

植木 郁子 論文内容の要旨

主 論 文

B cells-targeted therapy with anti-CD20 monoclonal antibody
in a mouse model of Graves' hyperthyroidism
(マウスバセドウ病モデルにおける抗 CD20 モノクローナル抗体を用いた B 細胞標的治療)

植木郁子、阿比留教生、古林正和、中原麻美、
市川辰樹、江口勝美、永山雄二

(Clinical & Experimental Immunology. 163 巻 P309-317, 2011 年)
長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 放射線医療科学 専攻
(主任指導教員：永山雄二 教授)

緒言

バセドウ病は抗原特異的自己免疫疾患であり、抗 TSH 受容体 (TSHR) 抗体が甲状腺機能亢進症とびまん性甲状腺腫大を引き起こす。これらの病態には、B 細胞および T 細胞が関与しており、B 細胞は抗体産生に加えて、最近では抗原提示細胞としての役割が注目されるようになった。そこで、マウスバセドウ病モデルに、抗マウス CD20 モノクローナル抗体を用いて B 細胞を除去し、B 細胞の疾患病態における役割・作用機序を検討した。

対象と方法

マウスバセドウ病モデル疾患好発系の BALB/c マウスに抗マウス CD20 モノクローナル抗体を 50 μ g または 250 μ g 単回投与し 5 日後の脾臓・末梢血・腹腔内での成熟 B 細胞数 (B220⁺IgM⁺) をコントロール抗体投与群と比較検討した。さらに脾臓での抗 CD20 抗体の効果を経時的に 6 週間検討した。

次に、TSHR 発現アデノウイルス (Ad-TSHR289) を用いたマウスバセドウ病モデルを用いて以下の異なる 3 時期に抗 CD20 抗体を投与した：(i) 免疫開始前、(ii) 2 回目免疫前 (TSHR に対する T 細胞の感作のみで、抗体反応はまだ十分に見られない時期)、及び (iii) バセドウ病発症後 (治療的效果を検討)。

血清 Free T₄ は radioimmunoassay (RIA) により、血清抗 TSHR 抗体価は TSHR 発現 Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いて flow cytometry で測定した。血清中甲状腺刺激抗体 (thyroid stimulating antibody; TSAb) は血清を添加したラット正常甲状腺細胞 FRTL-5 から放出される cAMP を指標に測定した。血清 IgG 濃度は抗マウス IgG 抗体を用い ELISA 法で測定した。

また、抗 CD20 抗体投与による抗原特異的な T 細胞の反応を検討する目的で、

Ad-TSHR289免疫前5日及び免疫後10日に抗CD20 抗体を投与したマウスの脾細胞を2週間後に採取して、TSHR289タンパクで4日間刺激し産生される抗原特異的IFN- γ およびIL-4、IL-10、IL-17をBio-Plex™ Suspension Array System を用いて測定した。

結果

① 抗 CD20 抗体の基礎検討:

抗 CD20 抗体により、濃度依存性に成熟 B 細胞 (B220⁺IgM⁺) が除去された (よって以降の実験ではより効果がみられた 250 μ g/マウス投与した)。末梢血 \geq 脾臓 $>$ 腹腔内の順で高率に成熟 B 細胞 (B220⁺IgM⁺) が除去された。抗 CD20 抗体の効果は少なくとも 3 週間は継続し、6 週目には B 細胞は投与前の約 80%に戻った。

② 抗 CD20 抗体のマウスバセドウ病モデルへの応用:

今回 Ad-TSHR289 (10⁸ pfu) を 3 週間隔で 2 回ないし 3 回筋肉内へ免疫することで、効率よく抗 TSH 受容体 (TSHR) 抗体が産生され、甲状腺機能亢進症と IFN- γ が誘導されるマウスバセドウ病モデルを用いた。

(i) 免疫開始前投与群: Free T₄ は 5 週目・10 週目共に優位に低下していた。抗 TSHRAb は 5 週目は抑制されていたが、10 週目にはコントロールと差が無かった。IgG は不変だった。

(ii) 2 回目免疫前投与群: (A) と同様の結果であった。

(iii) バセドウ病発症後投与群 (治療的効果を検討): Free T₄・抗 TSHRAb・TSA b・IgG において、コントロール群と差異を認めなかった。

③ マウスバセドウ病モデルでの抗原特異的 T 細胞産生サイトカイン (IFN- γ) の変化:

Ad-TSHR289 の免疫 5 日前に抗 CD20 抗体を投与した群では抗原特異的 IFN- γ の抑制を認めたが、免疫後 10 日目に抗 CD20 抗体を投与した群では、抗原特異的 IFN- γ の産生を認め、コントロール群と差異を認めなかった。

考察

まず基礎検討では、抗マウス CD20 抗体は濃度依存的に効率よく、かつ長期にわたって脾臓・末梢血・腹腔内の B 細胞を除去した。

次に、マウスバセドウ病モデルにおいて、免疫前の抗 CD20 抗体は抗 TSHR 抗体の産生及び甲状腺機能亢進症への進展を抑制し、さらに TSHR 特異的な脾細胞からの IFN- γ の産生も抑制して発症をおさえた。免疫後で疾患発症前の抗 CD20 抗体投与は、同様に抗 TSHR 抗体産生及びバセドウ病発症を効果的に抑制したが、抗原特異的 IFN- γ 分泌の抑制は認めなかった。これらより、バセドウ病において B 細胞は抗体産生だけではなく、初期の抗原提示・免疫調節に重要な細胞であることが示唆された。しかし、抗 CD20 抗体は甲状腺機能が亢進しバセドウ病が発症しているモデルマウスには治療効果を示さなかった。この原因の 1 つは、免疫後に抗体産生 CD20⁺B 細胞が CD20⁻形質細胞へ分化していたことが原因と考えられる。

B 細胞は抗体産生以外に抗原提示・IFN- γ などの種々のサイトカイン産生を介して免疫反応を多岐にわたって調節していることが考えられる。この事は、T 細胞レベルのみでなく B 細胞による疾患発症抑制コントロールも可能であることを示唆している。