

論文内容の要旨

Disulfiram treatment suppresses antibody-producing reactions by inhibiting macrophage activation and B cell pyrimidine metabolism

マクロファージ活性化と B 細胞におけるピリミジン代謝の制御を介したジスルフィラムによる抗体産生反応の阻害

日本医科大学大学院医学研究科 解析人体病理学分野

大学院生 陳 維力

Communications Biology. 2024 Apr 22;7(1):488. 掲載

DOI: 10.1038/s42003-024-06183-9

【背景】

臓器移植における抗体関連型拒絶反応 (antibody-mediated rejection: AMR)の原因となる抗体は、抗原提示細胞、CD4 陽性 T 細胞やマクロファージなどが関わる一連の免疫応答により、B 細胞から分化した形質細胞により産生される。その過程で、マクロファージは活性化し、細胞浸潤能を獲得し、貪食作用や抗原提示能を有し、自然免疫だけでなく、獲得免疫系においても重要な役割を果たしている。マクロファージの病変局所への浸潤能の獲得に必要なケモカイン受容体(CCR2 および CCR5)の細胞内シグナル伝達を担う蛋白「FROUNT」を、ジスルフィラム(Disulfiram: DSF)により阻害することで、マクロファージの病変局所への浸潤や活性化を抑制することを、我々の共同研究チームは明らかにしている。さらに、近年では腫瘍関連マクロファージや炎症性活性化マクロファージの DSF による制御により、腫瘍の進行や糸球体腎炎の活動性を抑制できることを報告している。今回、臓器移植で認める AMR に対する DSF の効果を検証し、形質細胞に分化する B 細胞に対する DSF の直接作用を確認する。

【方法】

1. In vivo 同種マウス組織適合抗原完全不一致・異所性心臓移植モデル実験:

5-6 週令 BALB/c マウスの心臓を摘出し、7-8 週令 C57BL/6 マウスの頸部に異所性心臓移植を行った。拒絶反応のうち、AMR における DSF の有効性を検討するために、あらかじめ抗 CD8 抗体を投与し、CD8 陽性 T 細胞を枯渇させ、細胞性拒絶反応の関与を除外した。移植 10 日前より DSF(1.6mg/1g 飼料)を開始し、移植心臓の鼓動が停止するまでの移植臓器生存日数を、DSF 非投与群と比較した。さらに組織学的に移植心臓の AMR の評価を行い、血中の抗ドナー特異的抗体の濃度を検討した。また、リンパ節や脾臓、骨髄での B 細胞や形質細胞の細胞数をフローサイトメトリーで評価し、細胞分裂能を組織学的に評価した。

2. In vitro 実験:

未処置マウスの脾臓より調製した B 細胞を (i) IL4 と抗 CD40 抗体、または (ii) リポポリサッカライド (LPS) による刺激培養を行い、DSF 添加による活性化抑制効果を、B 細胞のクラスター形成能と B 細胞の細胞増殖および形質細胞の細胞数により評価した。また、DSF と既存のケモカイン受容体阻害薬や B 細胞活性化抑制薬との効果を比較検討した。さらに、DSF の B 細胞への直接的な作用機序を次世代シーケンサーを用いた RNA-sequencing (RNA-seq)により遺伝子発現を解析した。

【結果と考察】

1. 組織適合抗原完全不一致・異所性マウス心臓移植モデルにおける DSF の効果:

CD8 陽性細胞を抗体で枯渇させた同種異系統・異所性マウス心臓移植モデルにおいて、DSF 投与は、移植心臓の生存期間を有意に延長させた。組織学的には、移植心臓における浸潤マクロファージの減少、Foxp3+制御性 T 細胞の増加、IgG や IgM、C4d 沈着の有意な減少を認めた。血清中の抗ドナー特異的 IgG や IgM、および IL-6 や IFN- γ の減少も認め、AMR が著明に抑制されていた。また、レシピ

エントのリンパ節や脾臓、骨髄においても、DSF 投与により、B 細胞および形質細胞数の減少や、脾臓 B 細胞領域における B 細胞の増殖抑制を認めた。

これらの結果は、心臓移植モデルにおいて、DSF がマクロファージの浸潤を抑えるだけでなく、B 細胞および形質細胞に対して直接的に働くことで、強力に、移植拒絶反応における抗体産生を低下させ、移植心臓の AMR を抑制し、移植臓器生着が延長することを示している。これらは、心臓移植だけでなく、様々な臓器移植の AMR に対しても有効であると考えられる。さらに、臓器移植だけではなく、すでに私達が証明してきている抗糸球体基底膜抗体型腎炎などを含めた、自己免疫性疾患への治療効果も期待される。

2. B 細胞および形質細胞の活性化における DSF 添加による効果の in vitro 評価:

B 細胞は (i) IL4 と抗 CD40 抗体、または (ii) リポポリサッカライド (LPS) による刺激培養により、DSF 非投与群では B 細胞活性化に伴うクラスター形成がみられた。DSF 添加によりクラスター形成が著明に抑制され、さらに B 細胞および形質細胞の細胞分裂や細胞数は DSF 濃度依存性に減少した。既存のケモカイン阻害薬や B 細胞活性化抑制薬との比較検討では、DSF が最も強力に B 細胞および形質細胞の活性化を抑制した。

この抑制効果の作用機序を検討するために次世代シーケンス RNA-seq で遺伝子発現の解析を行ったところ、ピリミジン代謝経路が B 細胞の活性化に関与しており、この経路を DSF が抑制していることが示された。これらの所見は、DSF が既報のマクロファージの活性化だけでなく、B 細胞および形質細胞の活性化を直接的に抑制することを示している。そして、B 細胞から形質細胞に分化し抗体を産生する過程にはピリミジン代謝経路が関与しており、DSF はこの経路を抑制することが可能で、新たな治療法になることを示した。

【結語】

従来、断酒薬として臨床で用いている DSF は FROUNT の阻害によりマクロファージの遊走や活性化を抑制することを報告してきたが、この研究では、マクロファージの遊走や活性化の抑制に加え、DSF は B 細胞や形質細胞への直接的な活性化抑制作用を有し、抗体産生を抑制し、臓器移植後の AMR に対する有効な治療法になることを示した。DSF が B 細胞や形質細胞を標的にし、抗体産生能を制御する新規治療法として用いられることが期待される。