

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09515

研究課題名(和文) 遺伝子発現に基づくCD38+CD43+B細胞を標的とするSLEの新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic strategy targeting CD38+CD43+ B cell for SLE based on gene expression profile

研究代表者

藤井 博司 (FUJII, HIROSHI)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30531321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は健常人、SLE患者のB細胞サブセットの遺伝子発現プロファイルを比較することにより、SLEにおいて活性化されている遺伝子群の抽出を行い、SLEに対する新たな治療法の開発を目指した。健常人に比べて、SLE患者由来の各B細胞分画においてI型インターフェロン(IFN)誘導遺伝子群の有意な上昇を、SLE由来形質芽細胞に細胞分裂関連遺伝子群の有意な上昇を認め、in vitroの実験においてIFNによるプライミングがB細胞刺激の閾値を下げることを示した。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop the novel therapeutic strategy for SLE by analysis of gene expression profiling of plasmablast, naive B cell, memory B cell from healthy donors and SLE patients. Whereas IFN inducible genes were significantly elevated in each B cell subset of SLE patients, cell cycle related genes were increased in SLE plasmablast. And we also showed that priming of B cell with IFN stimulation caused to lower the threshold for B cell stimulation.

研究分野：膠原病

キーワード：全身性エリテマトーデス インターフェロン B細胞

## 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) は抗 2 本鎖 DNA 抗体をはじめとする自己抗体介在性に組織病変が引き起こされる自己免疫疾患であり、その病態には B 細胞 形質細胞への活性化、分化異常が関与していると考えられている。形質芽細胞はリンパ組織内で刺激された活性化 B 細胞と骨髄内で抗体を産生する形質細胞の間に位置づけられており、末梢血中に出現し、抗体産生能と細胞分裂能を有すると考えられている。SLE 患者に認められる B 細胞分画異常として、形質芽細胞 (CD19<sup>lo</sup>CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>++</sup>) の比率が上昇しており、疾患活動性に相関することが知られていた。CD43 は活性化 B 細胞に発現されており、CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B 細胞がその遺伝子プロファイリングから前形質芽細胞に位置づけられることも報告されており、CD43<sup>+</sup> B 細胞の形質芽細胞との関連、SLE の病態への関与が示唆されていたが、その遺伝子発現プロファイルや、SLE の病態への関与は不明であった。

## 2. 研究の目的

SLE 末梢血中に存在する CD38<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> B 細胞に着目し、その遺伝子プロファイリングの解析による病的意義の解明と新たな治療標的分子の同定を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) フローサイトメトリーによる末梢血中 B 細胞分画の解析

CD38<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> B 細胞の活動性 SLE に対する特異性の有無を明らかにする。SLE 患者、健康人末梢血より末梢血単核球 (PBMC) を分離し、抗 CD19、CD38、CD43、CD27 抗体を組み合わせ、フローサイトメトリーを行った。

### (2) マイクロアレイによるナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞、CD38<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> B 細胞の遺伝子プロファイリングの解析

健康人、SLE 患者末梢血 B 細胞よりナイーブ

B 細胞、メモリー B 細胞、CD38<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> B 細胞をフローサイトメトリーにて分離後、mRNA 発現量をマイクロアレイ (Agilent 社) により定量比較した。それらをパスウェイ解析 (IPA) を行なうことにより、各 B 細胞分画において、健康人に比べ SLE 患者に特徴的に上昇している遺伝子群の抽出を行った。

### (3) SLE 患者末梢血 B 細胞上の IFITM1 の発現

I 型 IFN のシグナルが入った B 細胞の細胞表面抗原マーカーとして、IFITM1 (interferon-induced transmembrane protein 1) を選び、抗 CD19、CD38、CD43、CD27 抗体に加え、抗 IFITM1 抗体を組み合わせ、フローサイトメトリーを行った。

### (4) IFN の B 細胞刺激における役割

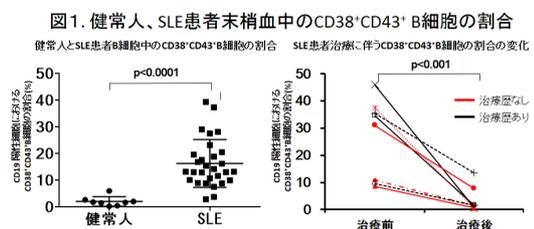
健康人末梢血単核球より B 細胞を分離、CSFE で標識し、IFN (1000U/ml) で 24 時間刺激後、抗 IgG/IgM 抗体、組み替え CD40、IL2、IL-10、IL-21 による刺激を行った。上記刺激後 CSFE 強度をフローサイトメトリーで定量することにより細胞分裂回数の比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 末梢血中 CD38<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> B 細胞の定量

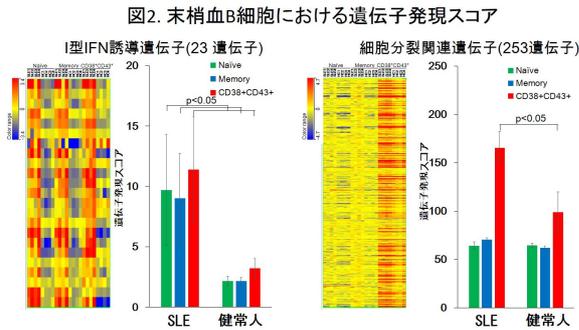
フローサイトメトリーにより健康人、SLE 患者末梢血中 B 細胞中の CD38<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> の割合を定量した。SLE 患者末梢血 B 細胞において CD38<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> の細胞の割合は健康人に比して有意に高く、また、治療により CD38<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> 細胞の割合は有意に低下した

(図 1)



## (2) マイクロアレイによる B 細胞サブセットの遺伝子プロファイリングの解析

健康人(n=4), SLE(n=4)末梢血中のナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞、形質芽細胞を分離し遺伝子発現プロファイリングを行った。各 B 細胞サブセットにおいて、I 型インターフェロン誘導遺伝子が健康人に比して SLE 患者 B 細胞で有意に上昇し、形質芽細胞のみにおいて細胞分裂関連遺伝子が上昇していた(図 2)。



## (3) SLE 患者末梢血 B 細胞上の IFITM1 の発現

IFITM1 は I 型 IFN 誘導遺伝子の prototype の一つである。結果 におけるマイクロアレイでも、SLE 患者由来の各 B 細胞サブセットにおいて、IFITM1 の発現が有意に上昇していた(図 3)。また、活動期 SLE 患者末梢血 B 細胞の一部に IFITM1 の発現が認められた(図 4)。

図3. B細胞サブセットにおけるIFITM1の相対的発現量

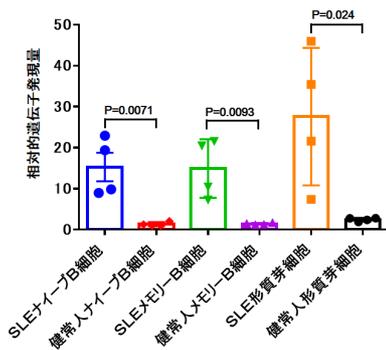
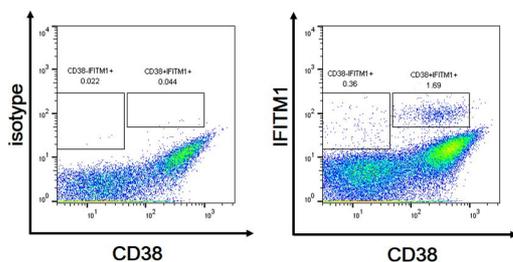


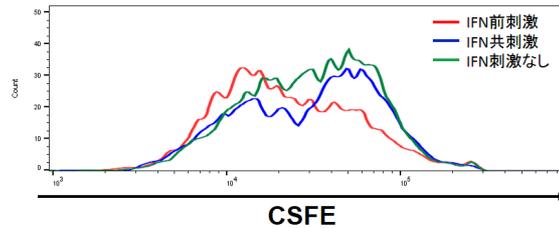
図4. SLE患者末梢血B細胞(CD19 gated)



## (4) B細胞刺激後の細胞分裂における IFN 刺激の効果

IFN 刺激(前刺激; B 細胞の 24 時間前より IFN 刺激、共刺激; B 細胞刺激と同時に IFN 刺激) B 細胞刺激後の細胞分裂回数を CSFE 希釈により定量した。IFN 刺激なし、IFN 共刺激に比べ、IFN 前刺激により刺激後 B 細胞はより多く分裂した(図 5)。

図5. B細胞刺激後分裂に対するIFNαの効果



マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングの比較により、SLE 患者由来末梢血 B 細胞各サブセットにおいて I 型 IFN 誘導遺伝子が有意に多く発現しており、また SLE 由来形質芽細胞において細胞分裂関連遺伝子が健康人に比べて有意に上昇していることが示された。前者は既報に概ね一致するが、後者は今回新たに見出された点である。また、in vitro の実験結果から、IFN で priming された B 細胞は BCR を介した刺激に対する感受性が上昇した。IFN 誘導遺伝子が SLE の病態に関与しているであろうことは知られているが、細胞レベル、分子レベルでの機序は不明であった。IFN の priming による B 細胞の活性化異常は SLE の病態に直接寄与する可能性があり、今後は分子レベルでの機序の解明を進めていく予定である。また、今回 IFN で誘導される膜タンパク IFITM1 が SLE 患者 B 細胞の一部に発現されていることも見出した。細胞表面 IFITM1 は末梢血中の IFITM1 primed B cell の有用なマーカーとなり、細胞表面に存在することから、抗体製剤による新たな治療の標的となりうる可能性がある。

## 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 11 件)以下、全て査読有。

1. Ichikawa S, Fukuhara N, Hatta S, Himuro M, Katsushima H, Nasu K, Ono K, Inokura K, Kobayashi M, Onishi Y, Fujii H, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Successful Cord Blood Stem Cell Transplantation for Primary Cutaneous CD8-positive Aggressive Epidermotropic Cytotoxic T-cell Lymphoma Complicated with Cerebral Infiltration. *Intern Med*. 2018 Mar 9. doi: 10.2169/internalmedicine.0568-17. [Epub ahead of print]
2. Ishii T, Tanaka Y, Kawakami A, Saito K, Ichinose K, Fujii H, Shiota Y, Shirai T, Fujita Y, Watanabe R, Chiu SW, Yamaguchi T, Harigae H. Multicenter double-blind randomized controlled trial to evaluate the effectiveness and safety of bortezomib as a treatment for refractory systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol*. 2018 Feb 15;1-7. doi: 10.1080/14397595.2018.1432331.
3. Ojima Y, Sawada K, Fujii H, Shirai T, Saito A, Kagaya S, Aoki S, Takeuchi Y, Ishii T, Nagasawa T. Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Vasculitis (AAV) Restricted to the Limbs: A Case Report. *Intern Med*. 2018 May 1;57(9):1301-1308. doi: 10.2169/internalmedicine.9848-17. Epub 2017 Dec 27.
4. Ikeda T, Fujii H, Nose M, Kamogawa Y, Shirai T, Shiota Y, Ishii T, Harigae H. Bortezomib treatment induces a higher mortality rate in lupus model mice with a higher disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2017 Aug 11;19(1):187. doi: 10.1186/s13075-017-1397-7.
5. Shirai T, Fujii H, Saito R, Nasu K, Kamogawa Y, Fukuhara N, Fujita Y, Shiota Y, Ishii T, Harigae H. Relapsing Polychondritis Complicated by Myelodysplastic Syndrome Is Resistant to Immunosuppression: Comment on the Article by Dion et al. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Mar;69(3):682-683. doi: 10.1002/art.39969. Epub 2017 Feb 2.
6. Watanabe R, Ishii T, Yoshida M, Takada N, Yokokura S, Shiota Y, Fujii H, Harigae H. Ulcerative keratitis in patients with rheumatoid arthritis in the modern biologic era: a series of eight cases and literature review. *Int J Rheum Dis*. 2017 Feb;20(2):225-230. doi: 10.1111/1756-185X.12688. Epub 2015 Jul 14. Review.
7. Tomiyama F, Watanabe R, Ishii T, Kamogawa Y, Fujita Y, Shiota Y, Sugimura K, Fujii H, Harigae H. High Prevalence of Acute Exacerbation of Interstitial Lung Disease in Japanese Patients with Systemic Sclerosis. *Tohoku J Exp Med*. 2016 Aug;239(4):297-305. doi: 10.1620/tjem.239.297
8. Saito S, Ishii T, Kamogawa Y, Watanabe R, Shirai T, Fujita Y, Shiota Y, Fujii H, Ito K, Shimokawa H, Yamaguchi T, Kawaguchi Y, Harigae H. Extracorporeal Shock Wave Therapy for Digital Ulcers of Systemic Sclerosis: A Phase 2 Pilot Study. *Tohoku J Exp Med*. 2016 Jan;238(1):39-47. doi: 10.1620/tjem.238.39.
9. Yoshida M, Watanabe R, Ishii T, Machiyama T, Akita K, Fujita Y, Shiota Y, Sugimura K, Fujii H, Shimokawa H, Harigae H. Retrospective analysis of 95 patients with large vessel vasculitis: a single center experience. *Int J Rheum Dis*. 2016 Jan;19(1):87-94. doi: 10.1111/1756-185X.12777. Epub 2015 Oct 7.
10. Ishizuka M, Watanabe R, Ishii T, Machiyama T, Akita K, Fujita Y, Shiota Y, Fujii H, Harigae H. Long-term follow-up of 124 patients with polymyositis and dermatomyositis: Statistical analysis of prognostic factors. *Mod Rheumatol*. 2016;26(1):115-20. doi: 10.3109/14397595.2015.1054081. Epub 2015 Jun 13.
11. Tomiyama F, Watanabe R, Fujii H, Kamogawa Y, Fujita Y, Shiota Y, Nakamichi T, Sato H, Ishii T, Harigae H. Synovitis in a Patient with IgG4-related Disease. *Intern Med*. 2015;54(11):1427-32. doi: 10.2169/internalmedicine.54.4320. Epub 2015 Jun 1.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 藤井博司、能勢真人、武藤智之、秋田佳奈恵、鴨川由起子、白井剛志、城田祐子、石井智徳、張替秀郎。高疾患活動性ルーブモデルマウスへのボルテゾミブ投与による致死的毒性について。第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会。2017

2. Hiroshi Fujii, Tomoko Ikeda, Masao Nose, Tomoyuki Muto, Kanae Akita, Yukiko Kamogawa, Tsuyoshi Shirai, Hideo Harigae. Bortezomib Treatment Induces Higher Mortality Rate in Lupus Model Mice with High Disease Activity. 2016ACR Annual Meeting. 2016
3. 藤井博司、能勢真人、武藤智之、秋田佳奈恵、鴨川由紀子、藤田洋子、城田祐子、石井智徳、張替秀郎。Longer suppression of antibody by sequential therapy with bortezomib and cyclophosphamide in lupus model mouse. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会。2016
4. Hiroshi Fujii, Tomoaki Machiyama, Kanae Akita, Yukiko Kamogawa, Ryu Watanabe, Yoko Fujita, Tomonori Ishii, Hideo Harigae. Cell cycle related gene signature and interferon inducible gene signature in circulating CD38+CD43+ B cell subset in B cell. 第59回日本リウマチ学会。2015

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )

〔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：  
 取得年月日：  
 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  
 血液免疫病学分野ホームページ  
<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤井 博司(Fujii, Hiroshi)  
 東北大学・医学系研究科・准教授  
 研究者番号：30531321

### (2)研究分担者

( )