

博士論文（要約）

単一細胞解析を用いた

強皮症患者およびモデルマウスの B 細胞の検討

江畑 慧

論文の内容の要旨

論文題目 単一細胞解析を用いた強皮症患者およびモデルマウスの B 細胞の検討

氏名 江畑 慧

全身性強皮症は、皮膚や内臓諸臓器の線維化と血管障害、自己免疫異常を 3 主徴とする予後不良な自己免疫疾患である。最も多い死因は間質性肺炎で、これを合併する患者の 10 年生存率は 29-69%と報告されている。病態についてはいまだに不明な点が多く残されているが、B 細胞が病態形成において中心的な役割を果たしている可能性が示唆されてきた。B 細胞に特異的に発現する CD19 の量は全身性強皮症患者で健常者よりも約 20%増加している。CD19 は B 細胞抗原受容体からのシグナルを増強させる働きを有していることから、全身性強皮症患者では B 細胞、特に常に自己抗原に暴露されている自己応答性 B 細胞が活性化していると考えられる。この結果、全身性強皮症患者では様々な自己抗体が検出され、さらにその種類は予後予測に有用とされている。特に、抗トポイソメラーゼ I 抗体の抗体価は、皮膚や肺の線維化の程度と相関することが知られている。また、全身性強皮症の遺伝的モデルマウスである **tight-skin** マウスは皮膚の著明な線維化を呈するのみならず、抗トポイソメラーゼ I 抗体も検出される。**Tight-skin** マウスで CD19 を欠損させると、自己抗体の産生が抑制され、皮膚硬化が改善することが示されている。さらに皮膚硬化の早期から抗 CD20 抗体により B 細胞を除去すると、自己抗体産生と皮膚硬化が著明に改善することが報告されている。

これらの知見を踏まえ、現在全身性強皮症の B 細胞をターゲットとした臨床研究が多数行われている。中でも、抗ヒト CD20 ヒト-マウスキメラ抗体であるリツキシマブが、有望な新規治療薬として注目を集めている。CD20 は、B 細胞の分化段階においてプレ B 細胞から活性化 B 細胞にまで発現する、B 細胞特異的な表面分子であり、リツキシマブは抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害活性、およびアポトーシスの誘導などを介して B 細胞を除去する。すでに各国で臨床研究が行われており、これらの研究は概ねリツキシマブの全身性強皮症に対する有用性を示唆している。本邦では、筆者らが 2011 年から自主臨床試験を施行し、標準療法であるシクロフォスファミドで加療された群と比較して、リツキシマブ群では皮膚硬化及び肺機能が著明に改善したことを報告している。さらに筆者らは、2017 年 12 月から多施設共同無作為化プラセボ対照二重盲検比較医師主導治験(Double-Blind, parallel-group comparison, investigators initiated phase II clinical trial of IDEC-C2B8 [Rituximab] in patients with Systemic Sclerosis; DesiReS 試験)を施行し、リツキシマブの全身性強皮症に対する有効性・安全性を検証した。主要評価項目である 24 週目時点の **modified Rodnan Skin Score** はリツキシマブ群でプラセボ群よりも顕著に低下しており、全身性強皮症における皮膚硬化を主要評価項目としたプラセボ対照二重盲検比較試験

としては、史上初めて有効性を示した。副次評価項目である%努力性肺活量も、リツキシマブ群においてプラセボ群と比較して有意に改善しており、皮膚だけではなく肺の線維化に対する効果も認められた。これまで全身性強皮症に対する疾患修飾薬は開発されておらず、全身性強皮症に対する新規治療開発は喫急の課題とされてきた。筆者らは今回の治験の結果から、リツキシマブは全身性強皮症に対する新規治療法になり得ると考えており、現在薬事承認申請に向けて規制当局と相談中である。このように全身性強皮症に対してリツキシマブが目覚ましい効果を発揮したことは、B細胞が全身性強皮症の病態において中心的な役割を担っていることを裏付けるものである。しかしながら、リツキシマブに対して治療抵抗性を示す症例も存在する。全身性エリテマトーデスなどの研究により、リツキシマブ投与後に残存するわずかなB細胞が、この治療抵抗性に関わっている重要な一因と考えられている。これまでは **single B cell** を蛋白質レベルで解析する技術が無かったため、これらのB細胞の役割を解析するのは困難であった。今回、筆者らは最新のマイクロ流体力学を応用し、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自己応答性 **single B cell** の解析を行った。

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。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。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

胞重集団は組織の線維化を抑制していることが示唆された。

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。しかし、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には、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。

本研究により、全身性強皮症の発症には血管内皮細胞との相互作用が強い自己応答性の B 細胞が関与しており、それらの B 細胞は IL-6 を産生し、自己抗体の産生量が多く、BAFF 受容体の発現量が高いものが多いことが明らかになった。また、これらの B 細胞はアポトーシスに拮抗的に働く Bcl-2 を誘導する BAFF 受容体の高発現により抗 CD20 抗体を投与しても他の B 細胞より相対的に残存しやすく、その残存数が抗 CD20 抗体投与後の治療反応性を予測する因子になりうることを示された。加えて、血管内皮細胞と強く接着する B 細胞は抗 CD20 抗体投与後も残存しやすいが BAFF 受容体の発現が強いため、抗 BAFF 受容体抗体を追加投与すると効率的に除去されること、実際にマウスモデルで抗 CD20 抗体と抗 BAFF 受容体抗体を併用することで皮膚や肺の著明な線維化改善効果が確認されたことにより、血管内皮細胞との反応性が強い病原性の B 細胞を効率的に除去し、血管内皮細胞との反応性が弱い制御性の B 細胞との比率を拡大させないことが全身性強皮症に対する新たな治療戦略になりうることを初めて示された。