

## 総 説

特集：自己抗体の産生機序とその病原性

## 全身性強皮症における B 細胞異常と自己抗体産生

佐藤 伸一

**B cell abnormalities and autoantibody production in systemic sclerosis**

Shinichi SATO

*Department of Dermatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences*

(Received December, 13 2005)

**summary**

The pathogenetic roles of autoantibodies remain unknown in systemic sclerosis (SSc). CD19, a cell-surface critical signal transduction molecule of B lymphocytes, augments signaling through B cell antigen receptor and CD19 overexpression in mice induces various autoantibody production. Peripheral B cells from SSc patients exhibit 20% increase in CD19 expression. Furthermore, B cells from a tight-skin (TSK) mouse, a genetic murine model of SSc, show augmented signaling through CD19. The deficiency of CD19 expression in TSK mice results in inhibition of autoantibody production, reduced skin fibrosis, and inhibition of augmented IL-6 production by splenic B cells. Collectively, a new model that could explain the relationship between autoantibody and the development of fibrosis is proposed. CD19 overexpression observed in SSc patients breaks down peripheral tolerance of B cells, which results in autoantibody production. Furthermore, it is also possible that in vivo chronic B cell activation probably due to CD19 overexpression results in the development of fibrosis through production of fibrogenic cytokines, such as IL-6. This model indicates that B cells or CD19 would be potential therapeutic targets in SSc.

**Key words**—systemic sclerosis; B lymphocyte; CD19; tight-skin mouse; autoantibody

## 抄 録

全身性強皮症 (systemic sclerosis ; SSc) では自己抗体の病原性は不明である。CD19 は B 細胞抗原受容体からのシグナルを増強させ、CD19 の過剰発現によって自己抗体産生が誘導される。SSc 由来 B 細胞上では CD19 の発現量は 20% 増加していた。さらに、SSc の動物モデルである tight-skin (TSK) マウス由来 B 細胞では、CD19 を介するシグナルの増強が認められた。TSK マウスでは CD19 を欠損させると自己抗体の産生が抑制され、皮膚硬化も減弱し、さらに B 細胞からの IL-6 産生も抑制された。以上より、自己免疫と皮膚硬化との関連性を説明するモデルを提唱したい。SSc 由来 B 細胞では CD19 発現量が増加していた。その結果、これらの B 細胞では末梢トレランスが壊れ、自己抗体の産生を来したものと考えられた。一方、CD19 シグナルの増強によって B 細胞が慢性的に活性化した結果、B 細胞から IL-6 をはじめとするサイトカインが産生され、これらが皮膚硬化を惹起すると考えられた。このモデルでは持続的に活性化した B 細胞を共通の原因として想定することによって、自己抗体産生と皮膚硬化の誘導を関連づけている。さらに、このモデルは CD19 や B 細胞が SSc の治療の標的となりうる可能性を示している。

## 1. はじめに

全身性強皮症 (systemic sclerosis ; SSc) は皮膚および肺、腎、消化管、心をはじめとする内臓諸臓器を系統的に侵す慢性疾患であり、膠原病に分類される<sup>1,2)</sup>。本邦における罹病率は人口 10 万人当たり 2.1~5.3 と報告されている<sup>3)</sup>。男女比は 1 : 14 であ

る。米国では、SSc の罹病率は 100 万人中 242 と推計されており、成人 100 万人について 1 年間に新たに発症した患者は 19.3 例とされている<sup>4)</sup>。SSc は家族内では 1.6% の頻度で生じるとされ、この頻度は SSc の一般人口における発症率 (0.026%) と比べると有意に高率であると報告されている<sup>5)</sup>。このように、すべての危険因子の中で、家族歴が SSc 発症に対して最も強い危険因子とされているが、実際には SSc の家族内で個々の家族構成員が SSc に罹

患する危険性は1%未満と極めて低い<sup>5)</sup>。従って、この事実はSScの発症においては遺伝的な背景のみならず、環境因子も強く働いていることを示している。

SScは、①膠原線維の増生(皮膚硬化、肺線維症)、②血管病変(レイノー症状、指尖部虫喰状癒痕・潰瘍、肺高血圧症、強皮症腎クリーゼ)、③免疫異常(自己抗体、サイトカイン産生など)といった3つの主要な病態よりなる<sup>6)</sup>。これらの3つの病態間の関連性については、例えば皮膚に浸潤するT細胞がサイトカインを産生し、それが線維芽細胞を刺激してコラーゲン産生を増加させるなどの仮説が提唱されている<sup>7)</sup>。しかしながら、現時点ではこの3つの病態を統一的に説明しうる病態仮説は見いだされていない。

## 2. SScにおける自己抗体の病因的意義

従来より、自己抗体はSScの病因と密接に関連していると考えられている。その理由としては、SScでは90%以上で自己抗体が検出されることがあげられる<sup>8)</sup>。さらに、SScにおいて自己抗体は発病以前より存在し、特定の病型との密接な相関がみられる。例えば、抗トポイソメラーゼI(topo I)抗体や抗RNAポリメラーゼは重症型のdiffuse cutaneous SSc(dSSc)と相関し、抗セントロメア抗体や抗Th/To抗体は軽症型のlimited cutaneous SScと相関することが知られている。また、SScに特異的な自己抗体はSScに排他的に検出され、他の膠原病や健康人に検出されることは稀である。

さらに、抗topo I抗体の力価はSScの疾患活動性や重症度と密接に相関することが最近明らかにされた<sup>9)</sup>。すなわち、抗topo I抗体力価は皮膚、肺、腎血管の線維化の程度と相関していた。さらに、経過中の抗topo I抗体力価の低下は皮膚硬化の改善と平行し、一方、その力価の上昇は皮膚・内臓病変の発生・悪化を伴っていた。同様の結果はkuwanaらによっても報告されている<sup>10)</sup>。つまり、抗topo I抗体陽性SSc患者の20%は経過中に抗topo I抗体が陰性となり、これは良好な予後と相関していた<sup>10)</sup>。

しかし、抗topo I抗体がdSScにおいて、このような密接な臨床的相関を示しているにも拘わらず、自己抗体とSScの症状発現との病因論的な因果関係については不明である。SScの自己抗体のターゲットとなる抗原(セントロメアやtopo Iなど)は核内抗原であり、しかも細胞分裂に必須の抗原であ

る。さらに、自己抗体が細胞内に入り、その対応抗原と反応することを示す証拠はほとんどない。もし仮に自己抗体が核内に入り抗原と反応すると仮定したとしても、その場合細胞分裂に障害を来とし、細胞死となると考えられる。また、自己抗体による細胞分裂の抑制とSScの病態である線維化との関連性も不明である。従って、自己抗体そのものがSScでは組織障害を来すとは考えられていない。それでは、SScにおいて自己抗体はどのような機序で、線維化などの症状発現と関連しているのであろうか? この問いこそがSSc、ひいては膠原病の病因を明らかにする上で、最も重要かつ中心的な問題である<sup>11)</sup>。

## 3. 自己免疫におけるB細胞の重要性

### 1. B細胞が注目されるに至った経緯

B細胞は液性免疫を司る高度に分化した免疫担当細胞である。自己免疫現象を背景に有する膠原病においては、自己抗体はB細胞によって産生されるため、古くからB細胞は自己抗体を介して膠原病の病態形成に関与していると考えられてきた。しかし、B細胞に比べてT細胞の免疫学的研究が飛躍的に進歩したため、膠原病ではT細胞による免疫反応・サイトカイン産生の異常に関心があつまっていた。自己反応性のT細胞がまず存在し、そのT細胞の制御の下に存在するB細胞がT細胞からの指示(ヘルプ)を受けて、自己抗体を産生するというシナリオが提唱されてきた。しかしながら、T細胞をターゲットとした治療(抗CD4抗体、抗ICAM-1抗体など)については、期待されたような効果が認められなかった。

一方、最近15年間でB細胞の研究が飛躍的に進んだ結果、T細胞からのヘルプとは全く無関係に、B細胞だけの異常で自己抗体を産生しうることが明らかにされてきた<sup>12-14)</sup>。例えば、CD22はB細胞に特異的に発現するシグナル伝達分子であるが、B細胞抗原受容体からのシグナルを抑制する機能が知られている<sup>15)</sup>。このCD22を欠損するマウスではB細胞の異常な活性化が生じ、その結果、抗DNA抗体などの自己抗体が産生されることが報告されている<sup>16,17)</sup>。さらに近年膠原病においてもB細胞の異常を示す報告が数多くなされ、後述するように抗CD20抗体などのB細胞をターゲットとした治療の有効性が示唆され、膠原病の成因においてB細胞の異常が注目を集めるようになった。

## 2. B 細胞の機能

B 細胞免疫学の進歩によって、B 細胞の免疫反応における役割は単に抗体産生細胞だけではないことが明らかにされつつある<sup>18)</sup>。このような観点から、B 細胞は以前考えられていた以上に免疫反応の制御において重要な役割を担っていることが認識されるようになった。例えば、B 細胞は抗原提示細胞の分化やリンパ系臓器の構造の維持に必須であることが示されている。さらに B 細胞自身も強力な抗原提示細胞として働く。T 細胞は B 細胞の抗体産生をヘルプするが、逆に B 細胞がエフェクター T 細胞の分化に必須であることも明らかにされている。さらに、B 細胞はインターフェロン- $\gamma$ 、腫瘍壊死因子- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、IL-12 などの多様なサイトカイン産生細胞であり、Th1、Th2 に類似するようなサイトカイン産生細胞にもそれぞれ分化しうることも示されている<sup>19)</sup>。このように B 細胞は抗体産生のみならず、抗原提示細胞、T 細胞による免疫反応の制御、サイトカイン産生、抗原提示細胞の分化などに重要な役割を担っていることが明らかにされた。

## 3. 膠原病モデルマウスにおける B 細胞の重要性

マウス膠原病モデルにおいて、B 細胞の重要性を認識させた最初の重要な報告は Shlomchik らのグループによってなされた<sup>20)</sup>。彼らは、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus ; SLE) のモデルマウスである MRL/*lpr* マウスと、 $J_H$  遺伝子座の除去によって B 細胞が欠損したマウスを交配させ、B 細胞を欠く MRL/*lpr* マウスを作成し、SLE の病態形成における B 細胞の役割を解析した<sup>21)</sup>。このマウスでは糸球体腎炎は全く生じず、さらに、腎臓の間質、血管周囲、皮膚にも炎症細胞浸潤がみられず、活性化した T 細胞の数も著明に減少していた。また、通常の MRL/*lpr* において病態が形成される週齢になっても、この B 細胞を欠く MRL/*lpr* マウスでは全く SLE 関連の病態があらわれなかった。従って、B 細胞は全身性の自己免疫の発現に必須であることが示された。

さらに同じグループによって、B 細胞が抗体産生を介して間接的に、あるいは自己抗原提示を介してより直接的に自己免疫を誘導しているかを検討するために、B 細胞は存在するものの、血清中に Ig を産生できない MRL/*lpr* マウスが作成された<sup>21)</sup>。このマウスは、膜結合型 Ig だけが産生されるように、分泌エクソンを除去した IgM 重鎖トランス

ジーンを、前述した B 細胞を欠く MRL/*lpr* マウスに導入することによって作られた。従って、このマウスには、血清中に Ig を産生・放出できないものの、抗原提示能やサイトカイン分泌能は正常である B 細胞が存在することになる。驚くべきことに、血清中に自己抗体がないにも拘わらず、このマウスは糸球体腎炎や血管炎を発症した。このように、血清中 Ig が存在しないにも拘わらず、SLE の臓器病変が存在したことから、B 細胞は単に自己抗体産生だけによって自己免疫を誘導しているのではないことが示された。さらに、B 細胞自体の存在と T 細胞活性化が相関していたことから、B 細胞が T 細胞に対して自己抗原の抗原提示細胞として機能している可能性が指摘された。このように膠原病モデルマウスの発症に B 細胞が深く関与していることを示す報告が相次いでなされてきた。

## 4. SSc における B 細胞異常

### 1. CD19 の構造と機能

我々は B 細胞特異的なシグナル伝達分子である CD19 に注目し、CD19 発現およびその機能の異常による B 細胞の慢性的な活性化が、SSc における全身性自己免疫と症状発現を結びつける可能性を明らかにしたので、その知見を以下に紹介する<sup>11)</sup>。CD19 は Ig スーパーファミリーに属する、B 細胞特異的なシグナル伝達分子である<sup>11,12,14)</sup>。CD19 は Ig 遺伝子再構成の早期から発現し、形質細胞に分化すると失われる。抗 IgM 抗体、lipopolysaccharide、IL-4 によって B 細胞を活性化した場合でも、ヒト、マウスともに CD19 の発現量は活性化前と比べて不変であり、CD19 の発現量はきわめて厳密に制御されている<sup>22)</sup>。このことは CD19 発現量の変化が B 細胞機能を変調させうることを示している。また、CD19 はその細胞内ドメインの 9 つのチロシン残基を介して、phosphatidyl inositol 3-kinase, Src-family に属する Lyn, Fyn および Lck といったチロシンキナーゼや、Vav を活性化する重要なシグナル伝達分子であることが明らかにされている<sup>23)</sup> (図 1)。CD19 は B 細胞表面では CD21, CD81 および Leu13 と結合し複合体を構成している<sup>14)</sup>。CD21 は iC3b, C3d,g, C3d の受容体であり、ヒトでは EB ウイルスの受容体としても働く。現在まで CD19 のリガンドは同定されていないが、CD21 を介して補体や EB ウイルスが CD19 のリガンドとして働いている可能性が示唆されている。

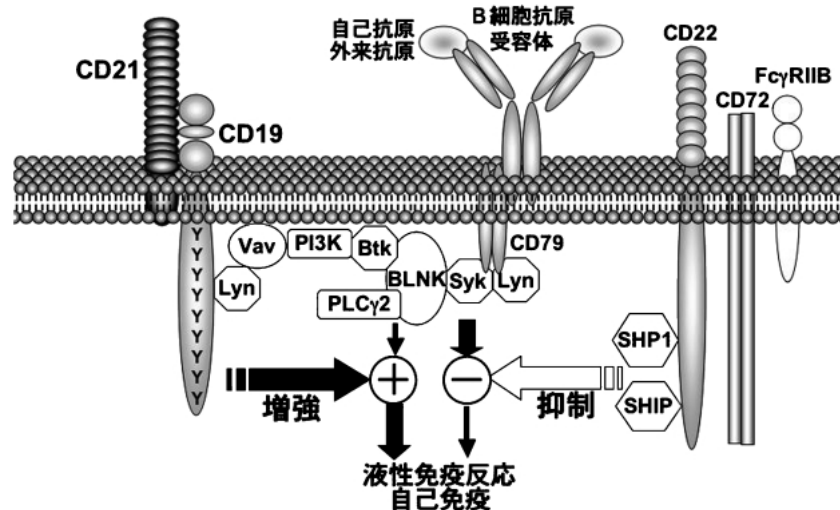


図1 B細胞シグナルの制御. B細胞抗原受容体からのシグナルは、CD19をはじめとする正の反応制御分子によって増強され、一方CD22などの負の反応制御分子によって抑制される. このバランスによって適正な液性免疫反応が生じるが、バランスがくずれると自己免疫を誤って誘導してしまう. PI3Kはphosphatidylinositol 3-kinaseを、PLC $\gamma$ 2はphospholipase C $\gamma$ 2を、BLNKはB cell linker proteinを、SHP-1はsrc homology (SH) 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1を、SHIPはSH2 domain-containing inositol polyphosphate 5'-phosphataseをそれぞれ表す. 文献11より改変.

CD19 ノックアウト (CD19<sup>-/-</sup>) マウス、CD19 を正常より3倍多く発現するCD19 トランスジェニック (TG) マウスの解析によりCD19の*in vivo*の機能が明らかにされた<sup>22,24~26</sup>). CD19<sup>-/-</sup>マウス由来B細胞は様々な刺激に対する反応性が著しく低下し、逆にCD19TGマウス由来B細胞では著明に亢進していた. 従って、CD19はB細胞抗原受容体からのシグナルを増強する機能を有していることが明らかにされた (図1). さらにCD19TGマウスでは様々な自己抗体の産生が認められた. CD19発現量を様々に変化させた多数のCD19TGマウスを作成し、これらのマウスにおける自己抗体産生を解析したところ、CD19発現量と自己抗体産生量とは密接に相関していた<sup>22</sup>).

Hen egg lysozyme (HEL) に高い親和性で反応するIgをB細胞表面に発現するTGマウスを、体液中に可溶性HELを発現するTGマウスと交配させると、B細胞にHELに対して無反応な状態 (アネルジー) を誘導できる. このマウスにCD19を過剰に発現させると*in vivo*でこのアネルジーを破綻させ、1000倍以上の自己抗体を産生させることができた<sup>27</sup>). 従って、CD19TGマウスにおける自己抗体産生は、CD19発現増加がB細胞の末梢トランスを直接破綻させることによって生じることが明らかにされた.

## 2. SScにおけるCD19発現量の異常

ヒトの膠原病でもCD19の発現量が増加し、それが自己免疫と関連しているという仮説のもと、SSc由来B細胞上の各種細胞表面分子の発現について解析したところ、SSc患者ではB細胞上のCD19の発現量は健常人と比較して約20%増加していることが明らかとなった<sup>28</sup>). B細胞上でCD19と結合するCD21の発現量も同様に約20%増加していた. しかしながら、SSc患者由来B細胞上のCD20、CD22、CD40の発現量は健常人と同程度であった. SScで認められたCD19発現量増加は他の膠原病や自己免疫性水疱症では認められず、SScに特異的な現象と考えられた. さらに、CD19TGマウスにおいて、CD19の発現量が増加すると、それに応じて血清中の免疫グロブリン値が増加した事実と一致して<sup>25</sup>), SSc患者でもCD19発現量と血清中IgM値、IgG値との間に正の相関が認められた. それ故、SSc患者でしばしばみられる高 $\gamma$ グロブリン血症にはCD19発現増強が関与している可能性が示唆された.

SScで認められたCD19発現量増加と関連するCD19のプロモーター領域の多型性も最近明らかにされた<sup>29</sup>). すなわち、SSc患者のCD19プロモーター領域 (-499) で、Tを有する頻度 (53%) は健常人における頻度 (33%) より有意に高率であった. さらにこの多型を有するSSc患者におけるCD19発現量は、多型を持たないSSc患者と比較し

て増加していた。このように、CD19 は SSc における自己免疫を規定する疾患感受性遺伝子の一つであることが明らかにされた。

### 3. SSc 由来 B 細胞の内在性異常

近年、CD27 がメモリー B 細胞の表面抗原であることが明らかにされ<sup>30)</sup>、末梢血 B 細胞のサブセットの異常が相次いで明らかにされてきた。末梢血中の B 細胞は CD27 の発現量によって、CD27 を発現しないナイーブ B 細胞、CD27 を中程度発現するメモリー B 細胞、CD27 を高発現する形質細胞前駆細胞に分類できる (図 2)。SSc では末梢血液中のナイーブ B 細胞は増加し、メモリー B 細胞や形質細胞前駆細胞は減少していた (図 2)<sup>31)</sup>。一方、SLE では形質細胞前駆細胞が増加し、この細胞数は疾患活動性と相関することが示されている (図 2)<sup>32,33)</sup>。一方 SLE では B 細胞数の減少により、ナイーブ B 細胞とメモリー B 細胞は減少していた。

SSc 由来メモリー B 細胞が *in vivo* で活性化しているかどうかを、CD80, CD86, Fas (CD95) などの活性化マーカーの発現量を検討することによって解析した。SSc 患者では、メモリー B 細胞における、CD80, CD86, Fas 陽性細胞の頻度は、健常人と比較して有意に増加していた。従って、SSc 由来メモリー B 細胞は *in vivo* で活性化していると考えられた。

Fas 発現量は B 細胞の活性化とともに増加し、T 細胞上の FasL と結合することによって、B 細胞に CD95 を介するアポトーシス (activation-induced cell death) が誘導され、これは過剰な B 細胞活性化を抑制するために重要なフィードバック機構であることが知られている。SSc 由来メモリー B 細胞上の Fas 発現量が増加していたことから、SSc 由来メモリー B 細胞ではアポトーシスが亢進しており、

その結果、血液中のメモリー B 細胞が減少した可能性が考えられた。そこで、無刺激下で SSc 由来メモリー B 細胞のアポトーシスが亢進しているかどうかを検討したところ、SSc 由来メモリー B 細胞でアポトーシスの頻度が有意に増加していた。従って、SSc 由来メモリー B 細胞ではアポトーシスが亢進していることが明らかとなった。

SSc では高  $\gamma$ -グロブリン血症はしばしば認められる免疫学的異常である<sup>34)</sup>。そこで、SSc ではメモリー B 細胞は減少しているものの、その IgG 産生能は亢進しているかどうかを解析した。刺激を加えた SSc 由来メモリー B 細胞は健常人と比較して IgG 産生は増強していた。従って、SSc 由来メモリー B 細胞はその数は減少していたものの、IgG 産生は亢進しているため、SSc では高  $\gamma$ -グロブリン血症を来すものと考えられた。

このように、SSc におけるメモリー B 細胞は慢性的に異常な活性化を示し、Fas 発現が増加し、アポトーシスに対する感受性が亢進した結果、血液中のメモリー B 細胞が減少したと考えられた。メモリー B 細胞の減少に対するフィードバック機構によって骨髄からのナイーブ B 細胞の動員が増加し、血液中のナイーブ B 細胞が増加したと解釈されている。以上の結果は SSc 由来 B 細胞に内在性異常があることを示しており、その異常は恐らく CD19 発現亢進によってもたらされたものと推測される。さらに、この事実は SSc において B 細胞が治療のターゲットとなりうる可能性を示している。

### 4. SSc における CD19 発現量増加は自己免疫を誘導できるか？

SSc における、このわずか 20% にすぎない CD19 発現量の増加が自己免疫誘導に直接関与しているかどうかを明らかにするため、CD19 発現量を同様に約 20% だけ増加させた CD19TG マウスを作成した<sup>28)</sup>。この CD19TG マウスでは、SSc に特異的な自己抗体である抗 topo I 抗体の産生が認められた<sup>35)</sup>。このようにわずか 20% の CD19 の発現増加によって、抗 topo I 抗体の産生を誘導することができた。それ故 CD19 の発現量の増加は、SSc における自己免疫の誘導に関与していることが示された。しかしながら、CD19TG マウスでは皮膚硬化は認められず、この実験系では自己抗体の産生と皮膚硬化との関連性は不明であった。

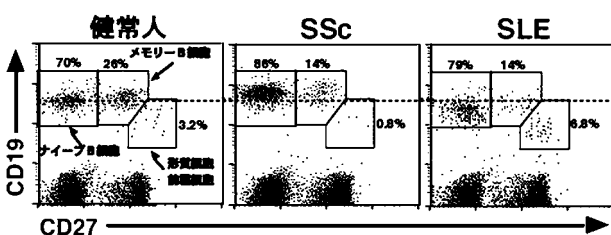


図 2 CD27 発現による末梢血液中 B 細胞のサブセット。ヒト末梢血液を抗 CD19 抗体、抗 CD27 抗体で 2 重染色し、フローサイトメトリーにて解析した。点線は CD19 発現量の比較のために示した。文献 31 より改変。

## 5. Tight-skin (TSK/+) マウスにおける CD19 の役割

### 1. TSK/+ マウス

TSK/+ マウスは著明な皮膚の線維化を呈する突然変異マウスであり、SScの動物モデルとされている<sup>36)</sup>。常染色体優性変異であり、ホモ (TSK/TSK) は子宮内死亡する。TSK/+ マウスではSScと同様の自己免疫現象がみられ、抗核抗体、特に抗topo I抗体が検出される。しかし、TSK/+ マウスではSScでみられるような肺線維症はみられず、肺気腫を呈する。さらに、SScとは異なり、骨肥厚や心肥大も認められる。フィブリリン遺伝子の重複が原因と推定されているが<sup>37,38)</sup>、フィブリリン遺伝子はヒトではマルファン症候群の原因遺伝子であり、TSK/+ マウスでフィブリリン遺伝子の異常がどのような機序で皮膚硬化や自己免疫と関連しているかは不明である。

### 2. TSK/+ マウスにおける CD19 シグナル異常

TSK/+ マウス由来 B 細胞では、SScにみられたような CD19 発現量の増加は観察されなかった。しかし、TSK/+ B 細胞では CD19 チロシンリン酸化は恒常的に亢進していた (図 3)<sup>39)</sup>。また、CD19 シグナルの下流に位置する、主要なシグナル伝達分子である Vav のチロシンリン酸化も TSK/+ B 細胞で亢進していた (図 3)。TSK/+ B 細胞における CD19 を介するシグナルの異常をさらに解析するために、抗 CD19 抗体で B 細胞を刺激し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 流入を測定した。CD19 架橋後の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 流入は、野生型 B 細胞と比較して TSK/+ B 細胞で増強していた (図 3)。従って、TSK/+ B 細胞では CD19 を介するシグナル伝達が亢進していることが明らかとなった。

### 3. TSK/+ B 細胞の慢性的な活性化

TSK/+ B 細胞の *in vivo* における活性化状態を知るために、B 細胞抗原受容体である IgM の発現量を測定した。一般に B 細胞上の IgM 発現量は *in vivo* における活性化状態を反映する。例えば、B 細胞が活性化状態にある CD19 を過剰に発現した CD19TG マウス、CD22 欠損マウス、SHP-1 に欠陥のあるマウスなどでは IgM 発現量は減弱する<sup>25,40,41)</sup>。重要な点は、これらのマウスはすべて自己免疫現象を伴うという点であり、IgM 発現量の

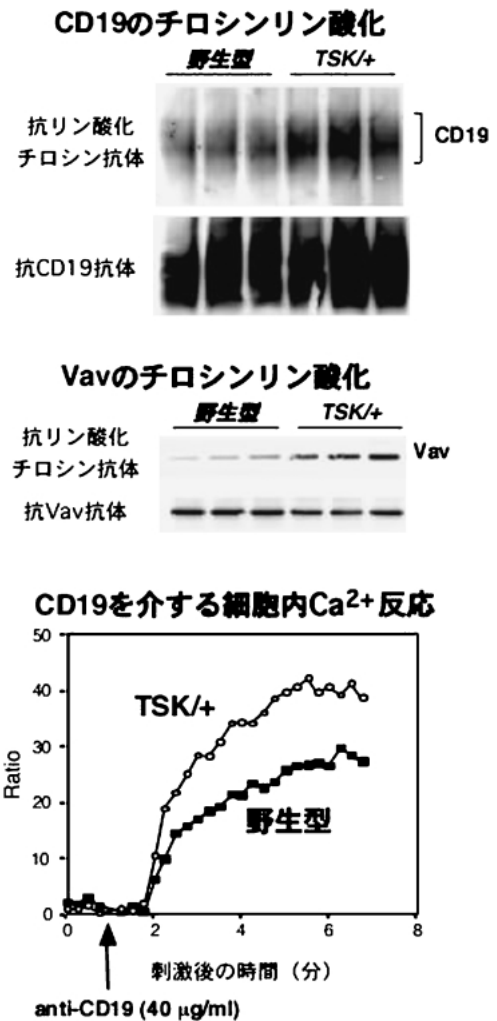


図 3 TSK/+ マウス由来 B 細胞における CD19 シグナル伝達の亢進。CD19 のチロシンリン酸化については、TSK/+ および野生型 B 細胞 (それぞれ 3 匹) を脾臓より精製し、無刺激のまま CD19 を免疫沈降し、ニトロセルロース膜に転写後、抗リン酸化チロシン抗体にてチロシンリン酸化の程度を検出した。同じニトロセルロース膜で CD19 の量を検出し、各レーンに同量の CD19 が入っていることを確認した。CD19 を介する細胞内 Ca<sup>2+</sup> 流入反応については、脾臓 B 細胞を抗 CD19 抗体で刺激し、その後の細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入を、B 細胞取り込ませた Indo-1 AM ester にて測定した。細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入は蛍光強度の比の上昇として検出される。文献 39 より改変。

低下は自己免疫と密接に関連した B 細胞の表面形質である。さらに、慢性的に自己抗原の刺激を受けている B 細胞でも同様の IgM 発現低下が観察されている<sup>42)</sup>。逆に、B 細胞の活性化が低下している CD19<sup>-/-</sup> マウスでは IgM 発現量は増加する。

興味深いことに、TSK/+ B 細胞上の IgM 発現量は野生型 B 細胞と比較して、著明に低下していた。前述した如く、同様の異常は CD19TG マウス由来 B 細胞でも見いだされているため、TSK/+ B 細胞上の IgM 発現量の低下は CD19 を介したシグ

ナルの増強によると考えられる。さらに、TSK/+ マウスと CD19<sup>-/-</sup> マウスを交配して作成した CD19 を欠損した TSK/+ マウス (CD19<sup>-/-</sup>TSK/+ マウス) では、TSK/+ B 細胞でみられた IgM 発現量の低下はみられなくなり、むしろ CD19<sup>-/-</sup> マウスと同程度にまで増加した。このように、TSK/+ B 細胞はその IgM 発現量が低下していたことから、慢性的に活性化した状態にあり、その活性化状態は CD19 シグナルの増強によると考えられた。

#### 4. TSK/+ マウスの自己抗体産生に対する CD19 欠損の効果

TSK/+ マウスでは、前述した B 細胞の慢性的な活性化と一致して、血清中の IgM, IgG1 濃度が野性型マウスと比較して増加していた。さらに、SSc 特異的な IgM 型および IgG 型抗 topo I 抗体力価も増加していた。CD19<sup>-/-</sup>TSK/+ マウスでは、TSK/+ マウスで増加していた血清 IgM, IgG1 値は CD19<sup>-/-</sup> マウスと同程度にまで低下した。さらに重要なことに、CD19<sup>-/-</sup>TSK/+ マウスでは、抗 topo I 抗体も完全に陰性化した。このように TSK/+ マウスでみられた高  $\gamma$ -グロブリン血症および自己抗体産生は、CD19 を欠損させることによって完全に除去された。

#### 5. TSK/+ マウスの皮膚硬化に対する CD19 欠損の効果

TSK/+ マウスにおける皮膚硬化は、SSc でみられる真皮の肥厚ではなく、皮下脂肪組織下層の結合組織層 (皮下結合組織層; 図 4 の\*で示した部位) の肥厚による。TSK/+ マウスでは野性型マウスと比較してこの皮下結合組織層が約 9 倍肥厚していた。TSK/+ マウスに CD19 を欠損させると、TSK/+ マウスと比較して皮下結合組織層の厚さは著しく減弱した。同様の結果は皮膚のハイドロキシプロリン量を測定することによっても確認された (図 4)。従って CD19 は TSK/+ マウスにおいて、その自己免疫の誘導とともに、皮膚硬化にも関与していることが示された。

#### 6. TSK/+ B 細胞の IL-6 産生能

前述した B 細胞の慢性的な活性化と、皮膚硬化とをどのように関連づければよいのであろうか。一つの可能性は、慢性的に活性化した B 細胞から産生されるサイトカインが皮膚硬化に寄与するという

ものである。ヒトの SSc では免疫担当細胞より産生されるサイトカインや細胞成長因子が線維芽細胞を刺激して、線維化を来すと考えられている。IL-6 は B 細胞などから産生され、線維芽細胞からのコラーゲン産生を亢進させることが知られている<sup>43,44</sup>。さらに SSc 由来末梢血単核球からの IL-6 産生亢進も報告されている<sup>45,46</sup>。そこで TSK/+ B 細胞について抗原受容体と CD40 刺激後の IL-6 の産生について検討したところ、野生型 B 細胞と比較してその産生が有意に増加していた。CD19 を欠損させると TSK/+ B 細胞からの IL-6 産生は正常化した。従って、TSK/+ B 細胞からの IL-6 産生は CD19 のシグナルに依存し、皮膚硬化に関与している可能性が考えられた。

#### 6. SSc における病原性自己抗体の可能性

前述の如く、自己抗体そのものが SSc では組織障害を来すとは考えられていない。それでは、SSc では自己抗体と線維化という病態は結びつかないのであろうか？ 最近、コラーゲナーゼである matrix metalloproteinase (MMP) に対する自己抗体が SSc で産生され、それが病原性を有する自己抗体として、SSc の病態と関連している可能性が示されているので以下にその知見について紹介する。

##### 1. SSc の線維化機序

SSc の病態生理の中心的現象は組織の細胞外基質 (extracellular matrix ; ECM), 主として 1 型, 3 型コラーゲンの異常な蓄積である。この ECM の蓄積は、ECM の構成成分の合成と分解との間のバランスに依存するとされている。ECM の分解はコラーゲナーゼ活性を有する MMP によって制御される。MMP-1 (interstitial collagenase-1) はこの SSc 病変部皮膚で増加している 1-3 型コラーゲンを分解する機能を有する。さらに、SSc 病変部皮膚では 5 型コラーゲン、デコリン、オステオネクチン、エラスチン、フィブリリンなどの ECM も増加しているが、これらは MMP-1 では分解されず、MMP-3 (stromelysin-1) で分解される。

生体では MMP が過剰となり、その結果 ECM の異常な分解が生じないようにするために、tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) によって MMP の蛋白分解活性が抑制されるシステムが存在する。すなわち、MMP と TIMP との間のバランスが ECM の代謝を適切に保っていると考えられてい

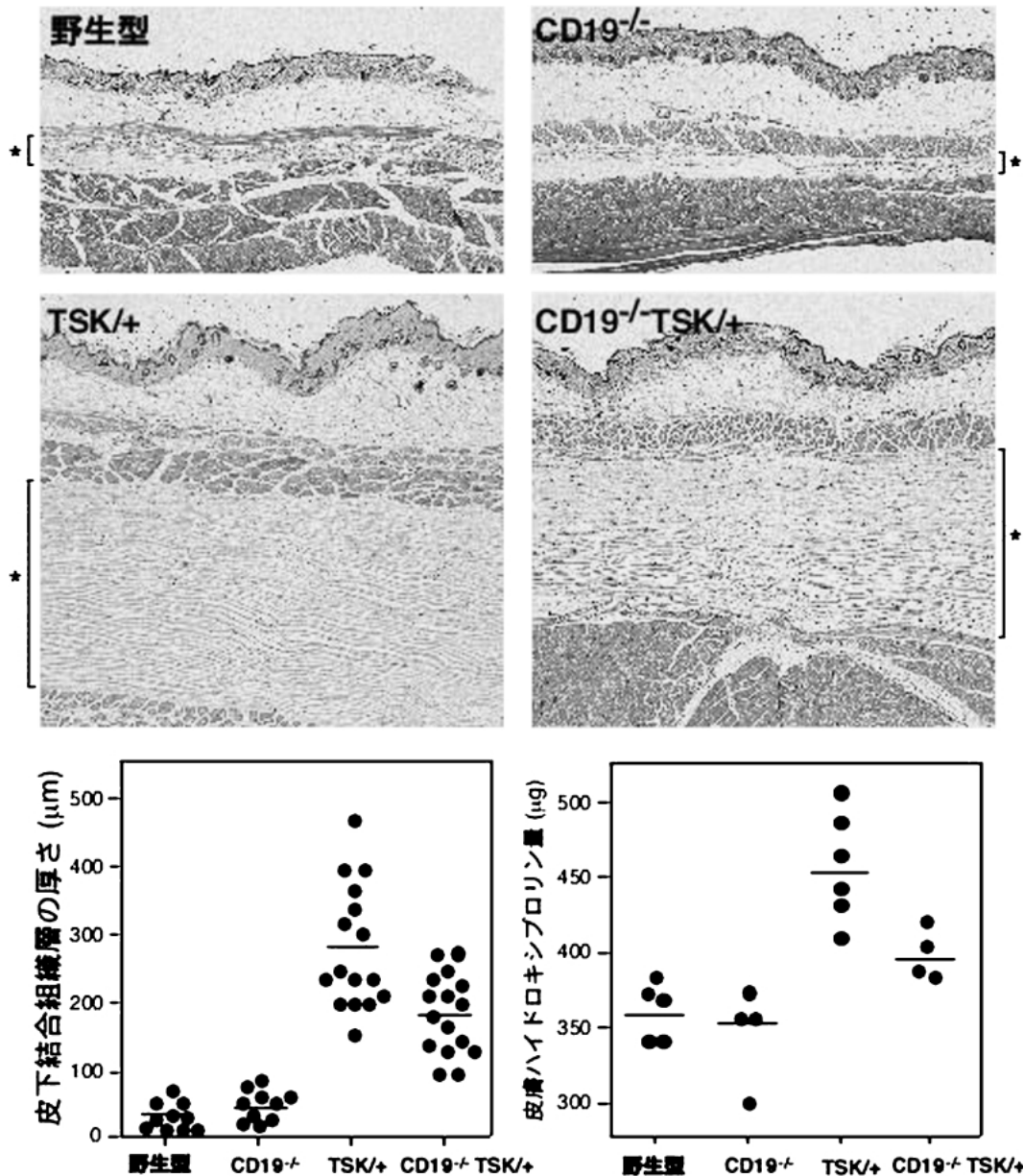


図4 TSK/+ マウスにおける皮膚硬化に対する CD19 欠損の影響。皮膚の H & E 染色像における\*は皮下結合組織層を示す。各マウスの皮膚硬化の程度を、皮下結合組織層の厚さおよび皮膚ハイドロキシプロリン量を測定することによって定量化した。文献 39 より改変。

る。このバランスが崩れると（つまり、MMP 活性の低下あるいは TIMP 活性の亢進が起こると）、線維化の病態を生じる可能性が示唆されている。

## 2. SSc における MMP-TIMP の異常

SSc では MMP と TIMP の異常な制御が報告されている。SSc 由来線維芽細胞では MMP-1 活性と産生が低下していることが報告されている。一方で SSc の早期皮膚病変由来線維芽細胞では MMP-1, 3 の発現が亢進し、安定期皮膚由来線維芽細胞では両者の発現は低下することを示す報告もある。さらには SSc では MMP-3 発現は正常であるとする報告

もみられる。

一方、TIMP に関しては、SSc 由来線維芽細胞による TIMP-1, 2, 3 の発現は増加していることが多数報告されている。加えて、TIMP-1, 2 は SSc 患者血清中で増加しており、活動性と相関することが示されている。このように MMP と TIMP とのバランスの異常が SSc での線維化に関与している可能性が示唆されている。

## 3. MMP に対する自己抗体

最近、MMP-1, 3 の活性を阻害する自己抗体の存在が報告され、SSc の線維化との関連性が示唆さ



れている<sup>47,48)</sup>。抗 MMP-1, 3 抗体は SSc とくに dSSc に高率に検出されることが報告されている。抗 MMP-1, 3 抗体は SSc の約 40% に陽性であり、dSSc では 60-70% に検出される。一方、SSc 以外の膠原病での陽性率は 5-20% 以下であったことから、抗 MMP 抗体は SSc に比較的特異的であると考えられている。

抗 MMP-1, 3 抗体ともに免疫ブロット法にてその存在が確認されており、さらに、抗 MMP-1, 3 抗体ともに SSc の皮膚硬化の程度、腎血管抵抗、肺線維症の重症度との相関がみられている。重要なことは、SSc 由来の抗 MMP-1, 3 抗体は MMP-1, 3 のコラゲナーゼ活性を抑制するというのである。従って、SSc では MMP-1, 3 活性を抑制する抗 MMP-1, 3 抗体が産生されていることが示された。

#### 4. SSc における抗 MMP 抗体と線維化との関連性

SSc ではその全身性自己免疫という背景によって、MMP-1, 3 に対する自己抗体が産生されたものと考えられる (図 5)。この抗 MMP-1, 3 抗体は MMP-

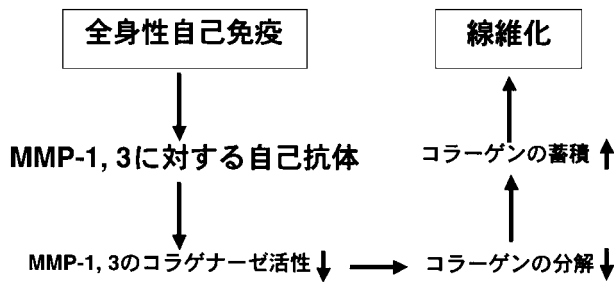


図 5 SSc における全身性自己免疫・抗 MMP 抗体産生と線維化との関連性。

1, 3 の酵素活性を阻害したことから、実際に MMP-1, 3 を抑制し、コラーゲン分解が低下した結果、組織にコラーゲンの異常沈着がおこる可能性が示唆される。このように、抗 MMP 抗体の存在は SSc において従来不明であった全身性自己免疫と線維化を結びつけるモデルとなりうる可能性があり、今後同様の視点からの研究が期待される。

#### 7. SSc における自己免疫のモデル

以上の結果より、全身性自己免疫と皮膚硬化との関連性を説明する新たなモデルを提唱したい(図 6)。SSc 患者由来 B 細胞では CD19 発現量は増加し、TSK/+ B 細胞では CD19 を介するシグナルが増強していた。CD19 発現量が増加し、その結果 CD19 シグナルが増強していると考えられる CD19TG マウスでは、末梢 B 細胞トレランスの破綻を来とし、自己抗体の産生が生じることが明らかとなっている<sup>27)</sup>。これと同様に、SSc 由来 B 細胞や TSK/+ B 細胞も CD19 シグナルの増強によって末梢 B 細胞トレランスが壊れ、自己抗体の産生を来したものと考えられた。

一方、SSc 患者由来 B 細胞および TSK/+ B 細胞は *in vivo* で、恐らく CD19 シグナルの増強によって慢性的に活性化していた。このように B 細胞が慢性的に活性化した結果、B 細胞から IL-6 をはじめとするサイトカインが産生され、これらが皮膚硬化を惹起すると考えられた。このモデルでは持続的、慢性的に活性化した B 細胞を共通の原因として想定することによって、自己抗体産生と皮膚硬化の誘導を関連づけることを可能としている。このモデルでは B 細胞によるサイトカイン産生に目が向けられているが、最近の MRL/*lpr* マウスを用いた実験でも、B 細胞は自己抗体産生以外に、抗原提示

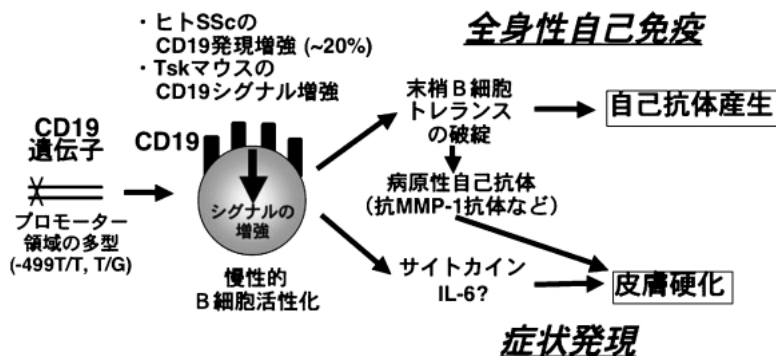


図 6 SSc および TSK/+ マウスにおける全身性自己免疫のモデル。文献 11 より改変。

細胞やサイトカイン産生細胞として SLE の病態形成に関与していることが示されている<sup>21)</sup>。

また、全身性自己免疫が MMP-1 に対する病原性自己抗体の産生を介して線維化の誘導に関与している可能性も考えられる。さらに、SSc では全身性自己免疫を背景として、他の未同定の病原性を有する自己抗体の存在も予想される。以上より、このモデルは B 細胞や CD19 が SSc の治療ターゲットとなりうることを示している。

## 8. ヒト膠原病に対する B 細胞除去療法

以上述べたような B 細胞異常に対する治療の選択肢の一つとして、抗 CD20 抗体 (リツキシマブ, リツキサン<sup>®</sup>) による B 細胞除去療法が注目を集めている。抗 CD20 抗体は B 細胞リンパ腫に対する安全性の高い治療法として開発されてきたものであるが、近年膠原病に対して盛んに応用されている<sup>49)</sup>。

### 1. 関節リウマチ (rheumatoid arthritis ; RA)

2001 年 Edwards らは各種抗リウマチ薬に不応性の RA5 例に、週 1 回の抗 CD20 抗体の 4 回投与とシクロホスファミドパルスと高用量のプレドニン内服の併用を行い、その効果を検討した<sup>50)</sup>。6 ヶ月後に全例で ACR50-70 のレベルで改善がみられた。リウマトイド因子や CRP も概して低下した。全例で B 細胞は検出できない程度まで低下したが、その後 4 例で正常値まで回復した。うち 2 例では再燃を伴った。残り 2 例では B 細胞数の上昇が 6 ヶ月以降にみられたが、再燃はなかった。免疫グロブリン値は若干低下したものの、副作用はなく、安全であった。この報告では大量の免疫抑制剤を併用しているため、抗 CD20 抗体による効果を判定することはやや困難であったが、その後免疫抑制剤に不応性の 6 例の活動性 RA に、週 1 回の抗 CD20 抗体を 4 回のみを行った検討が報告され、同様の結果が得られたことから、抗 CD20 抗体の有用性がより明確となった<sup>51)</sup>。

### 2. SLE

免疫抑制剤に不応性の 6 例の活動性 SLE 患者に、抗 CD20 抗体投与とシクロホスファミドパルスおよび高用量のプレドニン内服を行い、6 例中 5 例で改善がみられたと報告された<sup>52)</sup>。SLE 患者では抗 CD20 抗体投与後、抗 2 本鎖 DNA 抗体価は概して低下するが、この低下は必ずしも有効性と相関し

ていなかった。さらに 17 例の SLE に対して第 I/II 相試験が行われた<sup>53)</sup>。概して安全であったが、2 例で感染症、1 例で一過性虚血発作といった重篤な副作用がみられた。B 細胞が効果的に除去された 11 例では、抗 2 本鎖 DNA 抗体価や補体価の改善が見られないにも拘わらず活動性が低下した。このことは B 細胞には自己抗体産生に加えて、サイトカイン産生や抗原提示などの他の役割があることを示している。このように、抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法はヒトの膠原病に有用であることが示唆されている。今後 SSc においても、抗 CD20 抗体の有用性が明らかになるものと思われる。

## 文 献

- 1) Sato S : CD19 is a central response regulator of B lymphocyte signaling thresholds governing autoimmunity. *J Dermatol Sci* **22** : 1-10, 1999.
- 2) Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. : Anti-phospholipid antibody in localized scleroderma. *Ann Rheum Dis* **62** : 771-774, 2003.
- 3) Tamaki T, Mori S, Takehara K : Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo. *Arch Dermatol Res* **283** : 366-371, 1991.
- 4) Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J, et al. : Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* **48** : 2246-2255, 2003.
- 5) Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, et al. : Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* **44** : 1359-1362, 2001.
- 6) Furst DE, Clements PJ : Hypothesis for the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Rheumatol* **24** (suppl 48) : 53-57, 1997.
- 7) Sato S : Abnormalities of adhesion molecules and chemokines in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* **11** : 503-507, 1999.
- 8) Okano Y : Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* **22** : 709-735, 1996.
- 9) Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, et al. : Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels by ELISA in systemic sclerosis. *Rheumatology* **40** : 1135-1140, 2001.
- 10) Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, et al. : Longitudinal analysis of autoantibody response to

- topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **43** : 1074–1084, 2000.
- 11) Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. : Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol* **41** : 1123–1133, 2004.
  - 12) Tedder TF, Poe JC, Fujimoto M, et al. : The CD19–CD21 signal transduction complex of B lymphocytes regulates the balance between health and autoimmune disease : systemic sclerosis as a model system. *Curr Dir Autoimmun* **8** : 55–90, 2005.
  - 13) Goodnow CC : Balancing immunity and tolerance : deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci, USA* **93** : 2264–2271, 1996.
  - 14) Tedder TF, Inaoki M, Sato S : The CD19/21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* **6** : 107–118, 1997.
  - 15) Sato S, Tuscano JM, Inaoki M, et al. : CD22 negatively and positively regulates signal transduction through the B lymphocyte receptor. *Semin Immunol* **10** : 287–298, 1998.
  - 16) Sato S, Miller AS, Inaoki M, et al. : CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction : altered signaling in CD22-deficient mice. *Immunity* **5** : 551–562, 1996.
  - 17) O’Keefe TL, Williams GT, Batista FD, et al. : Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J Exp Med* **189** : 1307–1313, 1999.
  - 18) Lipsky PE : Systemic lupus erythematosus : an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* **2** : 764–766, 2001.
  - 19) Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. : Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* **1** : 475–482, 2000.
  - 20) Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ : From T to B and back again : positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **1** : 147–153, 2001.
  - 21) Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, et al. : A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* **189** : 1639–1648, 1999.
  - 22) Sato S, Ono N, Steeber DA, et al. : CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol* **157** : 4371–4378, 1996.
  - 23) Fujimoto M, Fujimoto Y, Poe JC, et al. : CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification. *Immunity* **13** : 47–57, 2000.
  - 24) Engel P, Zhou L-J, Ord DC, et al. : Abnormal B lymphocyte development, activation and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* **3** : 39–50, 1995.
  - 25) Sato S, Steeber DA, Jansen PJ, et al. : CD19 expression levels regulate B lymphocyte development : human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *J Immunol* **158** : 4662–4669, 1997.
  - 26) Rickert RC, Rajewsky K, Roes J : Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* **376** : 352–355, 1995.
  - 27) Inaoki M, Sato S, Weintraub BC, et al. : CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. *J Exp Med* **186** : 1923–1931, 1997.
  - 28) Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, et al. : Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* **165** : 6635–6643, 2000.
  - 29) Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, et al. : Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **50** : 4002–4007, 2004.
  - 30) Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, et al. : CD27 : a memory B-cell marker. *Immunol Today* **21** : 204–206, 2000.
  - 31) Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. : Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis : expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* **50** : 1918–1927, 2004.
  - 32) Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, et al. : Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **165** : 5970–5979, 2000.
  - 33) Hansen A, Odendahl M, Reiter K, et al. : Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjogren’s syndrome. *Arthritis Rheum* **46** : 2160–2171, 2002.

- 34) Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JRT : Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum* **20** : 975–984, 1977.
- 35) Asano N, Fujimoto M, Yazawa N, et al. : B Lymphocyte signaling established by the CD19/CD22 loop regulates autoimmunity in the tight-skin mouse. *Am J Pathol* **165** : 641–650, 2004.
- 36) Green MC, Sweet HO, Bunker LE : Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* **82** : 493–512, 1976.
- 37) Siracusa LD, McGrath R, Ma Q, et al. : A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res* **6** : 300–313, 1996.
- 38) Kasturi KN, Hatakeyama A, Murai C, et al. : B-cell deficiency does not abrogate development of cutaneous hyperplasia in mice inheriting the defective fibrillin-1 gene. *J Autoimmun* **10** : 505–517, 1997.
- 39) 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* **109** : 1453–1462, 2002.
- 40) Cyster JG, Goodnow CC : Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection. *Immunity* **2** : 13–24, 1995.
- 41) Hibbs ML, Harder KW, Armes J, et al. : Sustained activation of Lyn tyrosine kinase in vivo leads to autoimmunity. *J Exp Med* **196** : 1593–1604, 2002.
- 42) Cornall RJ, Goodnow CC, Cyster JG : The regulation of self-reactive B cells. *Current Opinion Immunol* **7** : 804–811, 1995.
- 43) Kishimoto T : The biology of interleukin-6. *Blood* **74** : 1–10, 1989.
- 44) Duncan MR, Berman B : Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J Invest Dermatol* **97** : 686–692, 1991.
- 45) Hasegawa M, Sato S, Ihn H, et al. : Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* **38** : 612–617, 1999.
- 46) Sato S, Hasegawa M, Takehara K : Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* **27** : 140–146, 2001.
- 47) Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, et al. : Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* **138** : 357–363, 2004.
- 48) Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, et al. : Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* **120** : 542–547, 2003.
- 49) Silverman GJ, Weisman S : Rituximab therapy and autoimmune disorders : prospects for anti-B cell therapy. *Arthritis Rheum* **48** : 1484–1492, 2003.
- 50) Edwards JC, Leandro MJ, Cambridge G : B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders. *Biochem Soc Trans* **30** : 824–828, 2002.
- 51) 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* **46** : 2029–2033, 2002.
- 52) Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, et al. : An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **46** : 2673–2677, 2002.
- 53) Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, et al. : B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus : a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* **50** : 2580–2589, 2004.