

医工連携によって実現した微量サイトカイン解析技術を用いた

全身性強皮症の病態解明と新規治療ターゲットの同定

吉崎 歩

東京大学大学院医学系研究科 皮膚科学

【研究の背景】

強皮症は自己免疫を背景に、皮膚および内臓諸臓器に線維化を来す予後不良の疾患であり、未だに有効な治療法が無く、新規治療法の開発が急務である。申請者が所属する施設は日本でも有数の強皮症診療施設であり、年間 1000 例を超える強皮症患者に対する臨床研究を行い、強皮症の病態形成においてサイトカインが重要であることを多数報告している。特に制御性 B 細胞は抗原特異的な刺激による IL-10 の産生を介して自己免疫疾患の制御に重要な役割を果たしていることを見出し、強皮症の病態形成においても重要である可能性を示唆している。それにも関わらず、サイトカイン研究には、検出下限は一般的に pM 程度であるという測定における大きな困難がある。このことは、極端に濃度上昇しているサイトカインしか現代の技術では捕らえ切れていないことを示唆しており、未だにサイトカインバランスの及ぼす病態への影響は明らかとなっていない。このことから、申請者は高感度のサイトカイン測定技術が必要であると考え、工学部との共同研究に着想した。その結果、東京大学工学部応用化学専攻と共同で、fM という超微量濃度のサイトカイン測定技術を確立している。

【目 的】

近年の医学の発展により、炎症を惹起するサイトカインは様々な炎症性疾患の形成に重要であることが明らかとなっている。しかしながら、生体内においてサイトカインはごく微量で存在するため、測定が難しく、その役割は完全には解明されていない。本研究の目的は、医工連携で実現した拡張ナノスペースと微小空間流体制御技術を応用した薄層流体 ELISA 技術を用いて、超微量サイトカイン解析を行い、強皮症に対する新たな病態理解を目指し、さらにはこれに基づく新規治療ターゲットを見出すことにある。

【方 法】

強皮症患者検体の収集:強皮症患者の末梢血からリンパ球を抽出した。同時に症状や臨床検査データの蓄積を行った。
超微量 fM サイトカイン測定:前述の通り、東大工学部と共同で開発したデバイスを用いて、患者末梢血リンパ球から産生されるサイトカインの超微量測定を行った。測定したサイトカインは、生物学的製剤のターゲットや、病態形成において重要であることが示唆されているものから選んだ。具体的には tumor necrosis factor- α 、interleukin (IL)-6、IL-17、IL-12、IL-23、IL-4、IL-10、IL-35、interferon- γ 、tumor growth factor- β の測定を行った。さらに、B 細胞に関しては、超微量測定法を用いて産生される抗体の抗原特異的の検討を行った。

【結 果】

強皮症患者から得られたリンパ球では、健常人から得たリンパ球に比して、炎症性サイトカインの産生増加が認められた。特に B 細胞に関しては、自己抗原反応性 B 細胞のサイトカイン産生能において、非自己抗原反応性 B 細胞と比較して異な

る性質が認められた。すなわち、自己抗原反応性 B 細胞では自己抗原との結合能が高い抗体を産生する、high affinity B 細胞において、炎症性サイトカインの産生亢進が認められ、一方で、自己抗原に対する結合能が低い抗体を産生する、low affinity B 細胞においては炎症抑制性サイトカインの産生亢進が認められた。これらの異なったサイトカインを産生する B 細胞の割合は、強皮症の病態にも関与しており、皮膚硬化や間質性肺炎が重度の症例においては、軽症例と比較して high affinity B 細胞の割合と炎症性サイトカインの産生量が増加していた。

【考 察】

今回の結果により、B 細胞の有する自己抗原特異性は、B 細胞自身のサイトカイン産生能と関係することが明らかになった。近年、B 細胞除去療法は数多くの自己免疫疾患において、有効性を示しており、B 細胞が自己免疫疾患の中心的な役割を果たすと考えられるようになってきた。しかしながら、これまで B 細胞の病態に関する直接的な役割は不明なままであった。今回の研究により、B 細胞は自己抗原反応性の違いにより、異なったサイトカインを産生することが明らかとなった。このことは、B 細胞が自己免疫疾患の病期を通じて、抗原親和性を高めることによって、病態の増悪を誘導することを示唆している。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回の研究によって、これまで測定不可能なレベルでの B 細胞のサイトカインプロファイルが明らかとなった。今後、強皮症以外の自己免疫疾患においても、B 細胞が産生するサイトカインの測定を行い、自己免疫疾患における新たな病因論を見出したい。

【参考・引用文献】

1. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ, Tedder TF. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*. 2012; 491: 264-8.
2. Fukasawa T, Yoshizaki A, Ebata S, Nakamura K, Saigusa R, Miura S, Yamashita T, Hirabayashi M, Ichimura Y, Taniguchi T, Asano Y, Shimizu H, Kazoe Y, Mawatari K, Kitamori T, Sato S. Soluble form of PD-1 and PD-L2 contributes to disease severity and progression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2017; 69: 1879-90.
3. Nakao T, Kazoe Y, Mori E, Morikawa K, Fukasawa T, Yoshizaki A, Kitamori T. Cytokine analysis on a countable number of molecules from living single cells on nanofluidic devices. *Analyst*. 2019; 144: 7200-7208.