

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893053

研究課題名(和文) 強皮症における抗原特異的B細胞の役割

研究課題名(英文) The role of regulatory B cells in systemic sclerosis

研究代表者

吉崎 歩 (Yoshizaki, Ayumi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40530415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症(systemic sclerosis; SSc)は皮膚硬化と内臓諸臓器の線維化を主徴とする予後不良の自己免疫疾患であり、我が国の特定疾患(いわゆる難病)に指定されている。病態発生の機序は未だ不明瞭であり、更なる研究の発展と、新たな治療法の開発が急務である。今回申請者らはSScモデルマウスを用いて制御性B細胞の役割について検討した。その結果、制御性B細胞は抗原特異的な機序でSScにおける免疫異常を抑制することが示唆された。SScにおける新たな治療法の一つとして、制御性B細胞は有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Immune cells play a crucial role in systemic sclerosis (SSc). B cells have more functions than producing antibodies. In addition, abnormal B cell function can drive the development of autoimmunity. However, specific B-cell subsets can also play a protective role during T cell-mediated inflammation and have been termed regulatory B cells. According to our previous studies, regulatory B cells can ameliorate autoimmune abnormalities in various diseases but the function of regulatory B cells has remained unclear in SScs. Therefore, we investigated the role of regulatory B cells, in the development of fibrosis and autoimmunity using the mouse models for SSc. In this study, we showed regulatory B cells are potent negative regulators of antigen-specific inflammation and T-cell-dependent autoimmunity in SSc model mice. This study may indicate first that regulatory B cells improved fibrosis and immunological abnormalities via an antigen-specific manner in SSc.

研究分野：皮膚科学

キーワード：強皮症 制御性B細胞 抗原特異性 動物モデル 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

1) SScの病態解明および新規治療法開発の必要性

SScは、皮膚および内臓諸臓器の線維化を主徴とする膠原病であり、国の特定疾患(いわゆる難病)に指定されており、国民の健康を犯す重大な疾患である。内臓諸臓器の線維化として間質性肺炎を約60%の患者に認め、重症型の10年生存率は約60%とされており、新規治療法の開発が急務である。SScの病因は未だ解明されていないが、皮膚および内臓諸臓器の線維化は免疫機能が異常に亢進した結果もたらされると考えられているため、現在、免疫抑制薬を中心とした対症療法が行われている。しかし、このような免疫抑制薬には、大きな副作用を伴うため、たとえ疾患の改善がある程度見られたとしても、患者のQOLは著しく阻害されている。また、重症例では免疫抑制薬の投与にもかかわらず体幹の皮膚および内臓の硬化のために死亡することも多い。それゆえ、SScの病態生理の解明と、それに基づいた新規治療法の開発が切に望まれている。

2) SScの病態における自己免疫および炎症反応の重要性

SSc患者ではT細胞やB細胞、マクロファージをはじめとする炎症細胞が線維化において重要な役割を果たす。炎症細胞の異常活性化は自己免疫応答と密接に関連しながら生じることが広く知られており、詳細な機序は不明ながらも患者に認められる自己抗体が何であるかは重症度および予後に大きく影響する。SSc患者において最も高頻度に認められる抗トポイソメラーゼI(topoisomerase I; topo I)抗体は、特に重篤な病態と関与することが知られているが、研究代表者はtopo Iに対する自己免疫応答がIL-6をはじめとした炎症性サイトカインを介した炎症細胞の活性化を来し(Yoshizaki A et al, Arthritis Rheum 2011; 63(11):3575-85)、皮膚及び肺へ直接浸潤することで、線維化を顕著に誘導することを見いだした(Yoshizaki A et al, Arthritis Rheum 2010; 62(8):2476-87, Yoshizaki A et al, J Immunol 2010; 185(4):2502-15)。浸潤した炎症細胞から産生される活性酸素は新たな組織障害を誘導し(Yoshizaki A et al, Arthritis Rheum 2011; 63(10):3086-97)、さらなる炎症細胞の活性化とそれに続く組織の線維化といった負のサイクルを形成することになる(Yoshizaki A et al, Ann Rheum Dis 2011; 70(1):194-200)。このようにSScにおける自己免疫と炎症反応、それによって引き起こされる線維化は密接に関連している。

3) SScの動物モデル

ブレオマイシン(bleomycin; BLM)誘発SScモデルマウスは、BLMの持つ組織障害作用に

よって引き起こされる皮膚硬化および肺線維化を呈するモデルである。研究代表者はBLM誘発SScモデルで、この症状が炎症細胞浸潤および自己免疫と関連していることを見いだした(Yoshizaki A et al, Am J Pathol 2008; 172(6):1650-63)。さらに研究代表者はtopo Iを免疫することによって皮膚硬化と肺線維化が誘導されることを見だし、新たなSScモデルとしてtopo I誘発SScモデルを確立している(Yoshizaki A et al, Arthritis Rheum 2011; 63(11):3575-85)。多くの自己免疫疾患において炎症反応と自己免疫は密接に関連しているという共通の見解はあるものの、両者は複雑に絡み合い、先行する病態はどちらかという点が未だに解明されておらず、治療ターゲットが明確にならない理由の一つとして挙げられる。この2つのSScモデルは患者において認められる強い炎症と自己免疫のそれぞれをよく反映したモデルであり、両モデルの検討を併せて行うことにより治療ターゲットが明確となり、作用点のはっきりとした有害反応の少ない治療法が開発されると考えられる。

4) 抗原特異的B細胞の自己免疫疾患に対する役割

自己免疫疾患においてB細胞は単に抗体を産生するのみではなく、抗原の提示、T細胞やマクロファージをはじめとした他の免疫担当細胞の活性化、炎症性サイトカインの産生などの役割を果たし、病態の形成に大きく寄与することが知られている。B細胞受容体(BCR)を介した抗原特異性は、B細胞の持つ最も大きな特徴の一つであるが、先に挙げたB細胞の機能は抗原特異的に発現することが様々な研究から示唆されている。研究代表者のグループによって同定された制御性B細胞は、種々の炎症性疾患において免疫抑制作用を呈することが示されてきたが(Kalampokis I, Yoshizaki A et al, Arthritis Res Ther 2013; 15 Suppl 1:S1(総説))、その働きは抗原によってBCR刺激を受けたB細胞が、自身のMHC IIとT細胞のTCRとの結合を介することで発揮される(Yoshizaki A et al, Nature 2012; 491(7423):264-8)。MHC IIとTCRの結合はまさしく抗原を介した抗原特異的な反応であり、B細胞の抗原特異的な反応は自己免疫疾患において中心的な働きをする可能性を示している(図)。B細胞が高い抗原特異性を獲得するためには、somatic hypermutationによるBCRの遺伝子再構成が必要となるが、これはActivation-induced cytidine deaminase (AID)によって調節されていることが明らかとなっている。近年、AIDのノックアウトマウスが開発され、BCRの観点からB細胞の抗原特異性に着目した研究が可能となっているが、SScに関しては未だ検討が行われていない。SScモデルマウスにおけるB細胞の抗原特異性と疾患活動性を評価する

ことにより、自己抗原特異的な炎症反応が SSc の線維化においてどの程度関与しているかがあきらかとなり、さらにはターゲットが明確な治療法を確立することにつながる。

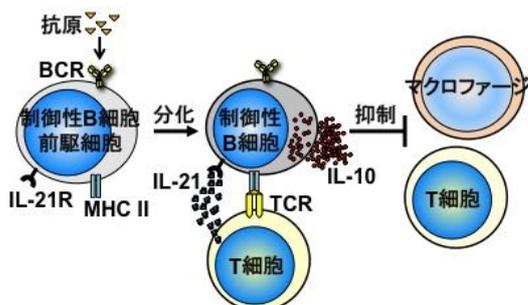


図. B 細胞の抗原特異性は自己免疫反応に大きく影響を及ぼす。

## 2. 研究の目的

以上より本研究の目的は、SSc における抗原特異的な免疫反応の線維化に対する役割を検討することで病因を明らかとし、さらには自己免疫をターゲットとした新しい治療法を開発することである。そのため、AID ノックアウトマウスを用いて BLM 誘発 SSc モデルおよび topo I 誘発 SSc モデルを作成し、皮膚および肺の線維化、サイトカイン産生などの解析を行う。

## 3. 研究の方法

SSc マウスモデルを作成し、ex vivo 誘導性制御性 B 細胞を投与した。その後、皮膚及び肺の線維化に対する治療効果を評価した。加えて、血清、肺および皮膚における線維化に関与するサイトカインの発現を解析することで、ex vivo 誘導性制御性 B 細胞がどのように SSc モデルの線維化を抑制するかを検討した。さらに topo I に特異的な制御性 B 細胞を作成し、線維化におよぼす効果を評価することにより、SSc における抗原特異的な治療が可能であるかを検討した。

1) マウス; 本研究では米国 Jackson Lab より購入した C57BL/6 マウスを使用した。7-12 週齢のマウスを以下の実験に用いた。各解析についてそれぞれ最低 10 匹のマウスを用いた。

2) BLM 誘発 SSc モデルマウスの作成; BLM(日本化薬株式会社)を phosphate-buffer saline (PBS) に 1 mg/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛したマウスの背部皮膚へ 4 週間にわたり 27 ゲージの注射針で 300 µg (300 µl) を連日皮下投与した。コントロールとして PBS のみを BLM と同様の方法で投与した。

3) Topo I 誘発 SSc モデルマウスの作成; Topo I (TopoGEN 社)を PBS に 500 units/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛した

マウスの背部皮膚へ 2 週間の投与間隔で合計 4 回、Freund アジュバントと共に 300 µl 皮下投与した。コントロールとして PBS のみを同様の方法で投与した。

4) Ex vivo 誘導性制御性 B 細胞の作成; マウスの線維芽細胞株である 3T3 細胞に CD154 と B cell activation factor を遺伝子導入し、これを feeder 細胞として用いた。C57BL/6 マウスより抽出した脾臓 B 細胞を IL-4 及び IL-21 存在下にて 9 日間培養することで ex vivo 誘導性制御性 B 細胞を作成した (Yoshizaki A et al, Nature 491: 264-8, 2012)。作成された細胞は、以下の SSc モデルマウスに対して  $2 \times 10^6$  個、尾静脈より養子移入した。

5) 抗原特異的制御性 B 細胞の作成; topo I で免疫したマウス脾臓からピオチン化した topo I を標識として、抗原特異的な B 細胞を抽出した。抽出した脾臓 B 細胞を前述の feeder 細胞上で IL-4 及び IL-21 存在下にて 9 日間培養することで抗原特異的制御性 B 細胞を作成した (Yoshizaki A et al, Nature 2012; 491(7423):264-8)。作成された細胞を SSc モデルマウスに対して  $2 \times 10^6$  個、尾静脈より養子移入した。

6) SSc モデルマウスにおける線維化の評価; 各 SSc モデルマウスから背部皮膚と肺を採取し、ヘマトキシリン&エオジン染色とヴァンギーソン染色を行い、皮膚、真皮、皮下脂肪織の厚さを測定した。肺に関しては左中葉のランダムに選ばれた部分を 100 倍の拡大率で観察し、線維化の程度を Aschcroft らの提唱するスコア法 (Aschcroft T et al, J Clin Pathol 1988) で評価した。

7) Real-time PCR によるサイトカイン、細胞成長因子の mRNA 発現の定量的解析と血清サイトカインの測定; 各 SSc モデルマウスより得られた皮膚および肺におけるサイトカイン、細胞成長因子の mRNA 発現を real-time PCR 法にて定量的に測定した。血清中のサイトカイン蛋白を ELISA 法にて解析した。

8) 血清中免疫グロブリンと自己抗体の検討; 各 SSc モデルマウスにおいて、ELISA 法で血清中の免疫グロブリン量と自己抗体価を測定した。

## 4. 研究成果

1) SSc モデルにおける制御性 B 細胞の変化; BLM 誘発 SSc モデルマウスにおける制御性 B 細胞の数を検討した。4 週間後の BLM 投与を終えたマウスでは、コントロールマウスと比べて有意な制御性 B 細胞の表現型である CD5+CD1dhiB 細胞の有意な減少を認めた。同様に IL-10 産生性 B 細胞の減少も認めた。

2) 皮膚硬化と肺線維化に対する制御性 B 細

胞の効果; BLM 投与前にコントロールマウスより得られた制御性 B 細胞を養子移入したところ、コントロールマウスに比して有意に皮膚硬化と肺線維化の抑制を認めた。さらに、BLM 誘発 SSc モデルマウスより得られた制御性 B 細胞は、コントロールマウスの制御性 B 細胞より有意な皮膚硬化と肺線維化の抑制作用を発揮した。制御性 B 細胞の養子移入は、皮膚および肺における IL-4, IL-6, IL-17 の mRNA 発現と、血清中における蛋白発現を有意に抑制したが、その抑制効果は BLM 誘発 SSc モデルマウスから得られた制御性 B 細胞で強く認められた。BLM 誘発 SSc モデルマウスで検出される抗 topo I 抗体に関しては、コントロールマウスから得られた制御性 B 細胞と BLM 誘発 SSc モデルマウスから得られた制御性 B 細胞の両者において、養子移入した際には産生が抑制されていた。

3) Topo I 特異的制御性 B 細胞の持つ疾患抑制効果; SSc における制御性 B 細胞の疾患抑制効果に関して、自己抗原特異性がどのように影響しているかを検討する目的で、topo I 誘発 SSc マウスモデルを用いて検討を行った。topo I 特異的 B 細胞をセルソーターで抽出した後、feeder 細胞上で制御性 B 細胞を誘導した。Topo I 特異的 ex vivo 誘導性制御性 B 細胞は、コントロールマウスより抽出した ex vivo 誘導性制御性 B 細胞よりも強く皮膚及び肺の線維化を抑制した。IL-4, IL-6, IL-17 のサイトカインについても同様に、topo I 特異的 ex vivo 誘導性制御性 B 細胞は topo I 非特異的な ex vivo 誘導性制御性 B 細胞よりも有意に皮膚および肺の mRNA 発現と血清中の蛋白発現を抑制した。

#### 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 6 件)

全て査読あり

Nakamura K, Yoshizaki A, Saigusa R, Taniguchi T, Asano Y, Sato S. The efficacy of dantrolene sodium for muscle cramps in patients with localized scleroderma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015, in press. DOI: 10.1111/jdv.13497.

Yoshizaki A, Taniguchi T, Saigusa R, Fukasawa T, Ebata S, Numajiri H, Nakamura K, Yamashita T, Takahashi T, Toyama T, Asano Y, Tedder TF, Sato S. Nucleosome in patients with systemic sclerosis: possible association with immunological abnormalities via abnormal activation of T and B cells. *Ann Rheum Dis*. 2015, in press.

DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-207405.

Nakamura K, Asano Y, Taniguchi T, Minatsuki S, Inaba T, Maki H, Hatano M, Yamashita T, Saigusa R, Ichimura Y, Takahashi T, Tokyama T, Yoshizaki A, Miyagaki T, Sugaya M, Sato S. Serum levels of IL-18 binding protein isoform; a clinical association with inflammation and pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2015, in press. DOI: 10.1111/1346-8138.13252.

Yokoyama T, Yoshizaki A, Simon KL, Kirby MR, Anderson SM, Candotti F. Age-Dependent Defects of Regulatory B Cells in Wiskott-Aldrich Syndrome Gene Knockout Mice. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0139729. DOI: 10.1371/journal.pone.0139729.

Saigusa R, Asano Y, Taniguchi T, Yamashita T, Ichimura Y, Takahashi T, Toyama T, Yoshizaki A, Sugawara K, Tsuruta D, Taniguchi T, Sato S. Multifaceted contribution of the TLR4-activated IRF5 transcription factor in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112: 15136-15141. DOI: 10.1073/pnas.1520997112.

Yoshizaki A, Sato S. Abnormal B lymphocyte activation and function in systemic sclerosis. *Ann Dermatol*. 2015; 27(1): 1-9. DOI: 10.5021/ad.2015.27.1.1.

[学会発表](計 4 件)

Ayumi Yoshizaki. Serum levels of soluble PD-1 and PD-L2 correlate with disease severity in systemic sclerosis. 2015 SID (74th) Annual Meeting.

Ayumi Yoshizaki. Regulatory B cells regulate skin and lung fibrosis and immunological abnormalities in a topoisomerase I and complete Freund's adjuvant-induced scleroderma model via an antigen-specific manner. 2015 ACR (79th)/ARHP (50th) Annual Meeting.

吉崎 歩. 強皮症合併間質性肺炎に対するシクロホスファミド(CYC)パルス療法の効果予測因子に関する検討. 厚生労働省「強皮症・皮膚線維化疾患の診断基準・重症度分類・診療ガイドライン作成事業」研究班 2014 年度班会議・厚生労働省「強皮症の病態解明および革新的医薬品開発の研究」研究班 2014 年度班会議・第 18 回強皮症研究会議(SSC, Scleroderma Study Conference)合同会議.

吉崎 歩. 強皮症に合併した間質性肺炎に対するシクロホスファミド(CYC)パルス療

法の効果予測因子. 日本皮膚科学会第 377 回  
新潟地方会.

〔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

<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/der/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉崎 歩 (Yoshizaki Ayumi)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：40530415

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：