

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17440

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の獲得とS100分子の関連

研究課題名（英文）The association between autoreactivity and S100 molecules in systemic lupus erythematosus

研究代表者

北郡 宏次（Kitagori, Koji）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20812639

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）：本研究は、S100A8分子が全身性エリテマトーデス（SLE）の病態にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。SLEや健康人、他の自己免疫疾患を解析し、高疾患活動性のSLEで特異的にB細胞表面のS100A8増加がみられることを見出した。B細胞単離実験では、SLEではBCR刺激によりS100A8が分泌された。健康人B細胞をSLEと同様のIFN α 存在下に刺激したが、S100A8分泌増加は見られず、S100A8分泌がSLEのB細胞に特有の変化であり、免疫活性化を招いていると考えられた。実験結果はArthritis Research and therapyに投稿しacceptされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、疾患活動性の高いSLEのB細胞特異的にS100A8が高発現していること、SLEのB細胞ではBCR刺激により、S100A8分泌が促進されることがわかった。他疾患では同様の変化はみられず、S100A8発現がSLEの病態形成に関与している可能性が示唆された。結果からは、SLEの疾患活動性指標にB細胞表面のS100A8が利用できるのみならず、今後、S100A8のB細胞における機能を解明することで、治療の標的分子としての利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify how the S100A8 molecule is involved in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). By analyzing SLE, healthy controls, and other autoimmune diseases, we found that S100A8 on the surface of B cells was specifically increased in SLE with high disease activity. In B cell isolation experiments, the B cells from SLE secreted S100A8 upon BCR stimulation. When healthy B cells were stimulated in the presence of IFN α , as in SLE, S100A8 secretion was not increased, suggesting that S100A8 secretion is a unique change in SLE B cells and leads to immune activation. The experimental results were submitted to Arthritis Research and therapy and accepted.

研究分野：Rheumatology

キーワード：全身性エリテマトーデス B細胞 S100A8

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス（SLE）は、抗核抗体や抗DNA抗体などの自己の細胞成分に対する自己抗体を特徴とし、自己反応性リンパ球の出現など、様々な免疫異常を伴った全身性自己免疫疾患である。自己免疫が生じる原因は不明であり、疾患の治療には副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤が使用されるが、正常な反応を示す免疫細胞の機能抑制、細胞死も避けられないことから、易感染性などが副作用として問題となる。より安全で効果的な治療を行うため、疾患の病態解明や新規治療薬の開発が切望されている。申請者はこれまでに、SLEの病態に関して、患者末梢血リンパ球における蛋白解析、mRNA解析を行ってきた。健常者と比較検討したところ、SLEのB細胞で著明に増加している分子としてS100A8を見出した。さらに、flowcytometryにて安定期のSLEでは発現を認めず、活動期のSLEでのみ発現亢進を認めたことから、SLEの自己反応性B細胞に特異的に発現している蛋白である可能性が示唆された。S100A8がどのようにSLEのB細胞機能異常に関連し、病態形成に関与しているか、という本研究課題の問いに至った。

2．研究の目的

本研究では、SLE患者末梢血B細胞で高発現しているS100A8について、疾患活動性などSLE病態との関連を検討する。まず、患者の血液においてプレデータで得られているB細胞表面のS100A8についてFACSを用いて評価し確認する。SLE患者血中のS100A8陽性B細胞を同定した後、S100A8を高発現しているB細胞をFACS Aria を用いて単離する。同細胞について刺激を加え培養することで、S100A8分子のサイトカイン産生能や抗体産生能、増殖能の変化について評価を行う。さらに、患者で発現しているS100A8のmRNA配列をもとに、B細胞系の培養細胞に遺伝子導入を行い、患者由来のS100A8を強制発現させた細胞にみられる変化を評価する。評価には、サイトカイン産生能のみでなく、産生される抗体の自己反応性もELISPOTを用い評価を行う。

以上の検討により、S100A8がSLEにおけるB細胞の自己反応性の獲得に関与していることが明らかになれば、SLEの病態解明のみでなく、今後、S100A8をターゲットとした治療法の開発に発展させることができる。

3．研究の方法

研究に使用する血液は、京都大学医学部附属病院 医の倫理委員会で承諾を得ている「各種全身性自己免疫疾患患者血液を用いた治療薬標的分子及びバイオマーカーの検証研究（G771）」にのっとり、京都大学医学部附属病院に通院中のSLE患者、そして自発的に参加を希望した健常者を対象とする。それぞれ、文書同意を得て血液採取を行い、研究に使用する。健常人および患者検体は、それぞれN=10を目標とし採取する。

患者情報は京都大学医学部附属病院で診療録より、年齢や性別の他、血液データについて抽出し、それぞれ匿名化の上、データ解析に使用する。研究データとして得られた、各種細胞分画の割合や、測定するIgG、IgM、S100A8、S100A9などは、それぞれGraphPad Prism 5やJMP Pro14を用いて統計解析を行い、その変化の有意性について検討する。

< 研究スケジュール >

・2020年度～2021年度

1) S100A8陽性B細胞の同定、分離

SLE患者末梢血をS100A8、CD19、CD3、CD14抗体を用い染色し、FACS (LSR Fortessa) 上でC19陽性、S100A8陽性細胞を同定する。S100A8の細胞表面上の発現量をFACSで得られたMFIをもとに、健常人やSLE患者の疾患活動性別に比較する。S100A8の高発現が認められた患者血液では、Ficol法を用いてPBMCを分離し、CD19、S100A8陽性分画をFACS Aria で単離する (S100A8陽性B細胞)。その後の刺激実験の対照として、S100A8陰性B細胞分画も同時に単離しておく。

2) S100A8陽性B細胞の増殖能

単離したS100A8陽性B細胞について、37 24hrの刺激培養 (PMA/Iono、IgG/IgM、imiquimod、LPS、CpG) を行う。増殖能は、Live/Dead® Fixable Dead Cell Stains (Thermo Fisher Scientific)を用いた生存細胞数やCFSEを用いた細胞分裂回数の検討をFACSを用いて行う。PMA/Ionoは、Ca細胞内流入による強制的な細胞の活性化を、IgG/IgMでは特異抗原による刺激を想定したB細胞受容体刺激による活性化を、imiquimodやLPS、CpGではTLR刺激による活性化を想定したものであり、様々な角度からB細胞を刺激した影響をS100A8陰性B細胞と比較することで評価する。

3) S100A8陽性B細胞の抗体産生能

S100A8陽性B細胞の単離培養刺激後の培養液中のIgGやIgM、S100A8、S100A9を測定し、S100A8陰性B細胞の培養液との濃度比較を行う。

・2021年度～2021年度

4) S100A8陽性B細胞の自己抗体産生能評価

S100A8陽性B細胞の自己反応性について、S100A8陽性B細胞を分離後、2本鎖DNAを抗原とした、ELISPOTで抗dsDNA抗体の産生能を評価する。

・2021年度～2022年度

5) S100A8分子のB細胞強制発現系の評価

S100A8高発現のヒトB細胞への影響を評価するため、ヒトB細胞のcell lineとしてRamos細胞に対しS100A8遺伝子を導入し、IgG産生能や自己抗体の産生能について、評価を行う。S100A8のmRNA配列について、患者血B細胞から抽出後cDNAを作成し、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入、またはリポフェクション法を用いた細胞内への遺伝子導入を行い、培養細胞における抗体産生能の変化をELISA法により、特にIgG、DNA抗体について評価する。さらに、サイトカイン刺激下、非刺激下での培養をおこなうことで、より患者の病態に近い状況での作用も確認する。

これまで、S100A8分子は、S100A9分子と共発現していることも報告されており、遺伝子の同時導入における、細胞機能の変化、特に抗体産生能についての評価も行う。

4 . 研究成果

本研究は、S100A8分子がB細胞における抗体産生、細胞の活性化に関連しているかを検討し、それが、自己抗体産生を特徴とし、多臓器に障害をきたす全身性エリテマトーデス (SLE) の病態形成にどのように寄与しているかを明らかにすることを目的とした。

研究に同意を得られた SLE や健常人に加え、他の自己免疫疾患患者における S100A8 陽性 B 細胞の分画も確認した。SLE(stable N=19, active N=17)のみでなく、同意が得られた皮膚筋炎(N=9)、強皮症(6)、シェーグレン症候群(5)、成人発症スティル病(1)、結節性動脈炎(4)、大動脈炎症候群(13)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(6)、多発血管炎性肉芽腫症(2)、顕微鏡的多発血管炎(5)、ベーチェット病(2)、再発性多発性軟骨炎、強直性脊椎炎(1)、IgG4 関連疾患(1)、関節リウマチ(5)など、各種自己免疫疾患についても検討を行った。Flowcytometry による結果は、活動性の高い SLE の B 細胞表面でのみ S100A8 の増加が認められ、SLE に特異的な変化であると考えられた。細胞内局在の有無を評価するためにコンフォーカル顕微鏡を用い評価を行ったが、結果、SLE の B 細胞表面においてのみ S100A8 の発現増加が確認された。

増加している B 細胞上の S100A8 は SLE の治療強化後に減少する傾向も認められ、SLE の疾患活動性評価、治療反応性評価にも利用できるマーカーであると考えられた。

病態との関連について、研究計画では、S100A8 陽性 B 細胞の機能解析にあたり、S100A8 陽性 B 細胞および陰性細胞を同時に分離する予定であったが、FACS 上、S100A8 陽性 B 細胞は、一塊の細胞集団として検出されており、予定していた S100A8 陽性/陰性 B 細胞間での機能解析が困難であった。

そこで、まずは SLE 特異的と思われる B 細胞上の S100A8 発現増加が、B 細胞のどのような活性化に伴い発現するのかを検討した。健常人、SLE 患者 B 細胞を単離後、BCR(anti - IgG/IgM)、TLR4(LPS)、TLR7(Imiquimod)、TLR9(CpG)刺激を加え、24 時間後の培養上清中の S100A8 濃度を測定したところ、SLE の B 細胞に BCR 刺激を加えた群においてのみ、培養上清中の S100A8 の濃度上昇が認められた。健常人の B 細胞については、SLE と同様の環境下を想定し、IFN を添加した状態で同様の刺激を行ったが、健常人 B 細胞においては S100A8 の分泌が認められなかった。

さらに、SLE 病態と S100A8 の関連を検討するため、B 細胞のどの分画で S100A8 が発現亢進しているのかを評価した。特に、近年 SLE 病態との関連が注目されている double negative B 細胞に関して評価を行ったが、S100A8 の有意な増加は認めなかった。

以上のことから、活動性の高い SLE B 細胞に著明に発現している S100A8 は SLE 特異的であり、BCR 刺激を加えることで B 細胞、特に memory B 細胞から分泌されていることがわかった。また、それらは何らかの機構を介して B 細胞表面にとどまり、治療強化による病勢の改善に伴い減少することがわかった。

これらの結果に関して、結果をまとめて Arthritis Research and therapy に投稿し、accept された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Koji Kitagori, Takuma Oku, Masaki Wakabayashi, Tomoya Nakajima, Ran Nakashima, Kosaku Murakami, Yoshitaka Hirayama, Yasushi Ishihama, Koichiro Ohmura, Akio Morinobu, Tsuneyo Mimori, Hajime Yoshifuji	4 . 巻 25
2 . 論文標題 Expression of S100A8 protein on B cells is associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Arthritis Research and Therapy	6 . 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-023-03057-z	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
---------	---------