

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22919

研究課題名(和文) 単一細胞解析を用いたSSc患者・モデルマウスのB細胞の検討

研究課題名(英文) Single cell analysis of B cells of patients with systemic sclerosis and mouse models of systemic sclerosis

研究代表者

江畑 慧 (Ebata, Satoshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80884569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症(SSc)患者やSScモデルマウスでは、マイクロ血管モデル内で多くのB細胞が血管内皮細胞に接着した。これらのB細胞をマイクロELISAで単一細胞解析すると、抗血管内皮細胞抗体や抗トポイソメラーゼI抗体を産生する自己応答性B細胞の比率が高かった。この自己応答性B細胞の亜集団は、血管内皮細胞との接着力が強い集団(強接着B細胞)と接着力が弱い集団(弱接着B細胞)とに分かれ、強接着B細胞の数が重症のSSc患者やSScモデルマウスで増加していた。弱接着B細胞は抗炎症サイトカインIL-10を産生するものが多かったのに対し、強接着B細胞は炎症性サイトカインIL-6を産生するものが多かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は、予後不良な自己免疫疾患であり、難病に指定されている。2021年に新規の治療薬としてリツキシマブが保険承認されたが全ての患者に等しく有効というわけではなく、リツキシマブに対して治療抵抗性を示す患者がいるメカニズムは解明されていなかった。

本研究では、単一細胞解析の技術を用いることで、重症の全身性強皮症の病態形成において、炎症性サイトカインを産生する一部の自己応答性B細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された。この研究成果は、リツキシマブに対する治療効果が乏しい全身性強皮症患者がいる理由の解明や、より効果的な治療薬を開発するための大きな助けになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In patients and mouse models of systemic scleroderma (SSc), many B cells adhered to vascular endothelial cells in a microvascular model. Single-cell analysis of these B cells by micro-ELISA revealed a high percentage of autoreactive B cells producing anti-vascular endothelial cell antibodies and anti-topoisomerase I antibodies. This subpopulation of autoreactive B cells was divided into those with strong adhesion to vascular endothelial cells (strongly adherent B cells) and those with weak adhesion (weakly adherent B cells), and strongly adherent B cells were found to be increased in patients with severe SSc and in mouse models of severe SSc. Weakly adherent B cells were more likely to produce IL-10, an anti-inflammatory cytokine, while strongly adherent B cells were more likely to produce IL-6, an inflammatory cytokine.

研究分野：膠原病

キーワード：B細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は、皮膚や内臓の線維化と血管障害、自己免疫異常を3主徴とする予後不良な自己免疫疾患で、B細胞が病態形成に中心的役割を果たす。本邦では、申請者が2011年から自主臨床試験を施行し、標準療法で加療された群と比較して、リツキシマブによるB細胞除去治療群では皮膚硬化及び肺機能が著明に改善したことを報告している(Ebata S, et al. J Dermatol. 2019; 46: 1006-13)。

しかし、リツキシマブによる全身性強皮症の皮膚硬化や肺機能の改善効果の程度は、患者間でのばらつきが非常に大きい。加えて、リツキシマブに対して治療抵抗性を示す全身性強皮症患者においては、リツキシマブ投与後の末梢血中からのB細胞除去が不完全であることが確認された(Ebata S, et al. J Dermatol. 2022; 49: 179-183)。これと同様の事象は、関節リウマチや全身性エリテマトーデスにおいても、リツキシマブの治療効果が乏しい患者において報告されている。

これらのことから、リツキシマブ投与後に僅かに残存するB細胞の中に、全身性強皮症患者での皮膚や肺の線維化をもたらす、すなわち病原性を有する自己応答性のB細胞が含まれているということが示唆される。難病である全身性強皮症のさらなる治療成績向上を目指す上では、これらのB細胞がなぜ治療抵抗性につながるのか、どのように病態に関与するのかを解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

リツキシマブに対して治療抵抗性を示す全身性強皮症患者においては、リツキシマブ投与後も残存する自己反応性B細胞が関与する可能性が示唆される。これまではsingle B cellを蛋白質レベルで解析する技術が無かったため、これらの自己反応性B細胞を解析することは困難だった。

本研究では最新のマイクロ流体力学を応用し、マイクロ血管モデルを作成して血管内皮細胞と反応する自己応答性B細胞のみをsingle cellレベルで解析する。血管内皮細胞に接着し組織に浸潤する自己応答性B細胞が、全身性強皮症の病態や治療抵抗性に果たす役割を明らかにし、より効果の高い治療法開発に資する研究を目指す。

### 3. 研究の方法

まずは、マイクロ化学チップ内に導入した血管内皮細胞をconfluentになるまで培養し、マイクロ血管モデルを作成する。このマイクロ血管モデルを用いることで、全身性強皮症におけるin vivoの組織中での毛細血管と類似した環境を再現することが可能になる。

続いて、マイクロ血管モデル内に全身性強皮症患者やトポイソメラーゼⅠ誘発全身性強皮症モデルマウスの末梢血中B細胞を導入する。マイクロ血管モデル内で血管内皮細胞と接着するB細胞が存在するかを確認する。

血管内皮細胞と反応するB細胞の存在を確認できたら、そのB細胞集団について、新規技術であるマイクロELISAシステムを利用することで単細胞解析を施行する。抗トポイソメラーゼⅠ抗体、抗血管内皮細胞抗体を産生する自己応答性B細胞からどのようなサイトカインが産生され、いかなる細胞内シグナル伝達物質が発現しているのかに関して、B細胞ごとに検討を行う。

さらに、自己応答性B細胞のマウスに対する養子移入実験を行い、これらのB細胞の持つ病原性を確認する。

### 4. 研究成果

全身性強皮症患者やトポイソメラーゼⅠ誘発全身性強皮症モデルマウスでは、それぞれ健常人やコントロール群のマウスと比べて、マイクロ血管モデル内で多くのB細胞が血管内皮細胞に接着した。この傾向は、線維化の程度が強く重症度が高い全身性強皮症患者や全身性強皮症モデルマウスで顕著であった。

これらのB細胞をマイクロELISAで単細胞解析したところ、抗血管内皮細胞抗体や抗トポイソメラーゼⅠ抗体を産生する、自己応答性B細胞の比率が高かった。この自己応答性B細胞の亜集団は、血管内皮細胞との接着力が強い集団(強接着B細胞)と接着力が弱い集団(弱接着B細胞)とに分けることができ、このうち強接着B細胞の数が重症の全身性強皮症患者や全身性強皮症モデルマウスでは増加していた。弱接着B細胞は抗炎症サイトカインIL-10を産生するものが多かったのに対して、強接着B細胞は炎症性サイトカインIL-6を産生するのに加えて抗トポイソメラーゼⅠ抗体産生量やBAFF受容体発現量が増加していた。

続いて、強接着B細胞を移植してからトポイソメラーゼⅠによる誘発を行ったマウスでは、対照群と比較して皮膚や肺の線維化が増悪した。逆に、弱接着B細胞を移植した場合では、線維化

の程度は抑制された。また、強接着 B 細胞の亜集団は抗 CD20 抗体による B 細胞除去に抵抗性を示したが、抗 BAFF 受容体抗体を併せて投与すると、効率的に除去された。さらに、トポイソメラーゼ I 誘発 SSc モデルマウスにおいて抗 CD20 抗体は単独でも線維化病変を改善したが、抗 BAFF 受容体抗体と併用すると線維化抑制効果が増強された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江畑 慧、吉崎 歩
2. 発表標題 単一細胞解析を用いた強皮症患者・モデルマウスのB細胞の検討
3. 学会等名 第48回 日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------