

- lupus erythematosus. *J. Immunol.* 165:5970.
5. Arce, E., D. G. Jackson, M. A. Gill, L. B. Bennett, J. Banchereau, and V. Pascual. 2001. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 167:2361.
 6. Jacobi, A. M., M. Odendahl, K. Reiter, A. Bruns, G. R. Burmester, A. Radbruch, G. Valet, P. E. Lipsky, and T. Dorner. 2003. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48:1332.
 7. Hansen, A., M. Odendahl, K. Reiter, A. M. Jacobi, E. Feist, J. Scholze, G. R. Burmester, P. E. Lipsky, and T. Dorner. 2002. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 46:2160.
 8. Bohnhorst, J. O., M. B. Bjorgan, J. E. Thoen, J. B. Natvig, and K. M. Thompson. 2001. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* 167:3610.
 9. Tedder, T. F., M. Inaoki, and S. Sato. 1997. The CD19/21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 6:107.
 10. Sato, S., M. Hasegawa, M. Fujimoto, T. F. Tedder, and K. Takehara. 2000. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J. Immunol.* 165:6635.
 11. Saito, E., M. Fujimoto, M. Hasegawa, K. Komura, Y. Hamaguchi, Y. Kaburagi, T. Nagaoka, K. Takehara, T. F. Tedder, and S. Sato. 2002. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J. Clin. Invest.* 109:1453.
 12. Wang, J., and T. Watanabe. 1999. Expression and function of Fas during differentiation and activation of B cells. *Intern. Rev. Immunol.* 18:367.
 13. Fleischmajer, R., J. S. Perlish, and J. R. T. Reeves. 1977. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum.* 20:975.
- G. 研究発表**
1. 論文発表

S. Sato, M. Fujimoto, M. Hasegawa, and K. Takehara: Altered Blood B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Sclerosis: Expanded Naïve B Cells and Diminished but Activated Memory B cells. Arthritis Rheum. (in press).

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

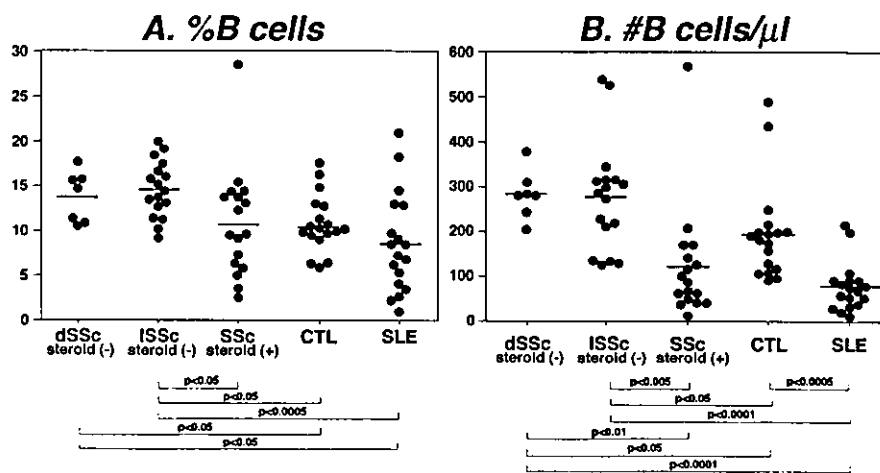


図1：無治療 dSSc、無治療 ISSc、ステロイド少量内服を受けている SSs、SLE、健常人 (CTL) における B 細胞頻度と絶対数

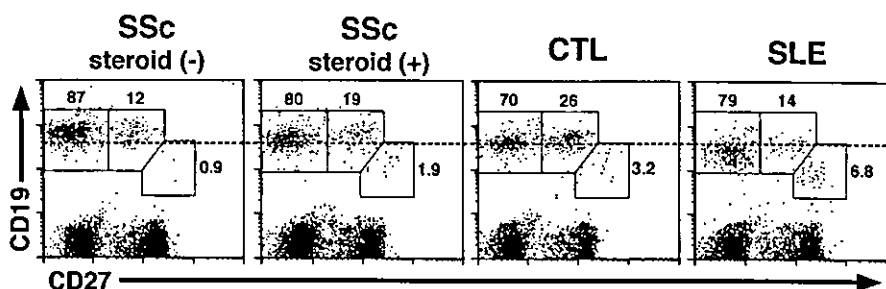


図2：無治療 dSSc、無治療 ISSc、ステロイド少量内服を受けている SSs、SLE、健常人 (CTL) における各 B 細胞サブセットの頻度および CD19 発現量 (点線を参照) の比較

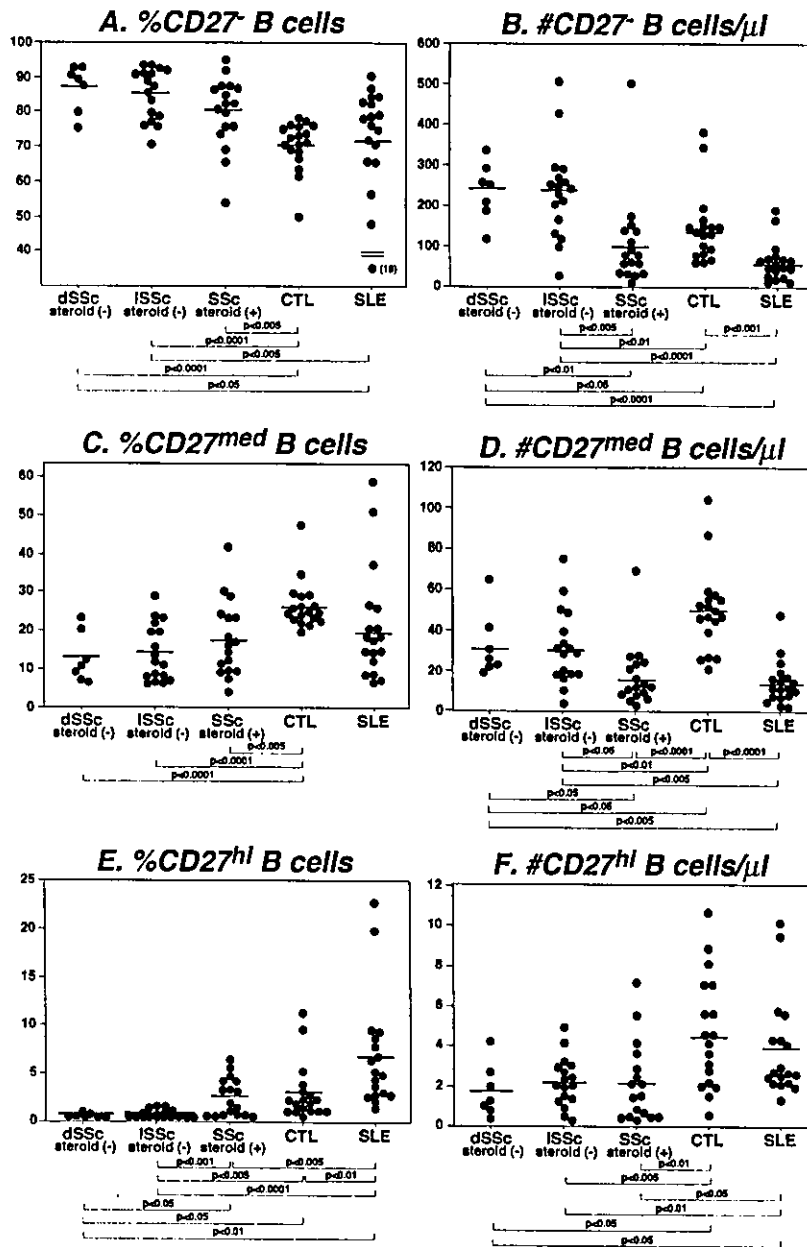


図3：無治療 dSSc、無治療 ISSc、ステロイド少量内服を受けている SSc、SLE、健常人 (CTL) における各 B 細胞サブセットの頻度と絶対数

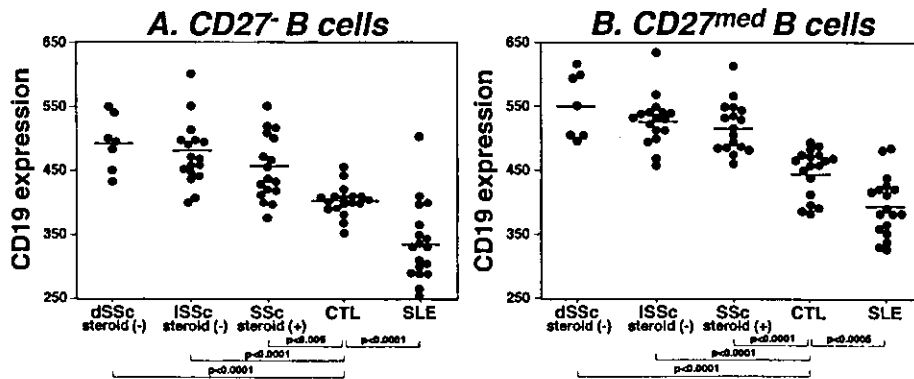


図4：無治療 dSSc、無治療 ISSc、ステロイド少量内服を受けている SSc、SLE、健常人 (CTL) における、ナイーブ B 細胞およびメモリー B 細胞の CD19 発現量

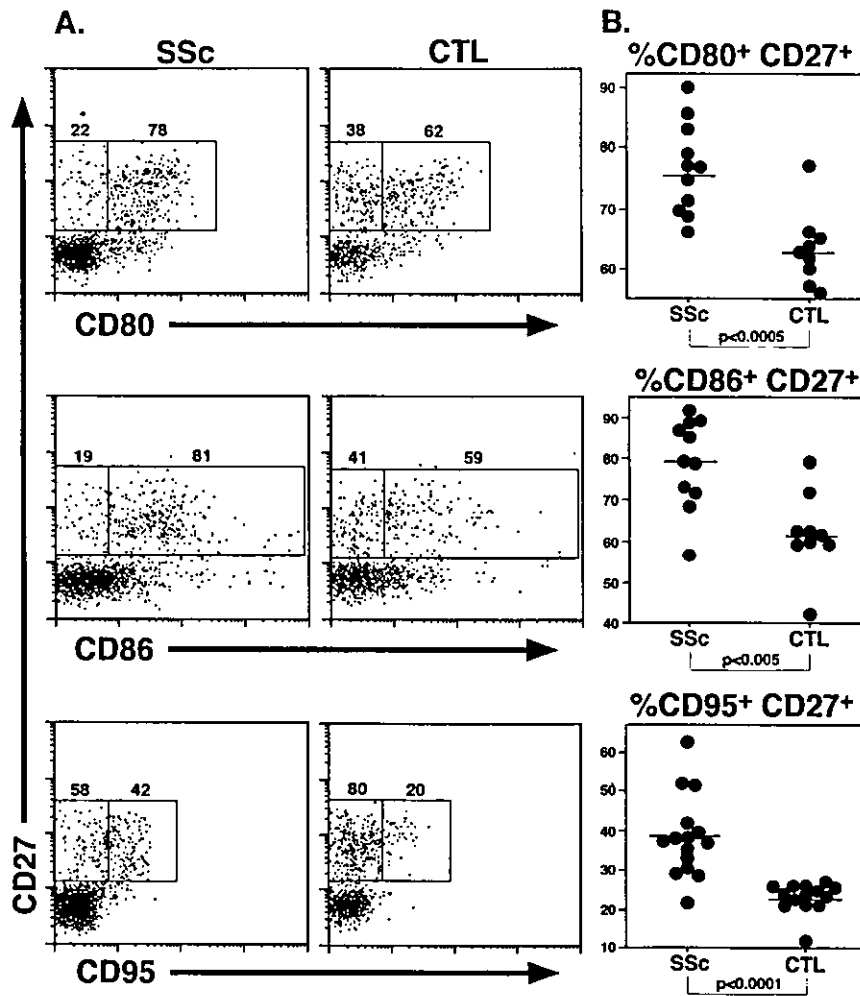


図5：無治療SSc、健常人(CTL)のメモリーB細胞におけるCD80、CD86、CD95の発現量

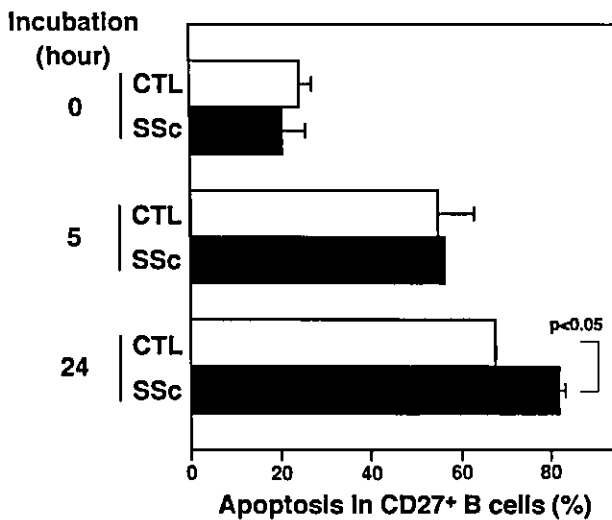


図6：無治療SSc、健常人(CTL)のメモリーB細胞におけるアポトーシスの頻度

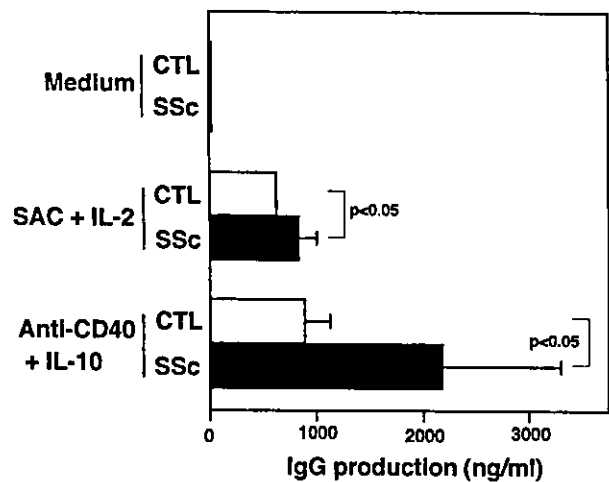


図7：無治療SSc、健常人(CTL)のメモリーB細胞によるIgG産生能

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

強皮症動物モデルである Tight-skin マウスにおける
B リンパ球シグナル伝達異常の解析

分担研究者 藤本 学 国立国際医療センター研究所
細胞組織再生医学研究部細胞修飾生体反応研究室長
分担研究者 佐藤伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
協力者 大河内仁志 国立国際医療センター研究所
細胞組織再生医学研究部長
協力者 浅野典子 国立国際医療センター研究所
細胞組織再生医学研究部流動研究員

研究要旨

全身性強皮症の動物モデルとして用いられている Tight skin (TSK/+) マウスは皮膚および皮下に著明な皮膚の線維化を主徴とし、強皮症に類似した免疫異常も認められる。われわれは、TSK/+マウスを対象に B リンパ球の抗原受容体を介するシグナル伝達に異常が存在するかどうかを検討した。TSK/+マウス由来の B 細胞は抗原受容体刺激に対して過剰な反応性を示し、これは主として CD22 の機能が障害されていることによると考えられた。

A. 研究目的

Tight skin (TSK) マウスは皮膚および皮下に皮膚の著明な線維化を主徴とする突然変異マウスで(1)、全身性強皮症の動物モデルとして用いられている(2)。この変異は常染色体優性遺伝で、ホモ接合体 (TSK/TSK) は子宮内で致死となるため、線維化を呈するマウスはヘテロ接合体 (TSK/+) である。TSK/+マウスの呈する症状は強皮症と全く同一ではないが、皮膚硬化のみならず強皮症と類似の免疫異常も認められることは大きな特徴である。例えば、全身性強皮症で特異的に検出される

抗トポイソメラーゼ I 抗体や抗 RNA ポリメラーゼ抗体などは TSK/+マウスでも出現することが知られている。TSK/+マウスの責任遺伝子は Fibrillin I と報告されているが(3)、まだ明らかになっていない部分も多い。いずれにしても TSK/+マウスが全身性強皮症と共通ないし類似した皮膚硬化と免疫異常をもつことは、本症の発症機序を研究する上で示唆に富むモデルであるといえる。

全身性強皮症をはじめとする自己免疫疾患では、リンパ球の異常な活性化が認められることが大きな特徴のひとつである。実際に、

リンパ球のシグナル伝達分子の発現を改変したノックアウトマウスやトランスジェニックマウスでは種々の自己免疫異常やそれに伴う病変がみられることが知られており、リンパ球のシグナル伝達機構の異常が自己免疫疾患の病態に関与する可能性が想定されている。特にBリンパ球ではLyn, CD22, SHP-1, CD72, FcγRIIBなどの抑制性分子ないし経路が重要であると考えられている(4)。

われわれは最近、全身性強皮症患者のB細胞表面のCD19の発現が増強していることを見出した(5)。また、TSK/+マウスにおいてCD19の発現が皮膚硬化に影響することを報告した(6)。この知見は、古くから知られている強皮症に高頻度に特異的な自己抗体が出現することに加えて、B細胞が本症の病態形成に重要な役割をもっていることを示唆している。そこでわれわれは、TSK/+マウスを対象にBリンパ球の抗原受容体を介するシグナル伝達に異常が存在するかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 動物

TSK/+マウスはJackson Laboratoryより購入した。マウスは国立国際医療センター研究所動物飼育室にて特定病原体非存在の環境にて飼育し、8-12週齢のものを使用した。マウスの飼育および実験にあたっては国立国際医療センター研究所動物管理委員会の承認を得て行った。

2) 抗体

使用した抗体は下記の通りである。抗B220

(RA3-6B2, Beckman Coulter), 抗CD19 (MB19.1) (7), 抗CD22 (MB22-1) (8) (Cy34, BD PharMingen), 抗I-A (M5/114.15.2), 抗リン酸化チロシン (4G10, Upstate Biotechnology, NY; PY99, Santa Cruz Biotechnology), FITC-conjugated 抗IgM (Southern Biotechnology Associations, Inc.), F(ab')₂ goat 抗mouse IgM (Cappel, ICN Biomedicals), 抗Lyn, 抗Syk, 抗PLCγ2, 抗-ERK2, 抗JNK1 (Santa Cruz Biotechnology), 抗SHP-1 (Upstate Biotechnology), 抗Akt, 抗phospho-Akt (Ser473) (New England Biolabs), 抗active ERK, 抗active JNK (Promega)。

3) B細胞の精製, 活性化, 免疫沈降

B細胞は脾臓からのsingle cell suspensionより、抗Thy1.2抗体がコートされた磁気ビーズを用いてT細胞を除去することにより精製した。B細胞の精製率はフローサイトメトリーにて95%以上(B220陽性細胞)であった。B細胞はRPMI1640培地中で37℃に加温した後、F(ab')₂抗マウスIgM抗体(40 μg/ml)で一定時間刺激し、4℃で細胞を遠心、溶解バッファー(1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Na orthovanadate, 2 mM EDTA, 50 mM NaFおよび蛋白分解酵素阻害剤)にて細胞を溶解した。溶解液はSDS-PAGEあるいは免疫沈降に用いた。免疫沈降は、細胞溶解液をマウスないしウサギIgGおよびプロテインG結合アガロースビーズで非特異反応を吸収した後、適当な抗体とプロテインGビーズを混合し、4~6時間程度反応させた。ついで、ビーズを溶解バッ

ァーにて4回洗浄し、SDS-PAGE サンプルバッファに溶解した。CD19 の免疫沈降には抗マウス CD19 モノクローナル抗体を Affi-gel (Bio-Rad 社) に結合させたものを使用した。

4) 免疫プロット法

細胞溶解液あるいは沈降させた蛋白は SDS-PAGE により分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜はペルオキシダーゼ標識抗リン酸化チロシン抗体 (4G10: Upstate Biotechnology 社; PY99: Santa Cruz Biotechnology 社) または適当な抗体とペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス/ウサギ IgG 抗体で反応させた。これらのプロットは enhanced chemiluminescence キット (Pierce 社) を用いて発色させた。各レーンの蛋白量が等しいことを確認するため、あるいは結合している別の蛋白を検出するために、プロット後抗体をはがし、適当な抗体で再度プロットを行った。

5) 細胞内カルシウム濃度測定

脾細胞に $1\mu\text{M}$ の indo-1-AM ester (Molecular Probes) を 37°C で 30 分間とりこませた後、FITC 標識抗 B220 抗体と 15 分間反応させた。UV レーザーで励起したときの B220 陽性細胞における蛍光波長の比 ($488/407\text{ nm}$) を Epics Altra flow cytometer (Beckman Coulter) で測定した。測定開始 1 分後に F(ab)'_2 抗マウス IgM 抗体 (10 または $40\ \mu\text{g/ml}$) を添加した。結果は 15 秒間の蛍光比の平均を求めることにより表わした。

6) 統計

サンプル間の平均値の差の有意差の検定には Student's *t* test を用いた。

C. 研究結果

1) TSK/+マウス B 細胞では抗原受容体刺激による細胞内カルシウム濃度反応が過剰に誘導される

TSK/+マウスの B 細胞は、B 細胞そのものには明らかな遺伝子異常がないにもかかわらず、B 細胞の表現型は IgM の発現減少、MHC class II の発現上昇、CD23 の発現上昇などの異常を呈することがわかっている。そこで TSK/+B 細胞において、抗原受容体刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を検討した。図 1 に示すように、TSK/+マウス B 細胞では野生型マウス B 細胞に比べて細胞内カルシウム濃度の上昇が約 50%大きくなっていた。

2) TSK/+マウス B 細胞のシグナル分子のリン酸化

TSK/+マウス B 細胞は抗原受容体刺激に対して過剰反応性であることが示されたため、抗原受容体刺激により誘導される細胞内シグナル分子のリン酸化や活性化について検討した。チロシンキナーゼの Lyn や Syk は野生型と同程度にリン酸化および活性化が誘導された (図 2)。また、カルシウム濃度の調節により直接的な作用のある PLC γ 2 や SHIP のリン酸化にも大きな差は認められなかった (図 2)。これは Shc のリン酸化についても同様であった (図 2)。

3) TSK/+マウス B 細胞では CD22 のリン酸化が減弱している

さらに TSK/+マウス B 細胞のカルシウム濃度の異常のメカニズムを検討するために、カルシウム制御に大きくかかわる膜表面分子の CD22 の機能を検討した。CD22 の構成的なリン酸化は TSK/+マウス B 細胞で減弱しており、抗原受容体刺激により誘導されるリン酸化も野生型 B 細胞に比べて著しく減弱していた (図 3)。これにともなって CD22 にリクルートされるチロシンフォスファターゼである SHP-1 の量も低下していた (図 3)。一方 TSK/+B 細胞では CD19 のチロシンリン酸化は野生型 B 細胞に比べ抗原受容体刺激後増加していた (図 3)。なお CD19 および CD22 の発現量には野生型 B 細胞と TSK/+B 細胞で違いは認められなかった。

4) TSK/+マウス B 細胞の下流のシグナルについて

TSK/+マウス B 細胞にみられるこのような CD22 の機能異常が下流のシグナル伝達にどのような影響を及ぼしているかをさらに解析した。抗原受容体刺激に誘導される ERK の活性化は TSK/+B 細胞で上昇しており、一方 JNK や Akt の活性化には有意な差は認められなかった (図 4)

D. 考案

本研究では、TSK/+マウスの B 細胞におけるシグナル伝達異常の有無について検討した。TSK/+マウスは自己免疫異常を呈する遺伝子改変マウスとは異なり、リンパ球そのものに

はこれまでに知られている遺伝子異常は存在しないが、血液中や脾臓の B 細胞は表面 IgM の発現低下、MHC class II や CD23 の発現増強という持続的に抗原刺激をうけているような表現型を呈し(6)、これらは CD19 過剰マウス、CD22 欠損マウスなど膜シグナルが構成的に増強しているマウスの B 細胞に共通してみられる所見である。このような所見に一致して、TSK/+マウス B 細胞では抗原受容体刺激に対して細胞内カルシウム濃度上昇や MAP キナーゼである ERK の活性化が野生型マウス B 細胞に比べて 50%程度増強して認められた。このことは TSK/+B 細胞におけるシグナル伝達が質的に変化し、過剰な応答性を示していると考えられる。

われわれの解析において、TSK/+マウス B 細胞は CD22 のチロシンリン酸化が特異的に障害されていた。CD22 は B 細胞に特異的な膜表面糖蛋白であり、細胞内に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) をもち、Lyn により CD22 のチロシン基がリン酸化されるとチロシンフォスファターゼである SHP-1 をリクルートすることができる(9)。この SHP-1 は種々のシグナル分子を脱リン酸化することにより、細胞の活性化を抑制する。すなわち、Lyn/CD22/SHP-1 経路は B 細胞の抗原受容体シグナルを抑制する中心的な経路である。TSK/+マウス B 細胞では、CD22 のリン酸化は抗原受容体刺激の非存在下でも野生型 B 細胞に比べて低下しており、抗原受容体の刺激に誘導されるリン酸化も著明に減弱していた。これに一致して CD22 の抑制性経路の主要なターゲットの一

つである CD19 のチロシンリン酸化は野性型にくらべ増加していた。CD19 は Src family チロシンキナーゼ, Vav, PI3 キナーゼの活性を制御することにより抗原受容体シグナルを増幅するはたらきがある(10)。したがって, TSK/+マウス B 細胞では CD22 抑制性経路が破綻することにより CD19 への抑制が解除され, 刺激への応答性が過剰になっていると推測することができる。この分子メカニズムは, われわれが最近報告した B 細胞上の CD19 の欠損により TSK/+マウスの皮膚の線維化が抑制されるという知見に合致するものである(6)。

CD22 は抗原受容体刺激後 Lyn によってリン酸化されることが示されている。しかしながら, われわれの検討では TSK/+マウスにおける Lyn の活性化は正常であった。CD22 のリガンドはシアル酸であり B 細胞表面上で IgM や CD45 のシアル酸と結合すること (cis 結合) が示されている(11)。TSK/+マウスの B 細胞における CD22 機能の破綻は, 例えば CD22 のリガンドが血中に存在することによって, B 細胞上の CD22 の cis 結合が解除され, 抗原受容体に対する抑制が失われるというモデルを想定することができる。TSK/+マウスにおいては CD22 の遺伝子異常は存在せず, 機能的な異常であると考えられるが, CD22 の遺伝子多型は自己免疫マウスでは報告されており(12), 自己免疫疾患発症の鍵となるシグナル伝達経路であると考えられ, 今後さらなる検討が重要であるとともに, 将来的に治療上のターゲットになりうるものと考えられた。

E. 結論

TSK/+マウス由来の B 細胞のシグナル伝達異常について解析した。TSK/+マウス B 細胞は抗原受容体刺激に対して過剰な反応性を示し, これは主として CD22 の機能が障害されていることによると考えられた。以上より, B 細胞抑制性シグナル伝達経路の質的な異常が強皮症の病態形成に関与している可能性が示された。

F. 文献

1. Green, M.C., H.O. Sweet, and L.E. Bunker. 1976. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 82:493-512.
2. Saito, S., K. Kasturi, and C. Bona. 1999. Genetic and immunologic features associated with scleroderma-like syndrome of TSK mice. *Curr Rheumatol Rep* 1:34-37.
3. Kielty, C.M., M. Raghunath, L.D. Siracusa, M.J. Sherratt, R. Peters, C.A. Shuttleworth, and S.A. Jimenez. 1998. The Tight skin mouse: demonstration of mutant fibrillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. *J Cell Biol* 140:1159-1166.
4. Tedder, T.F., S. Sato, J.C. Poe, and M. Fujimoto. 2000. CD19 and CD22 regulate a B lymphocyte signal transduction pathway that contributes to autoimmunity. *Keio J Med* 49:1-13.
5. Sato, S., M. Hasegawa, M. Fujimoto, T.F. Tedder, and K. Takehara. 2000. Quantitative

- genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 165:6635-6643.
6. Saito, E., M. Fujimoto, M. Hasegawa, K. Komura, Y. Hamaguchi, Y. Kaburagi, T. Nagaoka, K. Takehara, T.F. Tedder, and S. Sato. 2002. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the Tight Skin mice. *J. Clin. Invest.* 109:1453-1462.
 7. Sato, S., N. Ono, D.A. Steeber, D.S. Pisetsky, and T.F. Tedder. 1996. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol* 157:4371-4378.
 8. Poe, J.C., M. Fujimoto, P.J. Jansen, A.S. Miller, and T.F. Tedder. 2000. CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. *J Biol Chem* 275:17420-17427.
 9. Sato, S., J.M. Tuscano, M. Inaoki, and T.F. Tedder. 1998. CD22 negatively and positively regulates signal transduction through the B lymphocyte antigen receptor. *Semin Immunol* 10:287-297.
 10. Fujimoto, M., J.C. Poe, M. Hasegawa, and T.F. Tedder. 2001. CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification. *Immunol Res* 22:281-298.
 11. Razi, N., and A. Varki. 1998. Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7469-7474.
 12. Morel, L., C. Mohan, Y. Yu, B.P. Croker, N. Tian, A. Deng, and E.K. Wakeland. 1997. Functional dissection of systemic lupus erythematosus using congenic mouse strains. *J Immunol* 158:6019-6028.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Fujimoto M, Sato, S. CD22 Inhibitory Regulation is Disrupted in B Cell Antigen Receptor Signaling in the Tight-Skin Mouse. American college of Rheumatology. Annual Scientific Meeting. New Orleans. October, 2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

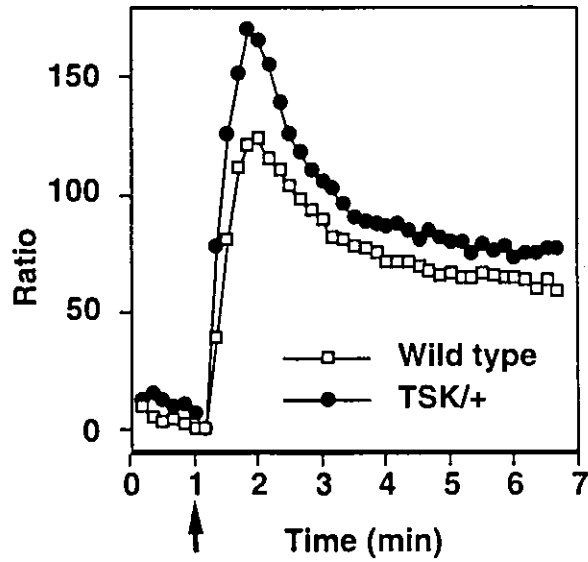


図1：TSK/+マウス B 細胞の抗原受容体刺激に伴う細胞内カルシウム濃度の変化。

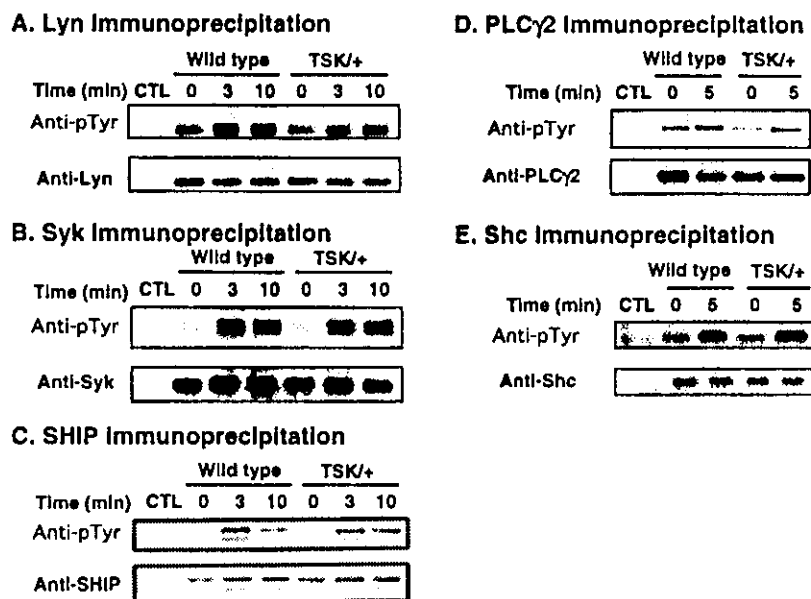
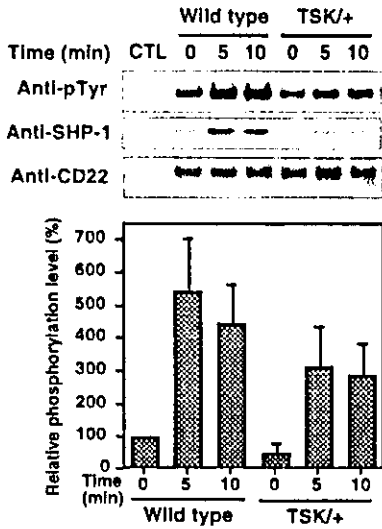


図2：TSK/+マウス B 細胞の抗原受容体刺激による各シグナル分子のチロシンリン酸化。A, Lyn; B, Syk; C, SHIP; D, PLCγ2; E, Shc.

A. CD22 Immunoprecipitation



B. CD19 Immunoprecipitation

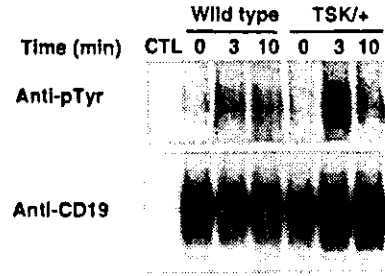
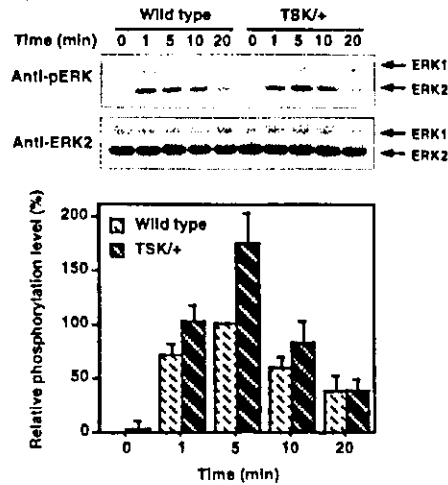
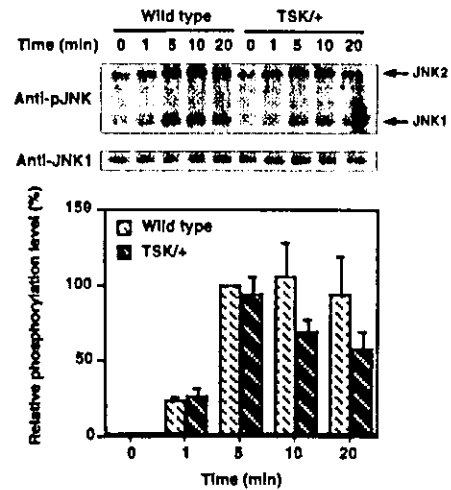


図 3 : TSK/+マウス B 細胞の抗原受容体刺激による (A) CD22 のチロシンリン酸化と SHP-1 との結合および (B) CD19 のリン酸化。

A.



B.



C.

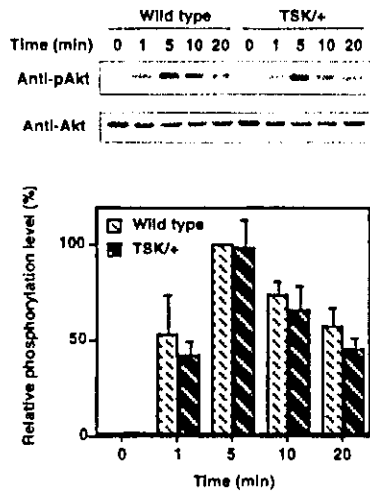


図 4 : TSK/+マウス B 細胞の抗原受容体刺激による ERK, JNK, Akt の活性化。

Tight-skin mouse における、抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法の 有用性の検討

分担研究者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授
協力者	長谷川 稔	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
協力者	Thomas F. Tedder,	Professor, Dept of Immunol, Duke University
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症の動物モデルである tight-skin mouse (TSK) において、抗マウス CD20 抗体による B 細胞除去療法の有用性を検討した。新生児より抗 CD20 抗体を投与したマウスでは、生後 8 週での皮膚硬化が軽減しており（～43%）、自己抗体の産生は全くみられなかった。少ない抗体量で投与して B 細胞除去が不完全な場合には、皮膚硬化や自己抗体産生の抑制は軽度であった。一方、生後 8 週のすでに皮膚硬化や自己抗体の産生がみられる TSK では、B 細胞を除去しても皮膚硬化や自己免疫の改善はみられなかった。皮膚硬化の進行期にある 3 週齢の TSK マウスで、皮膚におけるサイトカイン mRNA の発現を検討したところ、TSK では野性型マウスに比べて Th1 型のサイトカインよりも Th2 型のサイトカインの発現が亢進していたが、B 細胞除去はこれらのサイトカインのバランス異常の修正に働いた。このように、抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法は、症状の出現前に開始することによりサイトカインの発現を調整し、皮膚硬化や自己免疫を抑制した。このことは、全身性強皮症の治療において、B 細胞が重要なターゲットであることを示唆するものと考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis, SSc) は皮膚および内臓諸臓器の線維化、硬化性病変によって特徴づけられる膠原病である。その原因はいまだ不明であるが、抗核抗体が検出されることから自己免疫疾患に位置づけられている。これまでに我々は、SSc 患者の末梢血 B 細胞では、B 細胞の主要な調節分子である CD19 の発現が上昇していることを報告した（文献 1）。また、tight-skin mouse (TSK) は成長とともに SSc と同様の抗核抗体が検出され、皮膚から皮下にかけての硬化が出現する SSc の動物モデルであるが、このマウスにおいて CD19 の発現をなくした場合に皮膚硬化が有意に減少（～36%）し、自己抗体の産生が完全に抑制されることを報告した（文献 2）。

現在、世界的に自己免疫疾患の病態には B 細胞が重要であることが大変注目されている（文献 3）。

関節リウマチのモデルである K/BxN マウスの B 細胞から関節炎を惹起する自己抗体が産生されることが報告された（文献 4）。また、関節リウマチの患者に対して抗 CD20 抗体投与により B 細胞を抑制した際の有効例が報告されている（文献 5）。全身性エリテマトーデスにおいても、欧米では抗 CD20 抗体治療の臨床試験が始まっている（文献 6）。しかしながら、SSc では B 細胞をターゲットとした治療の試みについての報告はみられない。

CD20 は B 細胞に特異的に発現する蛋白分子であるが、最近、内田及び Tedder らはマウスの CD20 に対する特異的なモノクローナル抗体を作成した（文献 7）。この抗体は、投与量に依存して B 細胞を消失させることが可能である。このため、我々はまず SSc の動物モデルである TSK において抗 CD20 抗体を投与し、その有用性と作用機序について検討した。

B. 研究方法

1) マウスへの抗 CD20 抗体投与

生後3日の新生児の TSK マウス (C57/BL バックグラウンド) と野性型 C57/BL6 マウスに 10 または 20 μg の抗マウス CD20 モノクローナル抗体 (MB20-11、文献7) またはアイソタイプの一一致したコントロールモノクローナル抗体 (CTL Ab) を皮下注射した。2週間ごとに同量の抗体の皮下注射を繰り返した。

一方、皮膚硬化や自己抗体の産生がみられる生後8週の TSK マウスと野性型マウスでも同様に 20 μg の抗マウス CD20 抗体を投与した。

2) 皮膚硬化の組織学的な検討

新生児からの投与群では生後8週目に、生後8週からの投与群では生後16週目にマウスを殺して、背部の同一部位の皮膚から皮下を一塊に採取し、HE染色を施行した。

3) ハイドロキシプロリンの測定

皮膚におけるコラーゲン量を定量的に測定するために、マウスを殺した際に採取した皮膚におけるハイドロキシプロリンの量を前述 (文献2) のように測定した。

4) 自己抗体の測定

殺す前に採取した血清中の抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 ss-DNA 抗体、リウマトイド因子を前述 (文献2) のように ELISA にて測定した。

5) 免疫グロブリンの測定

血清中の各アイソタイプの免疫グロブリンの量を前述 (文献2) のように ELISA にて測定した。

6) サイトカインの発現

新生児より投与開始したマウスの一部は、生後3週の時点で殺して、皮膚を採取、凍結し、各サイトカインの mRNA の発現量を real time RT-PCR にて測定した。

C. 研究成果

1) 抗 CD20 抗体による B 細胞除去

生後3日から 10 μg または 20 μg の抗 CD20 抗体を2週間ごとに皮下注射し、生後8週目に解析した。20 μg の抗 CD20 抗体を投与した場合には、いずれのマウスの血液、脾臓、末梢リンパ節でも92%以上 B 細胞が除去されたが、10 μg 投与群で

は91%までしか除去されなかった。

生後8週より 20 μg の抗 CD20 抗体を2週間ごとに皮下注射した生後16週の野性型または TSK では各臓器において94%以上の B 細胞が除去された。

2) 皮膚硬化への効果

生後3日より 20 μg の抗 CD20 抗体を2週間ごとに投与した TSK では CTL Ab を投与した TSK に比べて、生後8週の時点で皮膚から皮下にかけての厚さが組織切片上で~43%減少していた (図 1A, B)。10 μg の抗体を投与した TSK では、生後8週の時点で皮膚から皮下にかけての厚さが 25%減少していた (図 1B)。野性型では、抗体の投与によって皮膚から皮下の厚さに有意な変化はみられなかった (図 1A, B)。一方、皮膚硬化が確立した生後8週より抗 CD20 抗体投与を開始した TSK や野性型では、生後16週の時点で CTL Ab を投与した群と有意な差を認めなかった (図 1B)。コラーゲンの量を反映するハイドロキシプロリンの量も、組織標本での皮膚から皮下の厚さを反映して、TSK にみられた増加は抗 CD20 抗体の新生児からの投与によって、容量依存性に減少がみられたが、生後8週から投与した場合には有意な影響がみられなかった (図 1C)。

3) 自己抗体の産生への影響

新生児期より CTL Ab を投与した TSK マウスでは、生後8週にて IgG 型および IgM 型の抗 topoisomerase I 抗体、IgM 型の抗 ss-DNA 抗体、リウマトイド因子などの自己抗体が CTL Ab を投与した野性型マウスよりも有意に高値を示した。IgG 型の抗 ss-DNA 抗体は両群間に有意な差を認めなかった。抗 CD20 抗体を投与した TSK では容量依存性にこれらの自己抗体の産生低下が認められた (図 2A)。しかし、生後8週より抗 CD20 抗体を投与した場合には、生後16週の時点で TSK にみられる自己抗体の産生に有意な影響がみられなかった (図 2B)。

3) 免疫グロブリンの産生

新生児期より抗 CD20 抗体を投与した TSK では、CTL Ab を投与した TSK よりも、血清中の各 isotype の免疫グロブリンの濃度が容量依存性に低下していた (図 3A)。しかし、生後8週より抗 CD20 抗体を投与した場合には、生後16週の時点で CTL Ab を投与した TSK と比べて免疫グロブリンの産生量

に有意な差がみられなかった (図 3 B)。

5) 皮膚でのサイトカインの発現

TSK における皮膚硬化の進行過程での皮膚での各種サイトカインの発現を調べるために、3 週齢の TSK の凍結皮膚における各種サイトカインの mRNA の発現を real-time RT-PCR にて検討した (図 5)。CTL Ab を投与した TSK では野性型に比べて IL-6 や IL-10 の発現が有意に亢進していた。逆に、TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 の有意な発現低下が認められた。しかしながら、生後 3 日より 20 μ g の抗 CD20 抗体を 2 週間ごとに皮下注射した TSK では、IL-6 や IL-10 の発現亢進が野性型に近い程度まで抑制され、逆に TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 の発現低下は野性型に近い程度まで増加が認められた。

D. 考案

今回の検討で、まだ皮膚硬化や自己免疫のみられない新生児期より抗 CD20 抗体を投与して末梢の B 細胞を十分に除去した場合には、皮膚硬化の進行が 43% まで抑制され、自己抗体の産生が完全に抑制された。一方で、皮膚硬化や自己抗体が出現した大人の TSK では、抗 CD20 抗体による症状の有意な改善がみられなかった。皮膚硬化の進行過程にある若い TSK では IL-6 や IL-10 などの Th2 型のサイトカインの発現が亢進、IFN- γ や IL-2 などの Th1 型のサイトカインや TNF- α が低下していたが、抗 CD20 抗体の投与によりこのようなサイトカインの偏りが是正される傾向がみられた。

本研究において、B 細胞が TSK において皮膚硬化の病態形成に重要な役割を有していることが示された。TSK において、皮膚硬化の出現前より B 細胞を除去することにより、43% まで皮膚から皮下の厚さが軽減され、コラーゲン量を反映するヒドロキシプロリンも皮膚において減少していた。抗体が少なく B 細胞除去が不完全な場合には、皮膚硬化の軽減が少なかったことから、B 細胞の数が皮膚硬化に密接に関連しているものと考えられた。我々は以前に、TSK において B 細胞の中心的な制御因子である CD19 の発現をなくした場合に、36% まで皮膚硬化が減少することを報告した (文献 2)。CD19 は B 細胞の機能に大きな影響を与えるが、B 細胞自体をなくすことで、今回の検討では皮膚硬化がより軽減したものと考えられる。しかしながら、一旦

皮膚硬化が成立した TSK では、B 細胞を除去しても皮膚硬化の有意な軽減は認められなかった。一旦線維化が生じると、現在はこれを軽減することはいかなる薬剤においても一般に困難であり、本治療法も例外ではなかった。

また、B 細胞が TSK における自己免疫の発症に大変重要であることが確認された。自己抗体の産生がみられる前から B 細胞を除去した場合には、その後の抗 topoisomerase I 抗体、抗 ss-DNA 抗体、リウマトイド因子などの自己抗体の産生は全く認められなかった。これらの結果は、TSK において CD19 の発現をなくして B 細胞の機能を低下させた我々の以前の検討と類似していた (文献 2)。近年、B 細胞は種々の自己免疫疾患において、病態に重要な役割を果たしていると考えられており (文献 3-6)、我々の結果はこれらを裏付けるものと考えられる。一旦、自己免疫の発症した大人の TSK では抗 CD20 抗体治療 2 ヶ月後の時点で自己抗体の明らかな低下はみられなかった。通常、これらの自己抗体は long-lived plasma cell により産生されると考えられている。しかし、long-lived plasma cell は CD20 を発現しないものとされ、このために抗 CD20 抗体治療によっても残存して、抗体を産生し続けるものと考えられる。一方、新生児期より抗体を投与した場合には、long-lived plasma cell に分化する前の B 細胞が消失するために、自己抗体を産生する long-lived plasma cell が残存しないのではないかと考えられる。また、TSK では成長とともに免疫グロブリンの産生が増加するが、この病態も B 細胞の異常によることがわかった。新生児から B 細胞をなくすことにより、TSK にみられる産生増加が有意に抑制された。免疫グロブリンの産生増加がみられる大人の TSK に投与した場合には、有意な影響がみられなかった。免疫グロブリンの産生においても、long-lived plasma cell が主要な働きを有しているものと考えられる。

本研究において、B 細胞除去が TSK マウスの皮膚におけるサイトカインの発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。TSK の皮膚硬化の進行時期には、IL-6 や IL-10 といった Th2 型のサイトカインの mRNA の発現亢進が認められ、一方で TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 などの Th1 型のサイトカインの発現が低下していた。すなわち、TSK では野性型に比べてサイ

トカインの発現が Th1 よりも Th2 よりに傾いていた。しかしながら、B 細胞除去した TSK では、IL-6 や IL-10 などの発現亢進と TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 の発現低下が野性型に近いレベルまで是正された。このことから、TSK において、B 細胞は皮膚におけるサイトカインの発現異常を介して皮膚硬化の病態に関与している可能性が考えられ、B 細胞を除去することで TSK にみられるサイトカインのバランス異常が是正される可能性が示唆された。今後、そのメカニズムの更なる検討が必要と思われる。

以上のように、抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法は、TSK の発症前から投与することにより、皮膚硬化、自己免疫の出現を抑制することが可能であった。また、B 細胞除去は TSK の皮膚にみられるサイトカインの発現を調節することにより、皮膚硬化の進行を阻止している可能性が示唆された。

E. 結論

発症早期からの B 細胞除去療法が、SSc の治療戦略としても有用である可能性が考えられた。

F. 文献

1. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, et al: Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000, 165:6635-43.
2. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, et al: CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002, 109:1453-62.
3. Martin F, Chan AC. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* 2004, 20:517-27.
4. Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, et al. From systemic T cell self-reactivity to

organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*. 1999, 10:451-61.

5. De Vita S, Zaja F, Sacco S, et al. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2029-33.
6. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, et al. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2580-9.
7. Uchida J, Y Lee, M, Hasegawa M, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol.* 2004;16:119-29.
8. Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 2004;199:1659-69.

G. 研究発表

1.学会発表

長谷川 稔、佐藤伸一、濱口儒人、内田純二、Thomas Tedder. 抗 CD20 抗体による治療は tight-skin mouse における皮膚硬化と自己免疫の出現を抑制する。第 34 回 日本免疫学会総会・学術大会. 平成 16 年 12 月、札幌。

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

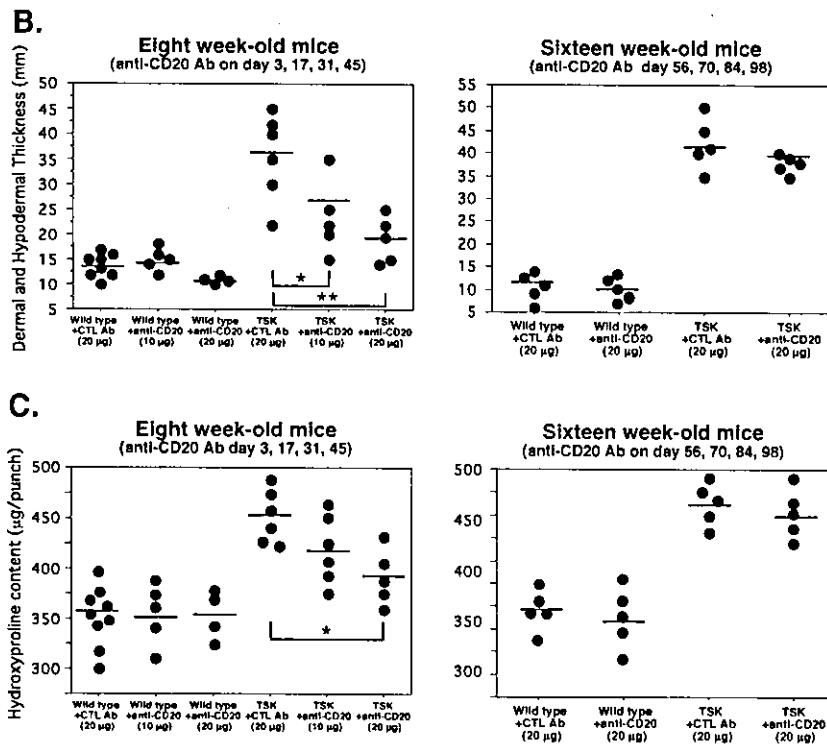
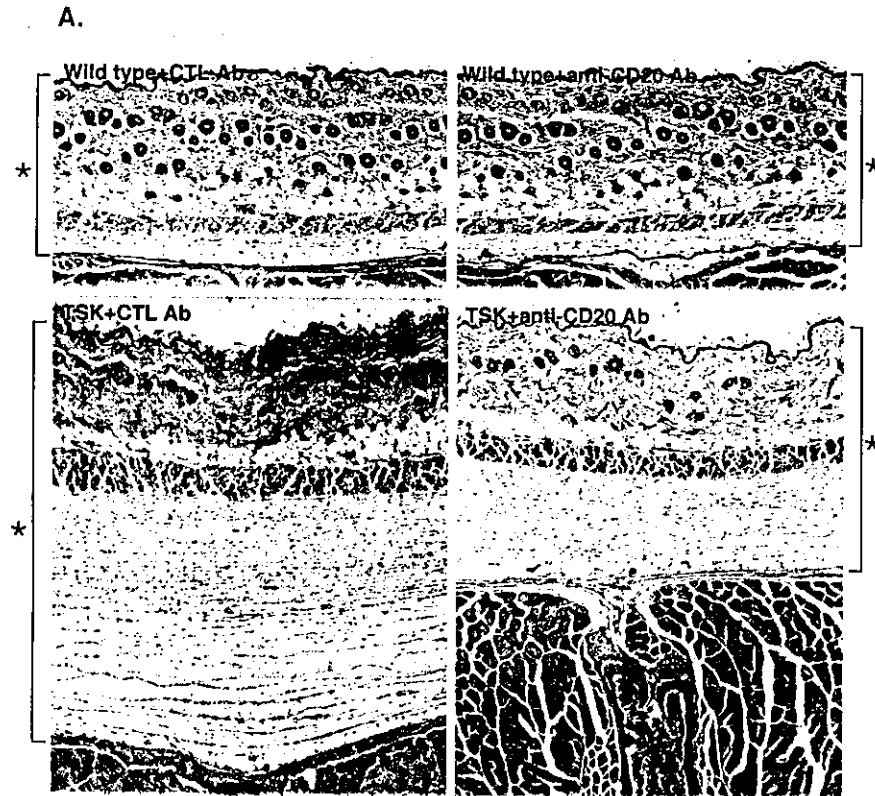


図1 生後3日より抗CD20抗体またはCTL Abを投与した生後8週の野性型またはTSKの背中の皮膚における皮膚の線維化(A~C)と生後8週より抗体を投与した生後16週での皮膚の線維化(B,C)。A) 代表的な組織標本(HE染色、 $\times 40$)。*は皮膚から皮下にかけての厚さを示す。B)各検体における皮膚から皮下にかけての厚さ。C)各検体における皮膚でのヒドロキシプロリンの含有量。

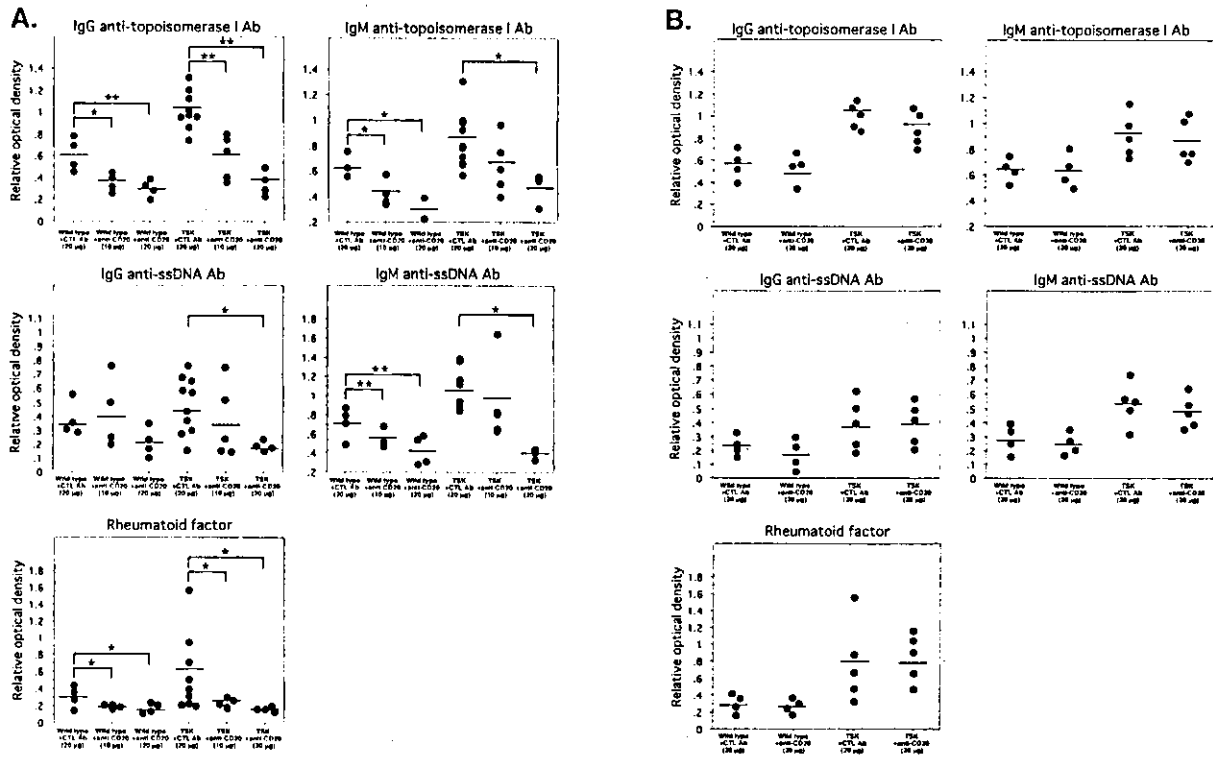


図2 野性型または TSK に CTL Ab または抗 CD20 抗体を投与した際の血清中の抗 topoisomerase I 抗体、抗 ss-DNA 抗体、リウマトイド因子を ELISA にて測定したもの。

A) 生後 3 日より抗体を投与した生後 8 週のマウス。 B) 生後 8 週より抗体を投与した生後 16 週のマウス。

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

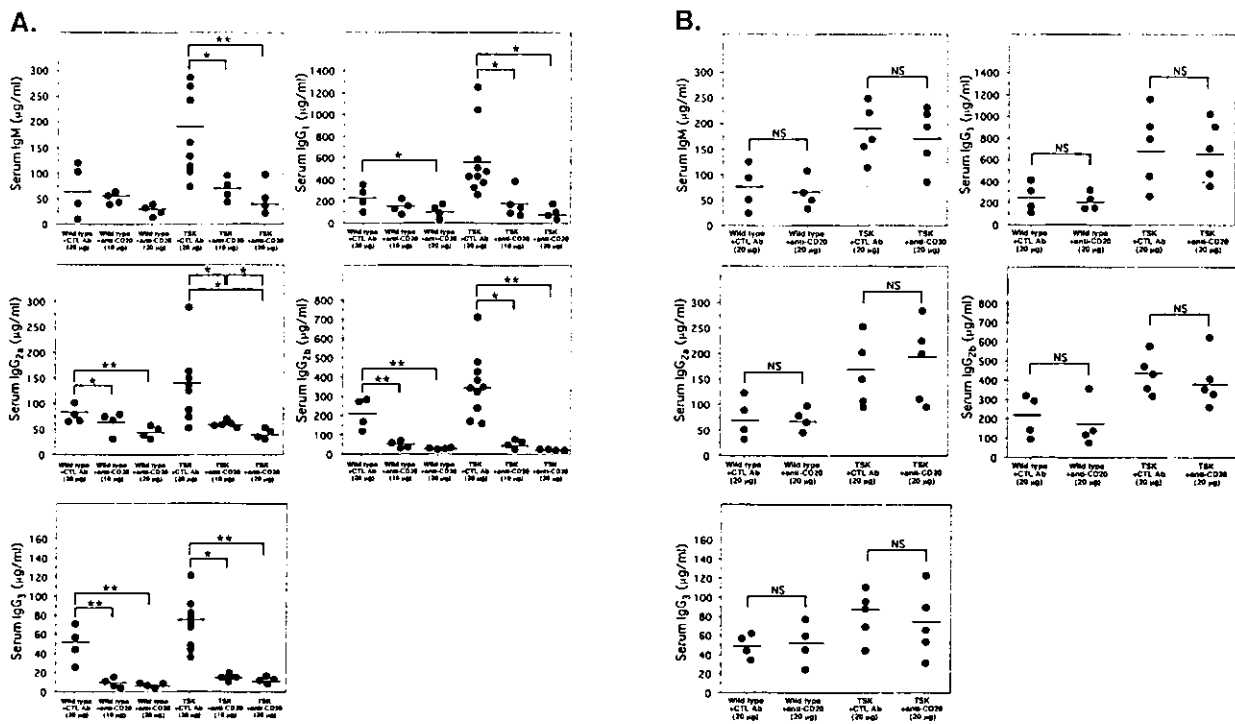


図3 野性型または TSK に CTL Ab または抗 CD20 抗体を投与した際の血清中の各アイソタイプの免疫グロブリンを ELISA にて測定したもの。

A) 生後 3 日より抗体を投与した生後 8 週のマウス。 B) 生後 8 週より抗体を投与した生後 16 週のマウス。

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

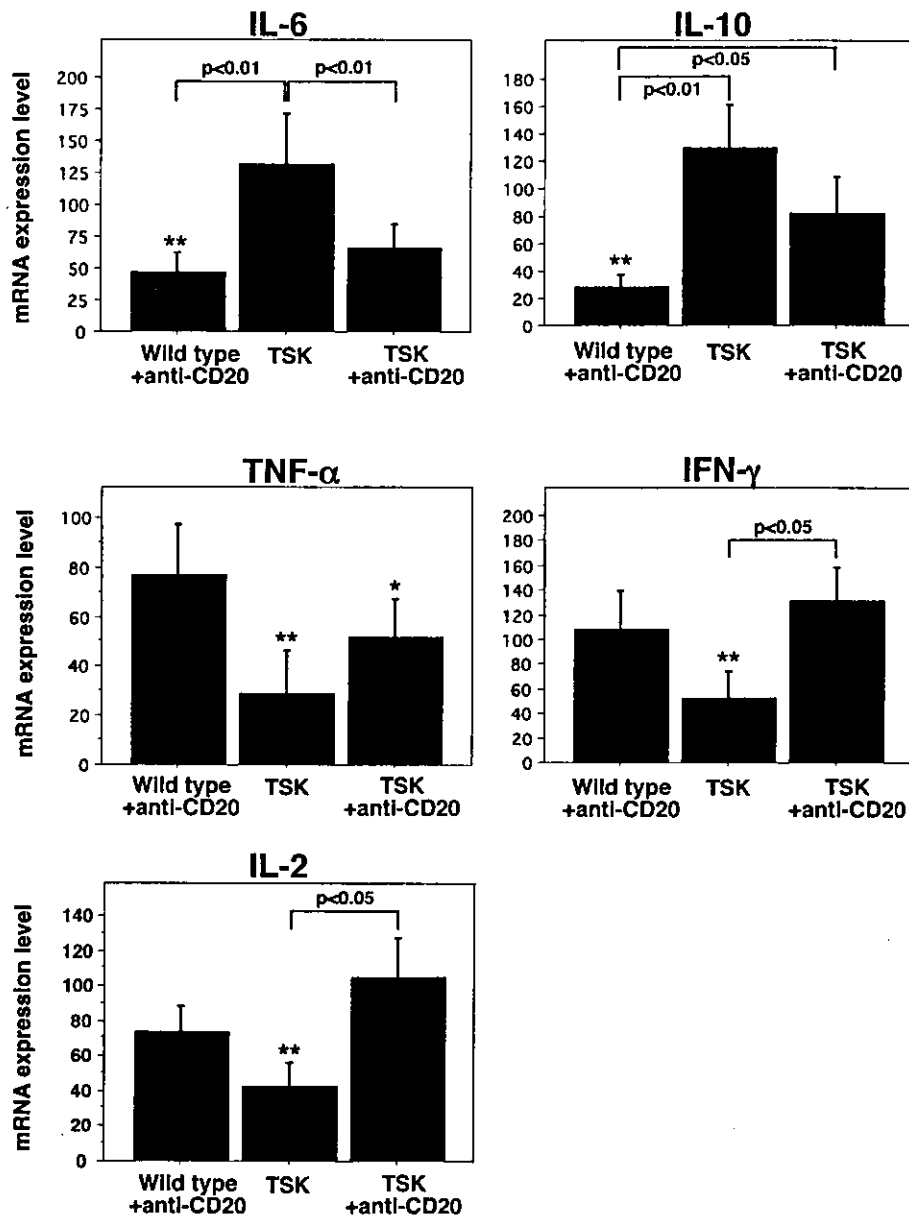


図4 生後3日より抗CD20抗体またはCTL Abを投与した3週齢の野性型またはTSKの背中の皮膚におけるIL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , 及びIL-2のmRNAの発現。mRNAはreal-time RT-PCRにて測定し、CTL Abを投与した野性型を基準にして、それに対する%を平均値+SEMで示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

全身性強皮症におけるB細胞機能分子多型の検討

研究協力者	土屋尚之	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野助教授
協力者	黒木喜美子	九州大学生体防御医学研究所 ワクチン開発構造生物学分野非常勤研究員
協力者	人見祐基	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野大学院生
研究分担者	藤本 学	東京大学大学院医学系研究科皮膚科助手
協力者	徳永勝士	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野教授
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
研究分担者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚病態学教授

研究要旨

昨年度までに強皮症との関連を報告した CD19 遺伝子プロモーター領域の単一塩基多型(SNP) -499G>Tにつき、臨床病型との関連を検討したところ、関連は抗セントロメア抗体陽性群、限局性皮膚硬化型強皮症(lcSSc)群において顕著に認められ、統計学的有意差に到達した(オッズ比 2.82, P=0.0008)。抗トポイソメラーゼI抗体陽性群、広汎性皮膚硬化型強皮症(dcSSc)群においても関連の傾向は認められたものの、有意差に到達しなかった。また、強皮症と関連する-499Tアレル陽性強皮症患者群においては、ナイーブB細胞、メモリーB細胞のいずれにおいても、-499T 陰性患者群と比較して、CD19 発現強度が有意に増強していた。以上の結果から、少なくとも一部の症例では、遺伝的に規定された CD19 発現増強自体が強皮症の発症に寄与することが示唆された。一方、B細胞の抑制型受容体であるCD22の翻訳領域の同義置換をコードするアレルが lcSSc と関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

われわれはこれまでに、ヒト全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)患者末梢血B細胞におけるCD19の発現が、ナイーブおよびメモリーB細胞のいずれにおいても増強していること(1,2)、SScモデルマウスである tight-skin マウスにおいて、CD19分子の

チロシンリン酸化と、CD19依存性B細胞シグナルの増強が見られること、CD19遺伝子欠損の導入により、皮膚病変と自己抗体産生の抑制が見られることを報告した(3)。

一方、われわれは、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)、関節リウマチ