

全身性強皮症におけるサイトカイン産生 B 細胞の機能解析ならびに新規治療法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-03-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Matsushita, Takashi メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00050410

【総説】

第14回 金沢大学十全医学賞受賞論文

論文 全身性強皮症におけるサイトカイン産生 B 細胞の機能解析ならびに新規治療法の開発

The roles of cytokine producing B cells in Systemic Sclerosis: Developing a new treatment strategy against cytokine producing B cell

松下 貴史 (まつした たかし)

はじめに

全身性強皮症 (強皮症) は, 抗トポイソメラーゼ I 抗体や抗セントロメア抗体などの自己抗体産生, 高γグロブリン血症に代表される自己免疫現象を背景に, 皮膚および内臓諸臓器の線維化, 血管病変によって特徴づけられる膠原病である. 本邦における患者数は約3万人と報告されており, 指定難病となっている. 強皮症は皮膚硬化の範囲により Limited cutaneous type と Diffuse cutaneous type に大きく分類される. 前者は抗セントロメア抗体が陽性となることが多く, 皮膚硬化は軽症であるが晩期に肺高血圧症を発症することがあるので留意を要する. 後者は抗トポイソメラーゼ I 抗体が陽性となることが多く, 皮膚硬化の範囲が広く間質性肺疾患など内臓病変を高率に生じ, 10年生存率は60-70%と予後不良である. 他の膠原病においては生物学的製剤の登場により治療法にパラダイムシフトが起きているが, 強皮症に対する有効な治療法は未だ確立されておらず, その開発が望まれる. この強皮症の病態形成には自己抗体産生などにより B 細胞が強く関与していることが知られている. B 細胞はこれまで主に抗体産生細胞としての側面から研究が進められてきたが, 近年, サイトカイン産生細胞としての機能が注目されている. 本稿では, 強皮症における B 細胞 (特にサイトカイン産生 B 細胞) の関与ならびに治療標的としての B 細胞の可能性について概説する.

1. B 細胞の多彩な作用

B 細胞の主な役割は液性免疫とよばれる抗体産生による細胞外微生物と微生物毒素を中和・除去し宿主を防御する機能である. T 細胞は非タンパク質抗原に対して免疫応答ができないため, 非タンパク質抗原である多糖類と脂質の豊富な莢膜をもつ微生物に対する免疫応答は B 細胞の液性免疫が担うことになる. B 細胞は Naïve B 細胞から Memory B 細胞まで表面に抗体をレセプターとして表出するものの抗体分泌能を持たず, Plasma 細胞に最終分化することにより抗体分泌細胞へと変化する. また, 抗体の種類も IgM から IgG, IgA, IgE へとクラススイッチし, 液性免疫の機能的能力を拡大する. 一方, 液性免疫が負の側面をもつ場合もある. 強皮症などの自己免

疫性疾患で検出される自己抗体は自己抗原を認識する B 細胞 (自己反応性 B 細胞) により産生されるが, この自己反応性 B 細胞は通常アポトーシスにより除去され, 自己抗体は産生されないように制御されている (ネガティブセレクション). しかしながら, B 細胞の強力な活性化・生存因子である BAFF が過剰に存在すると, 本来アポトーシスでネガティブセレクションされるはずの自己反応性 B 細胞が生存し, 自己抗体産生を来してしまう. このように B 細胞は液性免疫機能がこれまで主に解析対象となってきた. しかしながら B 細胞は抗体産生のみならず, T 細胞への抗原提示, 樹状細胞の制御, サイトカイン産生を介して重要な働きをしていることが明らかになってきた (図1). 特にサイトカイン産生 B 細胞の機能は重要であり, これまで B 細胞がサイトカインを産生することがあまり知られていなかったが, 近年の研究により B 細胞が種々のサイトカインを産生することが明らかとなってきた (図1). さらに B 細胞は均一な細胞集団ではなく, Effector B 細胞と Regulatory B 細胞の2つに大別される. Effector B 細胞は IL-6 や TNF- α などの産生により免疫反応や炎症を促進する作用がある. 一方, Regulatory B 細胞は, IL-10 の産生により過剰な免疫反応や炎症を抑制する. これら相反する作用を有する Regulatory B 細胞と Effector B 細胞のバランスが免疫反応において非常に重要である.

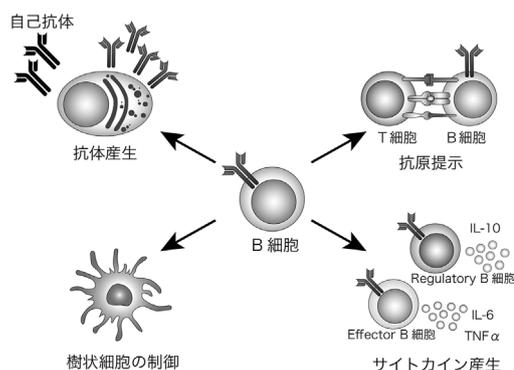


図1. B細胞の多彩な作用

B細胞は抗体産生のみならず, T細胞への抗原提示, 樹状細胞の制御, サイトカイン産生を介して重要な働きをしている.

2. 強皮症におけるB細胞の促進的役割について

強皮症患者ではB細胞上のCD19の発現量が健常人と比較して約20%増加していることが報告されている。また、強皮症患者ではCD19のプロモーター領域の多型性が明らかとなっており、多型を有する強皮症患者ではCD19の発現量が増加していた。さらに強皮症患者ではB細胞の活性化や分化の異常が示されている。すなわち、強皮症患者ではMemory B細胞が慢性的に異常な活性化を示し、アポトーシスに陥りやすく、減少している。また、Memory B細胞の減少に対するフィードバック機構によってNaïve B細胞が増加している。このように、SSc患者ではB細胞の内在性異常が存在する。また著者らはB細胞の強力な活性化・生存因子であるBAFFが強皮症患者血清中において上昇しており、皮膚硬化と正の相関を認めることを明らかとしている(図2)¹⁾。さらに血清BAFF濃度の経時的解析では、皮膚硬化の改善とともにBAFF濃度の低下を認め、経過中にBAFF濃度が上昇する例では臓器病変の新たな出現や増悪を認めていることより(図2)、血清BAFF濃度は強皮症において活動性を反映するマーカーとなりうる。

さらに強皮症のマウスモデルであるTskマウスにおいてもB細胞の異常活性化がみられ、強皮症患者と同様に高γグロブリン血症、抗トポイソメラーゼI抗体産生が見られる。また、Tskマウスでは、CD19のチロシン酸化が亢進しており、B細胞が慢性的に活性化していること、CD19の発現をなくすとB細胞からのIL-6などの産生が減少することにより皮膚硬化が軽減することが示されている。著者らはTskマウスにおいてBAFFの血清中での上昇を確認している²⁾。さらに、BAFFのアンタゴニスト

であるBAFF-R-Igを投与したところ、B細胞の減少とともに皮膚硬化の改善が見られ、高γグロブリン血症および自己抗体の産生が抑制された。

IL-6は免疫・炎症反応において重要な役割を果たすサイトカインで、自己免疫疾患においてはIL-6産生Effector B細胞の重要性が近年注目されている。著者らは強皮症では血清IL-6濃度の上昇及び病勢との相関がみられること、³⁾強皮症モデルマウスにおいても血清IL-6濃度の上昇がみられ、抗IL-6受容体抗体の投与により皮膚硬化の改善がみられることを明らかとしている(図3)⁴⁾。現在、強皮症治療における抗IL-6受容体抗体(アクテムラ[®])の有効性に関するPhase IIIの臨床試験が行われている。さらに、B細胞特異的IL-6欠損マウスを作成しプレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを誘導したところ、コントロール群と比べ優位に皮膚および肺の線維化が抑制されることが明らかとなった。以上より、我々の研究によりB細胞、特にIL-6産生Effector B細胞が強皮症の病態において促進的な役割を有することが明らかとなった。

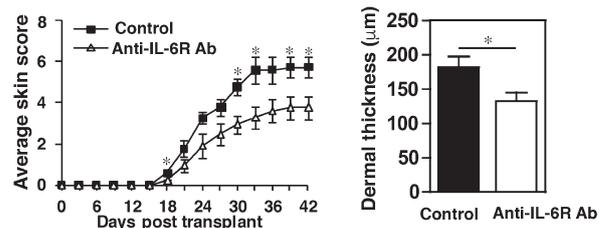


図3. 強皮症モデルにおける抗IL-6R抗体の効果 (左図) 皮膚硬化型慢性GVHDマウスに抗IL-6R抗体とコントロール抗体を投与しskin scoreを評価した。(右図) 皮膚硬化型慢性GVHDマウスの真皮の厚さを評価した。*p<0.05。(文献4より引用改変)

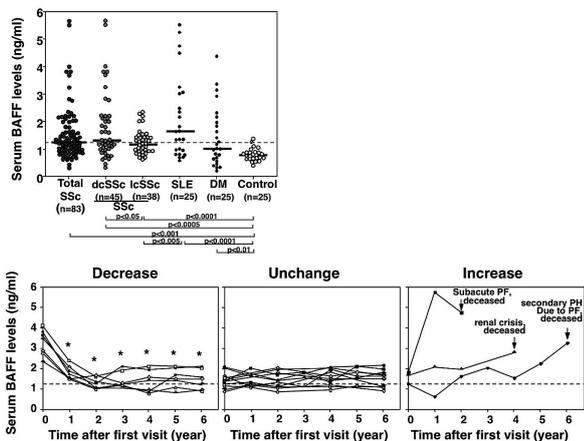


図2. 強皮症における血清BAFF濃度 (上段) 強皮症患者血清中のBAFF濃度をELISAで測定した。(下段) 左:血清BAFF濃度低下群, 中:血清BAFF濃度不変群, 右:血清BAFF濃度上昇群。 dcSSc=diffuse cutaneous systemic sclerosis, lcSSc=limited cutaneous systemic sclerosis, SLE=systemic lupus erythematosus, DM=dermatomyositis, PF=pulmonary fibrosis, PH=pulmonary hypertension。(文献1より引用改変)

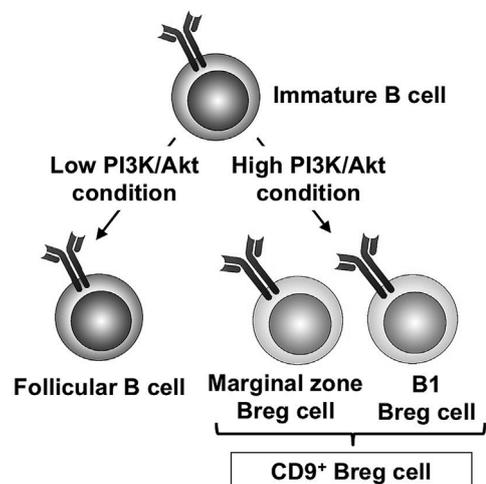


図4. PI3K-Akt シグナルとRegulatory B細胞 マウスRegulatory B(Breg)細胞の分化にはPI3K-Aktシグナルが重要である。CD9+はMarginal zone Breg細胞, B1 Breg細胞を包括するマーカーである。

3. Regulatory B細胞について

近年B細胞のなかに免疫反応を抑制するサブセットが存在することが明らかとなり, Regulatory B細胞として知られるようになった^{1),5),6)}. このRegulatory B細胞はIL-10の産生を介してT細胞や抗原提示細胞の活性化を抑制する働きがある. これまでマウスにおけるIL-10産生Regulatory B細胞のサブセットの報告については複数存在したが, 著者らはマイクロアレイ解析を用いRegulatory B細胞がMarginal zone B細胞およびB1 B細胞のサブセットに存在しCD9⁺ B細胞のフェノタイプを有していることを明らかとした(図4)⁷⁾. またRegulatory B細胞への分化にはPI3K-Aktシグナルが重要であることも明らかとなった. さらに, 著者らはヒトにおけるRegulatory B細胞の測定方法およびフェノタイプの解析を行いCD24^{high}CD27⁺ B細胞(主にMemory B細胞)のフェノタイプを有していることを明らかとした(図5)⁸⁾.

Regulatory B細胞の抑制機序についてはCD4⁺ T細胞のサイトカイン産生能(IFN- γ , TNF- α)や樹状細胞の抗原提示能を抑制することが報告されている⁹⁾. IL-10受容体の発現を調べるとCD4⁺ T細胞よりも, 樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞により強く発現していることより, Regulatory B細胞は抗原提示細胞により強く作用すると考えられる⁹⁾. さらにRegulatory B細胞はRegulatory T細胞を増加させ炎症・免疫反応を抑制する⁷⁾. ヒト自己免疫疾患でのRegulatory B細胞の解析も多数報告されてきている. 全身性エリテマトーデス, 関節リウマチ, 多発性硬化症, 自己免疫性水疱症などの患者末梢血中のRegulatory B細胞の測定が行われ, 各報告により違いはあるものの概ねRegulatory B細胞の減少ならびに機能低下が示されている^{8),10)}. またRegulatory B細胞の機能低下が免疫疾患の発症に関与する可能性や, Regulatory B細胞の減少が疾患活動性と逆相関していることより

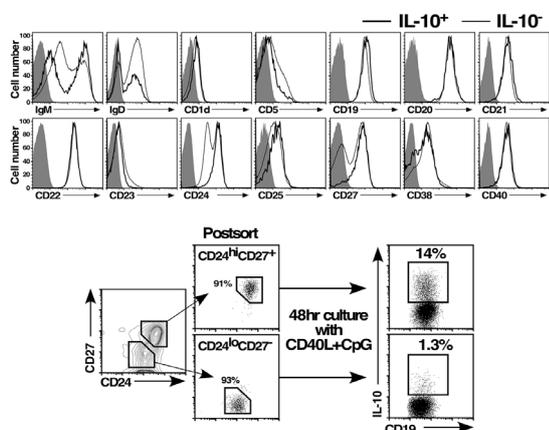


図5. ヒトRegulatory B細胞

ヒトRegulatory B細胞はCD24^{high}CD27⁺ B細胞サブセットに存在する. (上図) IL-10⁺ B細胞とIL-10⁻ B細胞の細胞表面マーカーを比較した. (下図) CD24^{high}CD27⁺ B細胞とCD24^{low}CD27⁻ B細胞をそれぞれソーティングしIL-10を測定した. (文献8より引用改変)

Regulatory B細胞が病勢を抑制する上で重要な役割を有している可能性が示唆されている¹⁰⁾.

4. 強皮症におけるRegulatory B細胞の役割について

これまで強皮症の病態におけるB細胞の役割は, 自己抗体産生やIL-6産生Effector B細胞による促進的作用が主であると考えられてきた. 申請者らはRegulatory B細胞を遺伝的に欠くCD19欠損マウスを使用し, 強皮症のマウスモデルである皮膚硬化型慢性GVHDを誘導したところCD19欠損マウスでは野生型マウスと比べより重症の皮膚硬化型慢性GVHDを発症することを明らかとした¹¹⁾. さらに, CD19欠損マウスにRegulatory B細胞を補充したところ, 皮膚硬化型慢性GVHDの改善効果が認められた(図6). 以上より, Regulatory B細胞がSScの病態に抑制的に働くことが明らかとなった. さらに, 全身性強皮症患者の末梢血中のRegulatory B細胞を測定すると, 強皮症患者では平均6%と健常人の11%と比べ有意に減少していた. さらに, 免疫抑制剤で治療を受けた強皮症患者6人の治療前後でのIL-10産生Regulatory B細胞の変化を検討すると, 治療により, modified Rodnan total skin thickness scoreが有意に低下するとともに, IL-10産生Regulatory B細胞が治療後に有意に上昇した(図7). これらよりIL-10産生Regulatory B細胞は強皮症の疾患活動性と負の相関があることが示された. 以上より強皮症マウスモデルならびに強皮症患者の解析よりIL-10産生Regulatory B細胞が強皮症の病態において抑制的な役割を有していることが示された.

5. Effector B細胞とRegulatory B細胞

自己免疫疾患におけるB細胞の重要性は, 関節リウマチ患者においてリツキサン[®](抗CD20抗体)によるB細胞除去療法が予想以上の治療効果を挙げたことから, 全世界で脚光を浴びるようになった. その後, 自己免疫疾患に対するB細胞除去療法の適応疾患は急速に拡大さ

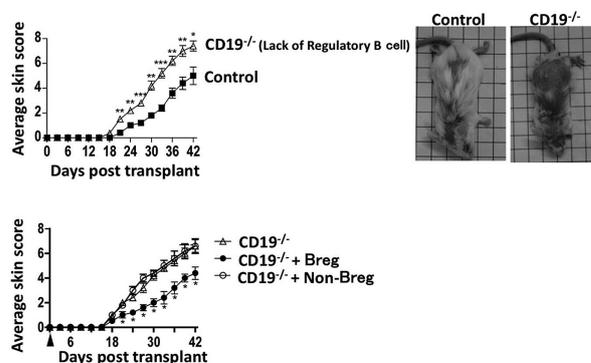


図6. 強皮症モデルにおけるRegulatory B細胞の役割

Regulatory B細胞は皮膚硬化型慢性GVHDマウスの線維化を抑制する. (上図) 野生型マウスとCD19^{-/-}マウスに皮膚硬化型慢性GVHDを誘導し, skin scoreを評価した. (下図) CD19^{-/-}マウスにRegulatory B細胞ないしはNon-Regulatory B細胞を移入し皮膚硬化型慢性GVHDを誘導しskin scoreを評価した. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. (文献11より引用改変)

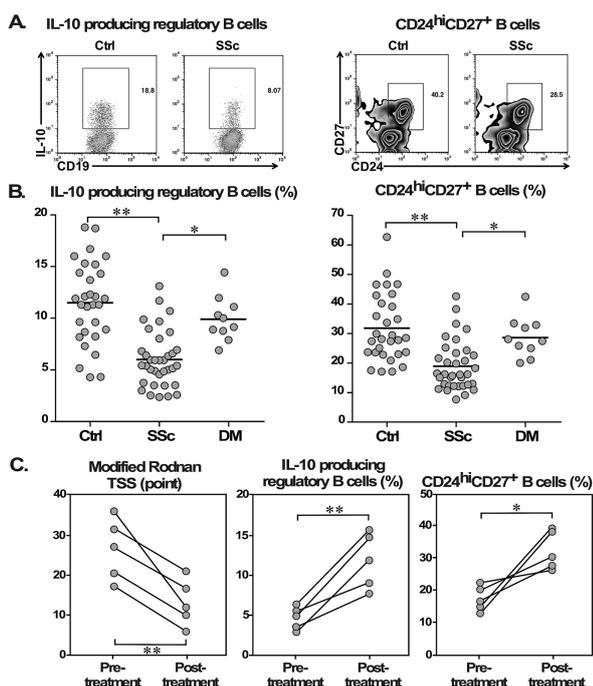


図7. 強皮症におけるRegulatory B細胞
Regulatory B細胞は強皮症患者で減少している。(A, B) 強皮症患者末梢血中のIL-10産生B細胞, CD24^{high}CD27⁺B細胞を測定した。(C) 治療前後のTotal skin score (TSS), IL-10産生B細胞, CD24^{high}CD27⁺B細胞を測定した。*p<0.05, **p<0.01. SSc= systemic sclerosis, DM=dermatomyositis. (文献10より引用改変)

れ, 全身性エリテマトーデス, 多発性硬化症, 皮膚筋炎, 天疱瘡, ANCA関連血管炎, 特発性血小板減少性紫斑病など枚挙に暇がない。さらに近年, 全身性強皮症に対するB細胞除去療法が複数報告され, 治療効果が認められたとの報告も散見される。しかしながら, B細胞除去療法が自己免疫疾患に対して必ずしも有益でない症例も報告されており, リツキサン®投与後に多発性硬化症の再発が誘導された症例や尋常性乾癬を発症した症例などが存在する。この理由としては, B細胞が自己免疫や炎症を促進する作用だけではなく, 抑制する作用も併せ持っているため, B細胞除去療法により自己免疫現象を増悪させた可能性が考えられる。この相反する作用は, Effector B細胞とRegulatory B細胞の概念で説明できる。これまで著者らは多発性硬化症や全身性エリテマトーデスのモデルマウスにおいてEffector B細胞とRegulatory B細胞の作用を詳細に解析し, 病早期のB細胞除去療法は病勢を悪化させ, 反対に病後期のB細胞除去療法は病勢を抑制することを明らかにしている(図8)¹²⁾。その治療効果はそれぞれの病期におけるEffector B細胞とRegulatory B細胞のバランスによることが示された。さらにB細胞除去療法の効果が有望視されていた全身性エリテマトーデスのPhase II/IIIの臨床試験が当初の治療目的に達せず失敗に終わったが, この原因としてRegulatory B細胞の影響が推測される。よって, 自己免疫性疾患に対するB細胞除去

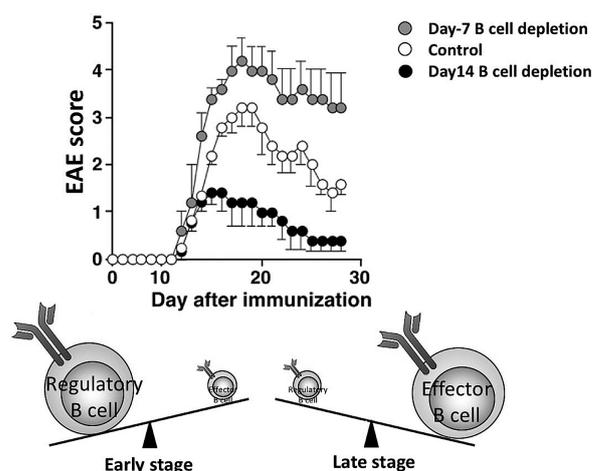


図8. 自己免疫疾患におけるEffector B細胞とRegulatory B細胞のバランス
多発性硬化症モデル(EAE)マウスでは発症前(Day -7)のB細胞除去により悪化し, 発症後(Day 14)のB細胞除去により改善する。Regulatory B細胞は強皮症患者で減少している。(上図) EAEマウスの発症前(Day -7)ないしは発症後(Day 14)に抗CD20抗体を投与しB細胞除去療法を行った。(下図) 病早期ではRegulatory B細胞が優位な状態で, 病後期ではEffector B細胞が優位な状態となる。(文献12より引用改変)

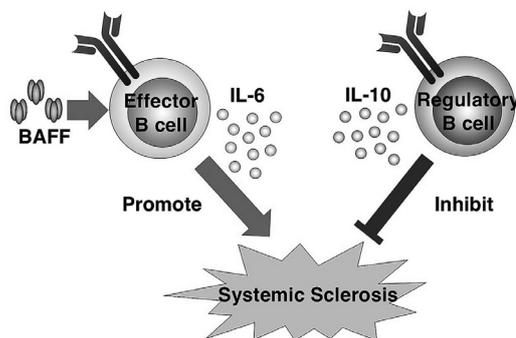


図9. 強皮症におけるEffector B細胞とRegulatory B細胞の役割
強皮症の病態形成においてRegulatory B細胞はIL-10産生を介して病態を抑制し, Effector B細胞はIL-6産生を介して病態を促進する。

療法に当たっては, すべてのB細胞を除去するのではなく, Effector B細胞のみを除去する選択的B細胞除去療法が重要であることが示唆される。我々のマウスにおける解析では, BAFF刺激によりマウスB細胞からのIL-6産生が増強され, IL-10産生が抑制されること, BAFF阻害によりIL-6産生Effector B細胞が減少し, IL-10産生Regulatory B細胞が増加することが示された(論文投稿中)。さらに, BAFF阻害によりプレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの皮膚および肺の線維化が抑制されることが明らかとなった。以上より, BAFF阻害がサイトカイン産生B細胞のバランスをRegulatory B細胞-優位(Effector B細胞↓/Regulatory B細胞↑)とし治療効果を誘導することが示唆された(図9)。

おわりに

これまでの研究成果により強皮症の病態形成において **Regulatory B細胞**はIL-10産生を介して病態を抑制し、**Effector B細胞**はIL-6産生を介して病態を促進することが明らかとなった(図9)。さらにBAFF阻害がサイトカイン産生B細胞のバランスを**Regulatory B細胞**-優位とし病勢を抑えることが示唆された。これらの結果は強皮症のみならず自己免疫疾患の発症・進展機構の解明につながる大きな進歩と考えられる。今後も研究を進展させ、強皮症の病態解明と治療法開発につなげていきたい。

謝 辞

平成29年度(第14回)金沢大学十全医学賞受賞にあたりまして、会長の太田哲生教授をはじめ、本賞の選考委員の先生方、運営されている関係者の皆様に心より御礼申し上げます。本研究遂行に当たりまして、入局以来現在に至るまで臨床・基礎の様々な面でご指導賜りました金沢大学大学院医学系研究科皮膚分子病態学 竹原和彦教授、大学院時代から強皮症の研究をご指導賜りました東京大学皮膚科 佐藤伸一教授、筑波大学皮膚科 藤本学教授、福井大学皮膚科 長谷川稔教授、米国留学において**Regulatory B細胞**の研究をご指導賜りましたDuke大学 Thomas F. Tedder教授に対して深く感謝申し上げます。また日々の診療・研究に多大なるご協力を頂いた金沢大学皮膚科の皆様、実験助手の皆様にも心より感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, et al.: Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis and rheumatism* 54: 192-201, 2006
- 2) Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, Matsushita Y, et al.: BAFF antagonist attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *The Journal of investigative dermatology* 127: 2772-80, 2007
- 3) Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, et al.: Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in

systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *The Journal of rheumatology* 33: 275-84, 2006

4) Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, et al.: IL-6 blockade attenuates the development of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *The Journal of investigative dermatology* 132: 2752-61, 2012

5) Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, et al.: Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 491: 264-8, 2012

6) Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, et al.: Inhibitory role of CD19 in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating cytokine response. *The American journal of pathology* 168: 812-21, 2006

7) Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, et al.: A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses allergic disease through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 138: 1170-82 e9, 2016

8) Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, et al.: Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117: 530-41, 2011

9) Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF: Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *Journal of immunology* 185: 2240-52, 2010

10) Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al.: Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: association with autoantibody production and disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 55: 263-7, 2016

11) Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, et al.: Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood* 121: 3274-83, 2013

12) Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, et al.: Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation* 118: 3420-30, 2008



Profile

- 1999年3月 金沢大学医学部医学科卒業
- 1999年4月 金沢大学皮膚科入局
- 2006年3月 金沢大学大学院医学系研究科卒業
- 2007年4月 米国 Duke 大学免疫学教室研究員
(2008年～2010年：日本学術振興会海外特別研究員)
- 2010年4月 金沢大学皮膚科助教
- 2013年6月 金沢大学皮膚科講師

趣味：トライアスロン

今後の抱負：今後も金沢大学ならびに十全医学会の発展に尽力させていただきます。