

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16219

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスにおける自己反応性B細胞の質的異常の解明

研究課題名(英文) Elucidation of qualitative abnormalities of autoreactive B cells in patients with SLE

研究代表者

好川 真以子 (Yoshikawa, Maiko)

産業医科大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70596676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SLE患者末梢血における自己反応性B細胞の質的異常について、B細胞のケモカイン受容体発現に着目し、SLE患者末梢血ではCXCR5-CXCR3-B細胞、CXCR5-CXCR3+B細胞が増加すること、CXCR5-CXCR3+B細胞は活動性症例で増加し、疾患活動性改善とともに減少することを見いだした。さらに、I型およびII型インターフェロン(IFN)が同サブセットの誘導に参与し、B細胞の病変組織への浸潤に寄与している可能性が示唆された。これらの結果はSLEのB細胞でみられる質的異常におけるIFNの重要性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の研究成果はSLE病態におけるI型およびII型IFNの重要性の再認識の観点から学術的意義があると考えられる。現在、SLE患者に対する抗IFNAR抗体の有効性が臨床試験で示されており、抗IFN-抗体の試験も進行中であるが、活動性ループス腎炎患者の腎生検組織でCXCR3+B細胞浸潤を認めたことから、T-betなどの転写因子やCXCR3などのケモカイン受容体による病態制御、治療応用へ展開する可能性もあり、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the expression of chemokine receptors in B cells to assess the qualitative abnormalities of autoreactive B cells in patients with SLE. The peripheral blood of patients with SLE showed higher levels of CXCR5-CXCR3- B cells and CXCR5-CXCR3+ B cells. CXCR5-CXCR3+ B cell levels were elevated in patients with active SLE, which decreased with improving disease conditions. Furthermore, in vitro experiments revealed that type I/II interferons (IFNs) are a potent inducer of effector memory B cells involving abnormal chemokine receptor expression, suggesting their involvement in B cell infiltration into tissues. These results demonstrate the importance of IFNs in qualitative abnormalities in SLE B cells.

研究分野：膠原病・リウマチ学

キーワード：全身性エリテマトーデス B細胞 ケモカイン受容体 CXCR3 CXCR5

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患において B 細胞は、抗原提示の stimulator ならびに自己抗体産生の responder として中心的な役割を担い治療標的としても注目される(1)。しかし、B 細胞の本質的な異常については、依然不詳な点が多い。B 細胞の性質を探索する過程において、様々な類似性を有する T 細胞のバイオロジーは有効な情報となり得る。T 細胞においては、B 細胞に比し、エフェクター細胞の分化、機能がより細分化され、各サブセットで主要転写因子、ケモカイン受容体の発現パターンも明らかとなっている。T 細胞と機能を共有する B 細胞において同様の機構が想定されるが、自己免疫疾患の病態において未だ明らかではない。

自己免疫疾患における B 細胞のケモカイン受容体発現に関する既報としては、SLE モデルマウス(NZB/W)において、CD138^{high}MHC⁺形質細胞で CXCR3 が高発現しており、腎組織の炎症局所で CD138⁺CXCR3⁺IgG⁺細胞が浸潤しているという報告がある(2)。また、ヒトにおいて、SLE 患者のメモリー B 細胞および形質細胞で CXCR3 の発現が亢進しているという報告(3)や RA および SLE 患者末梢血 B 細胞では CXCR5 の発現が減弱しているという報告(4)を認める。

これらの既報をもとに、我々は予備検討として、健常人、関節リウマチ患者、全身性エリテマトーデス患者の末梢血より単核球を分離し、T 細胞のサブセット分類に用いられるケモカイン受容体 (CXCR5、CXCR3)に着目して、B 細胞の特徴を検討したところ、全身性エリテマトーデス患者末梢血 B 細胞では CXCR5 が減弱し、CXCR3 が増強していることを見出した。さらに、in vitro では、健常人末梢血単核球から分離した B 細胞を IFN γ で刺激すると CXCR5 発現が減弱し、IFN γ で刺激すると CXCR3 発現が増強することを見出した。

これらの根拠をもとに、本研究では SLE 患者において、これらの病原性 B 細胞の詳細な誘導機構、炎症局所への浸潤機序、さらに自己抗体の産生亢進などの自己反応性の獲得機序を解明することで、未だ疾患特異的な治療の存在しない SLE での新規治療標的を探索する。

1) Tanaka, Y.: Treatment of inflammatory immunologic disease 4. B cell targeting therapy using the anti-CD20 antibody rituximab in inflammatory autoimmune diseases. *Inter Med.* 46: 1313-1315, 2007.

2) Lacotte, S., et al.: Early differentiated CD138(high) MHCII+ IgG+ plasma cells express CXCR3 and localize into inflamed kidneys of lupus mice. *PLoS One.* 8: e58140, 2013.

3) Nicholas, M.W., et al.: A novel subset of memory B cells is enriched in autoreactivity and correlates with adverse outcomes in SLE. *Clin Immunol.* 126: 189-201, 2008.

4) Henneken, M., et al.: Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 7: R1001-1013, 2005.

2. 研究の目的

(1) SLE 患者におけるケモカイン受容体発現異常と臨床病態との関連の検討

ケモカイン受容体発現異常と SLE の患者背景、疾患活動性、治療反応性など臨床病態との関連を明らかにする。また、自己免疫疾患において、T 細胞-B 細胞の相互作用は病態形成において極めて重要であり、T 細胞サブセットとの関連を明らかにする。

(2) ケモカイン受容体発現異常の誘導機構の検討

健常人末梢血より B 細胞を分離し、試験管内にて各種サイトカイン刺激下で分化培養させ、ケモカイン受容体発現の変化を評価することで、ケモカイン受容体発現異常が誘導される原因を明らかにする。

(3) ケモカイン受容体発現異常を有する B 細胞の病原性の解明

上記の実験系で誘導されたケモカイン受容体発現異常を有する B 細胞の遊走能、エフェクター機能(自己抗体の産生能、サイトカイン産生能)、抗原提示能の評価や、患者組織における同サブセットの浸潤の評価をし、病原性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SLE 患者におけるケモカイン受容体発現異常と臨床病態との関連の検討

健常人および SLE 患者末梢血から単核球を分離し、T 細胞・B 細胞表面マーカー (CD3, CD4, CD19, CD20)、B 細胞分化マーカー (IgD, CD27)に加え、ケモカイン受容体 (CXCR3, CXCR5, CCR6)を染色し、8 カラーフローサイトメーター (FACSVerse^R)で解析を行い、B 細胞のケモカイン受容体発現を評価する。8 カラーフローサイトメーター (FACSVerse^R)を用いることで、8 色同時染色が可能であり、B 細胞の各分化段階におけるケモカイン受容体発現の違いについても評価する。また、他の自己免疫疾患患者を疾患コントロールとして、比較検討する。

ケモカイン受容体発現異常と SLE の患者背景(年齢、性別、罹病期間、治療歴、重要臓器障害の有無)、疾患活動性 (SLEDAI, BILAG, 抗 ds-DNA 抗体価, CH50 など)、治療反応性 (SLEDAI・BILAG の改善、ステロイド減量効果) など臨床病態との関連を評価する。また、T 細胞サブセット (分化マーカーおよびヘルパー T 細胞サブセット) との関連を明らかにする。

(2) ケモカイン受容体発現異常の誘導機構の検討

健常人末梢血単核球より pan B 細胞を positive selection で分離 (分離精製用磁気ビーズ ; Dynabeads^R CD19 pan B および DETACHaBEAD^R CD19 を使用)し、BCR 架橋刺激 (抗 Ig

抗体、抗 Ig 抗体添加) sCD40L の刺激をベースに、SLE 病態に関わる可能性のあるサイトカイン (I 型 IFN, II 型 IFN, IL-21) をそれぞれ添加し、4 日間培養したのち、8 カラーフローサイトメーター (FACSVerse^R) にてケモカイン受容体の発現の変化を評価する。

転写因子発現 (Bcl-6, T-bet) の評価については上記と同様の条件で 2 日間培養し、8 カラーフローサイトメーター (FACSVerse^R); 細胞内染色にて行う。

(3) ケモカイン受容体発現異常を有する B 細胞の病原性の解明

遊走能の評価

健常人および SLE 患者末梢血単核球から B 細胞を分離し、発現異常を認めるケモカイン受容体のリガンドに対する遊走能を EZ-TAXIScan^Rを用いて測定する。

エフェクター機能 (抗体産生能・サイトカイン産生能) の評価

上記(2)の条件で 4 日間培養した際の培養上清を用いて CBA で評価する。抗体産生については、IgG, IgM を測定、サイトカイン産生については、IL-6, IL-10 を測定する。

抗原提示能の評価

上記(2)の条件で 4 日間培養した B 細胞を用いて、抗原提示細胞に発現する共刺激分子である CD40, CD80/86, ICOSL 発現を 8 カラーフローサイトメーター (FACSVerse^R) で評価する。

患者組織におけるケモカイン受容体発現異常を有する B 細胞の浸潤の評価

ループス腎炎患者の腎生検組織において、ケモカイン受容体発現異常を有する B 細胞の浸潤を証明する。具体的には CD19 および上記(1)で発現異常を認めたケモカイン受容体の免疫蛍光染色 (二重染色) を行い、評価する。

4. 研究成果

(1) SLE 患者におけるケモカイン受容体発現異常と臨床病態との関連の検討

SLE 患者末梢血では健常人、関節リウマチ患者と比較して、CXCR5-CXCR3⁻ B 細胞、CXCR5-CXCR3⁺B 細胞が増加していた。さらに、各分化段階におけるケモカイン受容体の発現を SLE 症例で評価したところ、CXCR5-CXCR3⁻ B 細胞および CXCR5-CXCR3⁺B 細胞は IgD-CD27+B 細胞および IgD-CD27-B 細胞でより増加していた。また、臨床病態との関連では CXCR5-CXCR3⁻ B 細胞は抗 Sm 抗体価と正相関し、CXCR5-CXCR3⁺ B 細胞は活動性症例で増加、疾患活動性改善とともに減少した。いずれのサブセットも SLE 患者背景との相関はなかった。T 細胞サブセットとの関連については、CXCR5-CXCR3⁺ B 細胞はエフェクターメモリー T 細胞と正相関した。

(2) ケモカイン受容体発現異常の誘導機構の検討

健常人末梢血から分離した B 細胞を IFN γ で刺激すると T-bet の発現が増強し、CXCR3⁺ の集団が増加した。IFN δ で刺激すると CXCR5 の集団が増加した。IFN γ , IFN δ で同時刺激すると、CXCR5-CXCR3⁺ の集団が増加した。

(3) ケモカイン受容体発現異常を有する B 細胞の病原性の解明

遊走能の評価として、EZ-TAXIScan^Rを用いた実験を行った。健常人、SLE 患者、RA 患者の末梢血 20ml より B 細胞を分離し、CXCR3 のリガンドである CXCL10 に対する遊走能を評価した。遊走細胞数、走化速度を指標としたが、各群で遊走能に有意差はみられなかった。また、健常人末梢血から分離した B 細胞を各種サイトカイン (IFN γ , IFN δ , IL-21) で刺激後 4 日間培養し、抗体産生能・サイトカイン産生能の評価として培養上清の IgG, IgM, IL-6, IL-10 を測定、抗原提示能の評価として B 細胞上の CD40, CD80/86, ICOSL 発現を測定したが、各刺激による有意差はなかった。

ループス腎炎 Class III or IV 患者の腎生検組織免疫蛍光染色にて CXCR3⁺ B 細胞の浸潤を認めた。

以上の結果より、I 型および II 型 IFN が SLE 患者 B 細胞におけるケモカイン受容体発現異常に関与し、B 細胞の病変組織への浸潤に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshikawa Maiko, Nakayamada Shingo, Kubo Satoshi, Nawata Aya, Kitanaga Yukihiro, Iwata Shigeru, Sakata Kei, Ma Xiaoxue, Wang Sheau Pey, Nakano Kazuhisa, Saito Kazuyoshi, Tanaka Yoshiya	4. 巻 200
2. 論文標題 Type I and II interferons commit to abnormal expression of chemokine receptor on B cells in patients with systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2018.12.017	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 Miyagawa Ippei, Nakayamada Shingo, Nakano Kazuhisa, Kubo Satoshi, Iwata Shigeru, Miyazaki Yusuke, Yoshikawa Maiko, Yoshinari Hiroko, Tanaka Yoshiya	4. 巻 58
2. 論文標題 Precision medicine using different biological DMARDs based on characteristic phenotypes of peripheral T helper cells in psoriatic arthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 336~344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/key069	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 Kubo Satoshi, Nakayamada Shingo, Miyazaki Yusuke, Yoshikawa Maiko, Yoshinari Hiroko, Satoh Yurie, Todoroki Yasuyuki, Nakano Kazuhisa, Satoh Minoru, Smith Vanessa, Cutolo Maurizio, Tanaka Yoshiya	4. 巻 58
2. 論文標題 Distinctive association of peripheral immune cell phenotypes with capillaroscopic microvascular patterns in systemic sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2273~2283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kez244	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 Kubo Satoshi, Nakayamada Shingo, Yoshikawa Maiko, Miyazaki Yusuke, Sakata Kei, Nakano Kazuhisa, Hanami Kentaro, Iwata Shigeru, Miyagawa Ippei, Saito Kazuyoshi, Tanaka Yoshiya	4. 巻 69
2. 論文標題 Peripheral Immunophenotyping Identifies Three Subgroups Based on T Cell Heterogeneity in Lupus Patients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2029~2037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.40180	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 Kubo Satoshi, Nakayamada Shingo, Zhao Jidong, Yoshikawa Maiko, Miyazaki Yusuke, Nawata Aya, Hirata Shintaro, Nakano Kazuhisa, Saito Kazuyoshi, Tanaka Yoshiya	4. 巻 57
2. 論文標題 Correlation of T follicular helper cells and plasmablasts with the development of organ involvement in patients with IgG4-related disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 514 ~ 524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kex455	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 Ma Xiaoxue, Nakayamada Shingo, Kubo Satoshi, Sakata Kei, Yamagata Kaoru, Miyazaki Yusuke, Yoshikawa Maiko, Kitanaga Yukihiro, Zhang Mingzeng, Tanaka Yoshiya	4. 巻 77
2. 論文標題 Expansion of T follicular helper-T helper 1 like cells through epigenetic regulation by signal transducer and activator of transcription factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1354 ~ 1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2017-212652	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 Nakayamada Shingo, Kubo Satoshi, Yoshikawa Maiko, Miyazaki Yusuke, Yunoue Naoki, Iwata Shigeru, Miyagawa Ippei, Hirata Shintaro, Nakano Kazuhisa, Saito Kazuyoshi, Tanaka Yoshiya	4. 巻 57
2. 論文標題 Differential effects of biological DMARDs on peripheral immune cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kex012	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----