

令和元年8月31日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10153

研究課題名(和文) B10細胞による自己免疫性皮膚疾患治療

研究課題名(英文) Treatment for autoimmune skin diseases with B10 cells

研究代表者

藤本 徳毅 (Fujimoto, Noriki)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50378460

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)：IL-10を産生するB細胞(B10細胞)に特異的な分子を同定することはできなかった。しかし、ヒト自己免疫性水疱症患者の末梢血中B10細胞の検討では、類天疱瘡ではなく天疱瘡において、B10細胞の比率が治療抵抗性に関連していることを見いだした。さらに、CD9陽性およびCD27陰性B細胞におけるIL-10産生能の低下が、天疱瘡の病因に関連していることを示唆する結果を得た。また、B10細胞の多くがCD26陽性であることが判明したため、DPP4阻害薬と関連した水疱性類天疱瘡患者の皮膚病変を検討した。CD26陽性細胞の増加が、紅斑が軽度で末梢血好酸球数が少ないという臨床的特徴と関連があると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己抗体により水疱を作る自己免疫性水疱症は天疱瘡と類天疱瘡に大別される。今回の研究成果により、天疱瘡においてはIL-10という免疫を抑制するサイトカインを産生するB細胞が病因に関連し、類天疱瘡と天疱瘡の病因は異なる可能性があることを示唆する結果を得た。また、糖尿病治療薬であるDPP4阻害薬による類天疱瘡ではCD26陽性B細胞が病態に関連していることが示唆された。これらにより、自己免疫性水疱症の治療にIL-10産生B細胞をターゲットにできる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We could not detect molecules specific for IL-10-producing B cells called B10 cells. However, we found that B10 cells in peripheral blood mononuclear cells of patients of human autoimmune bullous diseases were associated with not pemphigoid but pemphigus. B10-cell level in pemphigus was not associated with disease severity but inversely correlated with the required dose of steroid for treatment. This study suggests that the lower production of IL-10 in CD9+ and CD27- B-cell subsets are associated with the pathogenesis of pemphigus. Moreover, we found that most of B10 cells were positive for CD26. So, we histologically evaluated the infiltration of CD26-positive cells in the skin lesions of DPP4 associated pemphigoid. From the results, we consider that more infiltrated CD26-positive cells are clinically associated with mild erythema and decreased peripheral counts of eosinophil in DPP4 associated pemphigus than in usual pemphigus.

研究分野：自己免疫性皮膚疾患

キーワード：抑制性B細胞 B10 IL-10 CD26

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

1. 研究開始当初の背景

難治性自己免疫性皮膚疾患の治療には、大量ステロイドや免疫抑制剤、ガンマグロブリン大量静注療法 (IVIg) などの選択肢がある。それらの治療法を選択しても、全例に十分な効果が期待できるわけではなく反応性の良い群と悪い群が存在する。治療効果に免疫寛容が関与している可能性があるが、詳細は不明である。免疫寛容の維持に重要である免疫抑制機能を持つ細胞としては、抑制性 T 細胞 (Treg) が有名であり、精力的に研究がすすめられている。一方、T 細胞だけでなく B 細胞にも免疫抑制機能を有する細胞がいることが最近になり報告され、注目されてきている。マウスでは IL-10 を産生する B 細胞 (B10 細胞) が抑制性機能を持つという報告が多数されており、ヒト末梢血中にも B10 細胞が存在することが報告されているため、我々は B10 細胞に着目してきた。B10 細胞を特異的に認識できる細胞表面分子はまだ発見されていないため、B10 細胞を同定するには *in vitro* で刺激して IL-10 の産生能をみるしかない。我々も、ヒト健常人の末梢血を *in vitro* においてマウスとは違う条件下で PMA、ionomycin、CpG などを用いて刺激して細胞内染色をすることで、IL-10 産生 B 細胞が同定できることを確認している。

ヒトの疾患における B10 細胞の関与に関しては、関節リウマチ患者では健常人よりも B10 細胞が少なく、特に活動性が高い患者では低いことが報告され、B10 細胞と自己免疫疾患の関係について注目されてきている。しかし、ヒト自己免疫疾患での B10 細胞の検討はまだ少なく、治療に B10 細胞を用いることができるかについては不明である。そこで、IVIg を施行した自己免疫疾患患者の治療前後で B10 細胞の比率が変化するかを検討したところ、成人川崎病症例では増加を認めなかったが、IVIg により長期的寛解が得られた難治性天疱瘡症例では、治療後に末梢血中の B10 細胞が増加することを見いだした。注目すべき事に、過去の報告とは違い CD5 陰性分画に IL-10 産生細胞を多く認めていた。そのため、他の様々な自己免疫性皮膚疾患の治療反応性に B10 細胞が関係しているかを明らかにすることを目指すことにした。

また、マウス B10 細胞は *in vitro* で IL-21 存在下に増殖すると報告されているが、ヒト自己免疫疾患に *in vitro* で増殖させた自己の B10 細胞を投与して治療を試みることはできない。そこで、当大学ではカニクイザルを飼育しており、そのサルを用いて B10 細胞によるサル自己免疫性皮膚疾患に対する新規治療法の開発を目指すことにした。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では以下を目的とした。

- (1) ヒト自己免疫性皮膚疾患、特に自己免疫性水疱症に B10 細胞が関係しているかを解明する。
- (2) 自己免疫性水疱症モデルサルを B10 細胞により治療する。

3. 研究の方法

末梢血より単核球を分離し、*in vitro* で CpG と LPS で 24 時間もしくは 48 時間刺激し、最後の 4 時間は brefeldinA 存在下に PMA、ionomycin で刺激する。細胞を回収してパラホルムアルデヒドで固定し、細胞内の IL-10 や IL-35 などの抑制性サイトカインを染色し、フローサイトメトリーで IL-10 や IL-35 の陽性細胞を解析する。CD19 陽性 IL-10 陽性細胞を B10 細胞とし、B 細胞に対する比率を測定する。

(1) ヒト自己免疫性皮膚疾患に IL-10 を産生する B 細胞 (B10 細胞) が関係しているかを解明する

- ・健常人の末梢血を用いて、CD5、CD9、CD24、CD26、CD27、CD38、PD-L1、PD-L2 などの表面分子の発現と IL-10 や IL-35 を産生している集団との関係を検討し、B10 細胞に特異的な表面分子の同定を試みる。
- ・治療開始前の自己免疫性水疱症患者と健常人で、末梢血中の B10 細胞の比率や IL-10 を産生する B 細胞分画の違いをフローサイトメトリーで検討し、差があるかを検討する。
- ・自己免疫性水疱症患者の末梢血を用いて、末梢血 B10 細胞の比率と疾患重症度スコア (例えば天疱瘡であれば PDAI) と相関があるか、末梢血 B10 細胞の比率と標準治療で寛解に持ち込めたかどうか、に相関があるかを調べる。また、治療に伴う末梢血 B10 細胞比率および表面分子の変化をフローサイトメトリーで解析し、どの分画が IL-10 を産生しているかを検討する。
- ・自己免疫性水疱症患者の血清を用いて、ELISA で IL-10 および IL-35 の濃度を測定し、健常人と比較する。
- ・水疱性類天疱瘡患者の皮膚病変部の病理組織標本を用いて、免疫組織化学染色で CD26 などを染色し、抑制性 B 細胞と病型や臨床像との相関があるかと検討する。

(2) 自己免疫性水疱症モデルサルを B10 細胞により治療する。

- ・抗ヒト基底膜モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの上清を回収し、プロテイン G カラムで抗体を精製する。精製した抗ヒト基底膜抗体をカニクイザルに投与し、水疱を形成させる。サルの末梢血より *in vitro* で IL-21 を用いて増殖させた B10 細胞をカニクイザルに移入し、治療効果があるかを検討する。

4. 研究成果

(1) IL-10 および IL-35 の産生能と CD5、CD9、CD24、CD26、CD27、CD38、PD-L1、PD-L2 などの表面分子の発現との関係を検討し、ヒトの B10 細胞に特異的な表面分子の同定を試みたが、同定することはできなかった。

(2) 天疱瘡、類天疱瘡患者の末梢血中の IL-10 を産生する B10 細胞を健常人と比較したところ、天疱瘡患者では B10 細胞の比率が健常人と比較して有意に低いことが判明した。一方、類天疱瘡患者に関しては、健常人と差がなかった。しかし、抑制性 B 細胞のフェノタイプとして報告されている CD24^{hi}CD38^{hi}B 細胞の比率に関しては、天疱瘡患者では健常人と比較して有意に高く、類天疱瘡患者では健常人と差がなかった。そこで、天疱瘡患者の B10 細胞に関してさらに検討した。天疱瘡の疾患重症度と B10 細胞の比率とは相関がみられなかった。しかし、B10 細胞の比率は、天疱瘡の治療に伴い回復することが分かった。また、天疱瘡の治療に高用量のステロイドを要した群と、低用量のステロイドで治療できた群の B10 細胞を比較すると、高用量のステロイドを要した群の方が有意に B10 細胞の比率が低いことが判明した。さらに、種々の B 細胞表面分子を染色して、IL-10 を産生する B 細胞分画に関して検討したところ、天疱瘡患者では CD9 陽性細胞および CD27 陰性細胞における IL-10 産生細胞の比率が、健常人と比較して減少していることが分かった。以上のことから、自己免疫性水疱症においては、類天疱瘡ではなく天疱瘡において B10 細胞が関与しており、CD9 陽性 B 細胞や CD27 陰性 B 細胞の IL-10 産生能低下が、天疱瘡の病因に関与していることが示唆された。

(3) IL-10、IL-35 の末梢血中の濃度を ELISA で検討したところ、水疱性類天疱瘡患者と健常人の比較では、IL-10、IL-35 ともに有意な差はみられなかった。また、水疱性類天疱瘡との関与が近年指摘されている DPP4 阻害薬との関連も検討したが、DPP4 阻害薬と関連のある水疱性類天疱瘡と関連のない水疱性類天疱瘡でも、血中の IL-10、IL-35 濃度に有意な差はみられなかった。

(4) B10 細胞の多くが CD26 陽性であることが判明したため、DPP4 阻害薬と関連した水疱性類天疱瘡患者の皮膚病変を検討したところ、DPP4 阻害薬と関連のない水疱性類天疱瘡患者の皮膚病変と比較して、CD26 陽性細胞が増加していた。DPP4 阻害薬と関連のある水疱性類天疱瘡にみられる紅斑が軽度で末梢血好酸球数が少ないという臨床的特徴との関連が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Decreased level of interleukin-10-producing B cells in patients with pemphigus but not in patients with pemphigoid.

Kabuto M, Fujimoto N, Takahashi T, Tanaka T.

Br J Dermatol. 2017; 176: 1204-1212.

〔学会発表〕(計 1 件)

Analysis Of Serum Interleukin-10 And Interleukin-35 Levels In Pemphigoid Patients

Miho Kabuto, Noriki Fujimoto, Toshihiro Tanaka

International Investigative Dermatology 2018

〔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：小笠原一誠

ローマ字氏名：Ogasawara Kazumasa

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20169163

研究分担者氏名：田中俊宏

ローマ字氏名：Tanaka Toshihiro

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50188314

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋聡文

ローマ字氏名：Takahashi Toshifumi

研究協力者氏名：加太美保

ローマ字氏名：Kabuto Miho

研究協力者氏名：塚本裕子

ローマ字氏名：Tsukamoto Yuko

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。