

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19603

研究課題名(和文) アポトーシス/CD300aを基軸とした全身性強皮症の病態解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Roles of CD300a in the pathogenesis of systemic sclerosis

研究代表者

綾野 雅宏 (Ayano, Masahiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40773677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CD300aはアポトーシス細胞上のホスファチジルセリンをリガンドとしてアポトーシスの制御に関わる免疫応答分子である。本研究では、CD8陽性T細胞の分化および活性化に伴いCD300a発現レベルが亢進し、CD300a陽性分画でサイトカイン産生や細胞傷害活性などのエフェクター機能が強いことを明らかにした。またアポトーシス細胞との相互作用ではCD300aシグナルを介してCD8陽性T細胞の活性が抑制されることを示した。全身性強皮症患者の解析ではCD8陽性T細胞上のCD300a発現レベルがびまん性皮膚硬化型で亢進しスキンスコアと正の相関を示したことから、病態への関与も想定される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は既存の免疫抑制療法や分子標的療法では生命予後の改善に乏しく、病態の解明および新規治療法の開発が必要な疾患である。本研究ではCD300a陽性CD8陽性T細胞の機能的特徴を解明し、CD8陽性T細胞がアポトーシス細胞との相互作用を介して機能制御されていることを示した。本研究の結果からCD300aが全身性強皮症の病態に関連することが示唆され、CD300aを標的とした治療法の有効性が期待される。

研究成果の概要(英文)：CD300a is identified as a phosphatidylserine receptor and involved in the regulation of apoptosis. In this study, we revealed that CD300a expression on CD8+ T cells was upregulated after activation of the cells, and that CD300a+CD8+ T cells had increased effector functions such as cytokine production and cytotoxic activity. The effector functions were suppressed by the interaction with CD300a and apoptotic cells. CD300a+CD8+ T cells were increased in patients with systemic sclerosis (SSc) compared with healthy controls and were appreciably associated with the severity of skin sclerosis. These findings indicate that upregulated CD300a expression on CD8+ T cells reflects disease severity and is involved in SSc pathogenesis.

研究分野：膠原病内科学

キーワード：CD300a アポトーシス ホスファチジルセリン 全身性強皮症 CD8陽性T細胞

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

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は、血管障害、炎症、免疫異常、皮膚および諸臓器の線維化を特徴とする自己免疫疾患である。全身性強皮症の初期に血管内皮障害を認め、その結果免疫応答の活性化が生じ、各種サイトカインの放出、自己抗体の産生、線維芽細胞の活性化、コラーゲン合成の促進をうながし病態が形成されると考えられているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。

疾患の病態を理解する上で DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析は有用な方法の一つであるが、多くの細胞集団から構成される末梢血単核球を用いた解析は少ない細胞集団の重要な変化を見逃してしまう可能性がある。そこで我々はこれまでの研究において、健常者 5 名と全身性強皮症患者 9 名の末梢血リンパ球をセルソーティングにより 8 つのサブセットに純化回収した後にマイクロアレイ解析を行い、各リンパ球サブセットにおいて両群で発現レベルの異なる複数の遺伝子を抽出した。これらの候補遺伝子のうち、全身性強皮症患者エフェクターメモリー CD8 陽性 T 細胞で発現が亢進している遺伝子として CD300a を同定し、少数例のフローサイトメーターを用いた予備的検討で蛋白質レベルでも亢進していることを確認した。

CD300a は細胞膜表面上に発現する免疫応答分子であり、近年このリガンドがアポトーシス細胞上のホスファチジルセリンであることが報告された (Nakahashi-Oda C, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2012)。全身性強皮症の病初期に血管内皮細胞のアポトーシスが見られること、皮膚線維芽細胞のアポトーシス抵抗性が線維化促進に関与することなどから、アポトーシスを起点とした免疫応答および線維化の進展は全身性強皮症の病態を形成する上で重要な働きを示すと考えられている (Chabaud S, et al. Int J Rheumatol. 2011)。アポトーシス細胞との相互作用を介して免疫応答を制御する CD300a 陽性細胞の機能を解析することにより全身性強皮症の病態を新たな側面から捉えることが可能となり、病態形成メカニズムの解明、さらには新たな治療法の開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

(1) CD300a 陽性 CD8 陽性 T 細胞の機能的特徴を明らかにする。

(2) アポトーシス/CD300a を基軸とした新たな視点で全身性強皮症の病態形成メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CD300a が高発現している CD8 陽性 T 細胞サブセットの同定：

健常者から採取した新鮮末梢血を単核球分離し、細胞を各種蛍光標識抗体 (CD3、CD8、CD300a、CD45RA、CCR7、CXCR3、CRTH2) を組み合わせ多重染色を行い、マルチカラーフローサイトメーターを用いて、CD300a が定常的に高発現している CD8 陽性 T 細胞サブセット (ナイーブ、エフェクター、エフェクターメモリー、セントラルメモリー、Tc1、Tc2) を同定する。

(2) CD300a 陰性細胞と比較した CD300a 陽性細胞の機能的特徴の解析：

健常者由来の末梢血単核球からセルソーターを用いて CD300a 陽性 CD8 陽性 T 細胞と CD300a 陰性 CD8 陽性 T 細胞を分離回収し、PMA + イオノマイシン + モネンシンで刺激後に細胞内 IFN- γ をフローサイトメーターで測定する。

分離回収した CD300a 陽性 CD8 陽性 T 細胞と CD300a 陽性 CD8 陽性 T 細胞を CFSE でラベリングし、同様の刺激を行ったあとの細胞増殖能を評価する。

末梢血単核球を各種蛍光標識抗体 (CD3、CD8、CD300a、グランザイム B) で多重染色し、CD300a 陽性 CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害活性を評価する。

(3) CD300a の発現レベルを調整する因子の同定：

CD8 陽性細胞に対して TCR 刺激 (抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体、PMA + イオノマイシン)、サイトカイン刺激 (TNF- α 、IL-4、IL-6、TGF- β) 後の細胞表面上の CD300a の発現レベルの変化をフローサイトメーターで評価する。

(4) アポトーシス細胞との共培養時の CD8 陽性 T 細胞の機能解析：

紫外線照射でホスファチジルセリンを発現させたアポトーシス細胞と CD8 陽性 T 細胞の共培養を行い、細胞表面上の CD300a の発現レベルの変化をフローサイトメーター、上清中のグランザイム B 産生量を ELISA 法でそれぞれ測定した。実験の一部は、ホスファチジルセリン阻害剤 MFG-E8 の存在下で行った。

(5) CD300a 発現レベルと全身性強皮症患者の臨床パラメータとの関連の検討：

全身性強皮症患者、健常者から採取した新鮮末梢血を単核球分離し、細胞を各種蛍光標識抗体 (CD300a、CD3、CD4、CD8、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56) を組み合わせ多重染色を行い、各種細胞 (CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球) サブセット上の CD300a の発現レベルをフローサイトメーターで評価し、全身性強皮症患者に特徴的な CD300a 発現パターンを同定する。

全身性強皮症患者を臨床像で分類し、各群の CD8 陽性 T 細胞における CD300a 発現レベルを比較する。皮膚硬化はスキンスコアを、間質性肺病変は病変の広がりあるいは % 肺活

量を指標として、CD300a 発現レベルと相関があるか否かを評価する。

4. 研究成果

(1) CD300a が高発現している CD8 陽性 T 細胞サブセットの同定：

CD8 陽性 T 細胞をナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、エフェクターに分類すると、分化段階に従って CD300a 発現レベルは亢進した。CXCR3 陽性 Tc1、CRTH2 陽性 Tc2 は共に CD300a 陽性分画に多く含まれていた。

(2) CD300a 陰性細胞と比較した CD300a 陽性細胞の機能的特徴の解析：

CD300a 陽性 CD8 陽性 T 細胞で PMA + イオノマイシン後の IFN- γ 産生能が高く、特に CD300a 高発現サブセットで顕著であった。(1)の結果と合わせて、CD300a 陽性 CD8 陽性 T 細胞はサイトカイン産生能が高いと考えられる。

細胞増殖能に明らかな差は認めなかった。

CD300a 陽性 CD8 陽性 T 細胞でグランザイム B の陽性率が高く、エフェクター活性が高いと考えられる。

(3) CD300a の発現レベルを調整する因子の同定：

TCR 刺激で CD300a 発現レベルの亢進が見られた。CD300a の発現レベルを調整する因子を同定するために各種サイトカイン (TNF- α 、IL-4、IL-6、TGF- β) 存在下で同刺激を行ったところ、TGF- β 存在下で CD300a 発現レベル亢進の減弱を認めた。他サイトカインでは CD300a 発現レベルに明らかな変化は認めなかった。

(4) アポトーシス細胞との共培養時の CD8 陽性 T 細胞の機能解析：

アポトーシス細胞共培養下では CD300a 発現レベル、グランザイム B 産生が低下した。ホスファチジルセリン阻害剤存在下ではその効果は抑制され、ホスファチジルセリンを介した CD300a シグナルは CD8 陽性 T 細胞機能において抑制的に作用すると考えられた。

(5) CD300a 発現レベルと全身性強皮症患者の臨床パラメータとの関連の検討：

全身性強皮症患者 25 名、健常者 16 名から採取した末梢血単核球を用いて解析を行った。

CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞における CD300a の発現レベルは全身性強皮症患者で亢進していた。

病型で分類すると、びまん皮膚硬化型全身性強皮症患者 CD8 陽性 T 細胞では健常者と比較して CD300a の発現レベル有意に亢進していたが、限局皮膚硬化型全身性強皮症では健常者と同程度であった。重症度との関連では CD300a 陽性率はスキンスコアと正の相関を示したが、間質性肺炎の有無や%肺活量との相関は認めなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- (1) Ayano M, Tsukamoto H, Mitoma H, Kimoto Y, Akahoshi M, Arinobu Y, Miyamoto T, Horiuchi T, Niino H, Nagafuji K, Harada M, Akashi K. CD34-selected versus unmanipulated autologous haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe systemic sclerosis: a post hoc analysis of a phase I/II clinical trial conducted in Japan. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):30. doi: 10.1186/s13075-019-1823-0. 査読有.
- (2) Ueda S, Akahoshi M, Takeda A, Inoue Y, Omoto A, Ayano M, Kimoto Y, Mitoma H, Arinobu Y, Niino H, Tsukamoto H, Horiuchi T, Hikita SI, Fukuhara T, Ishibashi T, Sonoda KH, Akashi K. Long-term efficacy of infliximab treatment and the predictors of treatment outcomes in patients with refractory uveitis associated with Behçet's disease. *Eur J Rheumatol.* 2018;5(1):9-15. doi: 10.5152/eurjrheum.2017.17068. 査読有.
- (3) Otsuka Y, Kiyohara C, Kashiwado Y, Sawabe T, Nagano S, Kimoto Y, Ayano M, Mitoma H, Akahoshi M, Arinobu Y, Niino H, Akashi K, Horiuchi T. Effects of tumor necrosis factor inhibitors and tocilizumab on the glycosylated hemoglobin levels in patients with rheumatoid arthritis; an observational study. *PLoS One.* 2018;13(4):e0196368. doi: 10.1371/journal.pone.0196368. eCollection 2018. 査読有.

[学会発表](計5件)

- (1) 綾野 雅宏、三苫 弘喜、塚本 浩、柏戸 佑介、木本 泰孝、赤星 光輝、有信 洋二郎、赤司 浩一、堀内 孝彦、新納 宏昭. 全身性強皮症に対する自家造血幹細胞移植の長期成績. 第 56 回九州リウマチ学会. 2018 年.
- (2) 綾野 雅宏、木本 泰孝、三苫 弘喜、赤星 光輝、有信 洋二郎、赤司 浩一、堀内 孝彦、新納 宏昭. 全身性エリテマトーデス患者の長期予後に関する検討. 第 56 回九州リウマチ学会. 2018 年.
- (3) 綾野 雅宏、河野 正太郎、中野 未来、木本 泰孝、三苫 弘喜、赤星 光輝、有信 洋二郎、赤司 浩一、堀内 孝彦、新納 宏昭. ループス腎炎に対するタクロリムスの長期使

- 用成績：10年間の検討．第62回日本リウマチ学会総会・学術集会．2018年．
- (4) 綾野 雅宏、河野 正太郎、入野 健佑、中川 仁、木本 泰孝、三苫 弘喜、赤星 光輝、有信 洋二郎、赤司 浩一、堀内 孝彦、新納 宏昭．ループス腎炎に対する免疫抑制剤併用療法：ミゾリピン vs ミコフェノール酸モフェチル．第61回日本リウマチ学会総会・学術集会．2017年．
- (5) 綾野 雅宏、有信 洋二郎、久本 仁美、中山 剛志、高木 綾子、入野 健佑、三苫 弘喜、赤星 光輝、新納 宏昭、塚本 浩、赤司 浩一．肩関節超音波検査を用いたリウマチ性多発筋痛症のステロイド反応性予測因子の検討．第60回日本リウマチ学会総会・学術集会．2016年．

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(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。