

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790947

研究課題名(和文) SLE に対する B 細胞除去後の免疫再構築における BAFF の役割

研究課題名(英文) Role of BAFF on immune reconstitution following B-cell depletive therapy for SLE

研究代表者

川端 大介 (KAWABATA DAISUKE)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10402835

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は抗二本鎖(ds)DNA 抗体重鎖トランスジェニックマウス(R4A-Tg)においてサイクロホスファミド(CY)投与による B 細胞除去後の免疫再構築期に血清 BAFF の上昇を認め DNA 反応性 B 細胞の優位な再構築がみられること、BAFF-R-Ig 投与により BAFF を中和するとこの再構築の阻止が可能であることを明らかにした。今回 CY 誘導 B 細胞除去後に過剰に産生されるクロマチン DNA を DNase により分解することによっても DNA 反応性 B 細胞の再構築が阻止できることを見出した。NZB/W F1 マウスでは CY 投与 2 週間後より蛋白尿減少と抗 dsDNA 抗体価の有意な低下を認め寛解が導入されるが、4 週間後より蛋白尿の再増加と抗 dsDNA 抗体価の再上昇を認めた。本再燃モデルを用いて CY 投与後の免疫再構築期に BAFF 阻害療法を行うことで再燃阻止が可能であるかについて解析中である。

研究成果の概要(英文)：We have reported that cyclophosphamide (CY)-induced B cell depletion resulted in an expansion of pathogenic high-affinity DNA-reactive B cells of R4A-Tg mice, followed by an increase of serum levels of BAFF (B cell-activating factor). Neutralization of BAFF by BAFF-R-Ig (BAFF-receptor-immunoglobulin) prevented the expansion of high-affinity DNA-reactive B cells in the reconstituting repertoire. Further, we have shown that bovine pancreatic DNase (Bp-DNase) treatment resulted in a reduction of BAFF production in estrogen-treated R4A-Tg mice. In the current study, we showed that the treatment of R4A-Tg mice with i.p. injection of Bp-DNase diminished the expansion of pathogenic DNA-reactive B cells. In NZB/W F1 mice, serum BAFF levels were elevated as they developed nephritis. Elevated serum BAFF levels were associated with serum anti-dsDNA antibody titers. B-cell depletion induced clinical remission 2 weeks after CY injection, followed by a reduction of anti-dsDNA antibodies titers and proteinuria. Four weeks after CY treatment, we observed clinical relapse as they showed re-increase of serum anti-dsDNA antibody titers and proteinuria. We are now performing experiments to elucidate whether BAFF inhibition by BAFF-R-Ig or Bp-DNase during reconstitution could prevent clinical flare-ups in CY-treated NZB/W F1 mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：SLE, B 細胞除去療法, BAFF, DNase, 免疫再構築

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は自己反応性 B 細胞のポリクローナルな増殖と抗 DNA 抗体をはじめとする多彩な自己抗体産生を特徴とする自己免疫疾患である。近年、抗 CD20 モノクローナル抗体 (Rituximab)などの B 細胞除去療法が SLE の治療法として有効であることが明らかになり、B 細胞をターゲットとした治療戦略が脚光を浴びている。しかし B 細胞除去療法後の末梢血 B 細胞数の回復に伴う臨床上の再燃が報告されていること (Jonsdottir T et al.2008)、米国での SLE に対する Rituximab の第 II/III 相臨床試験において投与 52 週目の臨床効果がプラセボ群と比して有意な差を認めなかった (Genentech Inc.2008) ことなどから、SLE における B 細胞除去療法の長期的有効性については疑問が投げかけられている。

近年 SLE 患者において Rituximab による B 細胞除去療法後に B 細胞の分化・増殖因子として知られる BAFF (B cell-activating factor) / BlyS (B lymphocyte stimulator)が血清中で上昇することが報告された (Pers JO et al.2007, Cambridge G et al.2008)。BAFF は TNF ファミリーに属する分子で単球、マクロファージ、樹状細胞の細胞膜上に発現され、可溶型として分泌される。BAFF は B 細胞上の受容体に結合すると、未熟 B 細胞の生存と分化、成熟 B 細胞の増殖、抗体産生を促進することが知られている (Batten M et al.2000)。B 細胞除去後の BAFF の過剰産生は末梢 B 細胞数を維持するためのフィードバック機構と考えられている。申請者はこれまでに抗 DNA 抗体産生モデルマウスとして知られる R4A トランスジェニックマウス (R4A-Tg) を用いて高用量サイクロホスファミド(CY)投与による B 細胞除去後の DNA 反応性 B 細胞の再構築について解析した。R4A-Tg マウスは抗二本鎖 DNA 抗体重鎖トランスジェニックマウスであり、軽鎖との組み合わせにより DNA に対して様々な親和性を有する抗 DNA 抗体を産生する (Offen D et al.1992)。R4A-Tg マウスに CY を単回腹腔内投与 (200mg/kg) すると血清中の BAFF の上昇は 3 週間以上持続し、投与後の免疫再構築期において脾臓 B 細胞における抗 DNA 抗体産生 B 細胞の割合が有意に増加していた。さらに Single cell-PCR を用いた抗 DNA 抗体産生 B 細胞の軽鎖レパトア解析により、病因性を有する高親和性 DNA 抗体産生 B 細胞が再構築期に選択的に増加していること、またこの現象が BAFF の中和療法 (BAFF-R-Ig)を併用することにより完全に阻止できることが明らかとなった。B 細胞除

去後の免疫再構築過程における高親和性 DNA 反応性 B 細胞レパトアの増加は SLE における B 細胞除去治療後の臨床上の再燃を説明しうる現象であり、この現象は再構築期に認められる過剰な BAFF の産生に依存しているものと考えられた。

これらの結果から B 細胞除去治療後に BAFF の中和療法を行うことが SLE の再燃の阻止、さらには長期寛解維持につながる可能性があると推測され新たな治療戦略として期待される。

2. 研究の目的

全身性エリテマトーデス(SLE)における B 細胞除去療法後の免疫再構築期に BAFF を阻害することで病態のさらなる改善ならびに寛解維持の持続がもたらされうるかについて SLE モデルマウスを用いて検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CY 誘導 B 細胞除去 R4A-Tg マウスの DNA 反応性 B 細胞再構築における DNase 治療の効果の検討

R4A-Tg において CY による B 細胞除去療法後の免疫再構築期に bovine pancreatic DNase の投与を行い抗 DNA 抗体産生 B 細胞の軽鎖レパトアを Single-cell PCR により解析し病因性を有する高親和性軽鎖レパトワの頻度、さらに抗 dsDNA 抗体価、腎症発症について検討する。

(2) NZB/W F1 マウスにおける CY 誘導 B 細胞除去の臨床効果による B 細胞除去を行い腎症の改善および再燃の有無を確認する。CY 投与後の血清抗 dsDNA 抗体価、および血清 BAFF の推移をモニターする。CY 投与後に DNase 治療およびアデノウイルスベクター発現 BAFF-R-Ig を投与しておくことで再燃の阻止、および腎症の改善を認めるかどうかについて検討する。

(3) NZB/W F1 マウスにおける CY 誘導 B 細胞除去の臨床効果による B 細胞除去を行い腎症の改善および再燃の有無を確認する。CY 投与後の血清抗 dsDNA 抗体価、および血清 BAFF の推移をモニターする。CY 投与後に DNase 治療およびアデノウイルスベクター発現 BAFF-R-Ig を投与しておくことで再燃の阻止、および腎症の改善を認めるかどうかについて検討する。

4. 研究成果

(1) CY 誘導 B 細胞除去 R4A-Tg マウスの DNA 反応性 B 細胞再構築における DNase 治療の効

果の検討

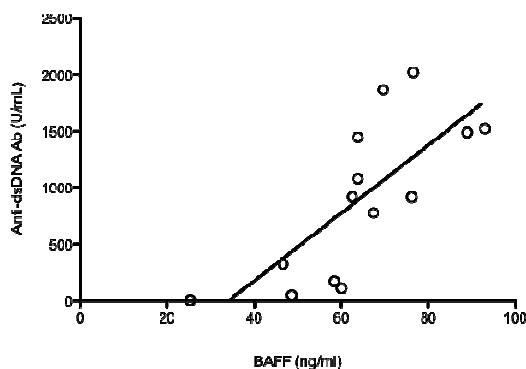
8-12 週令 R4A-Tg マウスに高用量 CY (200mg/kg)を単回腹腔内投与し、投与後より bovine pancreatic DNase 450μg 連日投与群, heat-inactivated DNase (HI-DNase) 450μg 連日投与群, PBS 連日投与群の 3 群に分けて投与し 2 週後に脾臓 DNA 反応性 B 細胞 (Tg+B 細胞)を Single cell PCR により免疫グロブリン軽鎖レパトア解析を行った。CY 投与後の高親和性 DNA 反応性 B 細胞の比率は CY 単独群および HI-DNase 投与群において有意に増加していたのに対し DNase 投与群においてはその増加が有意に抑制されていた。また抗 dsDNA 抗体価も DNase 投与群において有意に低下していた。5 週間投与後に腎病理組織を検討したところ、CY 単独投与群では腎糸球体への IgG 沈着を認めたのに対し DNase 投与群では沈着が有意に抑制されていた。

(2) NZB/W F1 マウスにおける CY 誘導 B 細胞除去の臨床効果

NZB/W F1 マウスは自然発症 SLE モデルマウスであり、雌においては 28 週齢以後より蛋白尿が出現する。

①32 週齢 NZB/W F1 マウスの血清抗 dsDNA 抗体価と血清 BAFF 値は有意な相関を示した (Fig.1) (Spearman $r = 0.8405$, P value = 0.0002)

Fig.1



②34 週齢 NZB/W F1 に高用量 CY を腹腔内投与し B 細胞除去後 10 日目 (d10)に抗 dsDNA 抗体価は有意に低下したが約 3 週間後 (d20)より抗体価は再上昇した。また尿蛋白量は CY 投与後 3 週目に有意に減少したがその後再増加傾向となり臨床的再燃と考えられた (Fig.2, 3)

Fig.2

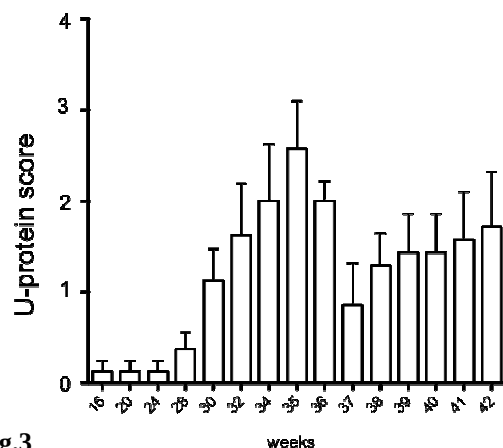
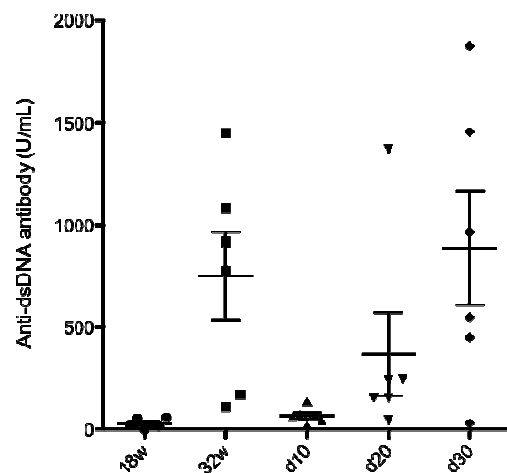


Fig.3



(3) NZB/W F1 マウスにおける CY 誘導 B 細胞除去後の BAFF 阻害療法の併用効果

BAFF-R-Ig 発現アデノウイルスベクター (Dr. Anne Davidson より供与)を SCID マウスの静脈内投与し、4 日後に血清採取し、BAFF-R-Ig を作成した。NZB/W F1 に高用量 CY を投与後 DNase あるいは週 2 回の BAFF-R-Ig 腹腔内投与により BAFF の産生を抑制しうるかどうか、さらには臨床的再燃の阻止、生存率を改善しうるかについて現在解析を進めている。

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 3 件)

1. Kawabata D, Jeganathan V, Ramanujam M, Davidson A, Grimaldi CM, Diamond B. Enhanced selection of high affinity DNA-reactive B cells following cyclophosphamide treatment. *PLoS ONE*, 2010;5(1):e8418.

2. Jeganathan V, Yoshifuji H. Kawabata D, Chinnasamy P, Stanevsky A, Grimaldi CM, Diamond B. Antigen is required for positive selection of pathogenic anti-DNA antibodies and systemic inflammation. *J Immunol*, 2011;186(9):5304-5312.

3. 川端大介. SLE 患者血清中 BAFF/BLyS および APRIL *リウマチ科* (43) 514-520. 2010.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 川端大介 リウマチ性疾患における B 細胞再構築. 第 53 回日本リウマチ学会総会シンポジウム(東京) 2009 年 4 月 24 日

2. 川端大介 SLE における B 細胞再構築
第 19 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会
シンポジウム
(大阪) 2009 年 8 月 7 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

川端 大介 (KAWABATA DAISUKE)
京都大学・医学研究科 ・助教
研究者番号：10402875

(2)研究分担者

なし

(3)研究協力者

Betty Diamond (Head, The Center for Autoimmune and Musculoskeletal Disease, The Feinstein Institute for Medical Research, NY, USA)

Anne Davidson (The Center for Autoimmune and Musculoskeletal Disease, The Feinstein Institute for Medical Research, NY, USA)