

令和 4 年 4 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08768

研究課題名(和文) サイトカイン産生B細胞の制御による強皮症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a Novel Treatment for Scleroderma by Regulation of Cytokine-Producing B Cells

研究代表者

松下 貴史 (Matsushita, Takashi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60432126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症の病態には自己抗体産生などによりB細胞が強く関与していることが知られている。本研究計画では、Effector B細胞のみを阻害する選択的B細胞阻害療法の開発を目指す。マウス脾臓からB細胞を抽出し、抗CD40抗体刺激、LPS単独刺激、LPS+抗CD40抗体刺激の3群でマイクロアレイ解析を行ったところ、IL-6が高発現するLPS+抗CD40抗体刺激群では、A遺伝子、B遺伝子の高発現がみられた。一方、IL-6が低発現である抗CD40抗体刺激群では、A遺伝子、B遺伝子の遺伝子発現が低かった。以上より、A遺伝子がIL-6産生を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、自己免疫疾患におけるB細胞を標的とした新規治療法の開発を目指しており、創造性に富む研究テーマである。本研究により、A遺伝子がIL-6産生を制御している可能性が示唆され、この結果を応用すれば、すべてのB細胞を除去するのではなく、Effector B細胞のみを除去する選択的B細胞阻害去療法の開発につながる重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：It is known that B cells are strongly involved in the pathogenesis of systemic scleroderma through autoantibody production. This research plan aims to develop a selective B cell inhibitory therapy that inhibits only effector B cells. B cells were extracted from mouse spleens and subjected to microarray analysis in three groups: anti-CD40 antibody stimulation, LPS stimulation alone, and LPS+anti-CD40 antibody stimulation. On the other hand, in the anti-CD40 antibody-stimulated group, in which IL-6 was low, gene expression of the A and B genes was low. These results suggest that the A gene may regulate IL-6 production.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 Regulatory B細胞 Effector B細胞 IL-6 IL-10

1. 研究開始当初の背景

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。これまでに強皮症患者の病態には 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血清 BAFF 濃度が強皮症患者において上昇し、皮膚硬化の重症度との相関が示されている。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、強皮症の病態に B 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。自己免疫疾患における B 細胞の重要性は、関節リウマチ患者においてリツキサン® (抗 CD20 抗体) による B 細胞除去療法が予想以上の治療効果を挙げたことから、全世界で脚光を浴びるようになった。さらに近年、全身性強皮症に対する B 細胞除去療法が複数報告され、治療効果が認められたとの報告も散見される。しかしながら、B 細胞除去療法が自己免疫疾患に対して必ずしも有益でない症例も報告されており、リツキサン® 投与後に多発性硬化症の再発が誘導された症例や尋常性乾癬を発症した症例などが存在する。この理由としては、B 細胞が自己免疫や炎症を促進する作用だけではなく、抑制する作用も併せ持っているため、B 細胞除去療法により自己免疫現象を増悪させた可能性が考えられる。この相反する作用は、Regulatory B 細胞と Effector B 細胞の概念で説明できる。これまで申請者らは多発性硬化症や全身性エリテマトーデスのモデルマウスにおいて Regulatory B 細胞と Effector B 細胞の作用を詳細に解析し、病早期の B 細胞除去療法は病勢を悪化させ、反対に病後期の B 細胞除去療法は病勢を抑制することを明らかにしている (Matsushita T et al. J Clin Invest. 118:3420, 2008)。その治療効果はそれぞれの病期における Regulatory B 細胞と Effector B 細胞のバランスによることが示された。さらに、最近我々は、IL-10 産生 Regulatory B 細胞がブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの病態を抑制し、反対に IL-6 産生 Effector B 細胞が促進することを明らかとした (Matsushita T et al. Science Advances 4:7, 2018)。また、全身性強皮症患者でも、IL-10 産生 Regulatory B 細胞の減少 (Matsushita T et al. Rheumatology. 55:263, 2016) ならびに IL-6 産生 Effector B 細胞の増加がみられ、その病態への関与が明らかとなっている。

2. 研究の目的

強皮症をはじめとする自己免疫疾患においては、すべての B 細胞を除去するのではなく、Effector B 細胞のみを阻害する選択的 Effector B 細胞阻害療法が重要であり、その開発には IL-10 産生 Regulatory B 細胞と IL-6 産生 Effector B 細胞の転写因子、シグナル伝達などを詳細に解析する必要がある。これまで、IL-10 産生 Regulatory B 細胞と IL-6 産生 Effector B 細胞の転写因子や、詳細なシグナル伝達経路については、明らかにされていない。そこで、本研究は IL-10 産生 Regulatory B 細胞と IL-6 産生 Effector B 細胞の転写因子の同定ならびにシグナル伝達を解明し、強皮症をはじめとする自己免疫疾患における選択的 Effector B 細胞阻害療法の開発を目標とする。

3. 研究の方法

転写因子の同定のためマイクロアレイにて解析を行う。すでに我々は、LPS 単独刺激では IL-10 産生 Regulatory B 細胞が誘導され、LPS+抗 CD40 抗体による刺激では IL-6 産生 Effector B 細胞が誘導されることを明らかにしている (Matsushita T, et al. Science Advances 4(7): eaas9944. 2018) ①抗 CD40 抗体刺激、②LPS 単独刺激、③LPS+抗 CD40 抗体刺激の 3 群で網羅的遺伝子解析を行う。以上の解析にて候補転写因子を解析する。

上記の網羅的遺伝子解析の結果を応用し、IL-10 産生 Regulatory B 細胞ならびに IL-6 産生 Effector B 細胞に重要なシグナル伝達経路を解析する。また、SCREEN-WELL® Kinase Inhibitor library (Enzo Lifescience 社: 約 80 種類の Kinase Inhibitor をスクリーニング可能な kit)を用いて、それぞれのサイトカイン産生に作用する、Kinase Inhibitor を絞り込む。以上により、B 細胞において IL-6 産生を抑制し、IL-10 産生を抑制しない Kinase Inhibitor を同定する。

4. 研究成果

マウス脾臓から B 細胞を抽出し、①抗 CD40 抗体刺激、②LPS 単独刺激、③LPS+抗 CD40 抗体刺激の 3 群でマイクロアレイ解析を行ったところ、IL-6 が高発現する LPS+抗 CD40 抗体刺激群では、A 遺伝子、B 遺伝子の高発現がみられた(図 1)。

一方、IL-6 が低発現である抗 CD40 抗体刺激群では、A 遺伝子、B 遺伝子の遺伝子発現が低かった。以上より、A 遺伝子が IL-6 産生を制御している可能性が示唆された。さらに IL-6 産生 Effector B 細胞に重要なシグナル伝達経路を解析するために、マウス脾臓から B 細胞を抽出し、LPS+抗 CD40 抗体刺激し、SCREEN-WELL® Kinase Inhibitor library を加えたところ、X54 では IL-6 産生が増強されたが、X4、X23 では IL-6 産生が

有意に阻害された(図 2)。以上により、阻害薬 X4, X23 が B 細胞からの IL-6 産生抑制しうることが明らかとなった。

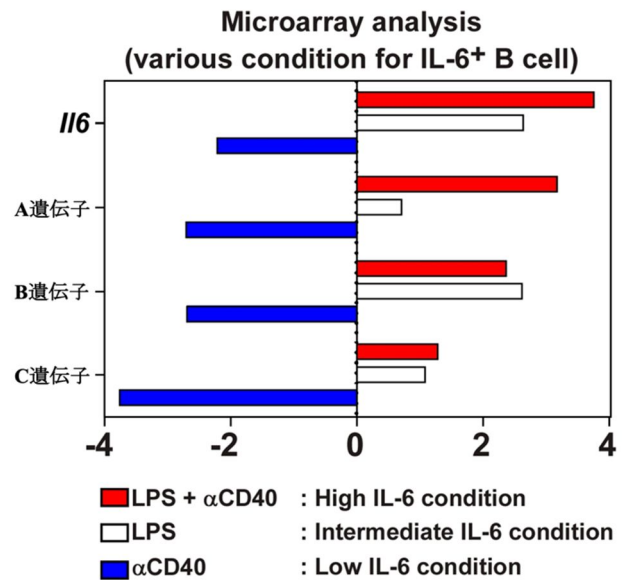


図1

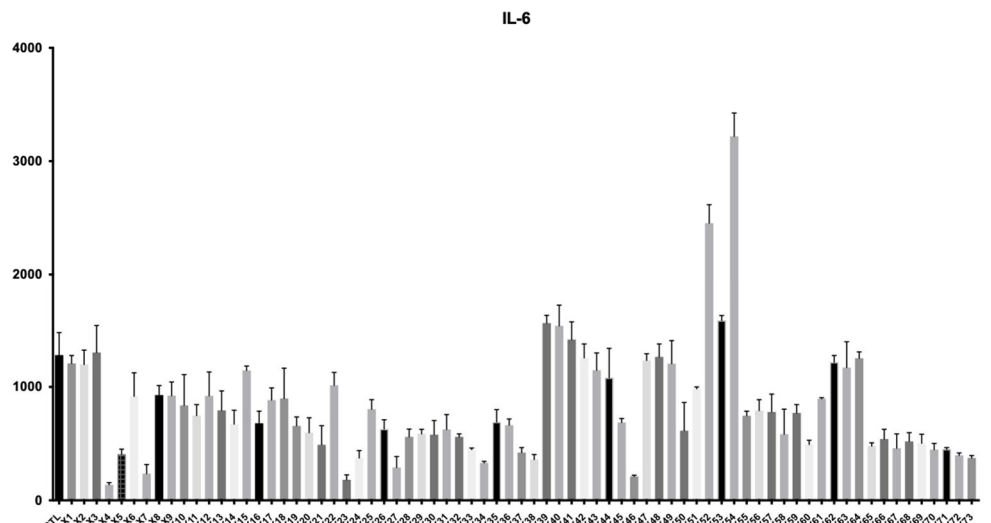


図2

考察： これらの結果から A 遺伝子が B 細胞からの IL-6 産生を制御し、阻害薬 X4, X23 が B 細胞からの IL-6 産生を抑制することが明らかとなった。これらの結果を応用し、自己免疫疾患における選択的 Effector B 細胞阻害療法の開発を継続する。

(本研究は、未発表データを含むため、遺伝子 A-C,阻害薬 X1-73 とした)

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 0件）

1. 著者名 Horii M, Matsushita T.	4. 巻 433
2. 論文標題 Regulatory B cells and T cell Regulation in Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 166685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmb.2020.10.019.	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 Aung WW, Wang C, Xibei J, Horii M, Mizumaki K, Kano M, Okamura A, Kobayashi T, Matsushita T.	4. 巻 101
2. 論文標題 Immunomodulating role of the JAKs inhibitor tofacitinib in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 174-184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.12.007.	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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------