

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10232

研究課題名(和文) 全身性強皮症におけるEffector B細胞の役割についての検討

研究課題名(英文) The role of Effector B cell in Systemic Sclerosis

研究代表者

竹原 和彦 (Takehara, Kazuhiko)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50142253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症は皮膚・内臓諸臓器の線維化を来す自己免疫疾患で、その病態形成にB細胞が強く関与している。PBMCを採取し、CpG、PMA、Ionomycin存在下で5時間培養し、細胞IL-6染色を行いFACSにてIL-6産生Effector B細胞を測定する系を確立した。また、強皮症患者におけるIL-6産生B細胞の頻度を解析したところ、健常人と比べ、強皮症で有意にIL-6産生B細胞が増加していた。さらにIL-6産生B細胞は強皮症の皮膚硬化の重症度を反映していた。さらに抗BAFF抗体投与によりIL-6産生Effector B細胞が低下することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は皮膚・内臓諸臓器の線維化を来す自己免疫疾患で、重症例では致死率の高い難病である。本研究により、IL-6産生Effector B細胞の測定法を開発し、そのフェノタイプを同定した。また、全身性強皮症においてIL-6産生Effector B細胞が上昇しており、さらに重症度を反映するスキンスコアを相関することを明らかにした。これらの結果より、IL-6産生Effector B細胞が全身性強皮症の新規治療標的となる可能性が示唆され、学術的意義の高い研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by skin and lung fibrosis. B cells play an important role in SSc pathogenesis. The blood levels of IL-6 producing effector B cells and IL-10 producing regulatory B cells were measured in 29 patients with SSc and 20 healthy subjects by FACS. The frequency of IL-6 producing effector B cells in blood was significantly elevated in patients with SSc than that in healthy controls. In contrast, the frequency of IL-10 producing regulatory B cells in blood was significantly decreased in patients with SSc than in healthy controls. Furthermore, the frequency of IL-6 producing effector B cells positively correlated with the extent of skin fibrosis in SSc patients. The result suggested that the dysregulation of effector and regulatory B cell balance contributes to SSc pathogenesis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 IL-6 IL-10 制御性B細胞 エフェクターB細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

a. 全身性強皮症と B 細胞

全身性強皮症は抗核抗体に代表される自己免疫現象を背景に、皮膚および内臓諸臓器の線維化を来す膠原病であるが、未だ根治的な治療法がない。これまでに強皮症の病態には B 細胞の活性化や分化の異常が示されている。また B 細胞の強力な活性化因子である BAFF が強皮症患者血清中において上昇し、皮膚硬化の重症度と相関することが示されている。さらに、強皮症モデルマウスの皮膚硬化の進展には B 細胞の異常活性化が重要であり、抗 CD20 抗体や BAFF 阻害剤による発症早期からの B 細胞除去療法が、皮膚硬化を有意に抑制することが示されている。以上より、強皮症患者ならびに強皮症モデルマウスの病態に B 細胞が重要な役割を果たしている。

b. サイトカイン産生 B 細胞 (IL-10 産生 Regulatory 細胞/IL-6 産生 Effector B 細胞)

B 細胞はこれまで主に抗体産生細胞としての側面から研究が進められてきたが、近年、抗原提示能、T-B 細胞相互作用やサイトカイン産生を介して免疫反応において非常に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。さらに B 細胞は均一な細胞集団ではなく、“善玉”と“悪玉”の2つに大別される。“善玉” B 細胞は Regulatory B 細胞と呼ばれ、IL-10 の産生により過剰な免疫反応や炎症を抑制する。一方、“悪玉” B 細胞である Effector B 細胞は IL-6 などの産生により免疫反応や炎症を促進する作用がある。これら相反する作用を有する Regulatory B 細胞と Effector B 細胞のバランスが自己免疫疾患において非常に重要である。IL-10 産生 Regulatory B 細胞はマウスでは Marginal zone (MZ) B 細胞および B1 B 細胞のサブセットに存在し CD9+CD80+ のフェノタイプを有しており、ヒトでは CD24^{high}CD27⁺ないし CD19+CD24^{high}CD38^{high} のフェノタイプを有している。さらに、強皮症患者や強皮症モデルマウスにおいて IL-10 産生 Regulatory B 細胞が抑制的な役割を有している。これまで IL-6 産生 Effector B 細胞については、その測定法やフェノタイプについて未解明であったが、我々はマウスにおいて LPS と抗 CD40 抗体で 24 時間培養し、細胞内染色を行うことにより FACS にて測定できること、IL-6 産生 Effector B 細胞が MZ B 細胞により多く存在することを明らかにした。また、BAFF 刺激によりマウス B 細胞からの IL-6 産生が増強され、IL-10 産生が抑制される。さらに骨髄キメラマウスを用いて B 細胞特異的 IL-6 (or IL-10) 欠損マウスを作成し、プレオマイシン誘発強皮症モデルを誘導したところ、B 細胞特異的 IL-6 欠損マウスでは線維化の減弱が見られ、B 細胞特異的 IL-10 欠損マウスでは線維化の亢進が見られた。以上より、IL-10 産生 Regulatory 細胞は強皮症の病態を抑制し、IL-6 産生 Effector B 細胞は強皮症の病態を促進することを解明した。しかしながら、ヒトにおける IL-6 産生 Effector B 細胞については多くが未解明である。

c. IL-6 と全身性強皮症

IL-6 は免疫・炎症反応において重要な役割を果たすサイトカインで、自己免疫疾患においては IL-6 産生 Effector B 細胞が重要性である。強皮症では血清 IL-6 濃度が上昇し、病勢との相関がみられる。強皮症モデルマウスにおいても血清 IL-6 濃度の上昇がみられ、抗 IL-6 受容体抗体の投与により皮膚硬化の改善がみられる (J Invest Dermatol 2012 研究業績 26)。さらに現在、全身性強皮症における抗 IL-6 受容体抗体 (アクテムラ®) の皮膚硬化に対する有効性に関する Phase III の臨床試験が行われている。以上より強皮症の病態において IL-6 は非常に重要なサイトカインであり、新規治療法開発のためには全身性強皮症における IL-6 産生 Effector B 細胞を詳細に解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、全身性強皮症患者における IL-6 産生 Effector B 細胞の役割を明らかにしたい。ヒト IL-6 産生 Effector B 細胞については多くが未解明であるので、まず測定方法を開発し、そのフェノタイプを解明する。さらに、全身性強皮症患者末梢血中における IL-6 産生 Effector B 細胞を測定し、その臨床的意義について解析する。具体的な研究項目を以下に示す。

3. 研究の方法

a. IL-6 産生 Effector B 細胞の測定法の開発ならびにフェノタイプ解析

これまでのマウスの実験において、FACS による IL-6 産生 Effector B 細胞の測定には抗 CD40 抗体刺激と Toll like receptor (TLR) 4 の agonist である LPS 刺激が重用であることが明らかとなっている。抗 CD40 抗体や LPS 単独での刺激では IL-6 産生 Effector B 細胞は測定できず、抗 CD40 抗体と LPS 両者の刺激が必須である。このマウスにおける IL-6 産生 Effector B 細胞の測定方法をヒトに応用し、CD40 刺激ならびに TLR 刺激をおこない、IL-6 産生 Effector B 細胞の測定法の開発を行う。まず、ヒトから末梢血単核球を分離し、CD40 ligand (CD40L) と TLR ligand を加え、各種条件 (5 時間、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間) で培養し、細胞内 IL-10 染色を行い FACS で測定する。これらにより IL-6 産生 Effector B 細胞測定のための至適条件を決定後、細胞表面マーカーによる IL-6 産生 Effector B 細胞のフェノタイプ解析を行う。IL-6 産生 B 細胞と IL-6 非産生 B 細胞の細胞表面マーカー (CD1d, CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27 など) を比較し、IL-6 産生 B 細胞に特異的な表面マーカーを同定する。

b. 全身性強皮症患者末梢血中における IL-6 産生 Effector B 細胞の増減の解析
 全身性強皮症患者における末梢血中の IL-6 産生 Effector B 細胞の末梢血単核球における割合を健常人と比較検討する。さらに、次に全身性強皮症患者において IL-6 産生 Effector B 細胞と皮膚硬化との相関関係を解析する。

c. IL-6 産生 Effector B 細胞・IL-10 産生 Regulatory B 細胞に対する BAFF の役割についての解析

マウスでは BAFF 刺激により B 細胞からの IL-6 産生が増強され、IL-10 産生が抑制される。よって、ヒトでも同じような作用があるかを BAFF で B 細胞を刺激し検討する。抗 BAFF 抗体 (Belimumab) は米国ですでに SLE に保険適応を有し本邦でも第 III 相試験が終了しており、BAFF 阻害によりサイトカイン産生 B 細胞のバランスを Regulatory B 細胞-優位 (Effector B 細胞 / Regulatory B 細胞) にすることが可能であれば、強皮症でも新規治療薬と成り得る。

d. 統計

全てのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で示した。有意差検定は Student's t test を使用した。

4. 研究成果

a. IL-6 産生 Effector B 細胞の測定法ならびにフェノタイプ

種々の検討の結果、末梢血から PBMC を採取し、CpG、PMA、Ionomycin 存在下で 5 時間培養し、細胞 IL-6 染色を行い FACS にて IL-6 産生 Effector B 細胞を測定する系を確立した。また、フェノタイプ解析にて IL-6 産生 Effector B 細胞は IgD を高発現していることが明らかとなった。

b. 全身性強皮症患者末梢血中における IL-6 産生 Effector B 細胞の増減の解析

全身性強皮症患者 29 人、健常人 20 人から PBMC を採取し、CpG、PMA、Ionomycin 存在下で 5 時間培養し、細胞 IL-6、IL-10 染色を行い FACS にて IL-6 産生 Effector B 細胞、IL-10 産生 Regulatory B 細胞を測定した。IL-6 産生 Effector B 細胞は、健常人と比べ、強皮症において有意に上昇していた。反対に IL-10 産生 Regulatory B 細胞は、健常人と比べ、強皮症において有意に低下していた(図 1)。

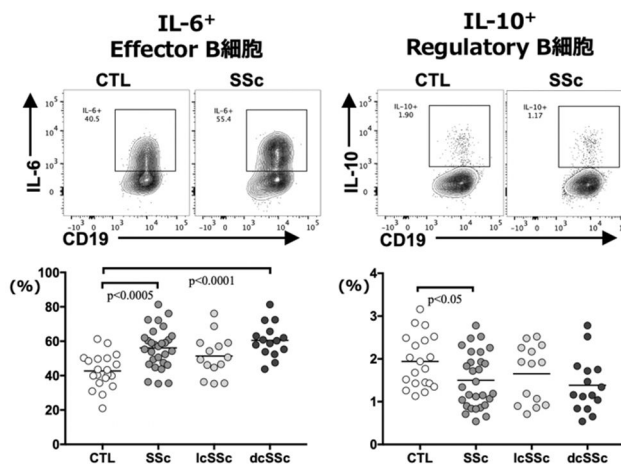


図 1

c. 皮膚硬化との相関

IL-6 産生 Effector B 細胞・IL-10 産生 Regulatory B 細胞と強皮症の重症度を反映するスキンスコアの相関関係を解析したところ、IL-6 産生 effector B 細胞はスキンスコアと正の相関関係が認められた。一方、IL-10 産生 Regulatory B 細胞はスキンスコアと負の相関関係が認められた(図 2)。

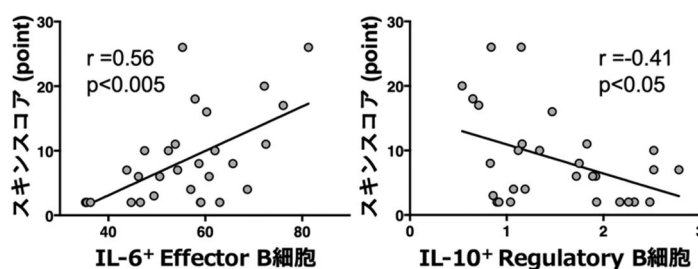


図 2

d. IL-6 産生 Effector B 細胞/IL-10 産生 Regulatory B 細胞に対する抗 BAFF 抗体の効果

SLE 患者において抗 BAFF 抗体投与前後で IL-6 産生 Effector B 細胞/IL-10 産生 Regulatory B 細胞の変化を解析したところ、IL-6 産生 Effector B 細胞は抗 BAFF 抗体投与後に低下し、反対に IL-10 産生 Regulatory B 細胞は抗 BAFF 抗体投与後に上昇が認められた(図 3)。以上

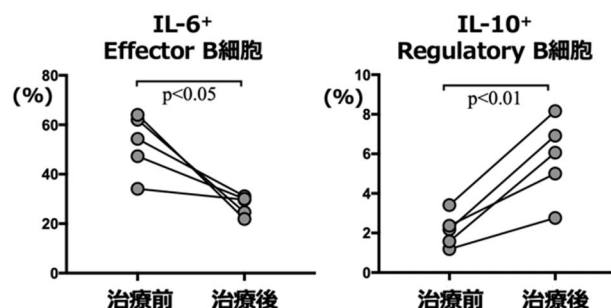


図 3

より BAFF 阻害によりサイトカイン産生 B 細胞のバランスを Regulatory B 細胞-優位 (Effector B 細胞 / Regulatory B 細胞) にすることが示された。

本研究により、IL-6 産生 Effector B 細胞の測定法を開発し、そのフェノタイプを同定した。また、全身性強皮症において IL-6 産生 Effector B 細胞が上昇しており、さらに重症度を反映するスキンスコアを相関することを明らかにした。これらの結果より、IL-6 産生 Effector B 細胞が強皮症の治療標的となる可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Okamura A, Matsushita T, Takehara K et al. | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Adipose-derived stromal/stem cells successfully attenuate the fibrosis of scleroderma mouse models | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases | 6. 最初と最後の頁 216-225 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1756-185X.13764 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Matsushita, T., Takehara, K. | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Soluble CD163 is a potential biomarker in systemic sclerosis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Expert Review of Molecular Diagnostics | 6. 最初と最後の頁 197-199 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14737159.2019.1571911 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Matsushita T, Kobayashi T, Kano M, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K |
| 2. 発表標題 Role of effector and regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: IL-6 producing effector B cells associated with skin fibrosis |
| 3. 学会等名 49th Annual ESDR Meeting（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-----------------------|-----------------|
| 1. 著者名 竹原和彦 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 保健同人社 | 5. 総ページ数 175 |
| 3. 書名 強皮症のすべてがわかる本 | |

〔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 分 担 者 | 松下 貴史 (Matsushita Takashi) (60432126) | 金沢大学・附属病院・講師 (13301) | |