

令和元年6月17日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10147

研究課題名(和文) 強皮症モデルマウスにおけるサイトカイン産生B細胞の役割

研究課題名(英文) The role of cytokine producing B cell in scleroderma mouse model

研究代表者

松下 貴史 (Matsushita, Takashi)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：60432126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：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・内臓諸臓器の線維化を来す自己免疫疾患である。その病態にはB細胞の活性化や分化の異常が関与している。B細胞は長らく抗体産生能が主に解析されてきたが、サイトカイン産生細胞としての機能が近年注目され始めた。今回我々は、B細胞特異的IL-6欠損マウスとIL-10欠損マウスを作成しブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを惹起し比較検討したところ、B細胞特異的IL-6欠損マウスでは線維化の減弱が認められB細胞特異的IL-10欠損マウスでは線維化の亢進が認められた。以上より、サイトカイン産生B細胞が強皮症の病態に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

強皮症の病態においてIL-6は非常に重要なサイトカインであり強皮症モデルマウスにおいてIL-6産生Effector B細胞の役割を解析した独創性のある研究である。さらに強皮症モデルマウスにおいてEffector B細胞/Regulatory B細胞のバランスを解析することにより、強皮症に対するB細胞をターゲットとした新規治療法の発展につながる極めて意義のある重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：IL-10-producing regulatory B (Breg) cells negatively regulate autoimmune diseases. We reported that Breg cells play a protective role in a mouse model of systemic sclerosis (SSc) and in patients. Recent studies indicate that IL-6-producing effector B (Beff) cells have pathogenic effect in autoimmune diseases. In this study, we investigated the phenotype of IL-6-producing Beff cells and their role in SSc pathogenesis. The bleomycin-induced skin fibrosis was attenuated in B-IL-6^{-/-} mice compared with that in B-WT mice. In contrast, B-IL-10^{-/-} mice showed more severe skin fibrosis than B-WT mice. IL-6-producing Beff cells play a pathogenic role in bleomycin-induced scleroderma model, while IL-10-producing Breg cells play a protective role. Thus, B cells have reciprocal roles in SSc pathogenesis, presenting pathogenic and protective functions.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 B細胞 BAFF IL-6 IL-10

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

a. 全身性強皮症と B 細胞

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 (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 濃度が強皮症患者において上昇し、皮膚硬化の重症度との相関が示されている (Arthritis Rheum 54: 192-201, 2006)。さらに、強皮症モデル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 (J Clin Invest 109:1453-62, 2002)、抗 CD20 抗体や BAFF 阻害剤による発症早期からの B 細胞除去療法が、皮膚硬化を有意に抑制することが示されている (Am J Pathol. 169: 954-966, 2006; J Invest Dermatol. 127:2772-80. 2007)。以上より、強皮症患者ならびに強皮症モデルマウスの病態に 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。

b. Regulatory B 細胞と Effector B 細胞

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目目されていたが、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 (Nat Immunol 2:764-766, 2001)、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。さらに近年、強皮症に対する B 細胞除去療法の有効性が報告されている。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®投与後の多発性硬化症の再発例や尋常性乾癬の発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である。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 (Nat Rev Immunol 10, 236-247, 2010)。“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 (J Immunol. 182:7459-72. 2009; J Immunol. 185:2240-2252. 2010)。我々はこれまでに、多発性硬化症や全身性エリテマトーデスのモデルマウスにおいて Effector B 細胞と Regulatory B 細胞の作用を解析し (J Clin Invest. 118:3420-30. 2008)、病早期の B 細胞除去療法は病勢を悪化させ、反対に病後期の B 細胞除去療法は病勢を抑制する効果が認められることより、B 細胞除去療法の効果はそれぞれの病期における Effector B 細胞と Regulatory B 細胞のバランスが重要であることを報告している。

c. サイトカイン産生 B 細胞 (IL-10 産生 Regulatory 細胞/IL-6 産生 Effector B 細胞)

Regulatory B 細胞は、IL-10 の産生により過剰な免疫反応や炎症を抑制する。Effector B 細胞は IL-6 の産生により免疫反応や炎症を促進する作用があると考えられている (Nat Rev Immunol 15, 441-451, 2015)。IL-10 産生 Regulatory B 細胞はマウスでは CD1dhighCD5+ の表現型を、ヒトでは CD24highCD27+ の表現型を有していることを我々が明らかとしている (Blood 117:530-41. 2011)。さらに、強皮症患者や強皮症モデルマウスにおいて IL-10 産生 Regulatory B 細胞が抑制的な役割を有していることを解明した (Blood. 121:3274-83. 2013; Rheumatology. pii: kev331. 2015)。しかしながら、IL-6 産生 Effector B 細胞については、その表現型ならびにその作用機序については、多くが未解明のままである。

d. IL-6 と全身性強皮症

IL-6 は免疫・炎症反応において重要な役割を果たすサイトカインで、自己免疫疾患においては IL-6 産生 Effector B 細胞の重要性が近年注目されている。強皮症では、血清 IL-6 濃度の上昇及び病勢との相関がみられる (J Rheumatol 33, 275-284, 2006)。強皮症モデルマウスにおいても血清 IL-6 濃度の上昇がみられ、抗 IL-6 受容体抗体の投与により皮膚硬化の改善がみられる (J Invest Dermatol 132, 2752-2761, 2012)。以上より強皮症の病態において IL-6 は非常に重要なサイトカインであり、IL-6 産生 Effector B 細胞を解析する必要がある。

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。

本研究では、サイトカイン産生 B 細胞の強皮症の病態における役割を明らかにしたい。IL-6 産生 Effector B 細胞については、多くが未解明であるので、まず測定方法を開発し、そのフェ

ノタイプおよび転写因子の同定に焦点をあてる。さらに、B細胞特異的 IL-6 欠損マウス及び B細胞特異的 IL-10 欠損マウスを作成し、プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを惹起し、強皮症の病態におけるサイトカイン産生 B細胞の役割を比較検討する。ここでは、IL-6 産生 Effector B細胞が強皮症の病態を促進させ、IL-10 産生 Regulatory B細胞が抑制させるといふ仮説の検証を行う。

具体的な研究項目を以下に示す。

a.IL-6 産生 Effector B細胞の測定法の開発ならびにフェノタイプ・転写因子の同定

b.強皮症モデルマウスにおけるサイトカイン産生 B細胞 (IL-6 産生 Effector B細胞/IL-10 産生 Regulatory B細胞) の役割の検討

c.強皮症モデルマウスにおける Effector B細胞/Regulatory B細胞のバランスの解析

これまでの国内外でのサイトカイン産生 B細胞研究の経験を生かし、本研究では B細胞をターゲットとした強皮症の新規治療法の開発のための研究基盤の確立を最終的目的とする。

3. 研究の方法

1. IL-6 産生 B細胞の測定法

マウスにおける IL-6 産生 B細胞は、LPS(TLR4)と抗 CD40 抗体で 24 時間培養し、細胞内染色を行うことにより測定する。IL-6 産生 B細胞と IL-6 非産生 B細胞の細胞表面マーカーを比較し、IL-10 産生 B細胞に特異的な表面マーカー(CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24 など)を同定した。

2. B細胞特異的 IL-6 欠損マウス、B細胞特異的 IL-10 欠損マウスの作成

B細胞特異的 IL-6 欠損マウスは骨髓キメラマウスから作成した。野生型 (WT) マウスを致死量放射線照射してレシピエントとする。次に B細胞を遺伝的に欠く μ MT マウスおよび IL-6 欠損(IL-6^{-/-})マウスから骨髓細胞を分離し、それぞれ 8:2 の割合で混合し、レシピエントに尾静脈より注入してミックス骨髓キメラマウス(B cell-IL-6^{-/-}マウス)を作製した。

3. 強皮症モデルマウスにおける Effector B細胞/Regulatory B細胞の役割の検討

強皮症モデルマウスは、プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを使用した。このモデルはプレオマイシンを連日皮下投与することにより皮膚ならびに肺の線維化が誘導される。評価方法は、コントロール群と B cell-IL-6^{-/-}マウス群、B cell-IL-10^{-/-}マウス群の背部皮膚ならびに肺での線維化を比較検討する。線維化の定量にはシリウスレッド法およびハイドロキシプロリンの ELISA 法によって組織中のコラーゲンを定量した。

4. BAFF 阻害剤の Effector B細胞/Regulatory B細胞に対する効果の検討

BAFF 阻害剤の添加により、Effector B細胞・Regulatory B細胞の増減を解析した。また、プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスに BAFF 阻害剤を投与し Effector B細胞/Regulatory B細胞のバランスを解析した。

5. 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) IL-6 産生 B細胞のフェノタイプ解析

IL-6 陽性 B細胞と IL-6 陰性 B細胞の細胞表面マーカーを比較検討したところ IL-6 陽性 B細胞で、CD1d、CD9、CD21 が高発現しており、MZ B細胞のフェノタイプが示唆された。さらに、B細胞の強力な活性化因子の BAFF の受容体の一つである、TACI が高発現していた。次に、マウス脾臓 B細胞を Follicular B細胞、Marginal zone (MZ) B細胞、B1 B細胞の各サブセットにソーティングし、IL-6 と IL-10 の産生を調べたところ、MZ B細胞がより多くの IL-6 を産生していることが明らかとなった。また、IL-10 は、B1 B細胞がより多くの IL-10 を産生していることが確認された。

(2) 強皮症モデルマウスにおける IL-6 産生 Effector B細胞

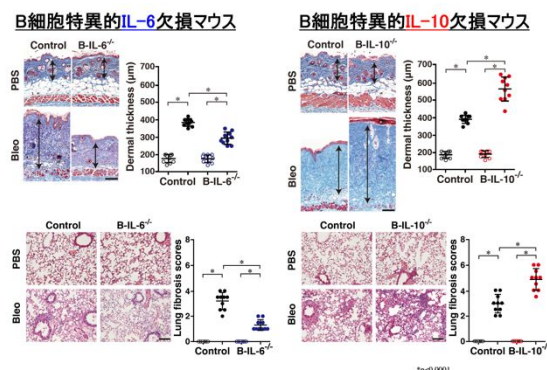
プレオマイシン誘発強皮症モデルマウスにおいて、プレオマイシン投与後の血清 IL-6、IL-10 濃度を測定したところ、IL-10 濃度は変化が見られなかったが、IL-6 濃度はプレオマイシン投与後に漸増傾向を認めた。また、脾臓由来 IL-6 産生 B細胞を調べるとプレオマイシン投与群において増加していた。

(3) 強皮症モデルマウスにおける Effector B細胞/Regulatory B細胞の役割の検討

B細胞特異的 IL-6 欠損マウス、B細胞特異的 IL-10 欠損マウスを作成し強皮症モデルマウスを誘導したところ B細胞特異的 IL-6 欠損マウスではコントロール群と比べ皮膚硬化が優位に減弱し、肺でも同様に線維化が優位に減弱した(右図)。一方、B細胞特異的 IL-10 欠損マウスではコントロール群と比べ皮膚硬化が優位に増強し、肺でも線維化が優位に増強していた(右図)。

(4) BAFF の Effector B細胞/Regulatory B細胞に対する効果

BAFF の in vitro における B細胞のサイトカイン産生に対する影響を解析したところ、BAFF

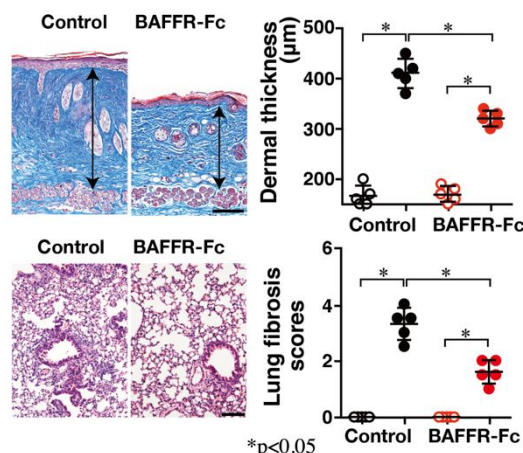


を加えると IL-6 の産生が増加し、IL-10 の産生が減少することが明らかとなった。一方、BAFF 受容体とイムノグロブリンの Fusion protein を使用し BAFF 阻害(BAFFR-Fc)を行うと、IL-6 産生 B 細胞の減少とともに IL-10 産生 B 細胞が増加した。

(5) BAFF 阻害の強皮症モデルマウスに対する効果

プレオモデルに BAFF 阻害剤(BAFFR-Fc)を投与したところ、コントロール群と比べ BAFF 阻害群で皮膚および肺の線維化が優位に減弱した(右図)。以上より、BAFF 阻害は強皮症モデルマウスの線維化を改善することが示された。

以上より、Effector B 細胞は IL-6 産生を介して強皮症の病態を促進し、Regulatory B 細胞は IL-10 産生を介して抑制することが明らかとなった。また、BAFF は Effector B 細胞を増加させ Regulatory B 細胞を抑制することにより強皮症の病態に強く関与していることが明らかとなった。さらに、BAFF 阻害により B 細胞バランスを Regulatory B 細胞優位とし、治療効果が期待できることが示された。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Kano M, Kobayashi T, Date M, Tennichi M, Hamaguchi Y, Strasser DS, Takehara K, Matsushita T. Attenuation of murine sclerodermatous models by the selective S1P1 receptor modulator cenerimod. *Sci Rep*. 24;9(1):658. 2019 doi: 10.1038/s41598-018-37074-9. (査読有り)
2. Mugii N, Matsushita T, Oohata S, Okita H, Yahata T, Someya F, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Hamaguchi Y. Long-term follow-up of finger passive range of motion in Japanese systemic sclerosis patients treated with self-administered stretching. *Mod Rheumatol*. 15:1-7. 2018 doi: 10.1080/14397595.2018. (査読有り)
3. Matsushita T, Kobayashi T, Mizumaki K, Kano M, Sawada T, Tennichi M, Okamura A, Hamaguchi Y, Iwakura Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. BAFF inhibition attenuates fibrosis in scleroderma by modulating the regulatory and effector B cell balance. *Science Advances* 4(7): eaas9944. 2018 doi: 10.1126/sciadv.aas9944. (査読有り)
4. Matsushita T, Date M, et al. Blockade of p38 MAP Kinase Inhibits Murine Sclerodermatous Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Am J Pathol*. 187(4): 841-850. 2017 doi: 10.1016/j.ajpath.2016.12.016. (査読有り)
5. Ikawa Y, Hamaguchi Y, Mugii N, Matsushita T, Takehara K. Classification of Japanese patients with mild/early systemic sclerosis (SSc) by the 2013 ACR/EULAR classification criteria for SSc. *Mod Rheumatol*. 27(4):614-617 2017 doi: 10.1080/14397595.2016.1250332. (査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Matsushita T, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: BAFF inhibition attenuates fibrosis in bleomycin-induced scleroderma model via modulating the regulatory and effector B-cell balance. American College of Rheumatology (ACR) 2018 Annual Meeting. Chicago, Oct 21, 2018 (poster)

〔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 :

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松下 貴史

ローマ字氏名：MATSUSHITA Takashi

所属研究機関名：金沢大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：60432126

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。