

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790790
 研究課題名（和文）
 CD20 抗体による B 細胞除去療法が免疫応答に及ぼす影響についての検討
 研究課題名（英文）
 The effect of B cell depletion on humoral responses during anti-CD20 mAb immunotherapy
 研究代表者
 濱口 儒人（HAMAGUCHI YASUHITO）
 金沢大学・附属病院・講師
 研究者番号：60420329

研究成果の概要（和文）：

CD20 抗体を用いた B 細胞除去療法が液性免疫に及ぼす影響については不明な点が多いため、マウスを用いた実験系で検討した。抗 CD20 抗体による B 細胞除去は抗体のクラススイッチを阻害し記憶 B 細胞を除去したが、血清中の免疫グロブリン値や抗原特異的抗体価、骨髄中の形質細胞数は変わらなかった。以上の結果から、CD20 抗体療法は成熟 B 細胞や記憶 B 細胞を除去するものの既存の抗体価に影響を与えないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The full effects of B cell depletion on humoral immunity are largely unknown. To address this issue, mature B cells were depleted in mice using CD20 mAb. CD20⁺ B cell depletion prevented humoral immune responses and class switching, and depleted B cell memory. Nonetheless, B cell depletion did not affect serum Ig levels, Ag-specific antibody titers, or bone marrow antibody-secreting plasma cell numbers. Thus, depleting mature and memory B cells does not have a dramatic negative effect on pre-existing antibody levels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：B 細胞、CD20、免疫応答

1. 研究開始当初の背景

B 細胞は高度に分化した免疫システムである獲得免疫を担う免疫担当細胞である。CD20 は代表的な B 細胞特異的表面分子であり、プレ B 細胞から未熟 B 細胞に分化する段階で発現し、成熟するに従って発現量

は増加するが、形質細胞に分化するとその発現は失われる。近年、特定の分子のみを標的として作用する薬剤を用いた分子標的療法の開発が精力的に進められている。CD20 を標的として開発された抗ヒト CD20 抗体（リツキシマブ）は代表的な分

子標的療法の一つであり、B細胞除去機能を有することからヒトのB細胞由来悪性リンパ腫に広く使用されている。抗 CD20 抗体が生体内で B 細胞を除去する分子機構として、抗体依存性細胞障害活性、補体依存性細胞障害活性、アポトーシスの誘導などが考えられていたが、詳細は不明であった。申請者は Duke 大学免疫学教室 Thomas F. Tedder 教授のもとで、マウスの B 細胞を非常に効率よく除去できる抗マウス CD20 モノクローナル抗体を世界に先駆けて作成した。このマウスモデルを用いて検討を行い、抗 CD20 抗体はマクロファージ上の IgG Fc 受容体 (FcγR) 依存性の経路を介して B 細胞を除去すること、抗体がアイソタイプ依存的に FcγR と結合して B 細胞を除去することを解明した。

B 細胞は抗体を産生することにより免疫応答において重要な役割を果たしている。これまでに、抗 CD20 抗体は B 細胞由来の腫瘍性疾患のみならず、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (SLE) 及び尋常性天疱瘡などの自己免疫疾患においてもその有用性が指摘されている。従来、抗体産生細胞である形質細胞は CD20 の発現を欠くため、抗 CD20 抗体療法により除去されないと考えられてきた。確かに、抗 CD20 抗体は血清 IgG 値に影響を与えないとする報告が多いが、抗 CD20 抗体療法により SLE 患者では 2 本鎖 DNA 抗体価が、尋常性天疱瘡患者では抗デスモグレイン抗体価が低下することが報告されている。このことは、CD20 を発現していない形質細胞以外に、CD20 を発現している抗体産生細胞が存在することを示唆している。抗 CD20 抗体はこれらの抗体産生細胞を除去している可能性があるが、詳細は不明である。

抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法が臨床に応用されて以来、B 細胞除去が易感染状態を引き起こすかどうかは重大な関心事である。近年、リツキシマブ投与により致死的な B 型肝炎ウイルスの再活性化が生じた例が報告されている。従って、B 細胞除去療法が宿主の免疫状態に及ぼす影響を検討することは重要な検討課題である。しかしながら、ヒトで詳細な検討をすることは現実的に困難であり、このような場合はマウスモデルが適している。マウスに免疫応答を誘導する抗原は大きく 3 つに分類される。TD 抗原はジフテリア毒素など、TI-1 抗原は細菌性リポ多糖類など、TI-2 抗原は肺炎球菌多糖類などに相当する。マウスに抗 CD20 抗体を投与して B 細胞を除去した状態でこれらの抗原を投与し、誘導された免疫応答を検討することで、抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法が多種多

様な感染症に対する免疫応答に及ぼす影響を間接的に検討することができる。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点について明らかにすることを目的とする。1) 一次免疫応答における B 細胞の役割の解明。2) 二次免疫応答 (免疫記憶) に対する抗 CD20 抗体療法の影響。3) 抗体産生細胞に対する抗 CD20 抗体療法の効果。4) 上記の免疫反応に関与する B 細胞分画 (胚中心 B 細胞、記憶 B 細胞、前形質細胞、形質細胞) における CD20 発現の評価

3. 研究の方法

①抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法が免疫グロブリンに及ぼす影響

day0 に 1 回のみ、抗 CD20 抗体 (MB20-11) あるいはコントロール抗体をマウスに投与し、day0 を含め day60 まで経時的に数回血清を採取する。ELISA 法により IgM、IgG1、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgA を測定し、抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法が血清中の免疫グロブリンに及ぼす影響について検討する。

②T 細胞依存性 / 非依存性免疫応答における B 細胞の役割の検討

T 細胞依存性免疫応答の惹起には DNP-KLH (TD 抗原)、T 細胞非依存性免疫応答の惹起には TNP-LPS (TI-1 抗原) と DNP-Ficoll (TI-2 抗原) を抗原として用いる。免疫をする 7 日前に MB20-11 あるいはコントロール抗体を投与する。各々の抗原で免疫後、day0、day7、day14、day21 に血清を採取し、ハプテン特異的抗体価を ELISA 法により測定する。なお、T 細胞依存性免疫応答の実験では、day28 に追加免疫を行い、day28、day35 に血清を採取し二次応答に対する影響についても検討する。

③胚中心性 B 細胞に対する効果

マウスを NP18-CGG で免疫し、脾臓に胚中心を形成する。免疫した 7 日後に MB20-11 あるいはコントロール抗体を投与し、投与 7 日後に脾臓を回収しフローサイトメトリー法により胚中心性 B 細胞の数を計測する。胚中心性 B 細胞は、GL-7⁺B220⁺ B 細胞として同定する。また、胚中心性 B 細胞における CD20 の発現量に関する検討も行う。以上の実験から、胚中心性 B 細胞は抗 CD20 抗体により除去されるのかどうかを検討する。

④記憶 B 細胞に対する効果

記憶 B 細胞には特異的表面分子が発現していないため、B 細胞上の表面分子に基づいて記憶 B 細胞を同定することは困難である。従って、抗 CD20 抗体が記憶 B 細胞を除去するかどうかを確かめるために、adoptive transfer の手法を用いる。マウスを NP18-CGG で免疫し、免疫 42 日後に脾臓を採取して磁気ビーズ法により B 細胞を精製する（ハプテン特異的 B 細胞）。キャリアー蛋白特異的 T 細胞は、マウスを CGG で免疫し、免疫 30 日後に脾臓を採取して磁気ビーズ法により精製する。同数のハプテン特異的 B 細胞とキャリアー蛋白特異的 T 細胞を Rag⁺マウスに移入し、移入直後に MB20-11 あるいはコントロール抗体を投与する。抗体投与 1 日後に可溶性 NP18-CGG で免疫し（静脈内投与）、経時的に血清を採取してハプテン特異的抗体価（NP5 あるいは NP25 に対する抗体）を ELISA 法により測定する。また、免疫 10 日後に脾臓と骨髄を採取し、ハプテン特異的抗体産生細胞数を ELISPOT 法により定量化する。

⑤前形質細胞に対する効果

前形質細胞における CD20 の発現を検討するため、*in vitro* と *in vivo* の実験系を用いる。精製した B 細胞に LPS と IL-4 を加えて培養し、*in vitro* で B 細胞の分化を誘導する (Hasbold et al, Nat Immunol, 5: 55, 2004)。分化した B 細胞は形質細胞と前形質細胞の表面マーカーである CD138 を発現しているため、CD138 陽性細胞における CD20 の発現をフローサイトメトリー法により検討する。また、これらの細胞が抗体を産生しているかについて ELISPOT 法により検討する。*in vivo* の実験では、マウスから骨髄と脾臓を採取し、前形質細胞 (B220^{low}CD138^{high}) における CD20 の発現を検討し、これらの細胞と濾胞 B 細胞 (B220⁺CD138⁻) における CD20 の発現量を比較する。

⑥抗原特異的抗体産生細胞に対する効果

マウスを DNP-KLH で免疫し、免疫 21 日後に MB20-11 あるいはコントロール抗体を投与し、経時的に血清を採取してハプテン特異的抗体価を ELISA 法にて測定する。また、初回免疫 90 日後に抗体を再投与し、その 7 日後に DNP-KLH で追加免疫して二次応答を誘導する。経時的に血清を採取し、ハプテン特異的抗体価の推移を検討することで、抗 CD20 抗体が二次応答に及ぼす影響について検討する。

⑦形質細胞に対する効果

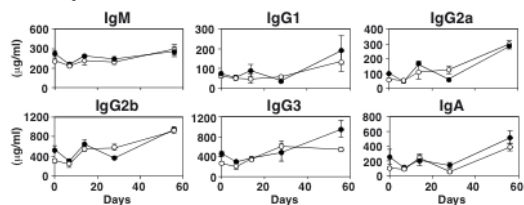
CD138 と BrdU を用いることにより、*in*

vivo で短寿命前形質細胞 (CD138^{high}BudU⁺) と長寿命形質細胞 (CD138^{high}BudU⁻) を区別することができる (Hoyer et al, J Exp Med, 199: 1577, 2004)。そこで、マウスに BrdU を経口投与しながら MB20-11 あるいはコントロール抗体を投与し、投与 7 日後に骨髄と脾臓を採取して前形質細胞と形質細胞の細胞数を検討する。また、抗 LFA-1 抗体と VLA-4 抗体は骨髄の形質細胞を除去することができるため、これらの抗体と抗 CD20 抗体を組み合わせることでマウスに投与し、免疫応答に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

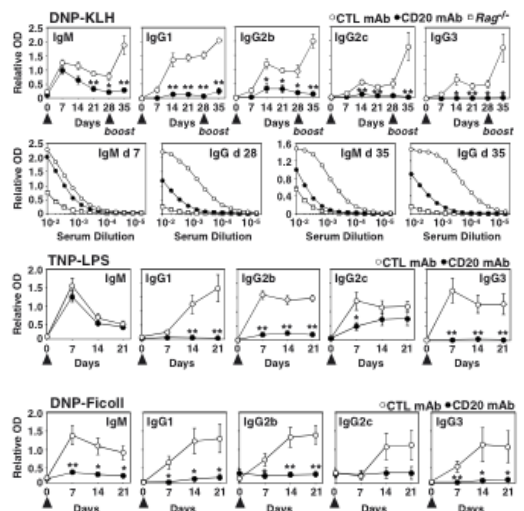
①抗CD20抗体によるB細胞療法が免疫グロブリンに及ぼす影響

抗CD20抗体療法は血清中のIgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3濃度に影響を与えなかった。



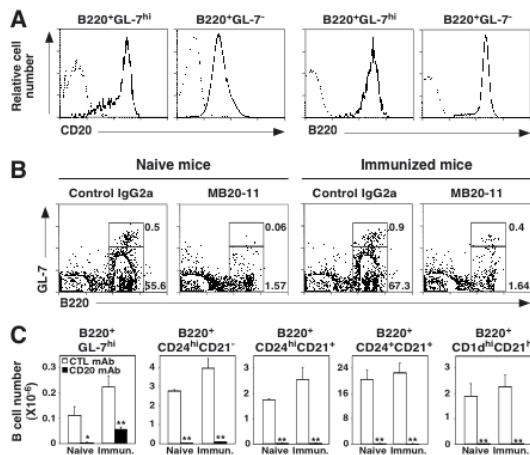
②T細胞依存性／非依存性免疫応答におけるB細胞の役割

CD20抗体療法は、DNP-KLHで免疫したT細胞依存性免疫応答、TI-1抗原(TNP-LPS)で免疫したT細胞非依存性免疫応答においてIgMからIgGへのクラススイッチを阻害した。一方、TI-2抗原(DNP-Ficoll)に対する免疫応答ではIgMの産生も阻害されていた。



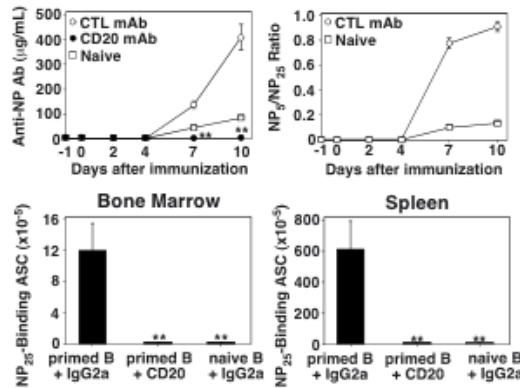
③胚中心性B細胞に対する効果

マウスをNP-CGGで免疫して胚中心を形成し、抗CD20抗体を投与したところ、胚中心性B細胞は除去され。また、フローサイトメトリーを用いた解析で、胚中心性B細胞はCD20を高発現していた。



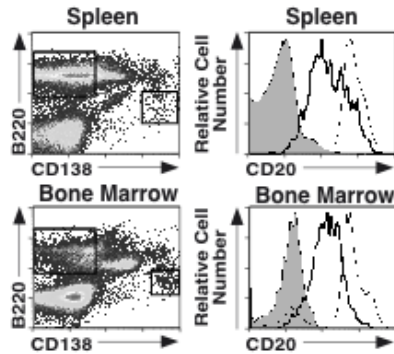
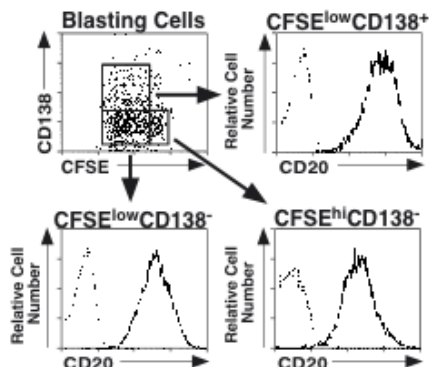
④記憶B細胞細胞に対する効果

Adoptive transferの手法を用いた免疫実験において、CD20抗体療法は免疫記憶応答を阻害した。さらに、抗CD20抗体を投与したマウスでは、抗原特異的抗体産生細胞数は減少していた。



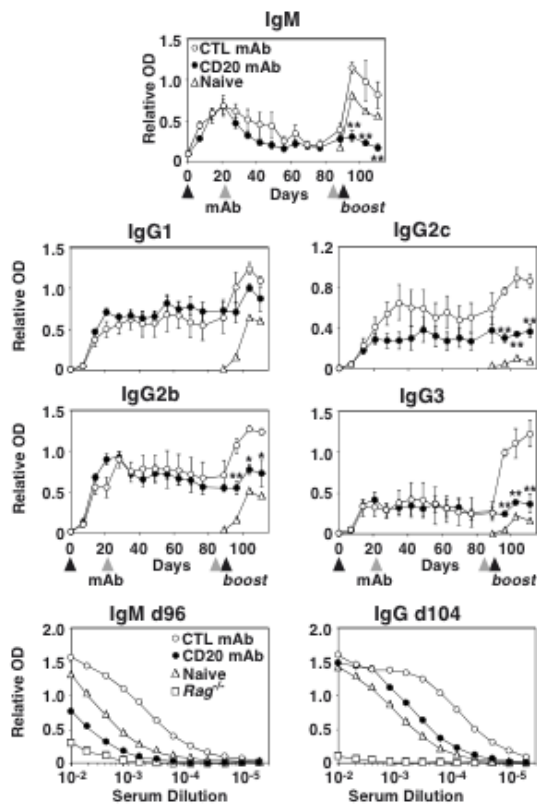
⑤前形質細胞に対する効果

精製したB細胞をCFSEで標識し、LPSとIL-4を加えて培養しin vitroで前形質細胞を誘導した。CFSE⁺CD138⁺前形質細胞はCD20を発現していた。in vivoの検討でも、マウスの骨髄と脾臓における前形質細胞(B220^{low}CD138^{high})はCD20を発現していた。



⑥抗原特異的抗体産生細胞に対する効果

マウスをDNP-KLHで免疫し、免疫21日後に抗CD20抗あるいはコントロール抗体を投与した。経時的に血清を採取してハプテン特異的抗体価をELISA法にて測定した。抗CD20抗体は抗原特異的抗体価に影響を与えなかった。



⑦形質細胞に対する効果

マウスにBrdUを投与するとin vivoで短寿命前形質細胞(CD138^{high}BrdU⁺)と長寿命形質細胞(CD138^{high}BrdU⁻)を区別することができる。抗CD20抗体は短寿命前形質細胞を除去したが、長寿命形質細胞は除去しなかった。しかし、抗CD20抗体を抗LFA-1抗体と抗VLA-4抗体とともに投与したところ、骨髄の形質細胞は除去された。

以上の結果から、CD20 抗体療法は抗体産生細胞である形質細胞には影響を及ぼさないものの、胚中心性 B 細胞や記憶 B 細胞、形質細胞の前駆細胞である前形質細胞を除去することが明らかとなった。また、T 細胞依存性／非依存性免疫応答にも影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに、抗 CD20 抗体を抗 VLA 抗体と抗 VLA-4 抗体とともに投与することで形質細胞を除去できる可能性が示唆され、免疫疾患の治療に応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱口 儒人 (HAMAGUCHI YASUHIITO)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：60420329