

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461710

研究課題名(和文)天疱瘡における自己反応性B細胞の活性化機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of the activation mechanism of autoreactive B cells in pemphigus

研究代表者

山上 淳(Yamagami, Jun)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80327618

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)：天疱瘡は、表皮角化細胞同士の接着分子であるデスモグレイン(Dsg)に対する自己抗体により生じる。本研究では、天疱瘡患者の末梢血中から、自己抗体産生に関わるB細胞の活性化および分化において重要な役割を果たす濾胞ヘルパーT細胞(Tfh)の検出を試みた。未治療の天疱瘡患者11例の末梢血単核球からCD3およびCD4陽性の細胞集団を展開して、CXCR5およびICOSを高発現している細胞をTfh様細胞として観察した。天疱瘡患者の末梢血単核球では、Tfh様細胞は健常人に比べて有意に高かった。また病勢が制御された後は、末梢血中のTfh様細胞の割合が有意に減少していた。

研究成果の概要(英文)：Pemphigus is an autoimmune disease caused by IgG autoantibodies against desmogleins (Dsgs). The mechanism of production of anti-Dsg autoantibodies in pemphigus has not been elucidated. In this study, we aimed to establish follicular helper CD4 T cells (Tfhs) that are considered as specialized providers of B cell help in the peripheral blood in pemphigus. We detected Tfh-like cells with high expression levels of CXCR5, PD-1 and ICOS (CD278) on the cell surface in the population of double positive for CD3 and CD4 using peripheral blood monocytes (PBMCs) from 11 patients with pemphigus. The percentage of peripheral Tfh-like cells in CD4+ PBMCs in pemphigus patients without treatment were significantly higher than those in PBMCs from healthy controls. After treatment, the ratio of Tfh-like cells decreased by more than 50% in 10 out of 11 cases with pemphigus, suggesting that the numbers of Tfh-like cells may reflect the disease activities.

研究分野：皮膚科

キーワード：天疱瘡 自己免疫疾患 自己抗体 濾胞ヘルパーT細胞 自己反応性B細胞

1. 研究開始当初の背景

天疱瘡は、皮膚の角化細胞同士の接着分子であるデスマogleイン (desmoglein; Dsg) に対する自己抗体により、皮膚および粘膜に水疱を生じる自己免疫疾患である。標的抗原である Dsg の遺伝子がクローニングされて以来、ELISA 法の開発やエピトープ解析など、患者血清中の自己抗体を用いた天疱瘡の病態解明が進められてきた。しかし、天疱瘡患者において自己抗体が産生される機構については、未だに明らかになっていない。申請者は、天疱瘡における Dsg 特異的 B 細胞の研究に従事してきたが (Yamagami et al. *J Immunol* 2009, Yamagami et al. *J Clin Invest* 2010)、特定の B 細胞の解析をめざそうとすると、なぜ患者の体内で自己抗体が産生されるのかという疑問に直面し、より上流のイベントにあたる Dsg 特異的 B 細胞が活性化される機構を解明したいと考えた。

近年、抗体産生における B 細胞の活性化機構が明らかにされてきた。二次リンパ組織は、T 細胞領域とその外側の B 細胞領域 (濾胞) から構成されており、抗原刺激を受けた成熟 B 細胞は、樹状細胞からの抗原提示によって活性化されて CXCR5 を発現した濾胞ヘルパー T 細胞 (follicular helper T cells; Tfh) と T/B 細胞の境界領域において反応する。Tfh の作用を受けた活性化 B 細胞は、Bcl-6 を強発現して胚中心 B 細胞へと分化し、可変領域に体細胞超突然変異 (somatic hypermutation) を導入することで抗体に新たな多様性を誘導する。この際に、抗原に対する親和性がより強くなった抗体産生クローンの選択、定常領域の IgM から IgG へのクラススイッチが起こる。さらに胚中心に移動してきた Tfh が産生する IL-4 や IL-21 などに誘導されて、胚中心 B 細胞は形質細胞に分化して効率的に抗体を産生するとともに、免疫記憶 B 細胞や長期生存形質細胞に分化して、生体内のリンパ組織や骨髄で長期間にわたり生存する (Nutt et al. *Nat Immunol* 2011)。

このように、胚中心の形成は抗体反応の活性化と成熟に大きな貢献を果たしており、Tfh を介した B 細胞の分化異常が自己免疫疾患の原因になると考えられている。天疱瘡においても自己抗体産生に B 細胞と Tfh との相互作用が関与していると予測されるが、以上の反応はリンパ組織で起きているため患者検体を使った観察が困難である。これに対して、末梢血のリンパ球は比較的容易に解析することができ、SLE などの自己免疫疾患において血中自己抗体の上昇に呼応して、末梢血中に CXCR5 を高発現する T 細胞の増殖が観察されるなど、末梢血中で Tfh のように B 細胞に作用できる Tfh 様細胞の研究は散見されるようになってきた (Morita et al. *Immunity* 2011, Simpson et al. *Arthritis Rheum* 2010)。末梢血中の CXCR5 高発現 T 細胞とリンパ組織の濾胞における Tfh との関係は、依然として明らかではないが、末梢血中の記憶ヘルパ

ー T 細胞が B 細胞反応を促進するという知見は、自己免疫疾患において末梢血中から Tfh の役割を果たす T 細胞 (前駆細胞や分化途中の細胞の可能性もある) が単離できる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、天疱瘡患者の末梢血 T 細胞の中から Tfh の表面マーカーを持ったものを選別し、Dsg 特異的 B 細胞との相互作用を観察することで、末梢血中の T/B 細胞の相互作用が自己抗体産生にどのような役割を果たすか、その詳細を検討することが目的である。

また、ヒト試料を用いた研究を進めると同時に、当研究室で開発された天疱瘡モデルマウスにおいて、自己反応性 B 細胞と Tfh の関係を解析することも計画した (Amagai et al. *J Clin Invest* 2000)。このモデルマウスは Dsg3 欠損マウスを rDsg3 で免疫し、その脾細胞を免疫不全マウス (Rag2 欠損マウス) に移入することで作成される。純粋な自己免疫発症モデルとして扱うことに関しては注意が必要だが、これまでの Tfh の研究においても B 細胞の標的抗原が皮膚に存在し続けるマウスの系は報告がなく、新しい知見を発見できる可能性を検討した。

3. 研究の方法

天疱瘡患者末梢血単核球から、Tfh の表面マーカーを持つ細胞 (以下、Tfh 様細胞) を単離する。フローサイトメトリーで CD4 陽性細胞集団を展開して、CXCR5 および PD-1 を高発現している細胞を Tfh 様細胞として単離する。ただし ICOS や他の表面マーカーを用いる方法も考えられるので、至適条件の検討を行った。同様に、申請者らが以前に行った方法で、天疱瘡患者末梢血から Dsg 特異的 B 細胞の単離を試みた (Yamagami et al. *J Dermatol Sci* 2008)。末梢血 Tfh 様細胞と Dsg 特異的 B 細胞を反応させ、組み換え Dsg を撒布したプレート上の ELISPOT で Dsg 特異的 B 細胞の抗体産生が増強するか観察した。Tfh 様細胞と Tfh の表面マーカーを持たない末梢血 CD4 陽性 T 細胞群との比較、また Dsg 特異的 B 細胞と末梢血単核球中の全 B 細胞、および全単核球との比較をそれぞれ行うことで、B 細胞の活性化・分化・抗体産生における Tfh 様細胞の作用を検討することを試みた。

また、B 細胞の活性化に必要なサイトカインとして、IL-4、IL-21 などが報告されているので、この評価系で Dsg 特異的 B 細胞が活性化された場合の、Bcl-6、ICOS、SAP などの転写制御因子および Th1、Th2、Th17 それぞれの系のヘルパー T 細胞に関連するサイトカイン、ケモカインの発現について RT-PCR で評価した。また、T/B 相互作用に重要な分子を予測し、その中和抗体存在下で B 細胞の活性化がどのように変化するかを検討を立案した。T/B 相互作用時に Th バランスがどのよ

うに影響を及ぼすかを検討するため、Th1、Th2、Th17 への分化を誘導するサイトカインを加え、B 細胞の活性化を評価した。

B 細胞との相互作用を起こす Tfh 様細胞の機能に重要な分子を検討するため、Tfh の分化に必要とされる Bcl-6 に加え、これまでの研究から発現が増強していることが予想される ICOS、SAP、IL-21 などの結果を検討した。さらに Dsg 刺激を加えた Tfh 様細胞について、ELISPOT でサイトカイン産生についての検討を行った。

Tfh 様細胞により活性化される B 細胞の特徴を検討するため、末梢血リンパ球をあらかじめ CD23 など活性化 B 細胞の表面マーカーとして知られる抗体で標識しておき、Tfh と反応する B 細胞の集団をフローサイトメトリーで展開して、亜集団として標識できる表面マーカーについて検討した。また活性化した B 細胞の mRNA を抽出して VH 遺伝子と塩基配列を解析することで特徴を調べ、活性化された B 細胞のバイオマーカーを検討した。

同一の天疱瘡患者において、病勢の強い活動期と病変の新生がない寛解期で、Dsg 特異的 B 細胞と Tfh 様細胞との相互作用を比較した。当研究室で以前行われた研究では (Nishifuji et al. J Invest Dermatol 2000)、寛解期患者の末梢血中からは活性化された Dsg 特異的 B 細胞は検出されなかったが、Tfh 様細胞についても病勢に応じて検出頻度に変化が見られるかを観察した。治療により病勢が低下した患者においても、Tfh 様細胞が検出される場合には、B 細胞に対する相互作用の強弱、Bcl-6、ICOS、SAP、IL-21 といった分子の発現について各病期を比較する研究計画を立てた。この実験を通じて、病勢に応じて患者末梢血中の B 細胞あるいは T 細胞の表現マーカーやその割合の変化を観察し、天疱瘡の病勢を評価する新たな手がかりとして、臨床的に応用できる可能性について検討した。

本研究は、患者由来のヒト検体を材料とすることにより、今までの抗原特異的 B 細胞および Tfh の研究に対して大きな優位性を持つため、できるだけ患者由来のリンパ球を用いることを検討した。しかし、末梢血中の Dsg 特異的 B 細胞および Tfh の表面マーカーを持つ T 細胞の頻度など不確定の要素も含まれるため、予定どおりに計画が進行しない可能性もあるため、天疱瘡モデルマウスを用いた Dsg3 特異的 B 細胞と Tfh の相互作用の検討を並行して進めた。天疱瘡モデルマウスは、Dsg3 欠損マウスを組換え Dsg3 で免疫し、その脾細胞を免疫不全マウス (Rag2 欠損マウス) に移入することで作成した。患者検体を用いる系と異なり、末梢血のみならず脾臓、骨髄、リンパ節、皮膚、粘膜など、多くの組織を解析できるので、各臓器、部位ごとに活性化 B 細胞および Tfh の局在を検討することが可能、リンパ濾胞で活動している Tfh を解析することが可能、といった利点がある

と考えられた。

通常、外来の標的抗原に特異的な B 細胞は、その抗原の侵入経路のリンパ節と脾臓に最も多く存在すると考えられる。この天疱瘡モデルマウスにおいても、Dsg3 に対する抗体を産生する B 細胞は主にリンパ節と脾臓に長期にわたって存在することが確認されているが、頻度は少ないながらも末梢血、骨髄からも Dsg3 特異的 B 細胞が検出される (Amagai et al, J Clin Invest 2000)。それぞれの組織から B 細胞を抽出し、マウス Dsg3 の組み換え蛋白と反応させ、患者末梢血検体と同様にフローサイトメトリーを用いて Dsg3 特異的 B 細胞の単離を試みた。

天疱瘡モデルマウスの脾臓、リンパ節、骨髄、末梢血から、CXCR5 および PD-1 を強発現した T 細胞の単離を試みた。ただし、ICOS、BTLA、CD200、SAP といった分子も Tfh で発現が増強しており、患者末梢血とは異なる至適条件を検討する必要性が生じる可能性もあわせて検討した。

それぞれの組織から単離された Dsg3 特異的 B 細胞と Tfh を反応させて、ELISPOT で B 細胞の Dsg3 に対する抗体産生を評価するとともに、IL-21 をはじめ各種サイトカインの発現を検討した。T/B 相互作用が起こる主要な部位についても重要な観察事項と考えられた。また、Dsg3 欠損マウスの脾細胞の移入から、複数の時点における Dsg3 特異的 B 細胞と Tfh との相互作用について検討した。CD27 などの免疫記憶 B 細胞の表面マーカーを用いて、胚中心 B 細胞からの分化についての評価も試みた。

4. 研究成果

まず未治療の尋常性天疱瘡および落葉状天疱瘡患者 11 名の末梢血から単核球を抽出し、フローサイトメトリーで CD3 および CD4 陽性の細胞集団を展開して、Tfh のマーカーとして知られる CXCR5 および ICOS を高発現している細胞を Tfh 様細胞として観察した (図 1)。

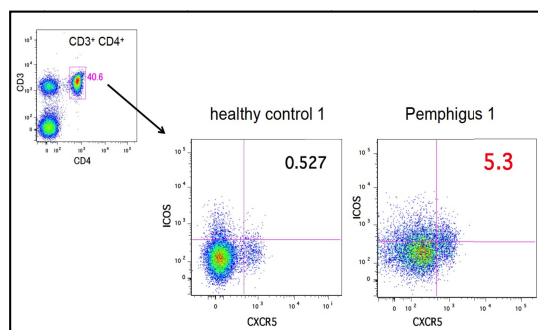


図 1 天疱瘡患者末梢血から Tfh 様細胞は CXCR5 および ICOS 陽性細胞として検出された。

天疱瘡患者の末梢血単核球では、Tfh様細胞はCD3およびCD4陽性細胞の0.65～5.3%（平均2.28%）を占め、健常人（n=3）での0.29～1.36%（平均0.73%）に比べて有意に高かった（ $p<0.01$, 図2）。

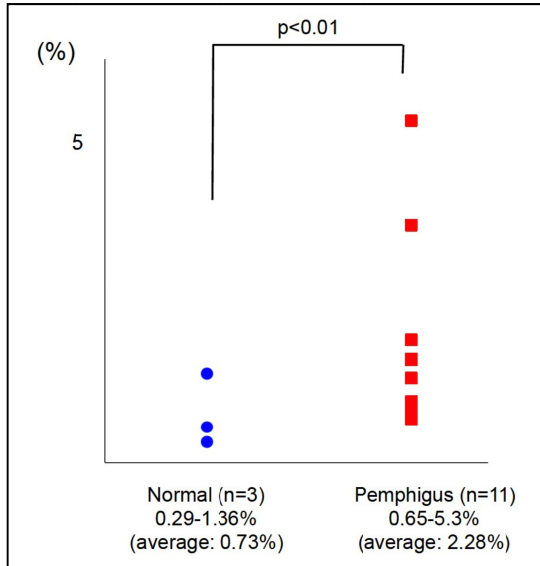


図2 天疱瘡患者末梢血中のTfh様細胞の頻度は健常人に比較して有意に高かった。

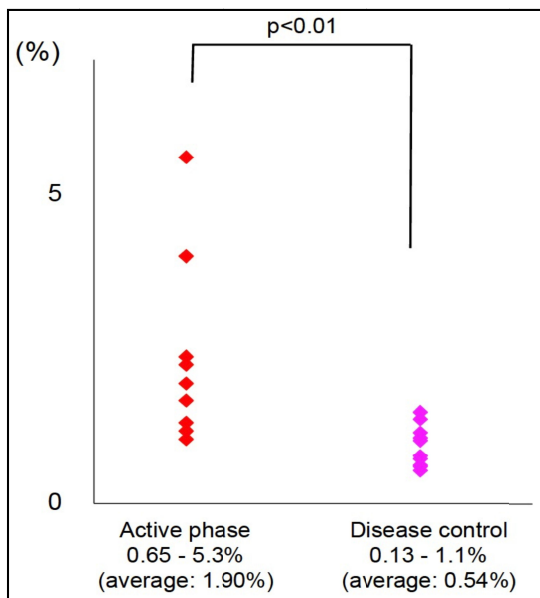


図3 治療後の天疱瘡患者末梢血中のTfh様細胞の頻度は、治療前に比較して有意に低下していた。

また治療前後の経過が観察できた10例において、治療により血清中の抗Dsg抗体が減少して病勢が制御された後は、0.13～1.1%（平

均0.54%）と末梢血中のTfh様細胞の割合が有意に減少していた（ $p<0.01$, 図3）。

Dsg3欠損マウスを組み換えDsg3で免疫し、その脾細胞を免疫不全マウス（Rag2欠損マウス）に移入することで作成される天疱瘡モデルマウスを用いて、CXCR5およびICOS陽性のTfhの単離を試みた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Saleh MA, Hashimoto R, Kase Y, Amagai M, Yamagami J. Low pathogenicity of anti-desmoglein 3 immunoglobulin G autoantibodies contributes to the atypical clinical phenotypes in pemphigus. *J Dermatol.* 42: 685-689, 2015. 査読あり
doi: 10.1111/1346-8138.12888

〔学会発表〕(計 1 件)

Yamagami J, Kamata A, Amagai M. Characterization of the population like follicular helper T cells in the peripheral blood in patients with pemphigus.

The 40th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology.

2015年12月11日～13日

岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山上 淳 (YAMAGAMI JUN)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：80327618

(2)研究分担者

高橋 勇人 (TAKAHASHI HAYATO)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：40398615

(3)連携研究者

天谷 雅行 (AMAGAI MASAYUKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90212563