

全身性強皮症と interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) 領域遺伝子多型の関連

研究協力者 土屋尚之 筑波大学大学院人間総合科学研究科教授
協力者 伊東郁恵 筑波大学医学群医療科学類学生
研究分担者 川口鎮司 東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター准教授
協力者 川崎 綾 筑波大学大学院人間総合科学研究科研究員
研究協力者 長谷川稔 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
研究分担者 藤本 学 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学准教授
協力者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
研究代表者 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 原まさ子 東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター教授

研究要旨

全身性強皮症発症における interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) 遺伝子の役割を検討する目的で、2つの独立な日本人患者対照群を用いて、関連研究を施行した。第1セットでは、これまでに全身性エリテマトーデスなどとの関連が報告された *IRF5* 遺伝子内および近傍の単一塩基多型7個所につき関連解析を施行し、*IRF5* の約5kb下流に位置する rs2280714 およびそれと連鎖不平衡にあり、3'非翻訳領域に位置する rs10954213 に関連あるいはその傾向が検出された。第2セットではこれら2個所について関連研究を施行したところ、同様の傾向が観察され、統合すると、rs2280714 において有意な関連が検出され（アリル頻度の比較において、 $P=0.0018$ 、オッズ比1.41、95%信頼区間1.14-1.75）、rs10954213 は rs2280714 との連鎖不平衡による二次的関連であることが示唆された。rs2280714 の関連は抗 topoisomerase I 抗体陽性群、広汎性皮膚硬化型強皮症群において顕著であった。GENEVAR データベースを用いた発現解析により、rs2280714 のリスク遺伝子型は、隣接する *TNPO3* 遺伝子よりも、*IRF5* 遺伝子の発現と良く相関することが示唆された。以上の結果から、*IRF5* 高発現と関連する SNP が全身性強皮症の疾患感受性と関連することが示された。

A. 研究目的

近年、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) をはじめとする各種自己免疫疾患における type I interferon (IFN) パスウェイの果たす役割が注目されている。全身性強皮症 (systemic sclerosis, SSc) においても、末梢血発現プロ

ファイルにおける IFN signature が報告され、SSc と type I IFN の関連が示唆された¹⁾。一方、SLE、関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) をはじめとする各種疾患において、interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) 多型の関連が報告され²⁾、原因的な意義を有することが明らかになった。

IRF5 は主として免疫系の細胞に構成的に発現し、type I IFN や炎症性サイトカイン誘導に関与する転写因子である。*IRF5* には少なくとも3個所の機能的多型が存在する。第1イントロン内に存在する単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) rs2004640 は、5' splicing donor site を形成し、exon 1B を含む splicing isoform の発現に関わり、exon 6 には10アミノ酸のinsertion/deletionが存在する。さらに、exon 9 に存在する3'非翻訳領域 (3'untranslated region, 3'UTR) に位置するrs10954213 は poly A signal を置換し、*IRF5* の mRNA レベルに直接影響する。

われわれは、日本人集団における *IRF5* と SLE との関連を検討し、日本人集団ではヨーロッパ集団とはハプロタイプ構造が異なること、ヨーロッパ集団とは異なる SNP (rs41298401) が SLE と関連することを報告した³⁾。さらに、これら以外にもいくつかの多型が原因として報告されている。

最近の研究により、*IRF5* は関節リウマチ、原発性シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎との関連が報告されていることから、*IRF5* はさまざまな自己免疫疾患の疾患感受性に関連していることが示唆される。以上の背景から、SSc の疾患感受性においても、*IRF5* 多型が関与する可能性が考えられたため、本研究では日本人 SSc と *IRF5* との関連研究を施行した。

B. 研究方法

<対象>

SSc 患者 281 名 (男 27 名および女 254 名、年齢: 43.0 ± 12.8 歳 [平均値 \pm 標準偏差])、健常者 477 名 (男 228 名および女 249 名、 34.1 ± 11.3 歳) を解析対象とするケース・コントロール関連解析を行った。

ケース・コントロール群は、金沢大学および筑波大学の共同研究による患者 106 名・健常者 290 名 (第1セット) と、東京女子医大膠原病リウマチ痛風センターの患者 175 名・健常者 187 名 (第2セット) から構成されている。これまでに *IRF5* 多型との関連の報告のある SLE およびシェーグレン症候群を合併した SSc 症例は、解析対象から除外した。

<遺伝子型決定>

対象者の末梢血からゲノム DNA を抽出し、直接塩基配列決定法およびリアルタイム PCR を用いた TaqMan genotyping assay により、過去の研究により、疾患感受性や機能的変化との関連が報告された7個所の SNP について、患者、健常者の遺伝子型を決定した。

<遺伝子型と mRNA 量の関連の検討>

rs2280714 遺伝子型と *IRF5*、transportin 3 (*TNPO3*) の mRNA 発現レベルとの関連は HapMap データベース (<http://www.hapmap.org/index.html>) と、HapMap ドナーより樹立された B 細胞株の発現プロファイルが登録されている Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/humgen/genevar/>) の GENEVAR データベースを利用し、HapMap ドナーの遺伝子型と mRNA レベルとの関連を、回帰分析により検討した。

<統計解析>

ケース・コントロール関連解析ではカイ二乗検定、Fisher の正確確率検定法を用いた。rs10954213 と rs2280714 の調整は、ロジスティック回帰分析を用いた。ハプロタイプ頻度の推定と、並べ替え検定を用いたハプロタイプの関連解析は、Haploview ソフトウェアを使用して施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、筑波大学、金沢大学、東京女子医大に

おける倫理委員会において審議され、承認をうけた研究計画に従い、遺伝子解析に関する研究参加者のインフォームド・コンセントを得、匿名化した試料を用いて施行されたため、研究の施行に倫理面の問題はないと判断された。

C. 研究結果

HapMap データベースより定法に則って選択される tagSNP は、先行研究において疾患感受性との関連が報告された SNP の多くを補足し得ないため、まず、第一セットについて、先行研究において SLE との関連が報告されている rs729302A>C、rs6953165C>G、rs2004640G>T、rs41298401C>G、rs3807306C>A、rs10954213G>A、rs2280714A>G の遺伝子タイピングを行った。-4001C>A は rs6973165 と、rs11770589 は rs10954213 と、それぞれ完全な連鎖不平衡にあり、exon 6 insertion/deletion も日本人集団においては rs10954213 と強い連鎖不平衡の関係にあるため ($r^2=0.98$ 、 $D'=0.99$)、解析対象から除外した。

図 1 に第 1 セットの健常者 290 名の遺伝子型に基づく *IRF5* SNP の連鎖不平衡プロットを示す。第 1 セットでは、アレル頻度の比較において、rs2280714 A アレルと SSc との関連の傾向が観察され ($P=0.057$, odds ratio [OR] = 1.36, 95% confidence interval [CI] : 0.99-1.87) (図 1)、優性モデルにおいては ([A/A + A/G] と G/G の比較)、有意差に到達した ($P=0.02$, OR = 2.04, 95%CI : 1.12-3.71)。また、poly A signal を置換することにより、直接機能的影響を有する rs10954213 においても、関連の傾向が観察された (アレル頻度 : $P=0.08$, OR = 1.32, 95%CI : 0.96-1.80)。

これらを確認する目的で、独立な第 2 セットにお

いて、これらの 2SNPs について関連解析を行った。第 2 セットにおいては、rs2280714 の関連は、アレル頻度においても有意差に到達し ($P=0.013$, OR = 1.45, 95%CI:1.08-1.95)、rs10954213 の関連傾向も再現された ($P=0.080$, OR = 1.30, 95%CI : 1.08-1.74)。

次に、第 1 セットと第 2 セットの結果を DerSimonian-Laird 法により統合すると、rs2280714 (アレル頻度 : $P=0.0018$, OR = 1.41, 95%CI : 1.14-1.75)、rs10954213 (アレル頻度 : $P=0.015$, OR = 1.31, 95%CI : 1.05-1.62) いずれにおいても有意な関連が確認された。

rs2280714 と rs10954213 の間には連鎖不平衡が見られたため ($r^2=0.769$)、この 2 つの SNPs のどちらが原因であるかを、ロジスティック回帰分析を用いて検討した。rs10954213 で調整した場合にも rs2280714 には統計学的有意差が検出された ($P=0.018$) 一方、rs2280714 で調整した場合には、rs10954213 の関連は消失した ($P=0.339$)。以上の結果から、rs10954213 の関連は、rs22804213 との連鎖不平衡による二次的な関連である可能性が支持された。

次に rs2280714 遺伝子型と臨床病型との関連について検討した (表 1)。rs2280714 遺伝子型は、dcSSc、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性群で関連が観察されたものの、lcSSc、抗セントロメア抗体陽性群では関連は観察されなかった。

rs2280714 は *IRF5* よりも *TNPO3* に近い場所に位置しているため、いずれの遺伝子の発現にも影響を及ぼす可能性がある。そこで、HapMap データベースと GENEVAR データベースを利用し、遺伝子型と mRNA レベルとの関連を検討した (図 2)。rs2280714 遺伝子型は、*IRF5* の mRNA レベルの発現量と強い関連が認められたのに対し ($r^2=0.447$, P

= 1.02×10^{-12} , slope = 0.51)、*TNPO3* mRNA レベルとは弱い関連が検出されたのみであった ($r^2 = 0.056$, $P = 0.025$, slope = -0.071)。

D. 考案

今回の研究により、*IRF5* 下流の SNP rs2280714 と SSc の関連が検出された。臨床病型別の解析では、dcSSc および抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性群において、顕著な関連が認められた。さらに、リスクアリルである A アリルは、*IRF5* mRNA レベルの上昇と関連していた。ごく最近、フランスのグループが、*IRF5* intron 1 rs2004640 と SSc との関連を報告した⁶⁾。彼らはこの 1 個所のみを解析しかしていないため、本研究との関連 SNP の違いが集団差によるものか否かについては今後の検討が必要であるが、これらの結果から、ほかのリウマチ性疾患と同様、SSc においても、*IRF5* が遺伝素因に関連することが明らかにされた。本研究は、SSc の病因論に新たな知見を提供するものと考えられる。

抗トポイソメラーゼ I 抗体を含む血清が、正常な末梢血単核球から IFN α を誘導するとの報告がみられるが、今回の結果において、*IRF5* 多型は dcSSc と抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性群において強い関連が観察されたことから、*IRF5* は抗トポイソメラーゼ I 抗体の産生に関わっている可能性も考えられる⁴⁾。

Type I IFN 治療により、SSc を発症した多発性硬化症の症例が報告されているが⁵⁾、本研究は、*IRF5* の過剰発現が SSc において重要な役割を果たしている可能性を示すのみならず、type I IFN が SSc の病因となる可能性を支持している。もし、この仮説が正しければ、type I IFN が SSc 治療の分子標的になる可能性が提唱される。

今後、SSc と *IRF5* の関連の分子機構の解明が必要である。

E. 結論

全身性強皮症の疾患感受性と *IRF5* 高発現と関連する遺伝子多型との関連が示された。

F. 文献

1) Tan FK, Zhou X, Mayes MD, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis. *Rheumatology* 2006; 45: 694-702.

2) Kyogoku C, Tsuchiya N. A compass that points to lupus: genetic studies on type I interferon pathway. *Genes Immun.* 2007; 8: 445-55.

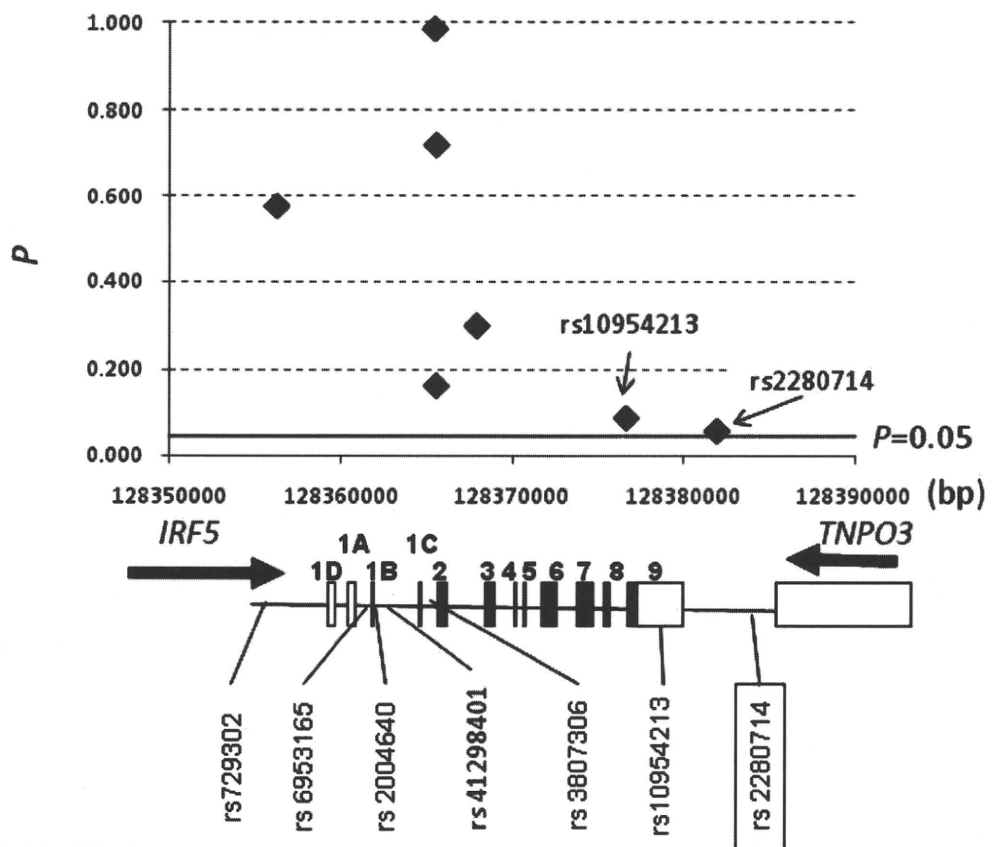
3) Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, et al. Association of *IRF5* polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Support for a crucial role of intron 1 polymorphisms. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 826-34.

4) Kim D, Peck A, Santer D, et al. Induction of interferon- α by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I. Association of higher interferon- α activity with lung fibrosis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2163-73.

5) Hügle T, Gratzl S, Daikeler T, et al. Sclerosing skin disorders in association with multiple sclerosis. Coincidence, underlying autoimmune pathology or interferon induced? *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 47-50.

6) Dieudé P, Guedj M, Wipff J, et al. Association

第一セットにおける関連解析



連鎖不平衡プロット

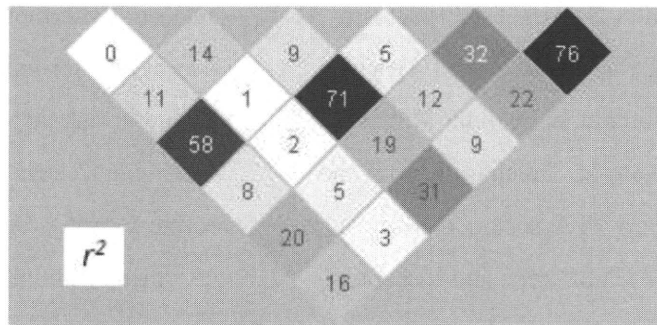


図1：第1セットの患者対照群における *IRF5* 領域 7 SNPs の関連解析の結果。
 上にアレル頻度を用いて計算した P 値を、下に日本人健常対照群に基づいて作成した連鎖不平衡プロットを示す。矢印は *IRF5* および *TNPO3* それぞれの転写の方向性を示す。
TNPO3 は、もっとも 3' 側の exon のみを示す。

between the *IRF5* rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: A new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2008; 60: 225-233.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Miyashita R, Hikami K, Kusaoi M, Tokunaga K, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Tsuchiya N. Association of *IRF5* polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Support for a crucial role of intron 1 polymorphisms *Arthritis Rheum* 2008; 58: 826-834.
2. Hikami K, Ehara Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita M, Oka T, Takehara K, Sato S, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of IL-10 receptor 2 (IL10RB) SNP with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 403-407.
3. Kawaguchi Y, Ota Y, Kawamoto M, Ito I, Tsuchiya N, Sugiura T, Katsumata Y, Soejima M, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kuwana M, Yamanaka H, Hara M. Association study of a polymorphism of the CTGF gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis* published online 3 Dec 2008; doi: 10.1136/ard.2008.100586

2. 学会発表

1. 氷上光輝、長谷川稔、松下正毅、藤本学、竹原和

彦、佐藤伸一、土屋尚之：全身性強皮症とIL10RB 遺伝子多型の関連。第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、札幌、2008年4月20日-23日。

2. 伊東郁恵、川崎綾、長谷川稔、氷上光輝、藤本学、竹原和彦、佐藤伸一、土屋尚之：全身性強皮症と *IRF5* 領域遺伝子多型の関連。第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会、札幌、2008 年 4 月 20 日-23 日。
3. Hikami K, Ehara Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita M, Oka T, Takehara K, Sato S, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of interleukin-10 receptor 2 gene (IL10RB) polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis. 2008 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 27, 2008, San Francisco. (*Arthritis Rheum* 2008; 58(Suppl), S591.)
4. Ito I, Kawasaki A, Hikami K, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Tsuchiya N. A single nucleotide polymorphism associated with expression of interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) is a genetic risk factor for systemic sclerosis. 2008 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 27, 2008, San Francisco. (*Arthritis Rheum* 2008; 58(Suppl), S590.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. rs2280714 と全身性強皮症との関連解析

	パネル	A アリル頻度	アリル頻度の関連解析	
			オッズ比 (95% 信頼区間)	P
SSc	第1セット	0.58	1.36 (0.99-1.87)	0.057
	第2セット	0.60	1.45 (1.08-1.95)	0.013
	統合		1.41 (1.14-1.75)	0.0018
dcSSc	第1セット	0.58	1.34 (0.82-2.18)	0.240
	第2セット	0.66	1.86 (1.31-2.63)	4.92E-04
	統合		1.65 (1.22-2.24)	0.0013
lcSSc	第1セット	0.59	1.37 (0.94-2.00)	0.098
	第2セット	0.51	1.03 (0.70-1.51)	0.899
	統合		1.19 (0.90-1.59)	0.230
anti-topo I +	第1セット	0.56	1.24 (0.69-2.25)	0.473
	第2セット	0.65	1.80 (1.19-2.74)	0.0054
	統合		1.59 (1.13-2.25)	0.0084
anti-centromere +	第1セット	0.58	1.36 (0.90-2.07)	0.148
	第2セット	0.53	1.08 (0.66-1.76)	0.771
	統合		1.23 (0.90-1.70)	0.198
controls	第1セット	0.49		
	第2セット	0.49		

第1セット、第2セットおよびこれらの結果を DerSimonian-Laird 法により統合した結果を示す。
 SNP rs2280714 の A アリル頻度が、特に dcSSc 群、抗 topoisomerase I 抗体陽性群において、有意に増加していた。

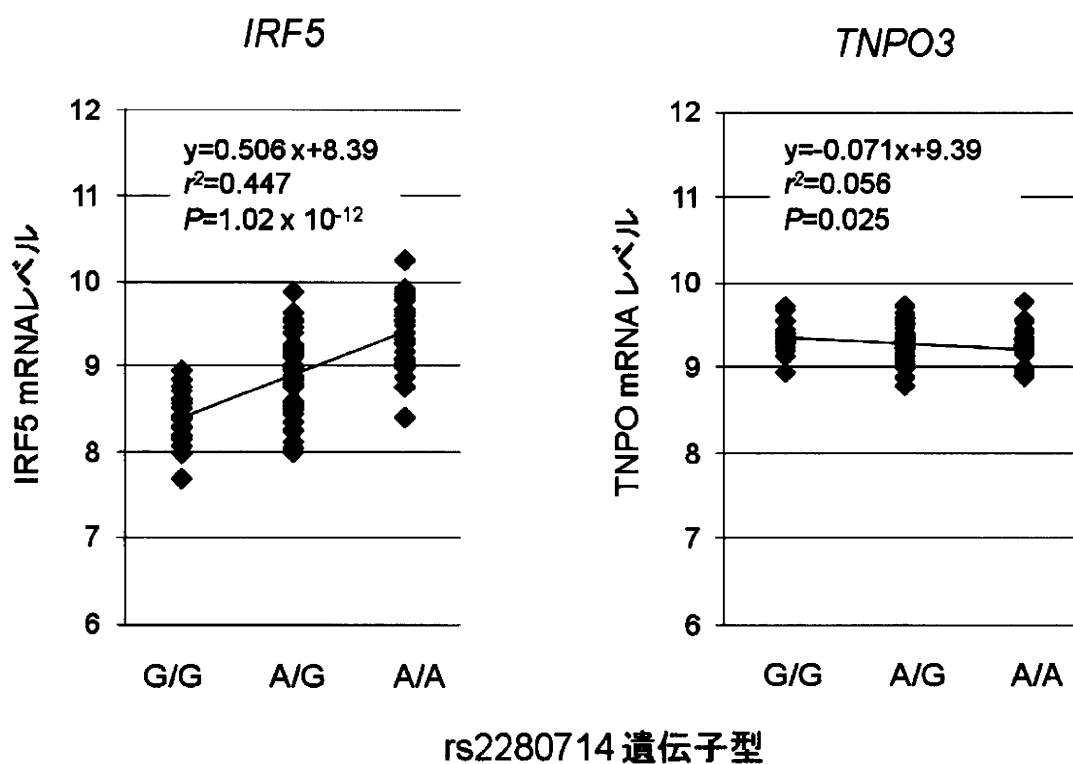


図2：SNP rs2280714 遺伝子型と *IRF5*, *TNPO3* mRNA レベルとの関連。
 HapMap ドナーの B 細胞株の mRNA 発現プロファイルデータベース (GENEVAR, <http://www.sanger.ac.uk/humgen/genevar/>) を用い、rs2280714 遺伝子型と *IRF5* および *TNPO3* mRNA レベルとの相関を回帰分析により検討した。*IRF5* 発現量との強い相関が検出されたのに対し、*TNPO3* とは弱い相関のみが検出された。

ブレオマイシン誘導性強皮症マウスモデルにおける inducible costimulator (ICOS)、inducible costimulator ligand (ICOSL) の役割に関する検討

研究協力者 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 田中千洋 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学
協力者 濱口儒人 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 講師
研究分担者 藤本 学 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 准教授
研究代表者 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 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

ブレオマイシン (BLM) 誘導性強皮症モデルにおける、inducible costimulator (ICOS) とそのリガンドである inducible costimulator ligand (ICOSL) の役割を検討した。BLM を気管支内、皮下に投与した所、ICOS^{-/-} マウスでは、野生型マウスに比べて局所のサイトカイン、ケモカインが減少して肺や皮膚の炎症や線維化が軽快し、生存期間が延長した。一方、ICOSL^{-/-} マウス、ICOS^{-/-} ICOSL^{-/-} マウスでは局所の TNF- α が増加して肺や皮膚の炎症や線維化が悪化し、生存期間が短縮した。興味深いことに、ICOS^{-/-} マウスでは、CD14 陽性マクロファージや B220 陽性 B 細胞における ICOSL の発現が野生型マウスに比べ有意に増加し、ICOSL^{-/-} マウスでは CD4 陽性 T 細胞での ICOS の発現が著明に増加していた。マクロファージや B 細胞に発現する ICOSL の発現量が、肺や皮膚の重症度と負の相関を示すものと考えられ、現在その詳しい機序について検討中である。以上より、BLM による強皮症マウスモデルにおいて、ICOS は炎症や線維化を促進し、ICOSL は抑制に働いている事が示された。

A. 研究目的

全身性強皮症などの膠原病では、自己抗体の産生がみられることなどから、T 細胞や抗原提示細胞などによる獲得免疫が重要な役割を果たしていると考えられている。獲得免疫における T 細胞と抗原提示細胞の相互作用に重要な補助分子として inducible costimulator (ICOS) と inducible costimulator ligand (ICOSL) があり、ICOS と ICOSL は現在知られている唯一のリガンド同士である¹⁾。ICOS は T 細胞にのみ発現するのに対し、ICOSL はマクロファージ、B 細胞、樹状細胞などの抗原提示細胞以外に

も、繊維芽細胞や肺胞上皮細胞、血管内皮細胞などにも発現するとされる²⁾。ICOS、ICOSL 軸は獲得免疫での役割のみが検討されてきたが、ICOSL はマクロファージなどの自然免疫に働く細胞や、繊維芽細胞や上皮細胞にも発現している。さらに、ICOS-ICOSL 軸は一般に線維化に関与すると考えられている Th2 サイトカインの産生に重要な働きを有することが知られている²⁾。近年、強皮症などの膠原病においても、獲得免疫だけでなく自然免疫の病態への関与が指摘されてきている³⁾。このため、ICOS や ICOSL が、強皮症の病態における、自然免疫、獲

得免疫、線維化などに関与している可能性は否定できない。今回我々は ICOS、ICOSL のいずれかが、あるいは両方を欠損したマウスを使用して、ブレオマイシン (BLM) 誘導性強皮症モデルにおける ICOS、ICOSL の役割について検討したので報告する。

B. 研究方法

1) マウス

C57BL/6 background の ICOS^{-/-} マウス、ICOSL^{-/-} マウスを Jackson 社から購入して繁殖した。また、これらの 2 系統を掛け合わせて、ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} マウスを作成した。対象コントロールとして、Jackson 社から購入した C57BL/6 野生型マウスを使用した。6~8 週齢の雌のマウスを用い、BLM を生理食塩水に 1 mg/ml となるように溶解して気管支内に 150~200 μ l を投与、もしくは腰背部の皮下に 300 μ l を連日 4 週間投与した⁴⁾。コントロールとして生理食塩水のみを同様の方法で投与した。

2) 病理組織学的検討

気管支内投与した群では生存期間の計測を行い、それとは別に 3 週間後の肺を採取した。皮下投与した群では 4 週間皮下注射後の皮膚と肺を採取した。Hematoxylin-Eosin 染色、Azan-Mallory 染色、Masson-Trichrome 染色を行い線維化の程度を評価した。肺の線維化は、Aschcroft らにより提唱された重症度スコア⁵⁾ を用いて、皮膚の線維化は真皮の厚さで定量的に測定した。

3) 浸潤細胞の評価

マウスに対する抗 F4/80 抗体、抗 B220 抗体、抗 CD3 抗体、抗 MPO 抗体、抗 α -SMA 抗体を用いて、肺や皮膚のパラフィン切片を免疫染色した。それぞれの検体の 5 つの切片につき、陽性細胞数を 400 倍の拡大率で 5 視野をランダムに選び測定し、1 視野

あたりの平均を算出した。

4) サイトカイン、ケモカインの測定

摘出した肺全体と 300 μ l の蛋白溶解液 (10 mmol/L PBS, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Nonidet P-40, 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid)⁶⁾ をよく攪拌し、15000 rpm、15 分間の遠心後、上清を採取した。この上清中の TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-6、IL-10、IL-12 の濃度を CBA キットを用いて測定した。また、各検体 (上清) における蛋白濃度を protein assay キットを用いて測定し、得られたサイトカイン、ケモカインの濃度を蛋白濃度で割った値をサイトカイン、ケモカインの相対的な濃度として解析に用いた。

5) 気管支肺胞洗浄液中の細胞における ICOS、ICOSL の発現

BLM 気管支内投与 7 日後のマウスから気管支肺胞洗浄液を採取した。採取した細胞をマウスに対する抗 CD4 抗体、抗 CD14 抗体、抗 B220 抗体、抗 ICOS 抗体、抗 ICOSL 抗体で蛍光免疫染色し、flow cytometry で発現量や発現細胞の数を測定した。

C. 研究成果

1) 生存率

BLM 気管支内投与後の生存期間は、ICOS^{-/-} マウスでは野生型マウスよりも延長していたが、意外にも ICOSL^{-/-} と ICOS^{-/-} ICOSL^{-/-} マウスは逆に短縮していた。21 日目時点の生存率の比較では、野生型マウスの 36% に比べて ICOS^{-/-} マウスが 60% と有意に高く、ICOSL^{-/-} マウスと ICOS^{-/-} ICOSL^{-/-} マウスではそれぞれ、15%、18% と有意に低かった (図 1)。

2) 線維化の評価

野生型マウスにおいて、高容量の BLM を連日皮

下投与することにより、皮膚だけでなく肺にも、気管支内1回投与と同様の線維化が生じる事が確認できた。気管支内投与により生じた肺の線維化、皮下投与により生じた肺、皮膚の線維化は、いずれも野生型マウスに比べICOS^{-/-}マウスで軽症であり、ICOSL^{-/-}マウス、ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-}マウスでは重症であった(図2、3)。気管支内投与よりも皮下注射の方が、左右差や個体差の少ない間質性肺炎が誘導できたので、以下の肺の実験にはことわりのない限り、皮下注射の系を用いた。肺の線維化の指標であるAshcroftらによる肺の線維化スコアにおいても野生型マウスに比べICOS^{-/-}マウスは有意に低いスコアであり、ICOSL^{-/-}マウス、ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-}マウスでは有意に高いスコアを示した。真皮の厚さにおいても同様の傾向を認めた(図4)

3) 浸潤細胞数の推移

肺の組織に浸潤しているF4/80陽性マクロファージ、B220陽性B細胞、CD3陽性T細胞、MPO陽性好中球は、野生型マウスで7日目から増加していた。ICOS^{-/-}マウスでは、野生型に比べてマクロファージ、B細胞、T細胞、好中球の細胞浸潤はいずれもほとんどの経時的なポイントで減少していた。一方、ICOSL^{-/-}マウス、ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-}マウスでは野生型マウスよりも細胞浸潤は増加する傾向にあり、特に7日目で顕著であった。

皮膚では、野生型マウスにおけるマクロファージ、T細胞、好中球の浸潤は7日目から増加していた。肺と同様にICOS^{-/-}では野生型よりも浸潤細胞は少なく、ICOSL^{-/-}マウス、ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-}マウスでは増加している傾向にあり、特に7日目では著明に浸潤細胞数が増加していた。(図5、6)

4) 組織蛋白抽出液中のサイトカインやケモカインの濃度

野生型マウスに比べ、ICOS^{-/-}マウスではTNF- α 、MCP-1、IFN- γ 、IL-6、IL-10が減少していたが、ICOSL^{-/-}マウス、ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-}マウスではTNF- α が増加していた(図7)。IL-12はいずれの系統でも野生型と差がなかった。

5) マクロファージ、B細胞におけるICOSLの発現とT細胞におけるICOSの発現

気管支内投与後の、BAL中の細胞におけるICOSとICOSLの発現をフローサイトメトリーで測定した。興味深いことに、BLM1回投与7日目の時点で、ICOS^{-/-}マウスでは、CD14陽性マクロファージ、B220陽性B細胞でのICOSLの発現が野生型マウスに比べてそれぞれ223%、306%に増加していた。一方、ICOSL^{-/-}マウスでは、CD4陽性T細胞でのICOSの発現が野生型マウスに比べ364%と著明に亢進していた。ICOS、ICOSLはいずれもday7の時点で最も発現が亢進していた(図8)。

D. 考案

ICOSとICOSLは、現在知られている唯一のリガンド同士であり、それぞれ欠損マウスは同じ表現型をとると考えられている⁷⁾。ICOSはT細胞、特にメモリーT細胞に発現し、一方ICOSLはB細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞に主として発現する。これらのICOS-ICOSL軸を介して、Th2サイトカインの産生や抗体産生に重要な働きを有する1,2ことから、ICOSとICOSLが強皮症の線維化や自己抗体の産生に関与しているのではないかという仮説のもとに本研究を開始した。しかし、ICOS^{-/-}マウスでは、予想したように肺や皮膚の炎症や線維化が軽快して生存期間が延長したのに対し、ICOSL^{-/-}マウスやICOS^{-/-}ICOSL^{-/-}マウスでは逆に炎症や線維化が悪化して、生存期間が短縮した(図

1~5)。獲得免疫が関与する多発性硬化症モデルでは、induction phase で ICOS に対するブロッキング抗体を投与すると増悪し、effector phase で投与すると軽症化するという報告がある^{8,9)}。また、同じく獲得免疫のモデルである関節リウマチモデルでは ICOS L の中和抗体の投与により、関節炎や抗体産生が抑制されることが報告されている¹⁰⁾。しかし、ICOS と ICOSL の役割は同一視されているため、これまで ICOS と ICOSL を同時にブロックしたり、ICOS^{-/-} マウスと ICOSL^{-/-} マウスでの症状の違いを比較した報告は見つからない。

膠原病においては、従来より獲得免疫が重要な役割を果たしていると考えられているが、近年では他の膠原病だけでなく全身性強皮症においても、toll-like receptor (TLR) などを介する自然免疫系もその病態に重要な影響を及ぼす事が示唆されている³⁾。BLM 誘導性強皮症モデルは、抗原特異的な疾患誘発モデルではなく、BLM が直接に、あるいは BLM により誘導されたアポトーシス細胞やヒアルロン酸分解物などが TLR を介してマクロファージなどの自然免疫担当細胞を活性化し、炎症や線維化を促進するサイトカインやケモカインの産生を誘導するものと考えられている^{11,12)}。今回の結果からは、自然免疫においては、ICOSL が ICOS-ICOSL 軸を介さない作用を有している可能性が考えられた。実際、ICOS は T 細胞のみに発現するが、ICOSL は自然免疫において重要な役割を担っているマクロファージや樹状細胞にも発現している。また、興味深いことに ICOS^{-/-} マウスではマクロファージや B 細胞における ICOSL が高発現し、ICOSL^{-/-} や両方を欠損したマウスでは、T 細胞上の ICOS の発現が劇的に増加していた (図 7)。ICOSL の発現が亢進している ICOS^{-/-} マウスでは炎症や線維化は軽度であり、

ICOS の発現が亢進している ICOSL^{-/-} マウス、ともに発現していない ICOS^{-/-} ICOSL^{-/-} マウスでは炎症、線維化とも増強した (図 1~6)。つまり、重症度は T 細胞における ICOS の発現ではなく、マクロファージや B 細胞における ICOSL の発現量と逆相関していた。このことから、著者らは ICOSL が ICOS を介さない役割を自然免疫においては有しているのではないかと考えている。最も考えられる機序としては、ICOSL が BLM により産生されたアポトーシス細胞やヒアルロン酸分解産物による TLR のシグナルを負に制御して、細胞の活性化や炎症・線維化に関わるサイトカインやケモカインの産生を抑制するというものである。マクロファージや B 細胞に発現する ICOSL が、発現細胞の活性化や TLR のシグナルに影響を及ぼすかどうかについては現時点ではわかっていない。しかし、ICOSL は TLR ligand により発現が低下することという報告¹³⁾もあり、ICOSL と TLR との間に相互作用が存在する可能性は否定できない。

今後、BLM 投与後に、ICOSL の発現量がマクロファージや B 細胞の活性化、サイトカイン・ケモカインの産生、および TLR のシグナルにどのような影響を及ぼすか検討する予定である。また、BLM により自己抗体産生が誘導されることが知られており¹²⁾、それに対する影響も検討したい。

E. 結論

ブレオマイシンによる強皮症マウスモデルにおいて、ICOS は炎症や線維化を促進し、ICOSL は抑制に働いている可能性が示された。

F. 文献

1. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento

- U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*. 1999; 402: 827-832
2. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 515-548
3. Fineschi S, Goffin L, Rezzonico R, Cozzi F, Dayer JM, Meroni PL, Chizzolini C. Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 3913-3923
4. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol*. 1999; 112: 456-462
5. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*. 1988; 41: 467-470.
6. Mori R, Kondo T, Nishie T, Ohshima T, Asano M. Impairment of skin wound healing in beta-1, 4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. *Am J Pathol*. 2004; 164: 1303-1314
7. Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, Dong C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 14163-14168
8. Rottman JB, Smith T, Tonra JR, Ganley K, Bloom T, Silva R, Pierce B, Gutierrez-Ramos JC, Ozkaynak E, Coyle AJ. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol*. 2001; 2: 605-611
9. Sporici RA, Beswick RL, von Allmen C, Rumbley CA, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Perrin PJ. ICOS ligand costimulation is required for T-cell encephalitogenicity. *Clin Immunol*. 2001; 100: 277-288
10. Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. *J Immunol*. 2002; 169: 4332-4339
11. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1996; 271: 17771-17778
12. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol*. 2008; 172: 1650-1663
13. Farina C, Theil D, Semlinger B, Hohlfeld R, Meinel E. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol*. 2004; 16: 799-809

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

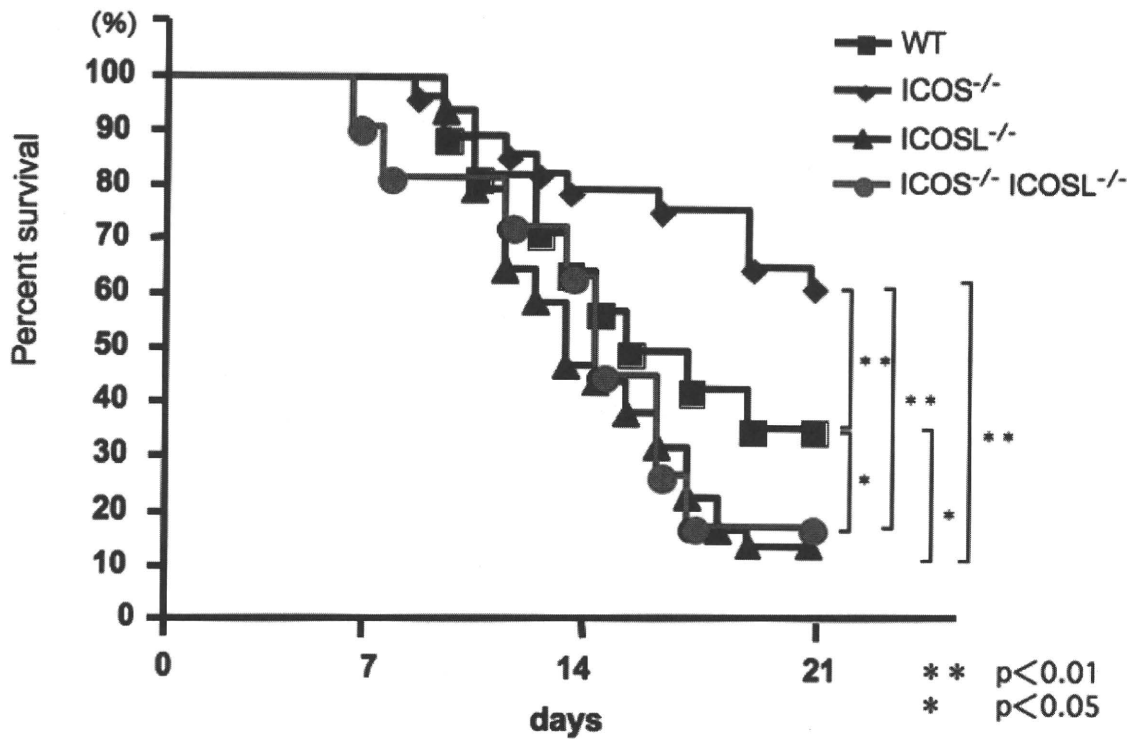


図1：プレオマイシン気管支内投与後の生存曲線。

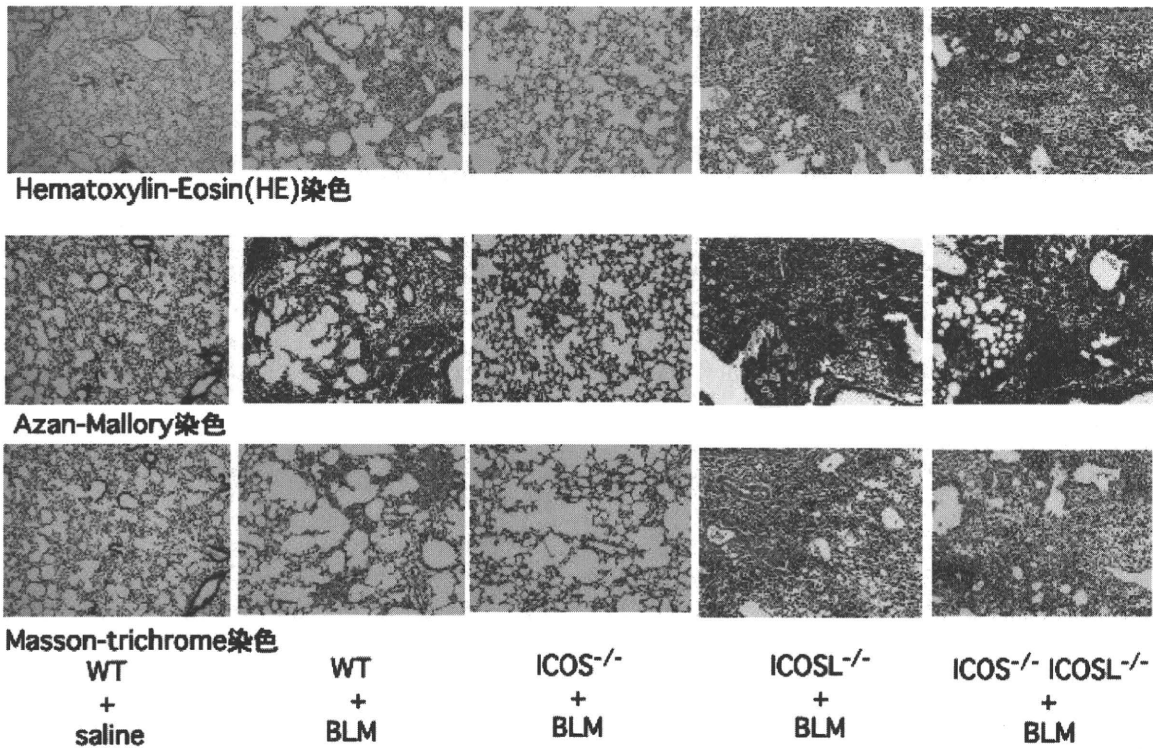


図2：プレオマイシン気管支内投与21日後の肺の病理組織像と Ashcroft らによる肺線維化スコア。

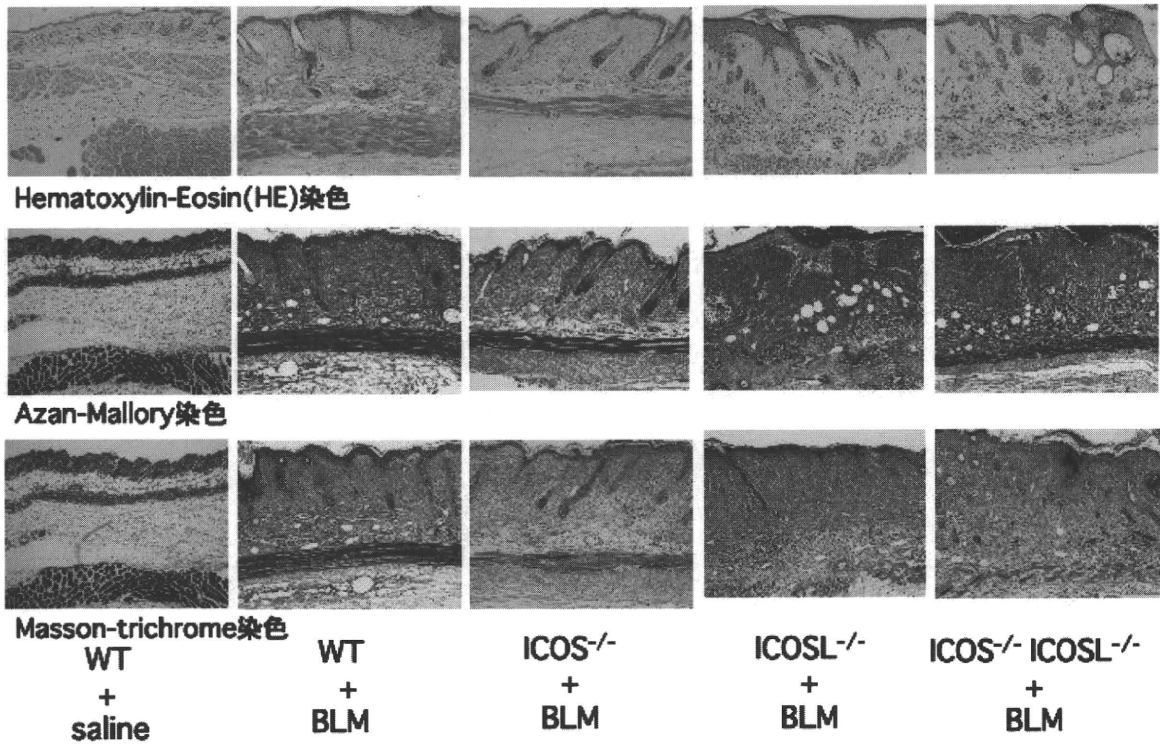
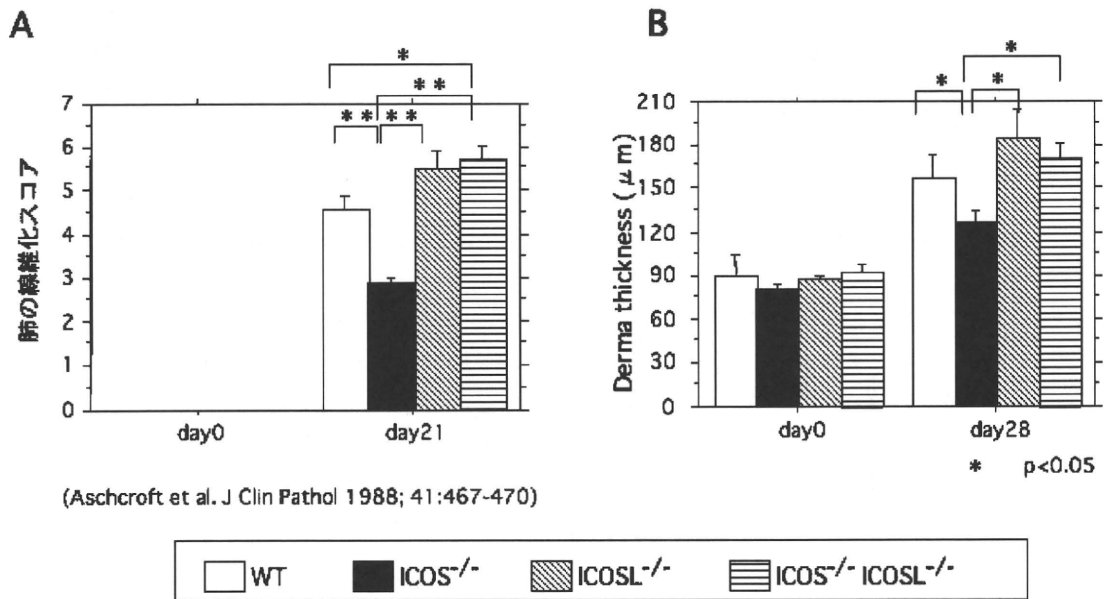


図3：ブレオマイシン皮下投与28日後の皮膚の病理組織像と真皮の厚さ。



(Aschcroft et al. J Clin Pathol 1988; 41:467-470)

図4：A 肺の線維化スコア、B 真皮の厚さ

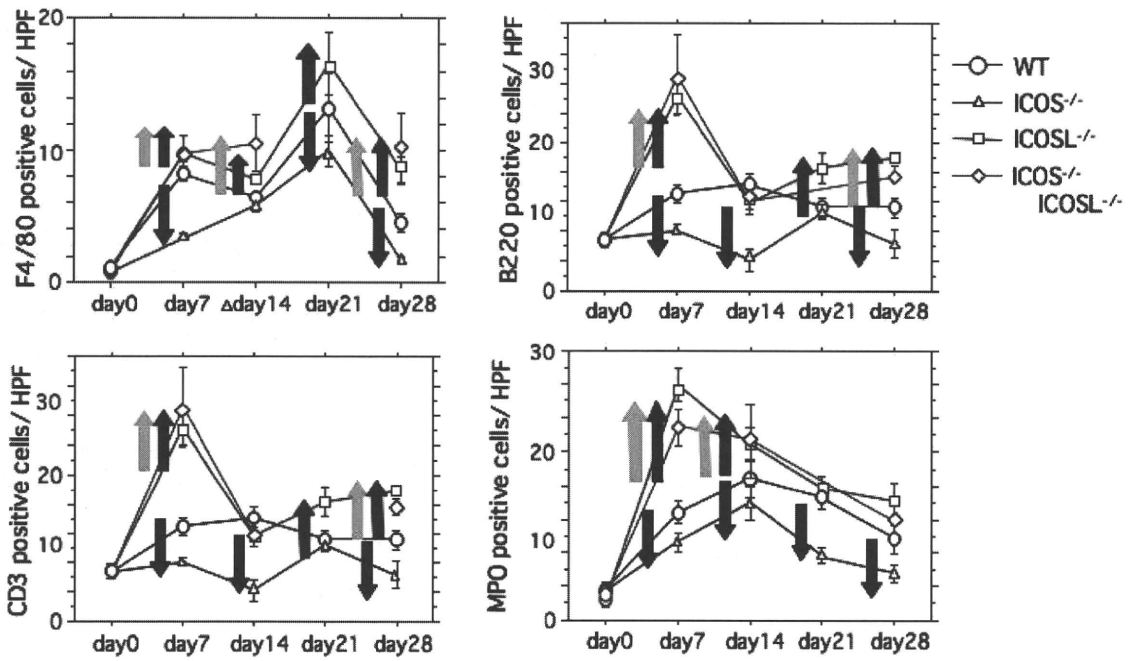


図 5：肺の浸潤細胞数の推移

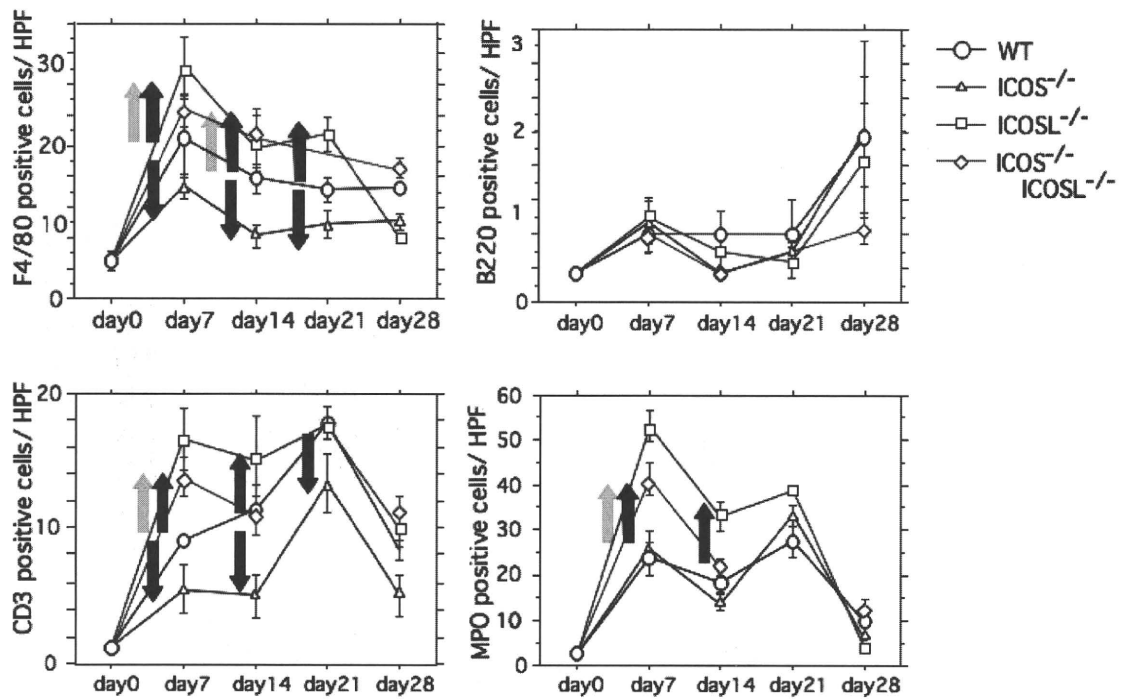


図 6：皮膚の浸潤細胞数の推移

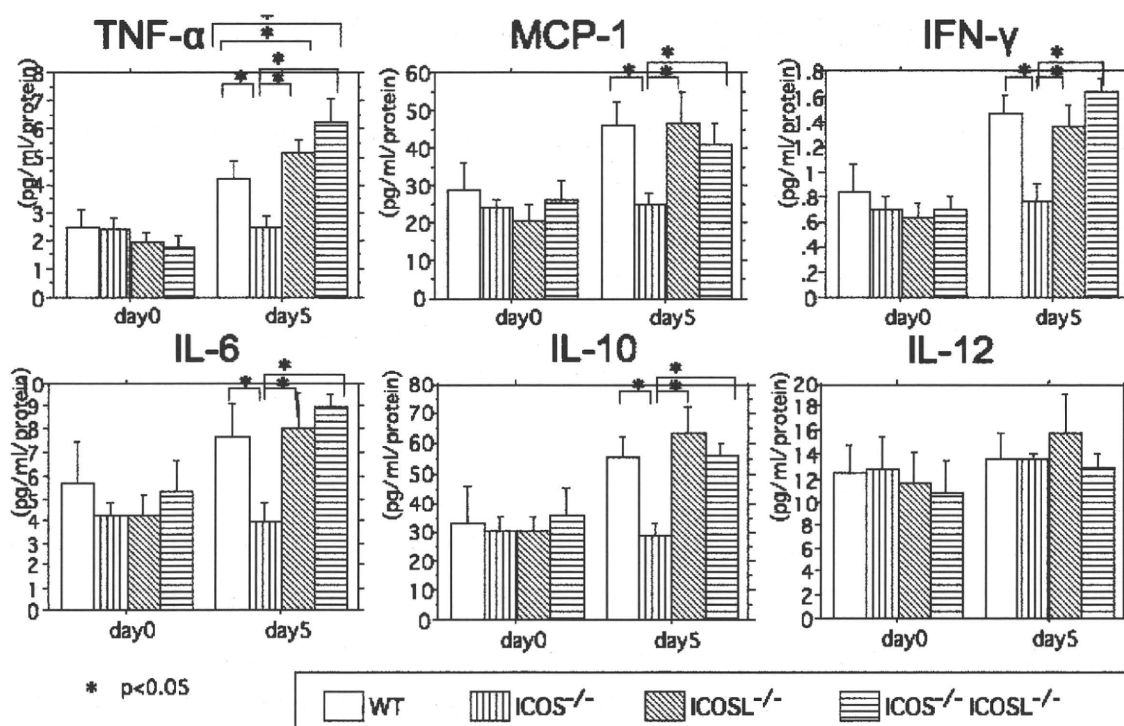


図7：肺の蛋白抽出液中のサイトカイン、ケモカインの濃度

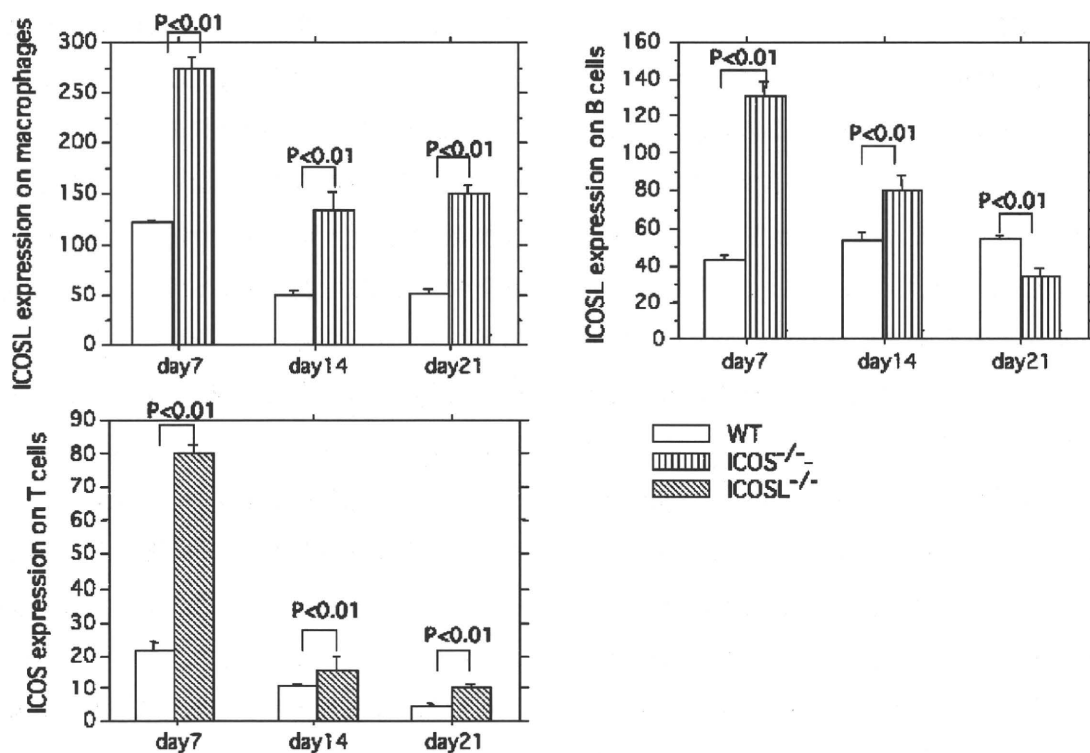


図8：気管支肺胞洗浄液中のマクロファージ、B細胞におけるICOSLの発現とT細胞におけるICOSの発現

全身性強皮症患者における制御性 B 細胞の解析

研究分担者 藤本 学 金沢大学医薬保健研究域医学系血管新生・結合組織代謝学（皮膚科）
准教授

協力者 松下貴史 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 助教

研究協力者 長谷川稔 金沢大学医学部附属病院皮膚科 講師

協力者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

研究代表者 佐藤伸一 東京大学医学部附属病院皮膚科 教授

研究要旨

制御性 B 細胞は IL-10 産生を介して過剰な免疫反応や炎症を抑制する。これまでは自己免疫疾患モデルマウスを用いて制御性 B 細胞の機能解析が進められてきた。今回、ヒトでの制御性 B 細胞の測定法を開発し、強皮症患者と健常人の末梢血中の制御性 B 細胞を測定したところ、強皮症患者では制御性 B 細胞が有意に減少していた。以上より、制御性 B 細胞の異常が強皮症の病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症は抗核抗体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。これまでに全身性強皮症患者の病態には B 細胞の活性化や分化の異常が示されている¹⁾。また、B 細胞の強力な活性化因子である血清 BAFF 濃度が全身性強皮症患者において上昇しており、皮膚硬化の重症度と相関していることが示されている²⁾。さらに、全身性強皮症の動物モデルマウスである Tight skin (Tsk) マウスの皮膚硬化の進展には B 細胞の異常活性化が重要であり³⁾、抗 CD20 抗体による発症早期からの B 細胞除去療法が、Tsk マウスの皮膚硬化を有意に抑制することが示されている⁴⁾。以上より、全身性強皮症患者ならびに強皮症モデルマウスの病態および線維化において B 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。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。B 細胞は長らく抗体産生能ばかりが注目されていたが、抗体産生のみならず抗原提示能、サイトカイン産生、T-B 細胞相互作用を介して免疫反応を促進することが示され、自己免疫疾患における B 細胞の重要性が飛躍的に高まることとなった。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B細胞集団は、“悪玉”と“善玉”B細胞の概念で理解されている。“悪玉”B細胞はeffector B細胞と呼ばれ、T細胞の活性化作用をもち、自己免疫や炎症を促進する働きがある。一方、“善玉”B細胞はregulatory B細胞と呼ばれ自己免疫や炎症を抑制する働きがある⁵⁾。これまで、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細胞の作用が詳細に解析されており、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効果が認められている。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。さらに最近、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。今後、自己免疫性疾患に対するB細胞除去療法に当たってはRegulatory/Effector B細胞のバランスを考慮に入れること重要である。Regulatory B細胞はIL-10を特異的に産生するB細胞亜集団と定義され、IL-10の産生により過剰な免疫反応や炎症を抑制する。近年、IL-10産生regulatory B細胞がCD1d^{high}CD5⁺の表現型を有し⁶⁾炎症反応および自己免疫反応の抑制に非常に重要であることが示されている^{7,8)}。さらに、ヒトでもIL-10産生regulatory B細胞の存在が確認されており、さまざまな炎症性疾患や自己免疫疾患への関与が示唆され

ている。今後、全身性強皮症患者でもB細胞除去療法が行われることが予想されるが、全身性強皮症の病態ならびに線維化におけるregulatory B細胞の役割を充分熟知しておくことは必要不可欠である。さらに、将来的には全身性強皮症や線維化疾患に対するregulatory B細胞を用いた治療法の開発が望まれる。

B. 研究方法

(1) ヒトにおけるIL-10産生regulatory B細胞の測定法の開発

これまでの予備実験において、ヒトにおけるIL-10産生regulatory B細胞は、PBMCをCpG(TLR9)とCD40Lで48時間培養し、細胞内染色を行うことにより測定できることを確認している。この刺激条件を用い、IL-10産生B細胞とIL-10非産生B細胞の細胞表面マーカーを比較し、IL-10産生B細胞に特異的な表面マーカー(CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24など)を同定する。

(2) 全身性強皮症患者におけるregulatory B細胞の検討

全身性強皮症患者においてIL-10産生regulatory B細胞の絶対数および頻度を健常人と比較検討する。また(1)で同定されたフェノタイプの数(%)も解析する。

倫理面への配慮：患者からの血液サンプルの採取は、患者に研究の趣旨・内容を十分に説明のうえ同意を得られた方のみから行う。また得られた研究データによって人権侵害など不利益が起こらないよう、個人の特定がなされないように配慮する。

C. 研究結果

(1) ヒトにおけるIL-10産生regulatory B細胞の測

定法の開発ならびにフェノタイプ同定

IL-10 産生性制御性 B 細胞の誘導には、CD40 シグナルと Toll like receptor の刺激が重要であることが明らかとなっているので、ヒトでも同様に CD40 刺激と各種 Toll like receptor にて刺激した。5 時間では約 0.7% の IL-10 産生 B 細胞を認めた。48 時間の培養ではより多くの IL-10 産生 B 細胞が認められ、CpG がもっとも効果が強く、IL-10 産生 B 細胞が約 8%、LPS がその次に効果が強く約 4% 認めた。よって制御性 B 細胞の測定には CD40L と CpG にて 48 時間培養が至適条件と判明した (図 1)。B 細胞の表面に発現している分子を解析し、CD24 と CD27 が IL-10 陽性と陰性で発現が大きく違っており、IL-10 産生 B 細胞は CD24^{high}CD27⁺ のフェノタイプを有していることが明らかとなった (図 2)。次に実際に CD24^{high}CD27⁺ の B 細胞が IL-10 を産生しているかを確認した。CD24^{high}CD27⁺ の分画と CD24^{lo}CD27⁻ の分画を FACS にて分離し 48 時間培養後の結果を図 2 下段に示したが、CD24^{high}CD27⁺ のポピュレーションが IL-10 を産生していることが確認された。

(2) 全身性強皮症患者における regulatory B 細胞の検討

健常人 24 人、全身性強皮症 24 人、皮膚筋炎 3 人、尋常性天疱瘡 / 落葉状天疱瘡、2 名の PBMC 中の IL-10 産生 B 細胞と CD24^{hi}CD27⁺B 細胞の頻度を解析した。結果は、IL-10 産生 B 細胞は健常人で平均 11%、強皮症は 6% と有意に減少していた (図 3)。一方、症例数が非常に少ないものの皮膚筋炎や天疱瘡では、ほぼ正常であった (図 3)。IL-10 産生 B 細胞と同様に CD24^{hi}CD27⁺B 細胞は健常人と比較して、全身性強皮症で有意に減少していた。次に皮膚硬化の重症度別に解析を行った。dcSSc の方がより

制御性 B 細胞が減少していることが予想されたが、結果は逆で、lcSSc の方がより減少している傾向に有った (図 4)。また、制御性 B 細胞と mRSS に正の相関を認めた。また、他の臓器病変との相関は認めなかった (図 4)。

D. 考案

制御性 B 細胞は免疫反応を抑制する作用を有することより、自己トレランスの維持に重要であることが推測される。本研究にて全身性強皮症では制御性 B 細胞が減少していることが判明した。制御性 B 細胞の減少により自己トレランスが破綻し、全身性強皮症の発症に関与した可能性が考えられる。しかしながら、制御性 B 細胞は重症度とは相関しておらず、制御正 B 細胞は発症後の病態促進作用への関与は少なく、その発症に深く関与している可能性が示唆された。

E. 結論

制御性 B 細胞は CD24^{hi}CD27⁺B 細胞の phenotype を有していた。

全身性強皮症患者では制御性 B 細胞の頻度が減少していた。

F. 文献

1. Sato S, et al. Arthritis Rheum 50: 1918-27, 2004
2. Matsushita T, et al. Arthritis Rheum 54: 192-201, 2006
3. Saito E, et al. J Clin Invest 109: 1453-62, 2002
4. Hasegawa M, et al. Am J Pathol. 169(3): 954-966. 2006
5. DiLillo DJ, et al. Ann N Y Acad Sci. 1183: 38-57. 2010