 全身性強皮症における regulatory B 細胞の解析

全身性強皮症患者と健常人の末梢血中の regulatory B 細胞を測定したところ、強皮症患者で有意に regulatory B 細胞が減少していた。さらに治療前後で、測定すると治療後に皮膚硬化の改善とともに、regulatory B 細胞の増加が見られた (図4)。以上より、regulatory B 細胞は病勢を反映することが示唆された。

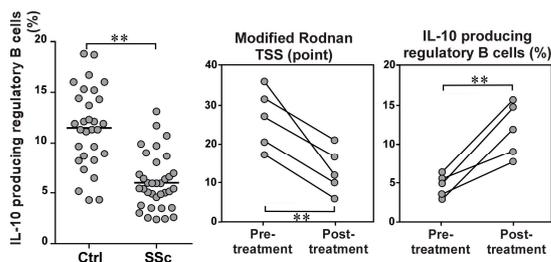


図4

以上より、regulatory B 細胞は強皮症モデルマウスにおいて抑制的に働くこと、強皮症患者において病勢を反映することが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Decreased Levels of Regulatory B cells in Patients with Systemic Sclerosis: Association with autoantibody production and disease activity. Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M. **Rheumatology (Oxford)**. 2016 Feb;55(2):263-7. doi: 10.1093/rheumatology/kev331. { 査読有り }

り }

2. Clinical and immunological predictors of scleroderma renal crisis for Japanese systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase III autoantibodies. Hamaguchi Y, Koder M, Matsushita T, Hasegawa M, Inaba Y, Usuda T, Kuwana M, Takehara K, Fujimoto M. **Arthritis Rheumatol**. 2015 Apr;67(4):1045-52. doi: 10.1002/art.38994. { 査読有り }
3. 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**. 2015 Sep;25(5):798-801. doi: 10.3109/14397595.2013.844296. { 査読有り }
4. B cells promote tumor immunity against B16F10 melanoma. Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Matsushita T. **Am J Pathol**. 2014 Nov;184(11):3120-9. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.07.003. Epub 2014 Aug 28. { 査読有り }
5. Regulatory B cells in mouse models of systemic lupus erythematosus (SLE). Matsushita T. **Methods Mol Biol**. 2014;1190:195-205. doi: 10.1007/978-1-4939-1161-5_14. { 査読なし }
6. Blockade of Syk ameliorates the development of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. Le Huu D, Kimura H, Date M, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Hau KT, Fujimoto M, Takehara K, Matsushita T. **J Dermatol Sci**. 2014 Jun;74(3):214-21. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.02.008. Epub 2014 Mar 12. { 査読有り }
7. A crucial role of L-selectin in C protein-induced experimental polymyositis in 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 Jul;66(7):1864-71. doi: 10.1002/art.38630. { 査読有り }
8. 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 }
9. 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.** 2013 Apr 27. { 査読有り }
10. Common and distinct clinical features in adult patients with anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies: heterogeneity within the syndrome. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Kaji K, Komura K, Hasegawa M, Kodera M, Muroi E, Fujikawa K, Seishima M, Yamada H, Yamada R, Sato S, Takehara K, Kuwana M. **PLoS One.** 2013;8(4):e60442. doi: 10.1371/journal.pone.0060442. Epub 2013 Apr 3. { 査読有り }
 11. 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 }
 12. Scleroderma: recent lessons from murine mouse models and implications for future therapeutics. Matsushita T, Fujimoto M. **Expert Review of Dermatology.** 8: 527-539. 2013 { 査読なし }
 13. 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 }
 14. Dermokine inhibits ELR(+)CXC chemokine expression and delays early skin wound healing. Hasegawa M, Higashi K, Matsushita T, Hamaguchi Y, Saito K, Fujimoto M, Takehara K. **J Dermatol Sci.** 2013 Apr;70(1):34-41. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.01.007. Epub 2013 Feb 4. { 査読有り }
 15. 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. Epub 2013 Feb 19. { 査読有り }

{ 学会発表 } (計 3 件)

1. Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Decreased Levels of Regulatory B cells in Patients with Systemic Sclerosis: Association with

autoantibody production. ESDR 2015, Rotterdam (Nederland), Sep 12, 2015 (poster)

2. Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: Association with autoantibody production and disease activity. JSID 2015, Okayama Convntion Center (Okayama Prefecture, Okayama city), Dec 11, 2015 (Oral)
3. Matsushita T, Le Huu D, Kimura H, Date M, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Blockade of Syk Ameliorates the Development of Sclerodermatous Chronic Graft-Versus-Host Disease. ESDR 2014, Copenhagen (Danmark), Sep 13, 2014 (oral)

{ 図書 } (計 1 件)

1. 松下貴史: 全身性強皮症と B 細胞「全身性強皮症の臨床と研究 Up to date」医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社, 東京. 604-608, 2014

{ 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

松下 貴史 (MATSUSHITA, Takashi)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号 : 60432126