

令和 6 年 6 月 17 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：2022～2023

課題番号：22K20754

研究課題名（和文）全身性強皮症における病的B細胞の形質変化や機能の解明

研究課題名（英文）Evaluating the phenotypic changes and function of aberrant B cells in systemic sclerosis

研究代表者

淡路 健太郎（Awaji, Kentaro）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90966201

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）：全身性強皮症に類似の病態を示す、B細胞におけるFli1遺伝子を欠損させたマウスの脾臓では、age-associated B細胞と呼ばれる膠原病患者の血中で見られるがその意義が未知である特殊なB細胞が増加していた。同細胞の機能に関して網羅的な遺伝子解析を行ったところ、細胞同士の接着に関する遺伝子群の発現の増加や、B細胞の活性化や免疫応答に関わる遺伝子群の発現量に変化が見られた。また、同細胞ではエピジェネティクスと呼ばれるDNAへの後天的な修飾が加わり、interferon regulatory factor (IRF) ファミリーと呼ばれるタンパク質がDNAへ結合する領域に異常な調節が生じていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠原病の一種である全身性強皮症は、異常な免疫が自身を攻撃することにより生じる自己免疫疾患であり、その原因は未だ不明である。自己免疫疾患の患者数は年々増加しており、その病態解明および治療法の開発が待たれている。age-associated B細胞は自己免疫との関連が強く疑われているもののその意義や機能が現在も明らかではなく、一部の患者の血液中に少数が存在するのみであることから詳細な検討が難しい細胞群である。そのため、マウスモデルを用いて今回の解析を行った結果、B細胞におけるFli1の欠損は前述の変化を通して免疫異常の原因の一端を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We discovered that age-associated B cells were increased in the spleen of B cell-specific Fli1 knockout mice, which exhibit similar symptoms to patients with systemic sclerosis. Age-associated B cells are a special type of B cell found in the blood of patients with connective tissue disease, but the function and significance of it is still unknown. Comprehensive genetic analysis of the function of these cells using RNA-seq revealed an increased expression of genes related to cell-cell adhesion and changes in the expression levels of genes involved in B cell activation and immune response. In addition, the cells showed an acquired modulation of DNA binding site, called epigenetics. It abnormally regulated the region where the interferon regulatory factor (IRF) family bind to DNA.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：age-associated B細胞 B細胞 Fli1 全身性強皮症

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(Systemic Sclerosis: SSc)は免疫異常と諸臓器の線維化や血管障害を呈する自己免疫疾患で、病気の成因は未だ明らかではないが抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法がその有力な治療法であると近年示された。一方、転写因子 Fli1 の発現低下はヒト、マウスともに SSc の形質の発症と密接に関係することを示すデータが蓄積されてきている。具体的には、皮膚の表皮細胞や血管内皮細胞、マクロファージなど、全身の様々な細胞における Fli1 の発現低下が全身性強皮症の上記の特徴に類似した様々な症状を呈することを、研究代表者の所属する研究室でのこれまでの検討が見出してきた。本研究では上記の抗 CD20 抗体の臨床試験の結果を元に B 細胞の異常が SSc の病態形成に重要な役割を担っていると考え、B 細胞特異的な Fli1 の低下が B 細胞の形質に与える影響をマウスモデルで検討した。研究代表者の事前研究により、B 細胞特異的 Fli1 欠失マウスの脾臓では自己免疫疾患との関連が近年相次いで報告されている CD11b⁺CD11c⁺または T-bet⁺CD11c⁺ の特殊な抗原パターンを有する age-associated B 細胞が若齢の段階から既に多数出現していることが判明している。本細胞群の機能や病態形成における役割は未だ不明な部分が多く、かつ細胞数が微小な集団であることからヒト血液より単離してその特徴を検討することが難しいという性質を有している。そのため、マウスモデルを用いて同細胞群の性質を中心とする解析を行うことを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は B 細胞における Fli1 の低下により B 細胞に生じる変化、特に誘導されている age-associated B 細胞がどのような特徴を有しているかを調べ、病態との関わりを検討することである。age-associated B 細胞は自己免疫や慢性炎症との関連について高齢マウス及び他の遺伝子改変マウスモデルでもその存在の報告が相次いでいる非常に注目度の高い細胞群である。同細胞群が SSc 患者の血液の中に見られるかに関しても検討を行い、症状等との関係について考察する。

3. 研究の方法

(1) *Fli1^{flox/flox}* マウス (ボストン大学 Maria Trojanowska 教授より供与) と *Cd19-Cre* マウスを交配し作成した B 細胞特異的 Fli1 欠失マウス (*Cd19-Cre⁺;* *Fli1^{flox/flox}*; Fli1 BcK0 マウス) の脾臓からリンパ球を含む脾細胞を抽出し、抗体で染色した後にフローサイトメトリーにより B 細胞の population に関する評価を行った。さらに、CD11b⁺CD11c⁺ age-associated B 細胞を cell sorting により単離し、以下の実験を行った。

単離した細胞から RNA を抽出して NEBNext® Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® を用いて cDNA ライブラリー作成を行い、RNA-sequence(RNA-seq)を行った。得られたデータを Star mapping でマッピング後、HOMER および DESeq2 を用いて発現変動遺伝子を出し、特徴的な遺伝子発現の変化を調べた。

同様に単離した age-associated B 細胞を Tn5 transposase 処理し DNA のタグメンテーションを行い、得られた DNA を PCR および磁気ビーズで処理してサンプルを作成し、Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing(ATAC-seq)を行った。得られたデータをトリミングし Bowtie2 でマッピング後、MACS2 を用いてピークコールを行った。また、HOMER を用いてモチーフ解析を行った。

(2) ヒト全身性強皮症患者の末梢血検体を溶血処理後、抗体で染色し同様にフローサイトメトリーを行い、age-associated B 細胞に関する評価を行った。血液検体に関しては、文書による同意を得た患者のみを対象とし、通常診療で血液検査を行った際の残検体を使用するとともに、被験者のプライバシー保護に対して十分な配慮を行った。

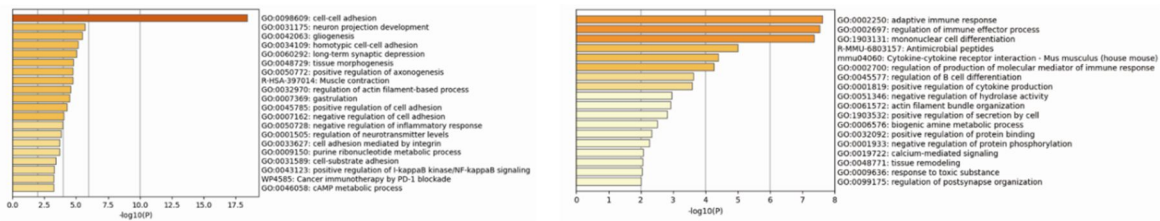
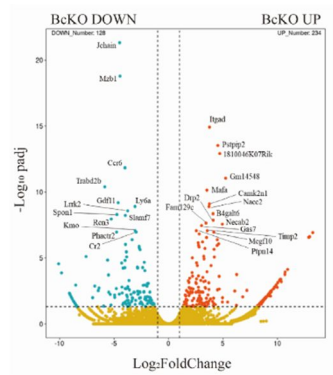
4. 研究成果

(1)

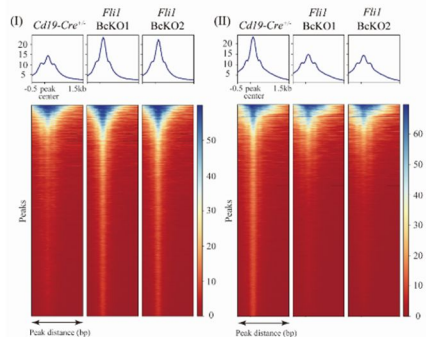
Fli1 BcK0 マウスの脾臓における B 細胞では、濾胞性 B 細胞(Cd21^{int}Cd23^{high})と辺縁帯 B 細胞(Cd21^{high}Cd23^{low})の割合が減少し、Cd21^{mid}Cd23⁺の表面抗原パターンを呈する Newly Formed B 細胞の分画が著明に増加していた。これらの細胞群では TLR9 の発現が亢進しており、さらに同分画内では、Cd43⁺ B-1 B 細胞や Cd11b⁺Cd11c⁺または T-bet⁺Cd11c⁺ age-associated B 細胞の増加が見られた。これらより age-associated B 細胞を Cell sorting で単離し、更に以下の解析を行った。

Fli1 BcK0 マウスで増加している age-associated B 細胞における RNA-seq を行い発現変動

遺伝子を解析した。クラスタリングを行った後に施行した G0 解析では細胞接着に関与する遺伝子群が強くエンリッチされており、B 細胞の活性化や免疫応答に関わる遺伝子群の発現にも変動が見られた。細胞接着に関しては、当研究室の検討により細胞接着因子である LFA-1 や Talin-1, Kindlin-3 の発現が Fli1 欠失 B 細胞および SSc 患者由来 B 細胞において上昇していることが判明しており、同様の変化が age-associated B 細胞でも起きている可能性が示唆された。これらの発現増加は細胞接着を介して血管内皮細胞の活性化に関与している可能性があり、SSc の病態の一つである血管障害の誘導に関わっている可能性が推測された。



さらに、Fli1 の低下が本細胞群における遺伝子発現にエピジェネティックな変化を及ぼしているかを検討する目的で行った ATAC-seq では、B 細胞における Fli1 の低下によりピークサイトの分布がコントロールマウス (*Cd19-Cre^{+/+}*) と比較して変化しており、Fli1 の低下により誘導された age-associated B 細胞はエピジェネティックな制御を受けていることが示された。モチーフ解析では、interferon regulatory factor (IRF) 8 や 3 など、IRF ファミリーのクロマチンアクセシビリティに関する変化が lost peak の上位に来ており、異常な調節が生じていた。これらの変化も、Fli1 BcKO マウスにおける B 細胞の機能変化に関与している可能性が予想された。



Fli1 BcKO lost peak

| TF | Motif | % of Targets | P-value |
|------|-------|--------------|---------|
| IRF8 | | 10.0% | 1e-133 |
| IRF3 | | 9.3% | 1e-108 |
| CTCF | | 5.7% | 1e-99 |
| PU.1 | | 12.0% | 1e-96 |
| Fli1 | | 19.2% | 1e-91 |
| ⋮ | ⋮ | ⋮ | ⋮ |
| KLF5 | | 13.8% | 1e-3 |

その他、Fli1 BcKO マウスの脾臓では age-associated B 細胞以外にも濾胞性 B 細胞における Cd138 陽性細胞の割合や Cd138 の Mean fluorescence intensity (MFI) が上昇しており、潜在的に plasmablast の形質を有している可能性が推測された。

B 細胞における Fli1 の低下はこれらの変化を通して、自己免疫の病態に関与している可能性が示唆された。

また、ヒト全身性強皮症患者の末梢血において Cd11b, Cd11c, T-bet を発現している異常な age-associated B 細胞が存在しているかに関して評価を行い、一部の患者群の末梢血中に同様の形質を持つ細胞群の出現が見られた。age-associated B 細胞が血中に見られた患者は血流障害を示す強い手指潰瘍や肺高血圧症を合併症として有していたが、全 15 例を測定した中で age-associated B 細胞が血中に見られたのは 2 名のみ (13%) であり、症状や予後との関連に一定の見解を出すには更なる症例の蓄積が必要であると考えられた。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|------------------------------------|
| 1．発表者名 淡路健太郎 |
| 2．発表標題 Flt1の発現低下がB細胞の形質変化に及ぼす影響 |
| 3．学会等名 第11回皮膚科最新医療研究会 |
| 4．発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

| | 氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号） | 所属研究機関・部局・職 （機関番号） | 備考 |
|-------|---|-----------------------|----|
| 研究協力者 | マリア トロジャノフスカ (Maria Trojanowska) | | |

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|