

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25年 3月31日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22591077

研究課題名（和文）自己抗体産生細胞を標的とした全身性エリテマトーデスの新規治療法の開発

研究課題名（英文） Establishment of targeting therapy for autoreactive B cells in systemic lupus erythematosus

研究代表者 小荒田 秀一 (KOARADA SYUICHI)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：50304887

研究成果の概要（和文）：RP105 陰性 B 細胞は自己抗体産生 B 細胞であるが、この細胞に対して、BCMA のリガンドである BAFF や APRIL 制御による治療への応用の可能性について検討を行った。in vitro において RP105 陰性 B 細胞の生存細胞数を計測し、BAFF, APRIL の有する機能を解析した。SLE 由来の RP105 陰性 B 細胞は、BCMA を特異的に発現していた。強力な CD40L により、RP105 陰性 B 細胞は、細胞死が誘導されたが、そのリガンドである BAFF、APRIL により、同細胞は細胞死を回避し、生存に寄与した。一方、RP105 陽性 B 細胞は BAFF, APRIL により細胞死を回避しえなかった。また、基礎的研究として、B 細胞での RP105 陰性 B 細胞の分化段階の位置付けするためにフローサイトメトリーを用いて、RP105 陰性 B 細胞のフェノタイプの解析を行った。この際に、RP105 陰性 B 細胞はさらに、活性化 B 細胞、前期・後期形質芽細胞、早期形質細胞、形質細胞の後期 B 細胞の 5 サブセットを形成していることが明らかとなった。SLE では、RP105 陰性 B 細胞の増加が認められるが、そのサブセットのうち、形質芽細胞の増加が特徴的な所見であり、病態に寄与している可能性があると考えられる。また、このうち、新たな B 細胞サブセットを形成する細胞群が SLE において存在することを初めて同定した。

研究成果の概要（英文）：

Systemic lupus erythematosus (SLE) is one of the systemic autoimmune diseases that is characterized by production of various autoantibodies including anti-double strand (ds)-DNA antibodies from B cells. In the pathogenesis of SLE, autoantibody-producing B cells may play a pivotal role in developing autoimmunity. Therefore, understanding of human autoantibody-producing B cell is an essential issue. We investigated phenotype of RP105-negative B cell subsets that produce anti-dsDNA antibodies and are increased in patients with SLE. Phenotyping RP105-negative B cell subsets was performed using a flow cytometer. RP105-negative B cells consist of at least 5 subsets of late B cells, including CD19(+)RP105(int), CD19(+)RP105(-), CD19(low)RP105(-)CD138(-), CD19(low)RP105(-)CD138(int), and CD19(low)RP105(-)CD138(++) B cells. CD19(+)RP105(int) and CD19(low)RP105(-)CD138(int) B cells are larger population than other RP105(-) B cell subsets in SLE. The phenotypic analysis of RP105(-) B cell subsets suggests dysregulation of later B cell subsets in SLE and may provide new insights into understanding regulation of late B cells in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000

年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：SLE、B cells、RP105、BCMA、BAFF、APRIL、CD40L

1. 研究開始当初の背景

最近、さまざまな生物製剤の開発が進んでいる。関節リウマチで生物製剤は高い有効性を示し、寛解導入が可能な時代となった。しかし、SLEにおいては、いまだに難治性病態が存在し、確実な治療法がないのが実情であり、新たな治療の開発が必要とされている。

SLEにおいて、B細胞を標的とした治療法として、リツキシマブなどの治療法が開発され有効性を示す症例もでてきたが、その治療効果はまだ満足のいくものではない(Edwards JCW, Best Prac Reseach Rheum 2006)。B細胞標的療法の場合、理論上、最も有効な治療法の一つは、自己抗体産生B細胞そのものを標的とした治療法であると想定される。もし、そのような治療法が可能であれば、正常B細胞に影響を与えず、副作用の少ない安全な治療法となると考えられる。しかしながら、ヒトでは自己抗体産生B細胞に特異的な細胞表面マーカーは同定されておらず、自己抗体産生B細胞のみを標的とした治療法の開発は困難であった。RP105はToll like receptors(TLRs)関連分子に属し、成熟B細胞に発現している。RP105はB細胞の活性化とシグナル抑制の2つの相反した機能を有している。RP105はB細胞の活性化、恒常性、分化、生存維持等に重要であると考えられ、RP105の異常は自己免疫病態に関連すると想定される。

我々は、SLEなどの自己免疫疾患で、RP105の発現が消失したB細胞(RP105陰性B細胞)を世界初めて発見した(Koarada S, Arthritis Rheum 1999)(Koarada S, J Rheumatol 2005)(Kikuchi Y, Clin Exp Rheumatol 2008)。また、RP105陰性B細胞は抗dsDNA抗体を産生する自己抗体産生B細胞であることを証明した(Kikuchi Y, Arthritis Rheum 2002)。そこで、RP105陰性B細胞に特異的に発現する分子を同定し抗体を作製することで、自己抗体産生B細胞を標的とした治療法が樹立できると考えられた。

これまでの研究で、我々はRP105陰性B細胞に特異的に発現する分子の探索を行ってきた。SLE患者からRP105陰性B細胞とRP105陽性B細胞を単離し、cDNAを作成後、DNAマイクロアレイ解析を行った。

その結果、RP105陰性B細胞に特異的に発現する分子を3分子同定した。これらの分子は、既知2分子、未知分子1分子であった。既知分子はCD38とBCMA(B cell maturation antigen)であることが同定された。未知分子に関しては、現時点では機能・構造ともわかっていないが、自己免疫疾患において重要な役割を果たしている可能性がある。RP105陰性B細胞特異的な未知の抗原に関しては、平成19-20年度の研究にて特異的抗体の作成まで終了している。

既知分子BCMAについての解析を平成21年度に行い、SLEにおいてRP105陰性B細胞特異的にBCMAの発現が増強しており(Koarada S, Rheumatology 2009 accepted)、BCMAの機能阻害や標的分子療法が治療戦略として有効であることを報告した。BCMAのB細胞における役割は未解明の部分が多く、RP105陰性B細胞におけるBCMAの解析やそのリガンドの機能解析は、ヒトにおける後期B細胞の分化に関する新たな知見を見出す可能性がある。

そこで、今後の研究方針として、上記未知抗原に関してSLEなどの自己免疫疾患におけるRP105陰性B細胞での発現を解析し、疾患活動性や病態との関連性の検討を行う。また、SLEモデルマウスを用いて、上記分子の発現や機能解析を行う。一方で、作成した抗体について本研究の最終目標である自己抗体産生B細胞を標的とした治療に使用できるかどうかを、in vitroの細胞傷害実験等で確認し、その後の臨床応用を目指して研究をすすめていく。

生物製剤により革命的な治療法の進歩を見た関節リウマチに比べ、SLEの治療法は、一部の免疫抑制剤が承認されたものの、ここ数十年前でほとんど変わっていないのが実情である。したがって、生物製剤の次なるターゲットは、治療法のない自己免疫疾患へと移っていくと予測されている。本研究は、SLEで病態の中核に位置する自己抗体産生B細胞自体を直接の標的とした世界初の治療法の開発である。世界的にみても同様の研究は行われておらず、まったく新しい独創的治療法の開発となる可能性がある。また、同研究の最終目標はヒト自己免疫疾患の治療へ

の応用であり、同治療法が成功すれば今もって有効な治療がない自己免疫疾患の難治性病態に対する福音となりうると考えられる。

2. 研究の目的

全身性エリテマトーデス (SLE) において自己抗体産生 B 細胞は重要な役割を果たしている。したがって、自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療法は、理論上、最も有効な治療法の一つであると想定されるが、確立されたものはないのが現状である。我々は、SLE で RP105 が消失した B 細胞 (RP105 陰性 B 細胞) が自己抗体産生 B 細胞であることを発見した。同細胞を標的とした治療法の開発を進め、RP105 陰性 B 細胞特異的抗原を同定し、特異的抗体の作製に成功した。本研究で、さらに抗原分子の臨床的意義を解明し、抗体療法が可能かを検討する。自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療法の開発は世界で初の試みであり、いまだに確実な治療法のない SLE 等の難治性病態に対して、今までにない新たな治療法の開発につながると考えられる。

3. 研究の方法

RP105 陰性 B 細胞を標的とした抗体による特異的治療法の確立を主目的とするが、臨床応用への前段階として RP105 陰性 B 細胞特異的分子の自己免疫疾患における機能・発現などの臨床的検討を同時に行った。そのために、本研究全体を以下の 2 つに分割した。

- RP105 陰性 B 細胞および同細胞特異的分子を標的とした治療的の開発
- 自己免疫疾患における RP105 陰性 B 細胞特異的分子の発現等の臨床的検討

in vitro における自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞の除去の試み

自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞に発現する特異的分子を標的とした抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 細胞による細胞除去を試みた。患者由来 RP105 陰性 B 細胞に対して in vitro での具体的な抗体を作用させる ADCC の条件設定を行った。抗体濃度や作用時間の設定、他の共役因子の必要性などの検討を具体的に進めた。

in vitro における自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞の生存・増殖の制御の試み

RP105 陰性 B 細胞に対し、BCMA のリガンドである BAFF や APRIL などによる制御の可能性について検討を加えた。また、CD40L や IFN α などのさまざまなサイトカインやリガンド、あるいは抗体、アンタゴニストを作用させることで、RP105 陰性 B 細胞の細胞死の誘導や増殖抑制ができないかを検討した。この際に実験系は in vitro において患者 B 細胞から産生される抗 DNA 抗体を ELISA 法にて測

定したり、RP105 陰性 B 細胞の生存細胞数を計測し、機能的解析を行った。

自己免疫疾患における RP105 陰性 B 細胞特異的分子の発現等の臨床的検討

RP105 陰性 B 細胞特異的分子に対する抗体を利用し、臨床的検討を行い治療に繋がる可能性について検討した。

まず、SLE をはじめとした自己免疫疾患患者において、疾患活動期および非活動期に分けて、RP105 陰性 B 細胞特異的分子の発現を FACS にて解析した。これらの値と疾患活動性との相関を検討した。また、ステロイド治療前後で、特異的分子の発現の経時的変動を検討した。

4. 研究成果

当該分子の RP105 陰性 B 細胞上での発現、構造決定などが必要となるため、抗原分子に対する特異的抗体を作成した。新規分子に対する抗体により、同分子は SLE 由来の形質芽 B 細胞特異的であることを確認した。また、SLE において RP105 陰性形質芽 B 細胞が増加しており、同細胞を標的とした今後の新規治療法の開発につながる基盤情報を得た (Koarada S, Clin Dev Immunol 2012) (Koarada S, NOVA Science Publishers 2012)。BCMA に関して、SLE で特異的に発現が増強していることを見出し、臨床的に BCMA を標的とした治療法が有用である可能性を示した (Koarada S, Rheumatology 2010)。

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 9 件) 全て査読有

1. Koarada S, Tada Y, Tashiro S, Suematsu R, Inoue H, Ohta A, Nagasawa K. In vitro analysis for prediction of long- and short-term response of anti-inflammatory drugs, TNF blockers, in patients with rheumatoid arthritis. Anti-Inflammatory And Anti-Allergy Drugs (AIAAD) 2013((accepted)

2. Koarada S, Tada Y, Suematsu R, Soejima S, Inoue H, Ohta A, Nagasawa K. Phenotyping of RP105-negative B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Dev Immunol. 2012;2012:198206.

3. Koarada S, Tada Y. RP105-negative B cells in systemic lupus erythematosus. Clin Dev Immunol. 2012;2012:259186.

4. Suematsu R, Ohta A, Matsuura E, Takahashi H, Fujii T, Horiuchi T, Minota S, Ishigatsubo Y, Ota T, Takei S, Soejima S, Inoue H, Koarada S, Tada Y, Nagasawa K. Therapeutic response of patients with adult Still's disease to biologic agents: multicenter results in Japan. Mod Rheumatol. 2012; 22: 712-9.

5. Misago N, Tada Y, Koarada S, Narisawa Y. Erythema Nodosum-like Lesions in Behçet's Disease: A Clinicopathological Study of 26 Cases. Acta Derm Venereol. 2012; 92:681-6.

6. 小荒田秀一、田代知子、末松梨絵、井上久子、大田明英、多田芳史. 自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞上に発現する B-cell maturation antigen は全身性エリテマトーデスの治療標的となりうるか. 日本臨床免疫学会会誌 2012; 35: 38-45.

7. Tada Y, Kondo S, Aoki S, Koarada S, Inoue H, Suematsu R, Ohta A, Mak TW, Nagasawa K. Interferon regulatory factor 5 is critical for the development of lupus in MRL/lpr mice. Arthritis Rheum. 2011;63:738-48.

8. Matsuura E, Ohta A, Suematsu R, Inoue H, Koarada S, Tada Y, Sherriff-Tadano R, Kuroki T, Ikeda D, Nagasawa K. Functional disturbance of the stress-adaptation system in patients with scleroderma. Mod Rheumatol. 2011; 21:397-405.

9. Koarada S, Tada Y, Sohma Y, Haruta Y, Suematsu R, Mitamura M, Inoue H, Ehara H, Tokoro Y, Ohta A, Nagasawa K. Autoantibody-producing RP105(-) B cells, from patients with systemic lupus erythematosus, showed more preferential expression of BCMA compared with BAFF-R than normal subjects. Rheumatology (Oxford). 2010; 49: 662-70.

[学会発表] (計 2 件)

1. 小荒田秀一: SLE および自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞上の BCMA/BAFF-R の発現の解析. 第 56 回日本リウマチ学会 2012. 4. 26 東京

2. Koarada S. Increased novel human late B cell subsets of RP105-negative B cells in patients with systemic lupus erythematosus. 第 41 回日本免疫学会

212. 12. 5 神戸

[図書] (計 2 件)

1. Koarada S. Autoantibody-producing B cells and B cell therapy in systemic lupus erythematosus. In Marquez TD, Neto DU editor: Lupus: Symptoms, Treatment and Potential Complications (Series: Immunology and Immune System Disorders), New York, 2012, Nova Science Publishers. 著書 219 ページ

2. Koarada S and Tada Y. Fundamental Rheumatological Knowledge of Arthritis Images of Hand and Case Studies for General Physicians. (Book) New York, 2013, Nova Science Publishers. 250 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小荒田 秀一 (KOARADA SYUICHI)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号 : 50304887

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者