

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16324

研究課題名(和文) マイクロ空間を用いた全身性強皮症における抗原特異的B細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of antigen-specific B cells in systemic sclerosis using micro space

研究代表者

吉崎 歩 (Yoshizaki, Ayumi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40530415

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)：近年の免疫学の進歩により、B細胞は免疫系において中心的な役割を果たすことが示唆されている。B細胞は自己免疫疾患においても重要であり、特にB細胞受容体を介した自己抗原刺激は、自己反応性B細胞の活性化とサイトカイン産生を誘導し、その結果病態の形成と進展に大きく関与する。ところが、自己反応性B細胞は生体内にわずかしが存在しておらず、その機能(自己抗原に対する反応性やサイトカイン産生、他細胞との相互作用)に関する直接的な検討は技術的な難しさから全く行われていない。本研究では、マイクロ空間を用いた独自の技術と方法論を用い、SScにおける自己反応性B細胞の機能を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新しい測定法を用い、SSc患者より得られた自己反応性B細胞の機能解析を行った。具体的にはガラスマイクロチップ上に作成されたマイクロ空間を用い、topo 1抗原特異的B細胞から産生されるサイトカインの測定を行い、モデルマウスへの養子移入を介して自己反応性B細胞の持つ機能を検討した。本研究により、自己反応性B細胞が産生するサイトカインは、自己抗原に対する抗原親和性によって変化することが明らかとなった。これまでブラックボックスであった自己抗原反応性B細胞の機能を直接的に検討したはじめての研究であり、今後の強皮症病態解明に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in immunology have suggested that B cells play a central role in the immune system. B cells are also important in autoimmune diseases, and in particular, self-antigen stimulation via B cell receptors induces activation of autoreactive B cells and cytokine production, resulting in significant involvement in the development and progression of diseases. However, only a few autoreactive B cells exist in the patients, and direct examination of its function such as reactivity to self antigens, cytokine production, and interaction with other cells is technically difficult. Therefore, there are no studies which analyze the role of autoreactive B cells directly. In this study, we examined the function of autoreactive B cells in systemic sclerosis using proprietary techniques and methodologies using microspace.

研究分野：免疫学

キーワード：強皮症 自己免疫疾患 B細胞 サイトカイン マイクロ・ナノデバイス

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

1. 研究開始当初の背景

(1) B 細胞は抗原特異的に機能を発揮し、免疫系において中心的な役割を果たす

近年の研究により、B 細胞は抗体産生のみならず多彩な機能を持つことが明らかとなってきた。B 細胞は抗原提示を行い、サイトカインを産生し、他の免疫細胞の分化と活性化を誘導し、免疫系に対して様々な影響を与える。特に interleukin (IL)-10 を産生する制御性 B 細胞と呼ばれる集団は、自己免疫反応において異常に活性化した炎症反応を抑制し、B 細胞は炎症を惹起・促進するだけではなく、抑制性の制御をも行うといった多様性が大きな注目を集めている。これらの多彩な機能を B 細胞が発揮するためには、B 細胞受容体(B cell receptor; BCR)に特異的に結合する抗原刺激が必要であり、B 細胞機能の多くは抗原特異的に発揮されると考えられている。実際、制御性 B 細胞に着目し、研究代表者らは自己抗原特異的の刺激は制御性 B 細胞前駆細胞を制御性 B 細胞へ分化させ、IL-10 の産生を誘導し、T 細胞やマクロファージとの相互作用を介して炎症反応を抑制することを見いだした(Yoshizaki A, et al. Nature 491:7423,2012)。このように B 細胞は抗原特異的な BCR 刺激を介して免疫系において中心的な役割を果たしている。

(2) 自己免疫疾患における自己反応性 B 細胞の役割

自己免疫疾患においても自己抗原特異的な自己反応性 B 細胞は、症状が明らかとなる前から疾患特異的な自己抗体を産生するため、病態に対して重要な役割を担っていると考えられている。さらに、B 細胞表面に特異的に発現する CD20 をターゲットとした抗体製剤である、リツキシマブを用いた B 細胞の除去は、自己免疫疾患の治療として優れた成果をあげていることより、自己免疫疾患の発症と進展に B 細胞が重要であることは、明らかである。ところが、リツキシマブは病原性を持たない非自己反応性 B 細胞や制御性 B 細胞をも含めた B 細胞全般を消し去ってしまうため、感染症への罹患や、ときとして自己免疫疾患の増悪を来すという重大な副作用が問題となっている。

SSc は皮膚科領域における代表的な全身性自己免疫疾患であり、自己免疫、皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管障害を主徴とする。有効な治療法がないため、患者の QOL は著しく障害されており、病態の解明と新たな治療法の開発が急務である。SSc においても、線維化や血管障害が顕在化する以前から、核内抗原である topoisomerase (topo) I などに対する自己抗体が検出され、実際に研究代表者らは Freund adjuvant を用いてマウスを topo I で免疫すると、SSc の症状が誘導されることを明らかとしており、topo I 特異的 B 細胞の病態への関与を示唆している(Yoshizaki A, et al. Arthritis Rheum, 63:3575,2011)。しかしながら、topo I のように全身性自己免疫疾患の自己抗原は多くが核内あるいは細胞質内抗原であるため、血液もしくは組織液といった細胞外液中に存在する自己抗体が、障害される臓器にどのような機序で影響を及ぼすのかわかっていない。このため、自己反応性 B 細胞の自己免疫疾患に対する直接的な役割を、自己抗体産生能で説明することはできず、自己反応性 B 細胞と SSc の病態の関係は不明瞭なままであった。

B 細胞からの抗 topo I 抗体産生は、BCR を介して topo I もしくはこれにホモロジーを持つ抗原からの刺激を受けた自己反応性 B 細胞が活性化していることを示唆している。研究代表者らは B 細胞の活性化に重要な CD19 を欠損したマウスでは、ブレオマイシン (BLM) 誘発 SSc モデルにおける線維化や免疫異常が著明に抑制されることを示しており(Yoshizaki A, et al. Am J Pathol, 172:1650,2008)、自己反応性 B 細胞の活性化は SSc の病態に大きな影響を与えることを示唆している。さらに、リンパ球と血管内皮細胞の接着分子を欠損したマウスでは、BLM 誘発 SSc モデルにおける B 細胞の活性化と、線維化が顕著に抑制されることから(Yoshizaki A, et al. J Immunol, 185:2502, 2010)、B 細胞と血管内皮細胞、あるいは T 細胞との接着による細胞間相互作用が SSc の病態において重要である可能性を示している。

(3) 自己反応性 B 細胞解析の必要性和従来法による解析の問題点

前述の通り、自己反応性 B 細胞の自己免疫疾患に対する直接的な役割は明らかとなっていない。この理由として第一に挙げられるのは、患者から得られる自己反応性 B 細胞は数が少なく、解析出来る細胞数に限りがあるという点である。第二に、少数の自己反応性 B 細胞から産生されるサイトカインは微量であるため、enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法や LUMINEX 法といった従来の手法では検出力が不足している。第三に自己反応性 B 細胞の機能を解析するためには、血管内皮細胞や他の免疫細胞との細胞間相互作用の検討が不可欠であるが、細胞培養プレートや ELISA プレートといった従来のデバイスでは細胞に対してサイズが大きすぎるため、生体内での細胞同士のやり取りが ex vivo で再現できていない。自己反応性 B 細胞の解析には、これらの問題点を解決する新しい手法が必要となる。

2. 研究の目的

以上のことから、本研究では上述の 3 つの問題点を解決する新しい独自の手法を用い、SSc 患者より得られた自己反応性 B 細胞の機能解析を行った。本研究ではマイクロチップ上に形成された直径 100 μm の流路からなるマイクロ空間を用い、自己反応性 B 細胞の解析を行った。これにより、自己反応性 B 細胞が血管内皮細胞や線維芽細胞および T 細胞などの免疫担当細胞

と相互作用した際のサイトカイン産生能を検討することが可能となり、これまでブラックボックスであった自己反応性 B 細胞の機能が明らかとすることを目的とした。

本研究では SSc における topo I 抗原に対する自己反応性 B 細胞の解析を行ったが、波及効果として、今回の成果は他の自己免疫疾患に関しても応用されることが容易に想像され、自己免疫疾患全般に対する病態解明と新規治療法の開発の観点から、極めて重要な研究になると考えられる。

3. 研究の方法

(1) Topo I 特異的 B 細胞

抗 topo I 抗体陽性の SSc 患者から、通常の診療で得られた採血検体を用い、血球分離剤によりリンパ球を分離した。引き続き CD20 抗体を用い、B 細胞の分離を MACS システムを用いて行った。蛍光標識された topo I 抗原に結合する B 細胞をセルソーターで抽出することにより topo I 特異的 B 細胞を得た。

(2) マイクロ空間を用いた B 細胞機能解析 (研究項目 B)

現在、サイトカイン産生能などを含めた B 細胞の機能を検討するために用いられている一般的な手法では、10⁴-6 個の細胞が必要となる。これは、サイトカイン解析に用いられる ELISA 法などでは検出するために最低でも 0.1 pmol/L 以上のタンパク質濃度が必要とされ、ionomycin などの強い刺激を与えた場合であっても、B 細胞から産生されるサイトカインは微量であるためである。そもそも現在一般的に用いられているマイクロチューブなどの反応容器は、細胞に対してあまりに巨大である。細胞をヒトの大きさに例えると、反応容器の容積は東京ドーム 10 個分に相当する(図 3)。細胞を溶解した際の希釈率は 10⁻⁸ 倍となり解析は難しい。次にサイトカイン分子をヒトの大きさに例えると、ELISA プレートの表面にあるサイトカイン分子が、底面の捕捉抗体までたどり着く道のりは、地球から月までの距離に等しい。さらに捕捉抗体に結合したサイトカイン分子を検出するのは、日本国土に存在する個人を宇宙の人工衛星から探すようなものであるため、シグナルを得るには高い検出力が必要となる。これらに加え、topo I 特異的 B 細胞は患者体内にごく僅かしか存在しないため、従来の測定方法では解析できない。研究代表者はマイクロチップを用いた独自のアッセイ系を確立しており、これらの問題点を解決した自己反応性 B 細胞の解析を行うことができる。

(3) マイクロチップ上での共培養

マイクロチップに形成された直径 100 μm の流路で血管内皮細胞を培養した。次に topo I 特異的 B 細胞を 10² 個導入し、topo I 特異的 B 細胞と血管内皮細胞の細胞間相互作用を検討した。対応抗原は不明ながらも、抗 topo I 抗体は血管内皮細胞の表面分子に結合することが知られており、topo I 特異的 B 細胞は BCR を介して血管内皮細胞から刺激を受けると考えられる。加えて前述の通り、細胞接着分子を介して B 細胞は血管内皮細胞に接着し直接刺激を受けることが知られている。さらにマイクロ流路には栄養の供給のため培養液が流れており、これは生体における血流に相当する。血流によって生じるシェアストレスは血管内皮細胞のタンパク分子発現を変化させるため、B 細胞と血管内皮細胞の新しい相互作用を明らかにできる可能性がある。血管内皮細胞のみならず、T 細胞や線維芽細胞、マクロファージも共培養の対象として用い、皮膚や肺、あるいはリンパ臓器におけるマイクロ空間を模倣した検討を可能とした。B 細胞のみをマイクロ空間に導入し、抗原やサイトカインで刺激し、産生されるサイトカインについても解析を行った。

(4) マイクロ ELISA

B 細胞から培養液中に放出された微量のサイトカインを、マイクロ空間に展開した捕捉抗体結合ビーズを用いて解析した。検出には高感度な熱レンズ顕微鏡検出系を用いているため、従来の手法よりも 10²-3 倍の感度で解析が可能である。

(5) マイクロ細胞 ELISA による自己抗体検出

Topo I 特異的 B 細胞が産生する抗 topo I 抗体や、その他の自己抗体の血管内皮細胞に対する結合能をマイクロチップ上で細胞 ELISA を行うことで検討した。さらに血管内皮細胞から産生されるサイトカインを解析することで、自己抗体が血管内皮細胞に及ぼす影響を検討した。

(6) BLM 誘発 SSc モデルマウス作成

野生型マウスに対して BLM を皮下投与し、BLM 誘発 SSc モデルを作成した。

(7) 病理組織学的解析

BLM 誘発 SSc モデルマウスにおける皮膚および肺から病理組織切片を作成し、線維化を解析した。

(8) 血清中サイトカイン・自己抗体解析

BLM 誘発 SSc モデルマウスから得た血清を用いて、サイトカイン濃度と自己抗体量を解析した。

(9) マイクロ空間による B 細胞機能解析

BLM 誘発 SSc モデルマウスより抽出した topo I 特異的 B 細胞を用い、B 細胞の機能解析を行った。

4 . 研究成果

(1) SSc 患者末梢血からの細胞分離

抗 topo I 抗体陽性の SSc 患者から、通常の診療で得られた採血検体を用い、血球分離剤によりリンパ球を分離した。引き続き CD20 抗体を用い、B 細胞の分離を MACS システムで行った。蛍光標識された topo I 抗原に結合する B 細胞をセルソーターで抽出することにより topo I 特異的 B 細胞を得た。SSc 患者では topo I 抗原特異的 B 細胞の出現を認め、その数は病勢と相関していることが明らかとなった。

(2) マイクロ空間を用いた B 細胞機能解析

まず、マイクロチップに形成された直径 100 μm の流路で血管内皮細胞を培養した。次に topo I 特異的 B 細胞を導入し、topo I 特異的 B 細胞と血管内皮細胞の細胞間相互作用を検討した。対応抗原は不明ながらも、抗 topo I 抗体は血管内皮細胞の表面分子に結合することが知られており、topo I 特異的 B 細胞は BCR を介して血管内皮細胞から刺激を受けると考えられ、これによる影響を検討した。血管内皮細胞のみならず、T 細胞や線維芽細胞、マクロファージも共培養の対象として用いており、皮膚や肺、あるいはリンパ臓器におけるマイクロ空間を模倣した検討を施行した。B 細胞のみをマイクロ空間に導入し、抗原やサイトカインで刺激し、産生されるサイトカインについても解析を行った。以上の検討から自己抗原特異的 B 細胞は、自己抗原に対するアフィニティーが高い程、炎症性サイトカインを産生することが明らかとなった。加えて、自己抗原に対する親和性が低い自己抗原特異的 B 細胞は、炎症抑制性のサイトカイン産生をすることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Kuzumi A, [Yoshizaki A](#), Fukasawa T, Ebata S, Miura S, Yoshizaki A, Sumida H, Asano Y, Sato S. Serum levels of human α -defensin 2: possible association with fibrosis and vasculopathy in patients with systemic sclerosis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 査読有、2019、in press

Yoshihara Y, Ishiuchi Y, [Yoshizaki A](#), Kurita M, Hayashi M, Ishiji T, Nakagawa H, Asahina A, Yanaba K. IL-10-Producing Regulatory B Cells Are Decreased in Patients with Atopic Dermatitis. J Invest Dermatol. 査読有、139 巻、2019、475-478

Yamashita T, Lakota K, Taniguchi T, [Yoshizaki A](#), Sato S, Hong W, Zhou X, Sodin-Semrl S, Fang F, Asano Y, Varga J. An orally-active adiponectin receptor agonist mitigates cutaneous fibrosis, inflammation and microvascular pathology in a murine model of systemic sclerosis. Sci Rep. 査読有、8 巻、2018、11843

Numajiri H, [Yoshizaki A](#), Fukasawa T, Ebata S, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Miura S, Hirabayashi M, Yoshizaki A, Sumida H, Asano Y, Kazoe Y, Mawatari K, Kitamori T, Sato S. Rapid alteration of serum interleukin-6 levels may predict the reactivity of i.v. cyclophosphamide pulse therapy in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. J Dermatol. 査読有、45 巻、2018、1221-1224

Kuzumi A, [Yoshizaki A](#), Toyama S, Fukasawa T, Ebata S, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Miura S, Hirabayashi M, Yoshizaki A, Asano Y, Sato S. Serum interleukin-34 levels in patients with systemic sclerosis: Clinical association with interstitial lung disease. J Dermatol. 査読有、28 巻、2018、314-319

[学会発表] (計 3 件)

Fukasawa T, [Yoshizaki A](#), Ebata S, Nakamura K, Asano Y, Kazoe Y, Mawatari K, Kitamori T, Sato S. Direct Interaction between Autoreactive B Cells and Endothelial Colony Forming Cells Induces Cytokine Production from B cells through B Cell Receptor and IL-6-JAK2-STAT3 Signaling Pathway, Suppressing Proliferation of Endothelial Colony Forming Cells in Systemic Sclerosis. 2018 ACR (82th)/ARHP (53th) Annual Meeting (国際学会) 2018

Suga H, Kuzumi A, Asano Y, [Yoshizaki A](#), Sato S. Elevated Serum Interleukin-34 Levels Are Correlated with Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis. 2018 ACR (82th)/ARHP (53th) Annual Meeting (国際学会) 2018

[吉崎 歩](#). 医工連携研究による単一細胞サイトカイン解析が紐解く、自己抗原特異的 B 細胞

の全身性強皮症における役割. 第 46 回日本臨床免疫学会総会 (招待講演) 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者 無し

(2) 研究協力者 無し

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。