

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08787

研究課題名(和文) マイクロ流路を用いた超微量タンパク分析による強皮症自己抗原反応性B細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of autoantigen-reactive B cells in systemic sclerosis by ultra-sensitive protein analysis using microfluidics.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞は抗体を産生する役割のみを持つとされてきたが、近年の免疫学の発展により、多様な役割が明らかとされてきている。その中でも特に重要な役割として、B細胞は抗原提示や、抗原刺激に応じたサイトカイン産生を介して、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。本研究では独自のマイクロフルイデクスを用いた新しい測定法を使い、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。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に、種々のサイトカインを産生し、SScの病態に深く関与してい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

SScにおいてB細胞は病態において重要であることが示唆されている。実際に本邦では、B細胞除去療法がSScの治療法として保険適応となっている。しかし、B細胞には自己免疫疾患において炎症を惹起する集団のみならず、感染防御に関与する集団や、炎症を抑制する集団など、様々な亜集団が存在している。このため、現在一般的に用いられている全般的なB細胞除去療法は必ずしも適切な治療とは言えない場合がある。本研究では、SScにおいて病原性を有するB細胞の同定を行ったことで、新たな治療法開発の礎となった。

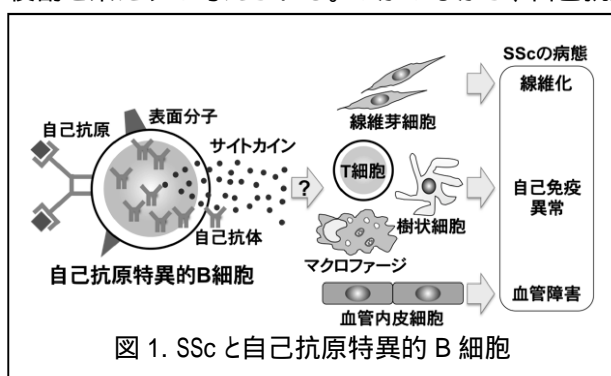
研究成果の概要(英文)：Although B cells have long been thought to play only an antibody-producing role, recent developments in immunology have revealed a variety of roles for B cells. Among them, B cells have been suggested to play a central role in the immune system through antigen presentation and cytokine production in response to antigen stimulation. In this study, we analyzed the function of autoreactive B cells obtained from SSc patients using a novel assay based on our original microfluidics. The results revealed that autoreactive B cells produce various cytokines when they interact with immune cells such as vascular endothelial cells, fibroblasts, and T cells, and are deeply involved in the pathogenesis of SSc.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：B細胞 強皮症 自己免疫 超微量タンパク分析 マイクロフルイデクス

## 1. 研究開始当初の背景

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 の病因は不明であるが、その発症には自己免疫が重要であると考えられている。その根拠として、SSc では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ることが挙げられる。さらに、出現する自己抗体の種類によって、合併症の頻度や予後が大きく異なる。このように自己免疫反応によって産生される自己抗体は SSc の病態と密接に関連しており、自己抗体産生の担い手である B 細胞は SSc の病態形成において中心的な役割を果たすと考えられる。しかしながら、自己抗原の多くは核内あるいは細胞質内に存在する



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、直接病態形成に関与するとは、一般的に考えられていない。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、自己抗原反応性 B 細胞と SSc の病態の関係は不明瞭なままであった(図 1)。

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。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。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支配的な役割を果たしており、SSc を含む自己免疫疾患においても自己抗原反応性 B 細胞が病態の中心をなす可能性がある。

前述の通り、自己抗原反応性 B 細胞は SSc において重要な役割を果たしていることが強く示唆されているにも関わらず、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抗原反応性 B 細胞は生体内に僅かしか存在せず、解析出来る細胞数に限りがあるという点である。第二に、少数の自己抗原反応性 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 法といった従来手法では検出力が不足している。第三に自己抗原反応性 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。

前述の通り、SSc は本邦における指定難病であり、患者数の少なさから十分な研究がなされておらず、病因の解明に至っていない。このため、有効な治療法開発には未だ至っていない。発症には自己免疫の関与が示唆されており、ステロイドと免疫抑制薬が治療として用いられている。これらの治療はある一定の効果を示すものの、重症例には効果がなく、また効果があったとしても副作用のために患者の予後は悪い。従って、病因の解明とそれに基づく治療法の開発が切望されている。SSc の病因には自己抗原反応性 B 細胞が重要であることは先に述べたが、これを検討するための技術はこれまで確立されていなかった。このため、研究代表者らは生体内にごく僅かしか存在していない自己抗原特異的 B 細胞を解析するため、東京大学工学部北森研究室と 2014 年から医工連携共同研究を行って来た。現在までの成果としてマイクロ空間を用いた超微量タンパク測定法を確立している。この技術は患者から得られた僅かな自己抗原特異的 B 細胞の機能解析を可能とするものであり、本研究で計画した通り、SSc 患者における topo I 反応性 B 細胞解析に着想した。

## 2. 研究の目的

以上のことから、本研究では SSc における自己抗原反応性 B 細胞の機能解析を行う。この解析に伴う前項の問題点に関しては、医工連携研究によって確立した新しい独自の手法を用いて解決する。詳細は次項で述べるが、本研究ではマイクロチップ上に形成されたマイクロ空間を用い、自己抗原反応性 B 細胞の解析を行う。これにより、自己抗原反応性 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 SSc における自己抗原反応性 B 細胞の機能が明らかとなることが期待される。本研究で得られる新しい知見は他の自己免

疫疾患にも応用可能であることが予想され、自己免疫疾患全体における新たな病因論を創造出来る可能性がある。本研究では SSc 患者における topo I 特異的 B 細胞の病原性を明らかにする。具体的には ex vivo で毛細血管環境を再現し、血管内皮細胞に topo I 特異的 B 細胞が接触した際の機能を検討する。さらに、SSc モデルマウスである topo I 誘導 SSc モデルから得られた topo I 特異的 B 細胞を野生型マウスへ養子移入し、その病原性について確認する。毛細血管環境の再現と、SSc 患者から少数しか得られない topo I 特異的 B 細胞の解析には、我々が開発したマイクロ空間を用いた解析システムを用いる。

### 3. 研究の方法

#### 1) マイクロ空間における B 細胞機能解析

現在用いられている一般的な手法では、サイトカイン産生能を含めた B 細胞の機能を検討するためには、 $10^{4-6}$  個の細胞数が必要となる。これは、サイトカイン濃度測定に用いられる ELISA 法などでは検出のために最低でも 0.1 pmol/L 以上のタンパク質濃度が必要とされ、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り、細胞を溶解した際の希釈率は 10-8 倍となる。さらにサイトカイン分子をヒトの大きさに例えると、検体の表層にあるサイトカイン分子が、ELISA プレート底面の捕捉抗体までに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、地球上に存在する個人を人工衛星から捜すようなものであるため、高い検出器が必要となる。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 topo I 特異的 B 細胞の解析を行うことができる。

1-1) SSc 患者末梢血からの topo I 特異的 B 細胞抽出; 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、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 細胞を得る。

1-2) 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  $\mu$ m の流路で血管内皮細胞を培養する。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する。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。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。

1-3) マイクロ ELISA によるサイトカイン、抗原結合能解析; B 細胞あるいは血管内皮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する。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、従来法よりも  $10^{2-4}$  倍の感度で解析が可能である。さらに 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 を行うことで検討する。

1-4) DNA マイクロアレイ解析; 共培養後の細胞をマイクロチップから取り出し、DNA マイクロアレイを行い、発現する遺伝子の解析を行う。

#### 2) SSc モデルマウス解析

2-1) topo I 誘導 SSc モデルマウス作成; 野生型マウスに topo I 抗原を免疫し、SSc モデルマウスを作成する。

2-2) マイクロ空間による B 細胞機能解析; ヒトと同様に、topo I 特異的 B 細胞の解析を行う。

2-3) 養子移入実験による topo I 特異的 B 細胞の病原性確認; topo I 誘導 SSc マウスから得た topo I 特異的 B 細胞を野生型マウスへ養子移入し、病理組織・血清サイトカイン・自己抗体を解析する。

### 4. 研究成果

#### 1) マイクロ空間における B 細胞機能解析

SSc 患者から抽出した topo I 特異的 B 細胞をマイクロチップ上で T 細胞と共培養したところ、T 細胞を IL-10 産生性の regulatory T 細胞に分化させる B 細胞と、IL-17 を産生する Th17 細胞へ分化させる B 細胞が存在していることが明らかになった。

マイクロ ELISA を用いて B 細胞から産生されるサイトカインを検討したところ、B 細胞からはさまざまなサイトカインが産生されることが明らかとなった。特に、IL-6、IL-23、IL-10、IL-35 の産生は T 細胞の分化と線維芽細胞からのコラーゲン産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに topo I 特異的 B 細胞の DNA マイクロアレイの解析において、上記のサイトカイン産生に重要な経路の遺伝子発現が更新していることが明らかとなった。

## 2) SSc モデルマウス解析

我々が樹立した topo I 誘導 SSc モデルマウスでは、topo I による免疫を複数回行うことになる。Topo I 誘導 SSc モデルマウスの体内では、topo I 特異的 B 細胞の出現が認められた。Topo I による免疫を 1 回行った場合と、4 回免疫した場合を比較したところ、topo I 特異的 B 細胞から産生される抗 topo I 抗体は、免疫の回数が多いマウスにおいて topo I に対する抗原親和性を増していることが明らかとなった。

Topo I 特異的 B 細胞からのサイトカイン産生能を検討したところ、topo I を用いて 1 回免疫したマウスから得られた抗原低親和性 B 細胞からは、IL-10 や IL-35 といった炎症抑制性のサイトカイン産生が認められた。その一方で、topo I で 4 回免疫したマウスから得られた抗原高親和性 B 細胞からは炎症を惹起すると考えられる IL-6 や IL-23 の産生が認められた。

次に IL-23 に対する中和抗体を用いて、4 回 topo I で免疫したマウスの治療実験を行った。その結果、それぞれの中和抗体の投与によって、topo I 誘導 SSc モデルマウスの皮膚硬化と肺線維化は改善することが示された。

以上の結果をまとめると、SSc において topo I 特異的 B 細胞は抗原に対する親和性が低い場合は、IL-10 や IL-35 を介して炎症抑制性に働き、その一方で、抗原親和性が亢進した際には、IL-6 や IL-23 を介して炎症を引き起こし、線維化を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Nakao T, Kazoe Y, Mori E, Morikawa K, Fukasawa T, Yoshizaki A, Kitamori T.	4. 巻 144
2. 論文標題 Cytokine analysis on a countable number of molecules from living single cells on nanofluidic devices.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 7200-7208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9an01702j.	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 Ebata S, Yoshizaki A, Fukasawa T, Miura S, Takahashi T, Sumida H, Asano Y, Sato S.	4. 巻 46
2. 論文標題 Rituximab therapy is more effective than cyclophosphamide therapy for Japanese patients with anti-topoisomerase I-positive systemic sclerosis-associated interstitial lung disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 1006-1013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15079.	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 Matsuda KM, Yoshizaki A, Kuzumi A, Fukasawa T, Ebata S, Miura S, Toyama T, Yoshizaki A, Sumida H, Asano Y, Oba K, Sato S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Skin thickness score as a surrogate marker of organ involvements in systemic sclerosis: a retrospective observational study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	6. 最初と最後の頁 129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-019-1919-6.	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ai Kuzumi, Ayumi Yoshizaki, Takemichi Fukasawa, Satoshi Ebata, Yoshihide Asano, Shinichi Sato
2. 発表標題 Microenvironment in systemic sclerosis provides a protective niche for tissue-resident B cells during B cell depletion therapy with anti-CD20 antibody
3. 学会等名 2019 ACR (83th)/ARHP (53th) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayumi Yoshizaki
2. 発表標題 Functional elucidation of autoantige-reactive B cells by single cell protein analysis
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉崎 歩
2. 発表標題 強皮症治療の進歩
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------