

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461466

研究課題名(和文) 全身性自己免疫疾患に対する新規B細胞標的療法の開発

研究課題名(英文) Novel B cell targeting therapies in systemic autoimmune diseases

研究代表者

小荒田 秀一 (Shuichi, Koarada)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：50304887

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)：自己免疫疾患の難治性病態では新たな治療法が必要とされている。自己抗体産生細胞を直接標的とした治療は、最も理想的な治療法となりうる。全身性エリテマトーデス(SLE)でCD180(RP105)陰性B細胞が抗dsDNA抗体などの自己抗体を産生し、その主体は形質芽細胞(プラズマブラスト)であることを発見した。本研究では難治性自己免疫疾患と類縁疾患において形質芽細胞を標的とした治療法の端緒となる免疫異常を検出した。自己抗体産生形質芽細胞を標的とする治療法の実験は世界初の試みで、新たな治療法の実現につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：CD180 (RP105) molecule is expressed on B cells. RP105 is associated with B cell function, survival and death. RP105-lacking B cells produce autoantibodies, including anti-ds-DNA antibodies in SLE. Large population of plasmablasts lacking RP105 are found in patients with systemic autoimmune diseases and take part in pathophysiology. We have studied clinical significance of RP105-negative B cells including plasmablasts in various immune-based diseases. We also analyzed the 5 sub-populations of plasmablasts in the various diseases. RP105-negative plasmablasts play crucial roles in systemic autoimmune and immune-based inflammatory disorders. Also, distribution of sub-population and difference of expressed antigens in RP105-lacking plasmablasts may be associated with pathophysiology in individual disorders.

研究分野：医歯薬学

キーワード：plasmablast B細胞 CD180(RP105) 自己免疫疾患 IgG4関連疾患 SLE 自己抗体 抗体免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、生物学的製剤 (biological DMARD) の開発により寛解・治癒に至るといわれる治療のパラダイムシフトが起こっている。しかしながら、SLE を含むその他の全身性自己免疫疾患では、いまだに様々な難治性病態が存在し、治療は立ち遅れている。

最近、膠原病治療において B 細胞標的療法の重要性和有用性が提唱されているが、その中で、最も理想的な方法は、自己抗体産生細胞や様々な炎症過程を介在する高度に活性化された B 細胞そのものを標的とした治療法であると想定される。自己抗体産生細胞や活性化 B 細胞のみを標的とすれば、正常 B 細胞に影響を与えず、安全かつ有効な治療となると考えられる。しかしながら、このような一部の B 細胞サブセットにのみ発現する特異的な分子は同定されていない。

SLE において、B 細胞を標的とした治療法として、リツキシマブ (抗 CD20 抗体)、ベリムマブ (抗 BAFF 抗体) などの治療法が開発され有効性を示す症例も存在するが、その治療効果は完全ではない。

我々は SLE で、RP105 陰性 B 細胞が増加していることを世界で初めて報告した (Koarada S, Arthritis Rheum 1999)。その後の研究で、同細胞は抗 dsDNA 抗体を産生する高度に活性化された B 細胞であり、主として plasmablast で構成されていることを発見した。また、RP105 陰性 B 細胞は、BCMA の発現が亢進した SLE 特異的なフェノタイプを有することを報告している (Koarada S, Rheumatology 2010, Koarada S, Clin Dev Immunol 2012)。

最近、抗 dsDNA 抗体を産生する B 細胞は、従来言われていたような形質細胞ではなく、plasmablast であることが別の研究者からも報告され、SLE のモデルマウスである BWF1 マウスにおいても、RP105 陰性 B 細胞が存在し病態に関与していることが報告されている。このように、SLE において、自己抗体産生細胞は plasmablast であることが最近解明されてきている。したがって、B 細胞標的療法として RP105 陰性 plasmablast や RP150 陰性活性化 B 細胞は標的細胞の有力な候補であると考えられる。

我々や他の研究者の研究によって、様々な免疫疾患における RP105 陰性 B 細胞の重要性が解明されてきている (表 1)。B 細胞が病態に重要であると考えられているシェーグレン症候群や皮膚筋炎はもとより、最近では、ANCA 関連血管炎、ベーチェット病や関節リウマチ、強皮症などの病態にも関与している可能性があることがわかってきている。また、全性自己免疫疾患にとどまらず、臓器特異的な自己免疫疾患である視神経脊髄炎 Neuromyelitis optica (NMO) や炎症性疾患である IgG4 関連疾患でも関与が報告されて

いる (Koarada S, Ann Rheum Dis 2015)。このように、RP105 陰性 B 細胞の治療標的としての重要性は SLE にとどまらず、様々な自己免疫疾患や免疫関連疾患、加齢などによる免疫変化にも敷衍することができると考えられる。

RP105 分子 (CD180) は、1994 年に放射線アポトーシスを回避させる抗体の抗原として佐賀大学の三宅らによって発見された。RP105 は、自然免疫系の分子である Toll like receptors (TLRs) の一つである。

RP105 分子は MD-1 分子と会合し、主として B 細胞表面上に発現している (図 2)。TLR4 とともにグラム陰性細菌由来の LPS (lipopolysaccharide) の認識・応答に関与しており、RP105 刺激は B 細胞活性化や細胞増殖をもたらす、抗体産生に寄与し、また、RP105 の刺激は、アポトーシスを回避させる。また、抗原同時認識を通じて、B 細胞恒常性維持にも関与している可能性も示唆されている。また、TLR2 と協調して細菌のリポペプチドを認識する。

RP105 分子による B 細胞恒常性の制御に関する CD40 と RP105 の比較をしたマウスでの実験がある。単独刺激の場合には CD40 も RP105 も細胞増殖を引き起こす。抗原刺激が同時に加わった場合には、CD40 刺激はさらに強い細胞増殖を引き起こすが、RP105 刺激の場合には、アポトーシスが引き起こされる。このことは、RP105 分子が、過剰な抗体産生や B 細胞活性化・細胞増殖の抑制にも関与しており、RP105 は、B 細胞恒常性の制御に与かっている可能性を示唆する。

B 細胞恒常性の維持に関与する RP105 の機能が障害された場合、B 細胞の異常な活性化や自己抗体の産生が引き起こされ、最終的に SLE などの自己免疫疾患に繋がる可能性が示唆される。

正常の RP105 が発現している場合は、感染症発症時に RP105 は LPS 刺激を B 細胞に伝え、細胞増殖、B 細胞活性化、抗体産生、クラススイッチなどが起こり、生体における感染防御に対して有利に働く。一方、正常者では自己抗原刺激が RP105 刺激と同時に入った場合は、B 細胞のアポトーシスを引き起こし、末梢での B 細胞免疫寛容の維持に関与していると考えられる。

RP105 分子と自己免疫疾患との関連については、マウスでの報告として SLE のモデルマウスである BWF1 マウスでの報告があり、RP105 陰性 B 細胞の増加がある。RP105 ノックアウトマウスや、その会合分子である MD-1 ノックアウトマウスにおいて、LPS に対する B 細胞増殖の抑制や抗体産生能の低下がみられるが、自己免疫病態は示さないが、これは back ground 遺伝子は正常であるためと考えられる。SLE モデルマウスで、RP105 をノックアウトと自己免疫が改善すると報告されている。

## 2. 研究の目的

全身性エリテマトーデス(SLE)をはじめとする自己免疫疾患は、いまだ難治性病態が存在し新たな治療法が必要とされている。SLEにおける抗 dsDNA 抗体のように、自己免疫疾患における自己抗体は主要な免疫異常の一つである。したがって、自己抗体産生細胞を標的とした治療は、最も理想的な治療法となりうる。しかし、自己抗体産生細胞に特異的な分子は発見されておらず、その標的治療は困難である。

我々は、SLEでCD180(RP105)陰性B細胞が抗 dsDNA 抗体(自己抗体)などの自己抗体を産生し、SLE特異的なフェノタイプを有する plasmablast (形質芽細胞)であることを世界で初めて証明した。

最近、さまざまな自己免疫疾患で形質芽細胞の重要性が指摘され、治療標的としての有用性が報告されている。しかしながら、未だ plasmablast を標的とした有効な治療法は確立されていないのが現状である。

本研究では自己抗体産生B細胞、とくに病的 plasmablast を標的とした治療法の開発を試みる。このような疾患特異的病的 plasmablast を標的とする治療法の開発は世界初の試みで、unmet needs の状態にある膠原病の難治性病態に対して新たな治療法につながる可能性がある。

## 3. 研究の方法

上記のように、RP105 は、B細胞活性化や自己抗体産生に参与することが示唆された。そこで、自己抗体産生やB細胞機能が病態に深く関与するヒトSLEにおけるRP105の解析の報告はなかったため、我々はまずSLEにおけるB細胞上のRP105の発現を検討した。

次いで、P105陰性B細胞の特徴とB細胞分化における位置づけをするために、多重染色によるフェノタイプ解析についてフローサイトメトリーを用いて行った。

RP105陰性B細胞とその膜タンパクは、SLE治療の有力な標的となりうる。そのために、同細胞に特異的に発現する抗原の網羅的検索を行った。

方法としてヒト膜タンパク17200の遺伝子DNAマイクロアレイ法を利用した。RP105(-)B細胞特異的膜分子 mRNA 特定のために Gene Chip 解析を行った。

## 4. 研究成果

SLEは、ポリクローナルな免疫グロブリンの産生や抗DNA抗体、抗Sm抗体などの各種自己抗体の産生を伴いB細胞機能が自己免疫病態に重要な役割を果たしていると考えられる。よって、B細胞恒常性の制御に関わるRP105の発現をまずSLE患者において検討した。

RP105陰性B細胞は、正常者に比べて、SLE患者で有意に増加しているが、SLEの疾患活

動期に増加し、寛解時には減少し、SLEの疾患活動性を反映していることがわかった。

GeneChip解析によって、RP105陰性B細胞に発現が強い分子の候補を同定した。そのうちの1つがBCMAである。

RP105陰性B細胞は、単一の細胞群ではなく、B細胞分化後期のいくつかのサブセットからなることが多重染色の解析の結果あきらかとなった。少なくとも、RP105(-)B細胞は5つのサブセットからなることが考えられた。

RP105陰性B細胞は、CD19、CD180(RP105)、CD138により活性化B細胞から plasmablast をへて、形質細胞へと至る少なくとも5分画に細分できる(詳細に解析すれば10以上)。そのうち、pre-plasmablast、plasmablast、late plasmablastの3分画が形質芽細胞サブセットを形成している。

SLEでは、RP105(-)B細胞のうちでサブセット3が増加している。サブセット3 RP105(-)B細胞が病的B細胞の主体を占めており、治療標的として有力である。

さらに、IgG4-RDにおけるRP105陰性 plasmablast のフェノタイプ、plasmablast のサブセット分画をSLEと比較し、その特徴を明らかとした。IgG4-RD患者、SLE患者、健常者より末梢血単核細胞を単離し、各種抗体による染色を行ったCD19、CD138、RP105(CD180)の発現をもとに、RP105陰性B細胞を同定した。さらに、成熟B細胞、活性化B細胞からpre-plasmablast、plasmablastを経て、late plasmablast、形質細胞に至る5つのサブセットに分けた。RP105陰性 plasmablast についてBAFF-R、BCMA、CXCR5、CD80、CD86など約200種類の表面分子の発現について、蛍光色素で標識した抗体により染色し、フローサイトメトリーを用い、網羅的に解析した。また、治療によるフェノタイプの変化も観察した。

IgG4-RDではCD180陰性 plasmablast が正常と比較して増加し、同細胞比率は治療経過と疾患活動性に相関していた。少数臓器型IgG4-RDはSLEよりも、B細胞サブセットの分布が、より早期のサブセットに偏っていたが、多臓器型IgG4-RDはより後期に傾き、病態により plasmablast の分布が異なっていた。plasmablast のフェノタイプ解析では、SLEでは、BCMAが、IgG4-RDではCXCR5が、疾患に特徴的な発現分布を示したIgG4-RDの治療抵抗例では、CXCR5の発現が持続した。

CD180(-)plasmablast とそのフェノタイプの解析結果をもとに治療に応用でき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5件)

1. Koarada S, Tada Y. Roles of plasmablasts in IgG4-related disease and various immune-based diseases. *World J Rheumatol* 6(1): 16-22, 2016.

DOI: 10.5499/wjr.v6.i1.16

2. Koarada S, Komine M and Tada Y. Microgeodic Disease that Can Mimic Rheumatoid Arthritis *Austin Journal of Musculoskeletal Disorders* 2:1016, 2015.

<http://austinpublishinggroup.com/musculoskeletal-disorders/download.php?file=fulltext/ajmd-v2-id1016.pdf>

3. Koarada S, Tsuboi M, Komine M, Nakao Y, Tokuda Y, Ono Y, Tashiro S, Maruyama A, Ono N, Ohta A and Tada Y. Effectiveness of Certolizumab Pegol in Treating Rheumatoid Arthritis Patients with Persistent Inflamed Residual Mono-or Oligosynovitis Resistant to Prior TNF-Inhibitors. *Case Rep Rheumatol* 2015; 348614; 1-4, 2015

doi: 10.1155/2015/348614.

4. Koarada S, Tashiro S, Tokuda Y, Ono Y, Sadanaga Y, Suematsu R, Ono N, Ohta A, and Tada Y. Persistent expression of CXCR5 on plasmablasts in IgG4-related disease. *Ann Rheum Dis* 74: e32, 2015.

doi: 10.1136/annrheumdis-2014-207207.

5. Koarada S, Tashiro S, Tokuda Y, Ono Y, Sadanaga Y, Suematsu R, Ono N, Ohta A, Tada Y. Subsets of RP105-negative plasmablasts in IgG4-related disease. *Ann Rheum Dis* 73 (10): e65, 2014.

doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206179.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Koarada S, Ohta A, Tada Y. The clinical significance of autoantibody-producing CD180-lacking plasmablasts in systemic autoimmune and immune-based inflammatory disorders. *The 13th International*

Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity 2016.10.11~13 京都・京都

2. 小荒田秀一, 堺真梨子, 貞永裕梨, 丸山暁人, 小野伸之, 多田芳史. IgG4 関連疾患および近縁疾患における形質芽細胞を標的とした新規治療の開発. 第 4 4 回日本臨床免疫学会総会 2016.9.8~10. 第 4 4 回日本臨床免疫学会総会抄録集 P405 神奈川・横浜

3. Koarada S, Ohta A, Tada Y. The role of RP105-negative plasmablasts in IgG4-related disease 第 4 4 回日本免疫学会学術集会 2015.11.18~20. 第 4 4 回日本免疫学会学術集会 北海道・札幌

4. 小荒田 秀一, 田代 知子, 中尾 嘉修, 徳田 悠希子, 小野 行秀, 丸山 暁人, 小野 伸之, 大田 明英, 多田 芳史. IgG4 関連疾患における形質芽細胞の役割. 日本臨床免疫学会 2015.9.25.~27. 日本臨床免疫学会会誌 38 Page309 東京

5. 小荒田秀一, 田代知子, 中尾嘉修, 徳田悠希子, 小野行秀, 丸山暁人, 小野伸之, 大田明英, 多田芳史. IgG4 関連疾患における形質芽細胞の CXCR5 の発現の検討 第 2 4 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2015.9.18~19. 第 2 4 回日本シェーグレン症候群学会学術集会抄録集 P56 東京

6. Koarada S, Ohta A, Tada Y. RP105-negative B cells are potential targets of autoimmune diseases. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 2014.12.10-12 日本免疫学会総会・学術集会記録 第 43 巻 p113 京都・京都

7. 小荒田秀一, 徳田悠希子, 小野行秀, 貞永裕梨, 末松梨絵, 小野伸之, 田代知子, 大田明英, 多田芳史. 自己免疫疾患における RP105 陰性形質芽細胞を標的とした新規治療法の開発の試み 第 4 2 回日本臨床免疫学会 2014.9.25~27 第 4 2 回日本臨床免疫学会抄録集 P358 東京

8. 小荒田秀一, 徳田悠希子, 小野行秀, 貞永裕梨, 末松梨絵, 小野伸之, 田代知子, 大田明英, 多田芳史. IgG4 関連疾患における RP105 陰性 B 細胞と臨床像の相関の検討. 第 2 3 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2014.9.12~13. 第 2 3 回日本シェーグレン症候群学会学術集会プログラム・抄録集 P65 長崎・長崎

9. 小荒田秀一, 田代知子, 貞永裕梨, 永尾奈津美, 末松梨絵, 大田明英, 多田芳史. IgG4 関連疾患における B 細胞の解析. 第 1 1 1 回日本内科学会講演会 2014.4.11~13 日本内科学会雑誌 P179 東京

〔図書〕(計 2 件)

Koarada S, Tokuda Y, Ono Y, Sadanaga Y, Tashiro S, Suematsu R, Ono O, Ohta A, Tada Y. Early Diagnosis and Preventive Strategy of Corticosteroid Induced Osteonecrosis in Systemic Autoimmune Diseases. Corticosteroids and Steroid Therapy: New Research 4: 79-100, Nova Science Publishers, New York, 2015

Koarada S and Tada Y. The Correlation of Soluble Endothelial Protein C Receptor and High Dose Corticosteroid Therapy in Patients with Systemic Autoimmune Diseases. Corticosteroids and Steroid Therapy : New Research 5: 101-108. Nova Science Publishers,, New York, 2015

〔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

<http://www.intmed.med.saga-u.ac.jp/kenkyugroup/group/collagen/kenkyu.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小荒田秀一 (KOARADA Syuichi)

佐賀大学医学部講師

研究者番号：50304887

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

田代知子 (TASHIRO Satoko)

永尾奈津美 (NAGAO Natsumi)