

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591469

研究課題名(和文) 正常骨髄細胞移植で制御できるSLE自己反応性細胞とは正できない異常及びその治療

研究課題名(英文) The induction of allogenic bone marrow chimerism regulates some lineage of auto-reactive lymphocyte, but not all of them in lupus prone mice.

研究代表者

竹内 恵美子 (Takeuchi, Emiko)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00406935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄移植による骨髄混合キメラ導入は難治性SLEの治療に有効であるが、その治療機序については不明なことが多い。本研究では、遺伝子改変動物の骨髄を導入することにより、正常な骨髄より発生したT細胞が自己反応性B細胞を制御してSLEの発症を抑制していることを示した。さらに、BXSBLoopsマウスは本態性に血清のBAFFの値が上昇し、B細胞が活性化しやすい体内環境を形成することがわかったため、骨髄移植によって置き換えられない細胞の中にB細胞の抗体産生に関わる細胞の異常があると考え、BXSBLoopsの濾胞樹状細胞にTLR7が過剰発現していること、TLR7からの刺激がBAFF産生に関わっているという結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Induction of allogeneic bone marrow(BM)chimerism has been reported as a therapy for patient with severe systemic lupus erythematosus(SLE),however, the details of therapeutic mechanism is still unknown.To clarify this mechanisms, we transplanted BM cells taken from TCR knock-out or BCR knock-out mice, into BXSBLoops lupus prone mice. As the result,mixed chimeric BXSBLoops mice donated TCR KO BM cells developed SLE but not in chimeric mice donated BCR KO BM cells. These results indicated that normal T cell developed from donor BM regulated auto-reactive B cells.

Moreover,we revealed that the serum level of BAFF was spontaneously increased in BXSBLoops lupus mice, and this cytokine may be one of triggers of auto-reactive B cell activation. We detected that transcription of TLR7 of follicular dendritic cells(FDCs)in BXSBLoops mice increased two to four fold higher than that in normal C57BL/6 mice.The stimulation of TLR7 of FDC may induce production and secretion of BAFF.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：全身性ループスエリテマトーデス 骨髄移植 濾胞樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

全身性ループスエリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus : SLE) は原因不明の自己免疫性疾患である。治療はステロイドや免疫抑制剤などを用いる対症療法が主体であり、現在も根治療法の確立が求められている。近年、様々な自己免疫性疾患に対し、骨髄移植による治療が試みられており、動物実験では有意な効果がある事がわかってきているが、実際の臨床現場では、骨髄移植が根治療法として取り入れられることは少なく、特に日本では成功例の報告も多くない。骨髄移植が自己免疫疾患の根治治療として浸透しない理由として、臨床例では MHC が適合するドナーを見付けることが困難であることや、骨髄移植という治療自体に侵襲性があること、GVHD などの副作用の発症する恐れがあるにも拘らず、骨髄移植による自己免疫性疾患の治療機序に不明な点が多いことなどが考えられる。我々は、骨髄移植の臨床上の問題点を解決する方法として「MHC 不完全一致ドナーの骨髄をホストの骨髄細胞を残存させた状態で共存させる骨髄混合キメリズム」の導入を考え、安定な混合キメラ導入のプロトコルを検討してきた。その過程において移入されたドナー骨髄より発生した正常 T 細胞がホストの B 細胞の中から自己反応性 B 細胞のみを特異的に刈り込んでいることを示す実験結果を得た。また、ヒト SLE のモデルとして用いた BXSB マウスには B 細胞活性化の閾値を下げる体内環境ができており、このマウスに正常 T 細胞との interaction を阻害した正常 B 細胞を導入すると抗核抗体を産生し始めることがわかった。この BXSB マウスの lupus prone の性質がどのような細胞の異常に起因するかを明らかにすることは、ヒト SLE の発症機序を理解するうえでも有用な知見になると考えられる。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究課題ではまず、骨髄移植が SLE の発症を抑制する機序をより明確にするため、遺伝子組み換えマウスと lupus prone BXSB/Yaa マウスとの骨髄キメラを作製し、遺伝子異常を持つ BXSB 側の B 細胞が残存していても T/B interaction によって異常な B 細胞を T 細胞が刈り込むことができれば SLE 症状は進行しないことを示す。

また、BXSB を host にすると、遺伝子異常を持たない正常マウス骨髄由来の B 細胞でも抗核抗体を産生するようになるため、BXSB では正常 B 細胞を自己反応性にするような因子を骨髄移植で置換できない細胞が産生していることが予想される。我々は、近年ヒトの SLE で疾患の消長との関連が指摘されているサイトカイン BAFF に注目し、リンパ球以外の host BAFF 産生細胞の特定を試みる。

3. 研究の方法

(1) BXSB/Yaa (H-2^b) を host にした骨髄混合キメラの誘導 : host には 7 週齢のオス BXSB を用い、骨髄移植前日に 4 Gy の放射線全身照射を行い、抗 CD40L 抗体 2mg (i.p.) とともに 2.0×10^7 cell のドナー骨髄細胞を静脈注射した。ドナーには RAG2^{-/-}・C57BL/6, TCR^{-/-}・C57BL/6, μ MT^{-/-}・C57BL/6 の 3 系統のノックアウトマウスを用いた。移植後 8 週目に FACS で骨髄混合キメラが生着したことを確認し、その後 4 週ごとに血清を採取した。50 週を経過したところで屠殺し、lupus 腎炎の病理学的評価を行った。

(2) 血清 BAFF と anti-dsDNA Ab の測定 : 生後 5 週齢から BXSB マウスの血清を 4 週ごとに採取し、BAFF と anti-dsDNA Ab を ELISA 法にて測定した。

(3) 濾胞樹状細胞の分離と TLR7, BAFF 発現の qRT-PCR による測定 : 前日に 10Gy 放射線をマウスに照射し、リンパ節から抗 FDC 1 抗体と magnetic beads を用いて濾胞樹状細胞を分離した。この細胞の mRNA を逆転写し TLR7 と BAFF の発現を qRT-PCR を用いて正常と BXSB で比較した。

(4) R848 刺激後の濾胞樹状細胞の BAFF 産生の変化 : TLR7 の特異的 Ligand である R848 を静脈より投与し、4~20 時間後の脾臓の濾胞樹状細胞が発現する膜型 BAFF の量に変化が見られるか、FACS にて解析した。

4. 研究成果

(1) BAFF (B cell activating factor) は、近年ヒトの SLE やシェーグレン症候群患者でその血清の値が上昇していることが明らかになってきており注目されているサイトカインである。まず、BXSB/Yaa マウスの血清 BAFF がどのように変化するか自然経過を把握するため、生後 4 週齢から 4 週おきに血清 BAFF の値を測定したところ、BXSB では生後 12 週齢頃から上昇し始め、BAFF の上昇と同時に抗 dsDNA 抗体価が上昇していくことがわかった。BXSB/Yaa マウスの抗核抗体産生に血清 BAFF が関わっている可能性が示唆された。

(2) BXSB には Yaa という mutation が存在し、X 染色体の Y 染色体への転座によりオスのマウスにおいて TLR7 遺伝子が重複し、主に B 細胞で TLR7 が 2 倍発現するため BCR からの signal 感受性が亢進して抗核抗体を作りやすくなるということが知られている。我々の今までの正常マウスを用いた骨髄移植実験の結果では、Yaa gene を持つ host の B 細胞が残存しても正常な T 細胞を移入すれば自己反応性 B 細胞が刈り込まれ SLE 症状が抑制されることが示唆されている。このことを明らかにするために RAG2^{-/-} (T, B cell を欠損)、TCR α ^{-/-} (T 細胞を欠損) μ MT^{-/-} (B 細胞を欠損) マウス (全て C57BL/6 : H-2^b) の骨髄を BXSB マウスに移植し、FACS で骨髄キメ

ラになったことを確認したうえで血清抗 DNA 抗体の推移と糸球体腎炎の評価を行った。RAG2^{-/-}と TCR^{-/-}を移植したマウスは血清の抗 dsDNA 抗体の上昇はおさえられることがなかった。また、 μ MT^{-/-}の骨髄を移植したマウスでは、lupus 腎炎の進行が見られなかったのに対し、RAG2^{-/-}と TCR^{-/-}の骨髄を移植したマウスでは lupus 腎炎の進行したマウスの数が多く、骨髄移植により T 細胞による B 細胞の制御を正常化することが SLE の発症を防いでいることが示唆される結果となった。

(3) 次に、我々は骨髄移植で置換できない細胞の中で BAFF を産生し、B 細胞を活性化の trigger となる細胞として濾胞樹状細胞 (FDC) に着目した。FDC は骨髄幹細胞から発生する細胞ではないと考えられており、BCR が認識しやすいように可溶性抗原を抗原抗体複合体の形で膜状に保持し B 細胞に提示してはいるものの、MHC を介した抗原提示はしないので MHC 完全ミスマッチの正常 B 細胞が移植された場合でも過剰に活性化できる可能性をもっている。近年の研究では FDC が BAFF を産生しているという報告もあり、SLE prone の体内環境を作り得る細胞の候補と考えられた。

そこで、BXS B と正常 C57BL/6 マウスよりリンパ節中の FDC を分離し、RT-PCR で TLR7, TLR9, MyD88 の発現を調べたところ、いずれも FDC での発現が確認され、BXS B では TLR9, MyD88 の発現は正常と同程度であるが、TLR7 の発現は正常の約 2~4 倍であることが明らかになった。これは、Yaa mutation の特徴である TLR7 の重複が B 細胞のみならず、FDC でも影響していることを示唆する所見である。

(4) FDC に TLR7 が過剰発現することが明らかになったため、FDC が TLR7 からの刺激により B 細胞の抗体産生を促すか *in vitro* で実験した。Anti-FDC1 Ab を用いて autoMACS により BXS B または正常 C57BL/6 より分離した FDC と naïve B 細胞を抗原抗体複合体 (OVA/rabbit anti-OVA 1:6) 存在下で 48 時間 co-culture し、培養上清中の BAFF と mouse anti-OVA IgM を ELISA 法で測定した。または、分離した FDC を TLR7 の Ligand である R848 で刺激し、培養上清中の BAFF を測定した。本方法は J.G.Tew らにより *J. Immunol* 誌上などに繰り返し publish されているが、今回我々が追試したところ再現性はなく、IgM, BAFF いずれも検出感度以下であった。原因として FDC を分離する際に用いる抗 FDC1 抗体が感知する FDC 上の抗原が放射線を照射しないと発現が低いため、放射線照射による FDC の viability の低下が回避できないためと考えられた。

そこで、放射線を照射しなくても FDC を検出できる新たな抗体、抗 FDC2 抗体を入手し FDC を分離せずに解析する実験系を立ち上げ

た。BXS B または C57BL/6 に TLR7 の Ligand である R848 を静脈注射し、投与後 4 時間と 20 時間後にマウスを屠殺して脾臓を採取、CD45-ICAM⁺ FDC2⁺ の細胞集団を FDC として、FDC に発現した細胞内 BAFF と膜型 BAFF を染色して FACS にて蛍光強度を測定して発現量を比較した。対照群には DMEM を静脈注射した。その結果、FDC の BAFF 産生は R848 投与の影響を受けて変化することが対照群との比較でわかった。しかしながら、FACS では分泌型の BAFF を検出できないため BXS B の FDC の方が C57BL/6 よりも R848 刺激に強く反応して大量の BAFF を産生しているという確証は得られなかった。BAFF はもともと TLR Ligand などの第一の刺激で多くは膜型として産生され、その後 γ -IFN などの第二の刺激で分泌型として放出されることが知られているが、BXS B のような SLE を自然発症するマウスでは BAFF 以外にも炎症性サイトカインの過剰な産生などが存在することは十分考えられ、C57BL/6 と膜型 BAFF を比較したときに、その状態が分泌される前なのか後なのかを同定することができない。この点を補うために R848 投与後の時間や投与量を変えて何度か実験を行ったが、使用できるマウスの個体数にも限りがあり、期間内にこの測定系だけで統計学的な有意差を得ることはできなかった。

また、仮に BXS B の FDC が TLR7 刺激により BAFF を過剰に産生するようになったとしても、FDC はもともと体内に存在する細胞数が少なく、(1) で示したように血清の BAFF の値を有意に上昇させるほど大量の BAFF を産生できるのかは疑問である。この点につき、BXS B の様々な細胞を分離して qRT-PCR を用いて BAFF の発現している細胞を探した結果、活性化 T 細胞と好中球で BAFF の mRNA の発現が高かった。その後、ELISA によっても好中球の BAFF の産生量が他の細胞よりも多いことが確認できた。SLE のような自己免疫性疾患における好中球の役割は長年考えられてこなかったが、近年 NETosis などの新たな好中球の機能が発見されたことで、好中球と SLE の進展との関わりは急速に注目されるようになった。今後はこのような自然免疫系の細胞と獲得免疫系の異常とがどのように影響しあうかを考慮しつつ、本課題で得られた研究結果を活かして発展させていく予定である。

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 5 件)

Okuno H, Satoh M, Takeuchi E,

Eshima K, Terashima M, Komotori

J, Habu S, Tamauchi H, Iwabuchi

K. Inhibitory function of NKT cells during early induction phase of nickel allergy. *Immunobiology* 221:833-838 (2016) DOI

10.1016/j.imbio.2016.01.012 査読有

田村昌也、竹内恵美子. 主要組織適合抗原不一致ドナーからの臍帯血移植による慢性肉芽腫症モデルマウスの治療
北里医学 45(1):53-56(2015)

URL:<http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/> 査読有

Takeuchi Y, Takeuchi E, Kamata K. A possible clue for the production of anti-glomerular basement membrane antibody associated with ureterial obstruction and hydronephritis. *Case Reports in Nephrology and Dialysis* 5:87-95(2015) DOI:

10.1159/issn.2296-9705 査読有

Takeuchi Y, Takeuchi E, Ishida T, Onodera M, Nakauchi H, Ohtsu M. Curative haploidentical BMT in a murine model of X-linked chronic granulomatous disease. *Int J Hematol* 102(1):111-120(2015) DOI

10.1007/s12185-015-1799-8. 査読有

Takeuchi E, Iizuka M, Tamura M, Takeuchi Y. Convenient Evaluation of Magnitude of Glomerulonephritis in BXSB/Mp Lupus Mice. *J Clin Cell Immunol* 5:209 (2014)

Doi:10.4172/2155-9899.1000209

ISSN:2155-9899 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

竹内恵美子、竹内康雄. 慢性肉芽腫症モデルマウスにおいてアリストロキア酸誘導性尿細管壊死性腎炎が増悪するメカニズムの解析. 第 43 回 臨床免疫学会. 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市) Oct.22-24,2015

竹内恵美子、岩淵和也、東原正明、竹内康雄. MHC不一致ドナーからの臍帯血移植による慢性肉芽腫症モデルマウスの治療 第16回 神奈川血液・免疫フォーラム 横浜ベイシェラトン (神奈川県横浜市) Nov.21.2014

Takeuchi E and Takeuchi Y. Stable supply of functional reconstituted neutrophils achieved by transplantation of allogeneic umbilical cord blood induced remission of inflammatory state in X-CGD mice. 18th European society of gene and cell therapy. Hague, Netherland. Oct 23-26, 2014

竹内恵美子、田村昌也、竹内康雄. MHC不一致ドナーからの臍帯血移植による慢性肉芽腫症モデルマウスの治療. 第42回 日本臨床免疫学会. 京王プラザホテル (東京都新宿区) Sep. 25-27, 2014

Okuno H, Satoh M, Takeuchi E, Eshima K, Tamauchi H, Iwabuchi K. The role of immunocompetent cells in the development of nickel-induced allergic contact dermatitis. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 11-13 2013, Makuhari, Japan.

Satoh M, Eshima K, Takeuchi E, Iwabuchi K. Characterization of non-invariant NKT cells in visceral adipose tissue. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 11-13 2013, Makuhari, Japan.

Takeuchi Y, Takeuchi E, Otsu M: Development of experimental animal model to assess of cause for disappearance of gene-corrected granulocytes as a clinical problem of human gene therapy of X-CGD.

European Academy of Allergy and Clinical Immunology, June 22-26 2013, Milan, Italy.

Takeuchi Y, Takeuchi E, Otsu. Development of gene therapy model for disappearance of gene-corrected granulocytes by immunological deletion associated with antigenicity of newly expressed GP91phox protein in X-CGD. Controversies in Rheumatology and Autoimmunity, April. 4-6 2013 Budapest, Hungary.

Takeuchi E, Takeuchi Y, Shinohara N, Iwabuchi K. Dysfunction of selective suppression of auto-antibody production in SLE mice and reconstruction of this mechanism by induction of bone-marrow chimerism.

Kobe, Hyogo, Japan, Dec 5-7,2012

竹内恵美子、竹内康雄、岩淵和也. 骨髄移植の自己免疫疾患への応用 ~ TCR/MHC interactionを介した自己反応性B細胞の監視 ~ . 第14回 神奈川血液・免疫フォーラム センチュリー相模大野 (神奈川県、相模原市) Nov. 2 2012

竹内恵美子、竹内康雄、江島耕二、篠原信賢、岩淵和也. TCR/MHC interactionを介したT細胞による自己反応性B細胞の監視.

第21回Kyoto T cell Conference, 和順会館(京都府、京都市) July 6-7 2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 恵美子 (TAKEUCHI, Emiko)
北里大学・医学部・講師
研究者番号 : 0 0 4 0 6 9 3 5

(2)研究分担者

岩淵 和也 (IWABUCHI, Kazuya)
北里大学・医学部・教授
研究者番号 : 2 0 1 8 4 8 9 8

(3)研究協力者

竹内 康雄 (TAKEUCHI, Yasuo)
北里大学・医学部・教授
研究者番号 : 6 0 2 8 6 3 5 9