

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590430

研究課題名（和文） SLEモデルにおけるB1細胞遊走異常による免疫寛容破綻とその是正

研究課題名（英文） Breakdown of immunological tolerance by aberrant cell trafficking of B1 cells in a murine model for SLE

研究代表者

石川 昌（ISHIKAWA SHO）

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00159691

研究成果の概要（和文）：

SLEの動物モデルであるBWF1マウスにおいて、B細胞ケモカインBLC/CXCL13の異所性高発現がB1細胞の遊走異常を引き起こすことが、病態形成に重要な役割を果たしていることを示唆するこれまで蓄積されてきた成績に基づき、発症初期のBWF1マウスに抗BLC/CXCL13中和抗体を投与したところ、生存曲線の改善を認めた。B1細胞はその強力な抗原提示能により T_{FH} 様のヘルパーT細胞を誘導することが明らかになったが、中和抗体投与は T_{FH} レベルや抗DNA抗体のレベルには影響を及ぼさず、血中IL-17レベルが著明に抑制された。以上の結果から、B細胞ケモカイン(BLC/CXCL13)は、SLE治療における分子標的として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Neutralizing anti-BLC/CXCL13 monoclonal antibody effectively inhibited B1 cell migration in chemotaxis assay and administration of the antibody resulted in increased number of peripheral B1 cells in aged BWF1 mice. Therapeutic injections of the antibody to pre-lupus BWF1 mice significantly prolonged their survival compared to those by control IgG. The levels of T_{FH} and IgG anti-DNA antibody remained unchanged in treated mice whereas IL-17 level in the serum was markedly reduced by the antibody injection. These results suggest that BLC/CXCL13 is a possible target for immunotherapy of SLE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：SLE、ケモカイン、B1細胞、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

SLEはIgG自己抗体産生を特徴とする代

表的な全身性自己免疫疾患であるが、その発

症メカニズムは依然として不明であり、特定の遺伝的背景のもとに、感染、性ホルモンなどの環境要因が加わって発症するものと考えられている。SLE はいわゆる難病の中で女性では最も頻度の高い疾患で、日本では5万人前後の患者が存在する。さらに過去数十年間で著明に増加していることが厚生労働省疫学調査班により明らかにされている。ステロイド療法の確立により SLE の予後は格段に改善されたが、副作用や抵抗性の問題は克服されるべき課題として残されている。従って、SLE の発症メカニズムを明らかにし、新たな効果的な治療法を開発することは患者の QOL の向上のみならず医療経済的にも重要な課題である。

研究代表者らは、ヒト SLE に最も近いと考えられる動物モデルである BWF1 マウスを用いてその病態や発症機序に関する基礎的研究を継続してきた。B1 細胞は自己免疫自然発症マウスにおいて高頻度に存在するユニークな B 細胞亜集団として早川らにより初めて報告されたが、BWF1 マウスにおいても病態形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。我々は研究開始当初までに、樹状細胞による異所性 B 細胞ケモカイン (BLC/CXCL13) 発現による B1 細胞の遊走異常が病態形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆する結果を得た (Ishikawa et al. *J. Exp. Med.* 193 : 1393, 2001, Ishikawa et al. *Eur J Immunol.* 32:1881, 2002, Ito et al. *J. Immunol.* 172:3628, 2004)。

さらに、B1 細胞は樹状細胞と同等の強い抗原提示能を有し、胸腺細胞や脾細胞と B1 細胞を IL-2 存在下で培養することにより、自己反応性 CD4T 細胞 (TB1) が MHC クラス II 依存性に活性化されることが明らかとなった (Sato et al. *Eur. J. Immunol.* 34:3346, 2004)。ちなみに、TB1 と濾胞性ヘルパー T

細胞との異同、さらに最近 SLE 患者でも増加が報告されている Th17 との関係は明らかになっていない。また、異所性 BLC 発現による腸管粘膜組織における B1 および B2 細胞の減少に伴い、感染抵抗性の減弱や経口寛容の破綻による全身性感作といった腸管免疫の破綻が起こることも明らかにした (Akadegawa et al. *J. Immunol.* 174:5499, 2005)。BWF1 マウスにおける腸管免疫の破綻は、腸内細菌や病原微生物の侵入を容易にし、T および B 細胞の過剰活性化をもたらす一因をなしているものと考えられる。

一方、近年自己免疫疾患における制御性 T 細胞 (Treg) の役割の詳細が明らかにされたが (Sakaguchi et al. *Nat. Immunol.* 6:345-352, 2005)、自然発症する自己免疫疾患における Treg の病理学的意義は必ずしも明確になったとはいえない。SLE 患者における Treg の動態についても最近報告がされており、Treg の機能は正常であるという報告が多いが、末梢免疫寛容の破綻機序についてはまだ不明な点が多い (Yan et al. *Arthritis Rheum.* 58:801, 2008, Chowdary et al. *Arthritis Rheum.* 58:2120, 2008)。BWF1 マウスにおける制御性 T 細胞 (Treg) の意義に関しても不明な点が多かったが、我々は研究開始当初までに、リンパ組織や標的臓器における Foxp3+CD25+CD4T 細胞が発症に伴いむしろ増加しており、その抑制機能も正常であるにも拘わらず、IgG 抗体産生に抑制作用を示さないことを明らかにした。さらに加齢 BWF1 マウスでは Treg の局在異常も認められた (Abe et al. *Am. J. Pathol.* 173:1682, 2008)。最近では Treg と TFH との可塑性も報告されており、実際に加齢 BWF1 マウスでは CXCR5 および ICOS 陽性の CD4T 細胞の増加も認められる (Ishikawa and Matsushima. *Front. Biosci.* 12: 1290-1803, 2007) ことから、

Treg の病理学的意義の解明は今後の課題として残されている。また最近新たなヘルパー T 細胞亜集団である Th17 の存在が明らかとなり、従来 Th1 優位の病態と考えられてきた EAE やコラーゲン関節炎などで重要な役割を果たしていることが明らかにされた (Nakae et al. *J. Immunol.* 171:6173, 2003, Komiyama et al. *J. Immunol.* 177:566, 2006)。さらに Th17 と Treg はそれぞれ IL-6 やレチノイン酸を介して互いに相反する分化特性をもつことも明らかとなった (Bettelli, et al. *Nature* 441:235, 2006)。このような報告から、Treg の動態は Th17 の動態と密接に関与していると考えられるが、BWF1 マウスにおける Th17 の動態に関してはまだ報告がない。

これらの事実から、異所性 BLC/CXCL13 の発現が、B1 細胞の遊走異常をもたらし、自己反応性 CD4 T 細胞の活性化や腸管免疫の破綻を引き起こし、SLE 病態形成に重要な役割を果たしているものと考えられた。さらに、異所性 BLC/CXCL13 発現による B1 細胞の遊走異常を是正することにより治療効果がもたらされることが期待された。

2. 研究の目的

以上述べた背景に基づき、本研究では B1 細胞の遊走異常により活性化される IgG 抗体産生促進性 CD4T 細胞 (TB1) の免疫学的性状を明らかにし、Treg による末梢免疫寛容の破綻を明らかにすること、さらに、抗 BLC モノクローナル中和抗体により免疫応答の場の異常を是正する新たな治療モデルを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TB1 の性状解析

① 若齢 BWF1 マウスの CFSE 標識脾臓 CD4T 細胞を IL-2 (1 ng/ml) 存在下で腹腔 B1 細胞と 4 日間培養し、分裂増殖する細胞

(CFSE^{low}CD4T 細胞)を便宜上 TB1 とよぶが、この細胞の様々な細胞表面抗原 (CD44、CD62L、CD69、OX40、4-1BB、ICOS、CD40L、CTLA-4、BTLA など) やケモカイン受容体 (CCR4、CCR5、CCR7、CXCR3、CXCR4、CXCR5 など) の発現レベルを FACS で調べ、すでに IgG 抗体促進作用があることが判明している加齢 BWF1 マウス脾臓 CD4T 細胞や濾胞性ヘルパー T 細胞 TFH の表現型と比較する。最近の報告では CXCR5⁺CD44^{High} BTLA⁺CD4T 細胞をマウスにおける TFH としている (Nurieva et al. *Immunity* 29:138, 2008)。なお若齢 BWF1 マウス CD4T 細胞は活性化マーカーの発現上昇はなく、IgG 抗体産生促進能も認められない。また各リンパ組織、標的臓器細胞浸潤部位からリンパ球を調整し、IL-17 細胞質染色による FACS を行い Th17 の存在の有無を明らかにし、存在が明らかになれば SLE 病態との関連を明らかにする。

② TB1 と B1 ないし B2 細胞を共培養すると B 細胞が若齢マウス由来であれば、加齢 BWF1 マウス由来であれば、IgG 抗体産生が促進されるが、この系に CD25⁺CD4T 細胞 (95% が Foxp3 陽性) を加え、IgG 抗体産生が抑制されるか否かを培養上清中の抗体活性を ELISA で測定し明らかにする。我々は加齢 BWF1 マウスの CD4T 細胞による試験管内 IgG 抗体産生促進は CD25⁺CD4T 細胞により抑制されないことを最近明らかにした (Abe et al. *Am. J. Patholol.* in press)。これらの実験は、この SLE モデルにおける末梢免疫寛容の破綻機序を理解するうえで非常に重要である。TB1 が産生促進する抗体に関しては、培養上清中に抗 DNA 抗体活性および抗ヌクレオソーム抗体活性があるか否かを ELISA により明らかにする。加齢 BWF1 マウスの CD4T 細胞は IgG 抗 DNA 抗体産生を促進することが過去に報告されている (Sekigawa et al. *J. Immunol.* 136:1247, 1986)。

(2) 抗 BLC/CXCL13 モノクローナル中和抗体を BLC 発現が上昇し、血清抗 DNA 抗体が陽性に転換する 5 ヶ月齢 BWF1 マウスに投与し、蛋白尿の改善、生存曲線の改善などの治療効果の有無を明らかにする。同時に抗体投与が B1 細胞、T_H、Th17 細胞レベルに与える影響を FACS 解析などにより明らかにする。

4. 研究成果

本研究により、抗 BLC 中和抗体投与が SLE モデルマウスである BWF1 マウスの生存曲線の改善をもたらすことが明らかとなった。抗体投与マウスでは末梢血中の B1 細胞が増加が認められたが、血中 IgG および IgG 抗 DNA 抗体のレベルにも有意な影響は認められず、抗 BLC 中和抗体の治療効果は IgG 自己抗体産生の制御によるものではないことが示唆された。一方、B1 細胞は試験管内で T_H 様ヘルパー T 細胞を誘導することが明らかとなったが、抗体投与により血中や脾臓の T_H のレベルには影響がなかった。細胞内サイトカイン染色による FACS 解析により、加齢 BWF1 マウス CD4 T 細胞では、IL-10、IFN- γ の発現増加が顕著にみられたほか、IL-17 陽性 CD4 T 細胞の増加も有意に認められた。さらに加齢 BWF1 マウス腎臓の免疫組織学的検索においても IL-17 の発現増加が認められた。抗 BLC 中和抗体を投与したマウスでは血清 IL-17 レベルの有意な低下が認められ、治療効果の機序の一つとして IL-17 抑制が示唆された。

SLE に対する生物学的製剤として期待された抗 CD20 抗体や抗 BAFF 抗体などが、臨床試験から撤退する状況のなかで、本研究により抗 BLC 中和抗体の有用性が示唆されたことにより、今後の臨床応用に向けた研究が期待される。この点を考慮し、本研究成果は未発表とした。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Ishikawa S. Children's immunology, what can we learn from animal studies (3): Impaired mucosal immunity in the gut by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): A possible role for allergic sensitization. **J. Toxicol. Sci.** 34:SP349-361, **2009**. 査読有
<http://www.jtoxsci.org>

[学会発表] (計 1 件)

1. 石川 昌 ダイオキシンによる腸管免疫の破綻とアレルギー感作 第 16 回免疫毒性学会 シンポジウム「子どもと免疫」2009 年 8 月 27 日 旭川市民文化会館、旭川、北海道

[図書] (計 1 件)

1. 石川 昌、松島 綱治: ケモカイン. *New 薬理学 改訂第 6 版* 2012, pp189-192. 田中千賀子 加藤隆一 共編、南江堂、東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 昌 (ISHIKAWA SHO)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00159691

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし