

審査の結果の要旨

氏名 江畑 慧

本研究は、全身性強皮症において自己応答性 B 細胞の果たす役割を明らかにするため、マイクロ血管モデルを作成して血管内皮細胞と反応する強皮症患者及び強皮症モデルマウスの自己応答性 single B cell の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マイクロ化学チップ内に血管内皮細胞を **confluent** になるまで培養し、マイクロ血管モデルを作成した。このモデルを用いることで、全身性強皮症における **in vivo** の組織中での毛細血管と類似した環境の再現に成功した。マイクロ血管モデル内に全身性強皮症患者やトポイソメラーゼ I 誘発強皮症モデルマウスの末梢血中 B 細胞を導入したところ、血管内皮細胞と接着する B 細胞の存在を認めた。これらの B 細胞について新規技術のマイクロ **ELISA** システムを利用して単細胞解析を施行したところ、抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗血管内皮細胞抗体を産生する自己応答性 B 細胞であることが明らかになった。健常人やコントロール群のマウスの末梢血 B 細胞中には、血管内皮細胞と接着する B 細胞は見られなかった。
2. 血管内皮細胞と接着する B 細胞は、強い溶液流れ下でも血管内皮細胞と接着し続ける接着力が強い亜集団と、弱い溶液流れ下でしか血管内皮細胞と接着できない接着力が弱い亜集団とに分類することが出来た。前者の亜集団を強接着 B 細胞、後者の亜集団を弱接着 B 細胞と定義すると、全身性強皮症での皮膚や肺の線維化の程度と相関しているのは強接着 B 細胞の数のみであり、弱接着 B 細胞数との相関は認めなかった。強接着 B 細胞の亜集団は、抗トポイソメラーゼ I 抗体産生量が多く、**BAFF** 受容体を高発現し、かつ炎症性サイトカインである **IL-6** を産生していた。一方、弱接着 B 細胞の亜集団は、抗トポイソメラーゼ I 抗体産生量が少なく、**BAFF** 受容体は低発現で、かつ抑制性サイトカインである **IL-10** を産生していた。
3. 強接着 B 細胞を移植してからトポイソメラーゼ I 誘発強皮症モデルマウスを作成したところ、コントロールとして血管内皮細胞と接着しない B 細胞を移植したマウスと比較して皮膚厚や肺線維化スコアは増悪した。逆に、弱接着 B 細胞を移植してからトポイソメラーゼ I での免疫を行ったところ、コントロール群のマウスと比較して皮膚厚や肺線維化スコアは軽減していた。全身性強皮症では、血管内皮細胞との接着力が強い B 細胞亜集団が組織の線維化増悪に関与しており、血管内皮細胞との接着力が弱い B 細胞亜集団は組織の線維化を抑制していることが示唆された。
4. リツキシマブ投与後も肺機能が改善しなかった全身性強皮症患者で投与後に残存して

いるわずかな B 細胞を検討したところ、強接着 B 細胞の弱接着 B 細胞に対する比率が投与前よりも上昇していた。トポイソメラーゼ I 誘発強皮症モデルマウスに抗 CD20 抗体を投与した場合でも、投与前よりも投与後で強接着 B 細胞の弱接着 B 細胞に対する比率が上昇した。強接着 B 細胞が抗 CD20 抗体による B 細胞除去に抵抗性を示し、これらの残存 B 細胞が治療抵抗性に関与していると考えられた。

5. トポイソメラーゼ I 誘発強皮症モデルマウスに対して抗 CD20 抗体の後で抗 BAFF 受容体抗体を併せて投与した場合では、強接着 B 細胞も弱接着 B 細胞と同程度で効率的に除去することが出来ており、強接着 B 細胞の弱接着 B 細胞に対する比率は投与前後で変化していなかった。トポイソメラーゼ I 誘発強皮症モデルマウスへ抗 CD20 抗体を単独で投与した場合でも皮膚厚や肺線維化スコアの改善は見られたが、抗 BAFF 受容体抗体と併用することで皮膚厚や肺線維化スコアの改善の程度がより向上することが確認された。

以上、本論文では申請者は、強皮症に対するリツキシマブの医師主導治験の有効性に基づき、強皮症の血管内皮と B 細胞の接着を検討した。検討に際して、マイクロ流体デバイスとマイクロ ELISA を組み合わせた解析系を構築し、この解析系内での血管内皮細胞と強皮症 B 細胞接着を評価した。その結果、強皮症や強皮症モデルマウスにおいて、血管内皮細胞と強く接着する B 細胞の亜集団が存在し、それらは BAFF 受容体を高発現し、かつ IL-6 産生性の自己反応性 B 細胞であることが示唆された。本研究は新規解析法を用いて、強皮症の病態を解明し、新規治療法の開発につながることを期待され、内容は非常に新規性が高いと言える。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。