






OPEN ACCESS

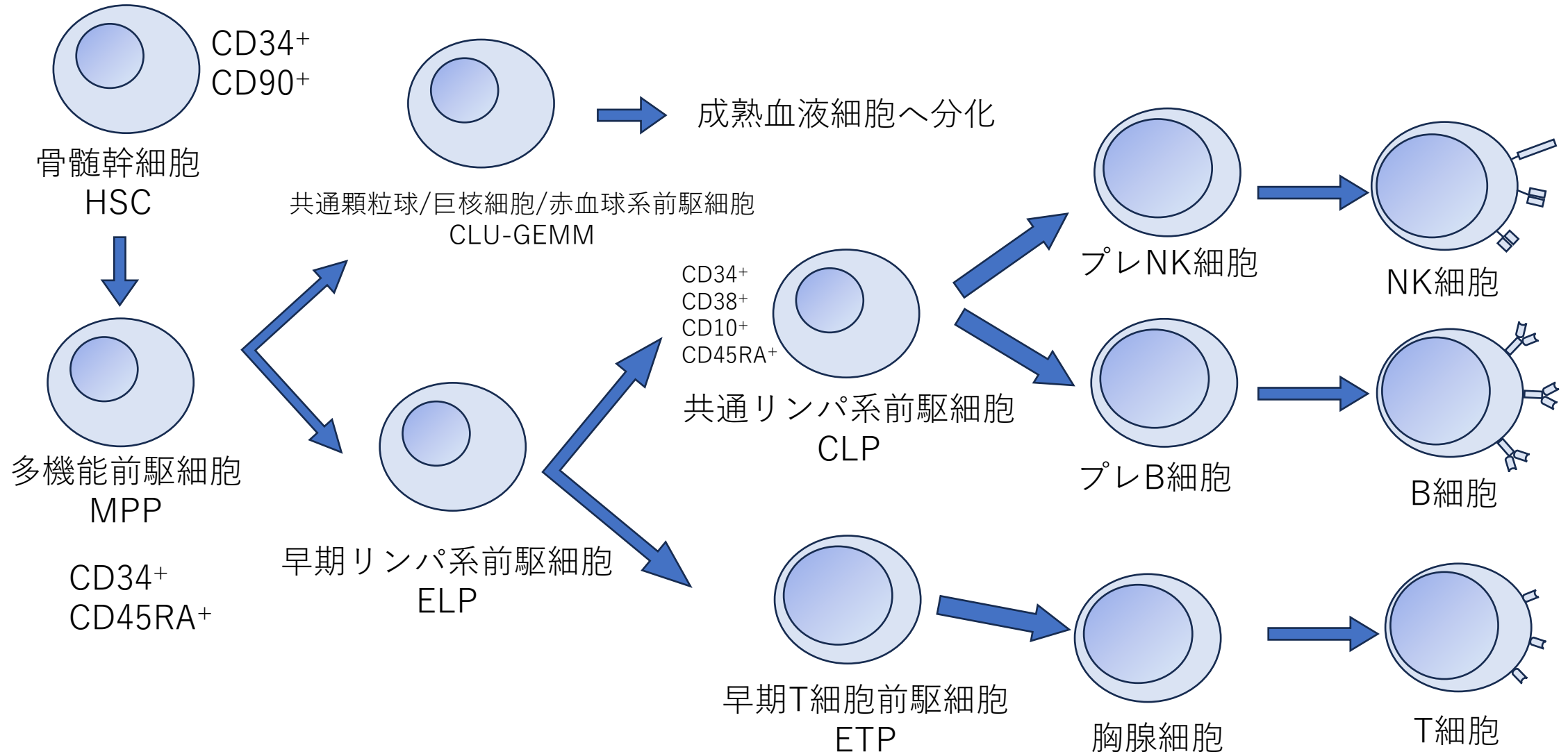
TRANSLATIONAL SCIENCE

Defects in B-lymphopoiesis and B-cell maturation underlie prolonged B-cell depletion in ANCA-associated vasculitis

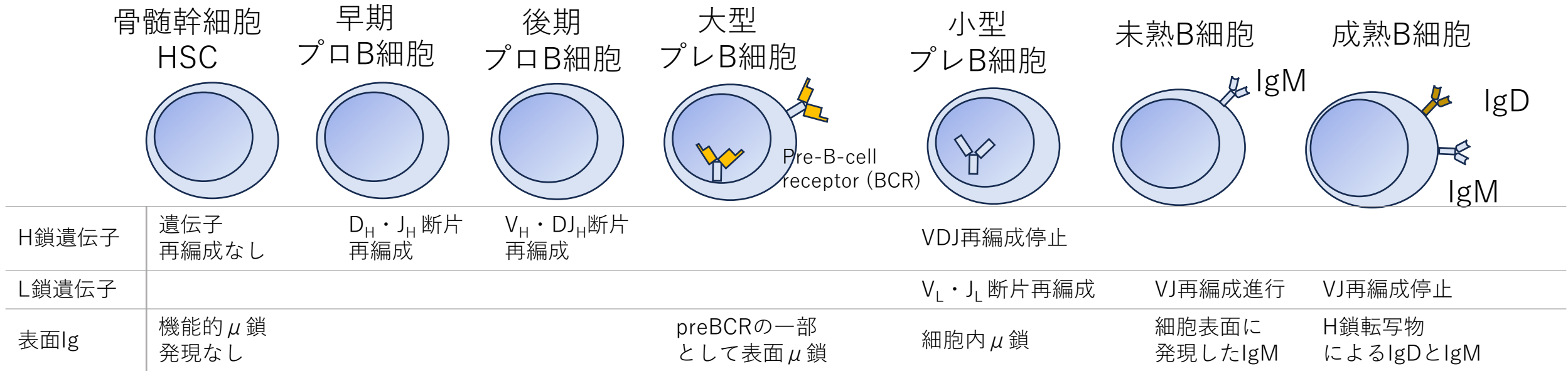
Jens Thiel,^{1,2} Franziska M Schmidt,³ Raquel Lorenzetti,^{1,2} Arianna Troilo,² Iga Janowska,² Lena Nießen,² Sophie Pfeiffer,² Julian Staniek,² Bruno Benassini,² Marei-Theresa Bott,² Jakov Korzhenevich,³ Lukas Konstantinidis,⁴ Frank Burgbacher,⁴ Ann-Katrin Dufner,² Natalie Frede ,² Reinhard E Voll,^{2,5} Jan Stuchly,⁶ Marina Bakardjieva,⁶ Tomas Kalina,⁶ Cristian Roberto Smulski,⁷ Nils Venhoff ,² Marta Rizzi ^{2,3,5,8}

[Thiel J, et al. Ann Rheum Dis 2024;0:1-13.]

骨髓幹細胞(HSC)からB細胞の分化



B細胞の分化



FLT3

シグナル伝達

IL-7R

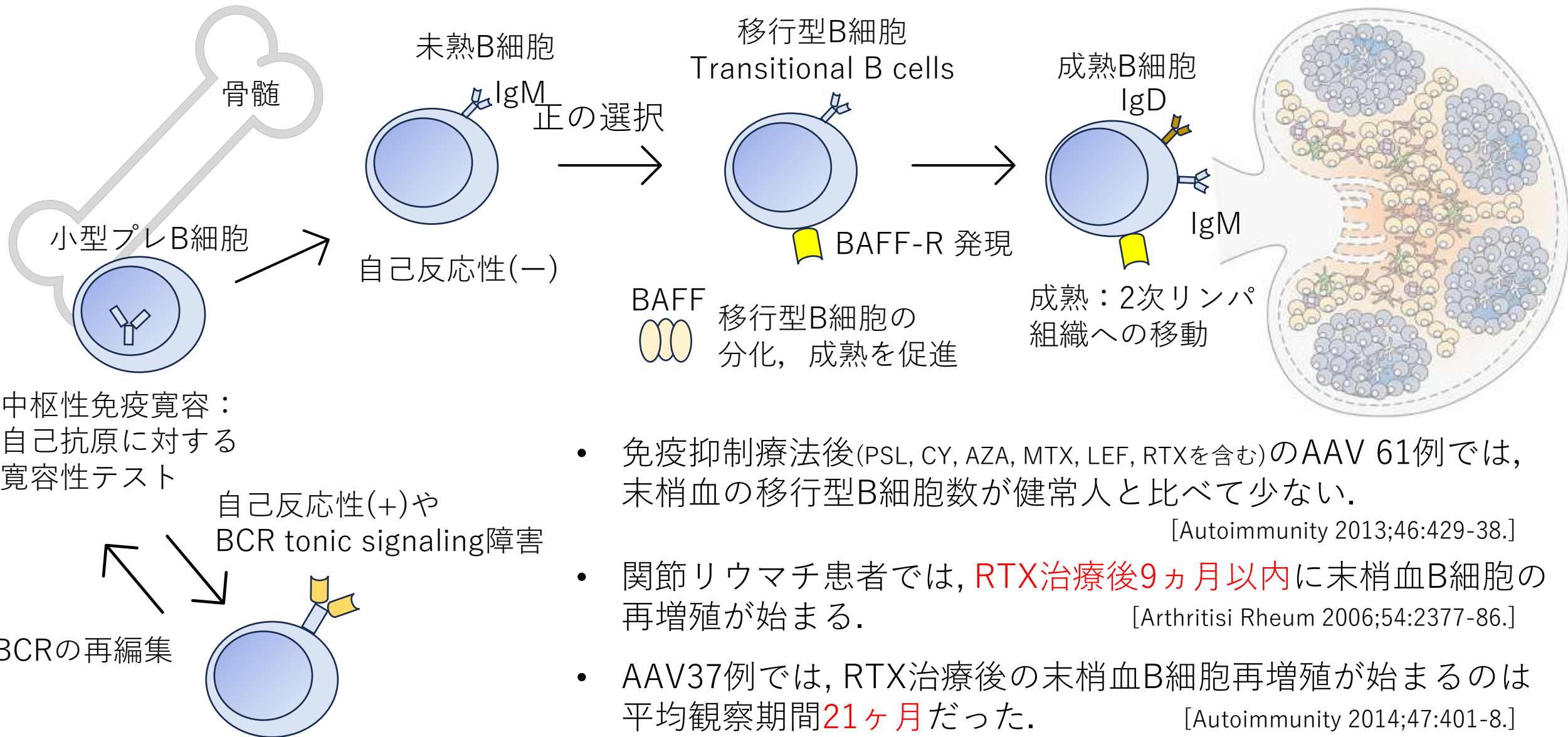
増殖因子レセプター

CXCL12

外因性調節因子

[Janeway's Immunobiology, 10th edition]
[Immunol Lett. 2023;261:1-12.]

骨髓→末梢へのB細胞分化



- 免疫抑制療法後(PSL, CY, AZA, MTX, LEF, RTXを含む)のAAV 61例では、末梢血の移行型B細胞数が健常人と比べて少ない。
 [Autoimmunity 2013;46:429-38.]
- 関節リウマチ患者では、**RTX治療後9ヵ月以内**に末梢血B細胞の再増殖が始まる。
 [Arthritis Rheum 2006;54:2377-86.]
- AAV37例では、RTX治療後の末梢血B細胞再増殖が始まるのは平均観察期間**21ヶ月**だった。
 [Autoimmunity 2014;47:401-8.]

目的・方法

- AAVにおけるRTX治療後のB細胞再増殖が、他の自己免疫疾患と比べて遅い原因を明らかにするため、末梢血・骨髄のB細胞を解析する。
- 患者のinclusion criteria ;
 - A. RTX治療を受け、その後の観察期間が最低6ヵ月以上ある
 - B. 新たにAAVと診断され、治療を受けていない(短期GCを除く)
- B細胞再増殖の定義 ; 末梢血B細胞 ≥ 5 個/ μ L (CD19⁺でgating)
- 骨髄穿刺液は新規発症の活動性AAV (n=3) と再発AAV (n=4) で採取

AAV 91例と健常(HD) 58例の患者背景

Patient characteristics	AAV (n=91)	HD (n=58)
Sex, female/male, n (%)	36 (39.56)/55 (60.44)	22 (37.93)/36 (62.07)
Age at analysis, median years (IQR)	60.78 (51.14–71.15)	59.9 (49.75–67.2)
ANCA specificity, n (%)*		
PR3	58 (63.74)	
MPO	20 (21.98)	
PR3 and MPO	2 (2.2)	
No ANCA	13 (14.29)	
Elevated CRP, n (%)†	37 (41.57)	
Elevated CRP (mg/L), median (IQR)	14.2 (6.93–23.8)	
CRP <5 mg/L, n (%)†	52 (58.43)	
Diagnosis		
GPA, n (%)	62 (68.13)	
MPA, n (%)	10 (10.99)	
EGPA, n (%)	19 (20.88)	
Disease form, n		
Localised	5	
Generalised	86	
Clinical manifestations, n (%)		
Renal	49 (53.85)	
Pulmonary	70 (76.92)	
ENT	68 (74.73)	
Skin	20 (21.98)	
CNS	16 (17.58)	
PNS	41 (45.05)	
Cardiac	11 (12.09)	
Creatinine (mg/dL), median (IQR) at time of analysis	0.99 (0.85–1.27)	
eGFR (mL/min/1.73 m ²), median (IQR) at time of analysis	73 (49.25–87.75)	
Duration of disease, median months (IQR)	70 (26.5–123)	

[ANCA]	N (%)
PR3+	58(63.74%)
MPO+	20(21.98%)
PR3 + MPO+	2(2.2%)
ANCA-	13(14.29%)

[診断]	N (%)
GPA	62(68.13%)
MPA	10(10.99%)
EGPA	19(20.88%)

[臨床像]	N (%)
Renal	49(53.85%)
Pulmonary	70(76.92%)
ENT(ear, nose, throat)	68(74.73%)
PNS(peripheral nervous system)	41(45.05%)

治療歴

AAV 91例の治療歴

Treatment characteristics	
Cyclophosphamide sum dose (g) at time of analysis, median (IQR)	6 (0-13)
Prednisone equivalent (mg/day) at time of analysis, median (IQR)	5 (0-5)
DMARD at time of analysis, n; dose, median (IQR)	
Azathioprine (mg/day)	19; 100 (100-150)
Methotrexate (mg/week)	20; 15 (14.38-15)
Leflunomide (mg/day)	11; 20 (20-20)
Mycophenolate mofetil (mg/day)	5; 720 (720-1000)
Other	1
No DMARD	14
RTX prior to analysis, n (%)	
Median time from last RTX infusion to analysis; median months (IQR)	17 (11-28.5)
Cumulative RTX dose (g), median (IQR)	2.67 (2-4)
DMARD, disease-modifying antirheumatic drug; RTX, rituximab.	

CYC sum dose (median, IQR)	6 (0-13)
PSL mg/d (median, IQR)	5 (0-5)
過去のRTX使用あり (N)	77
最終RTX~解析の期間 (median months, IQR)	17 (11-28.5)
新規発症 (N)	14
GC短期使用あり (N)	10
median sum dose [mg/days], IQR	35 (0.63-93.75)
治療期間 (median days, IQR)	3 (0-5)
解析時のIS (N, dose, IQR)	
MTX	20; 15 (14.38-15)
AZA	19; 100 (100-150)
LEF	11; 20 (20-20)

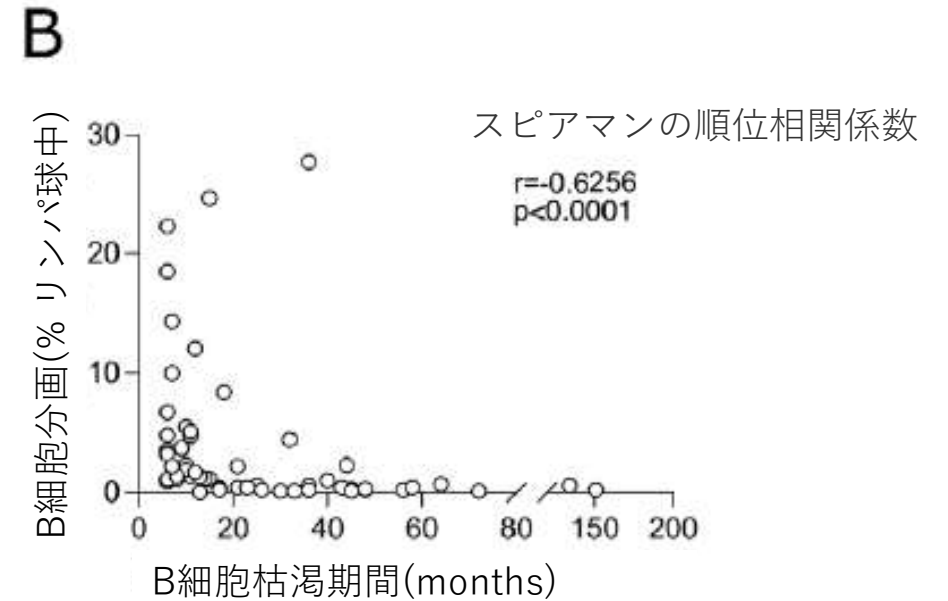
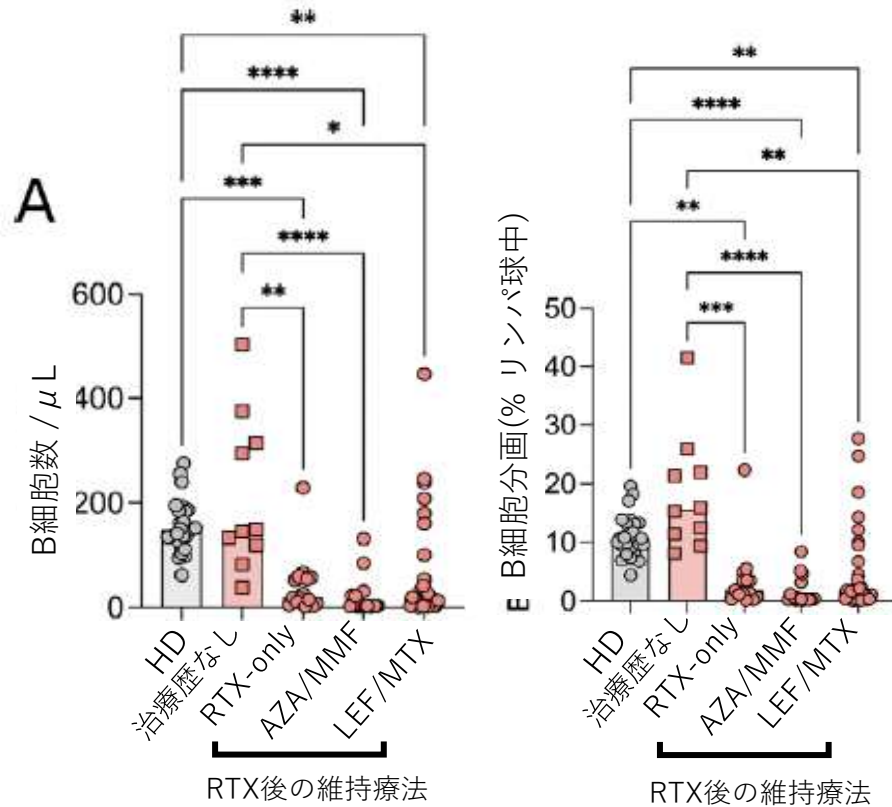
骨髄穿刺液採取したRTX-treated AAV 7例の治療歴

GC, IC未使用 (n)	1
LEF (n)	1
短期GC (n, median [d], IQR)	2; 1 (0.5-3)
CYC (n, median [g], IQR)	3; 1 (1-2.25)

末梢B細胞 AAV (n=74*/91) vs HDで解析

HD, 治療歴なし(12例), RTX治療あり(62例)の
B細胞数/分画

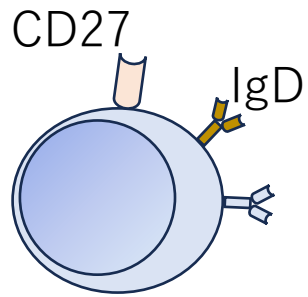
* 14例は測定できず, 3例は検体採取できず
RTX治療あり62例のB細胞枯渇期間



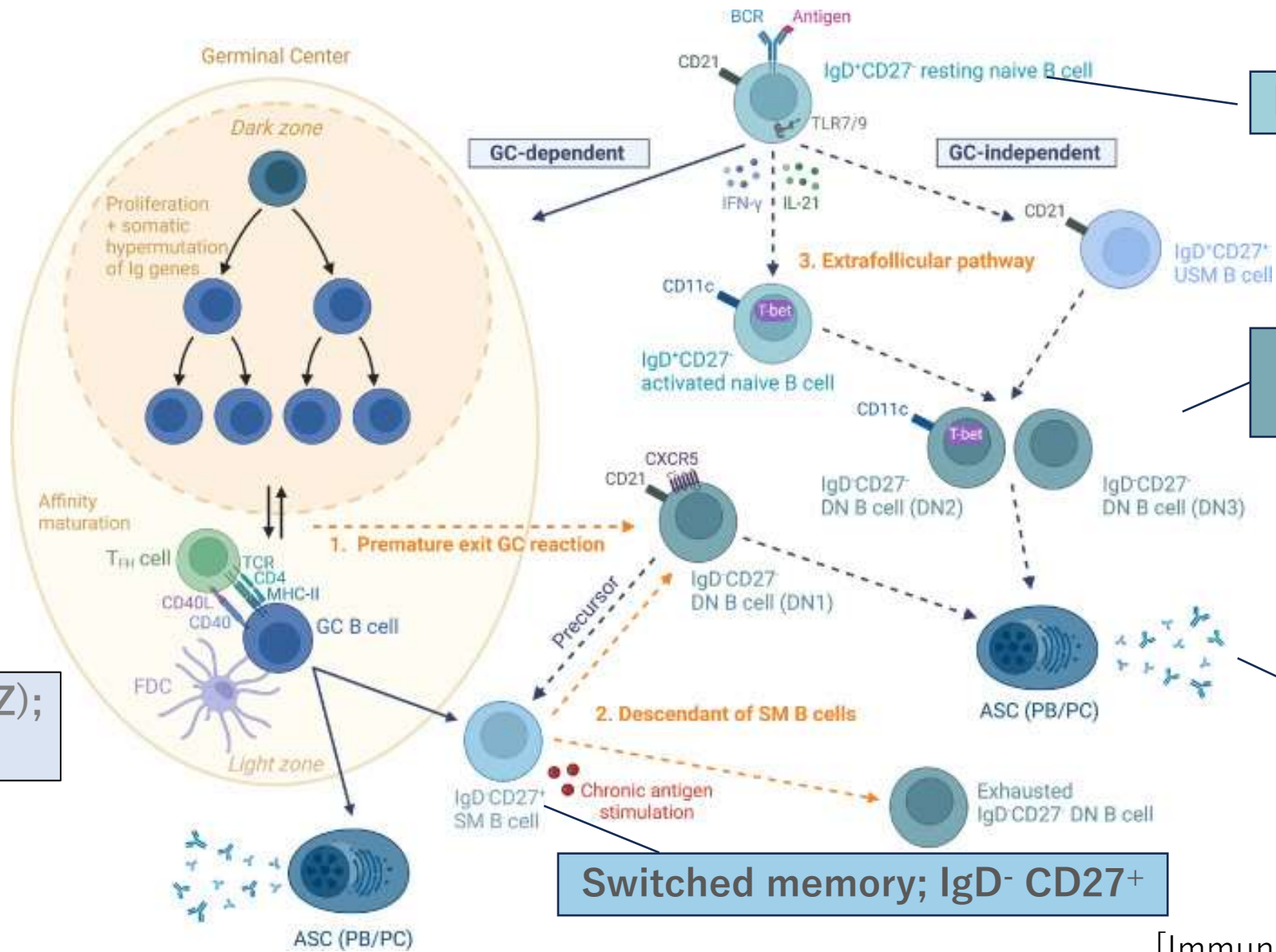
中央値 17months(IQR 9-36)
B細胞枯渇下でのRTX再投与した14例は,
最終RTXから再投与までの期間とした。

RTX-treated AAVはHDや未治療AAVと比較してB細胞数/分画が減少し, B細胞枯渇期間と反比例。

B細胞分化



Marginal zone (MZ);
IgD⁺CD27⁺



Naïve ; IgD⁺ CD27⁻

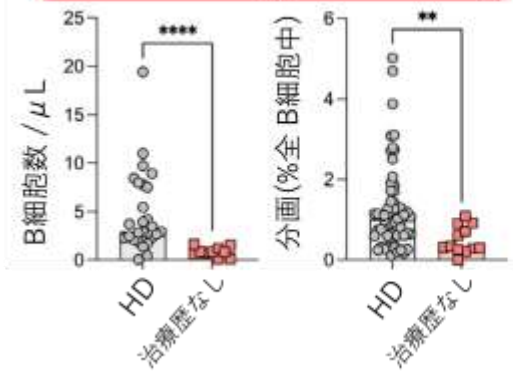
Double negative;
IgD⁻ CD27⁻

Switched memory; IgD⁻ CD27⁺

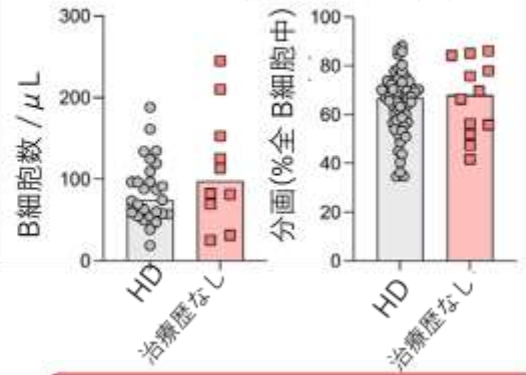
Plasmablasts;
CD38⁺CD27⁺

未治療AAVにおけるB細胞

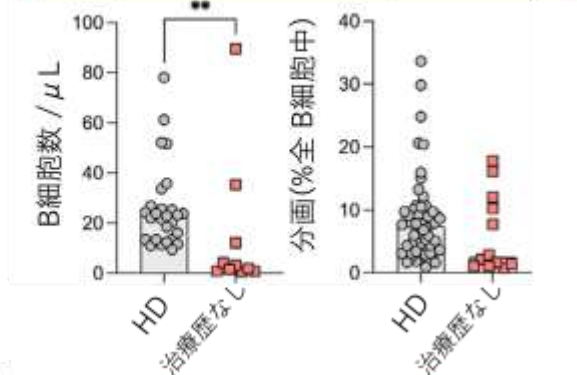
Transitional (IgM⁺⁺CD38⁺⁺)



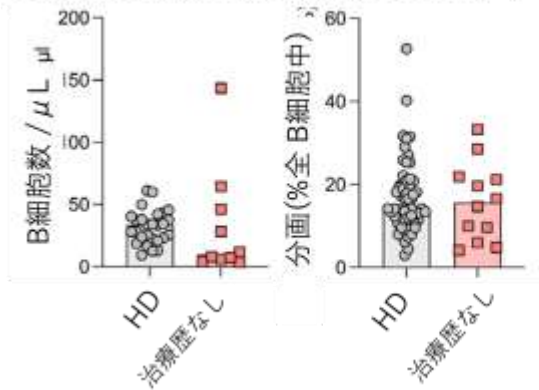
Naïve (IgD⁺CD27⁻)



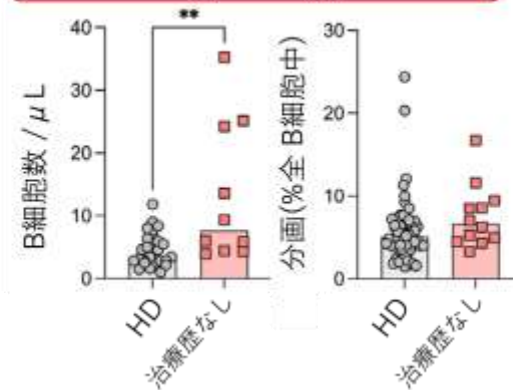
Marginal zone-like (IgD⁺CD27⁺)



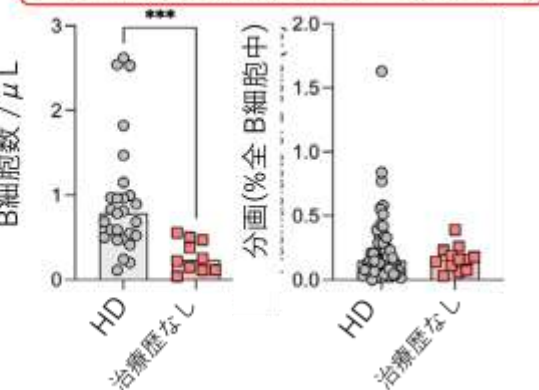
Switched memory (IgD⁻CD27⁺)



Double negative (IgD⁻CD27⁻)



Plasmablasts (CD38⁺⁺CD27⁺⁺)



- 未治療AAVはHDと比較して Transitional B細胞数, 分画共に有意に減少し, Marginal-zone like (MZ), Plasmablastsは細胞数が有意に減少していた。
- Double negative(=Extra follicular) B細胞数はHDと比較して有意に上昇していた。

異なる維持治療AAVでのB細胞

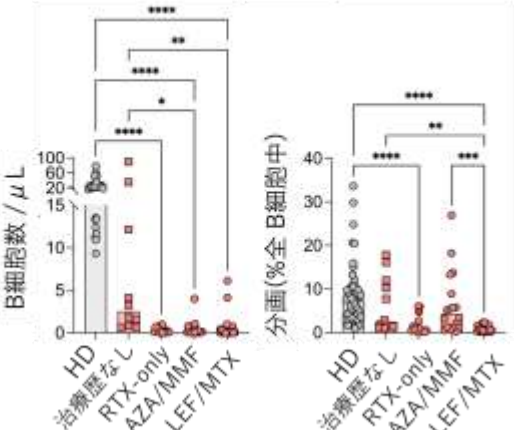
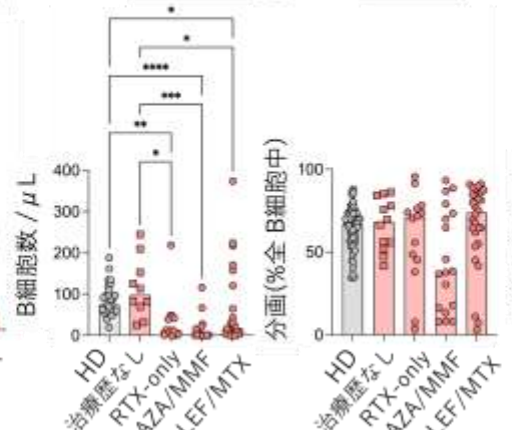
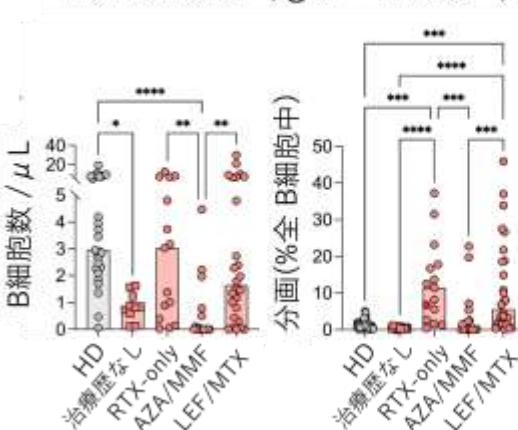
Transitional (IgM⁺⁺CD38⁺⁺)

Naïve (IgD⁺CD27⁻)

Marginal zone-like (IgD⁺CD27⁺)

[Transitional B細胞]
RTX後の維持療法AZA/MMFは著明に減少。一方RTX onlyやLEF/MTXはAZA/MMFよりは多い。

[Naïve B細胞]
分画でAAVとHDに差はない



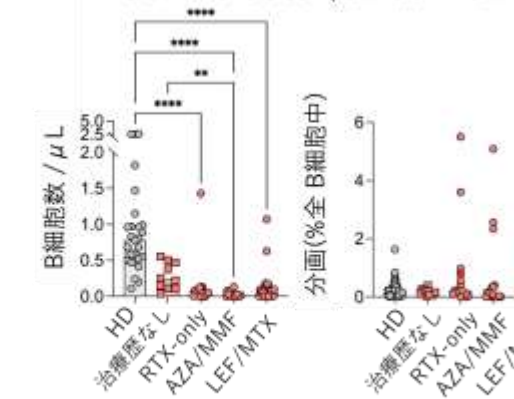
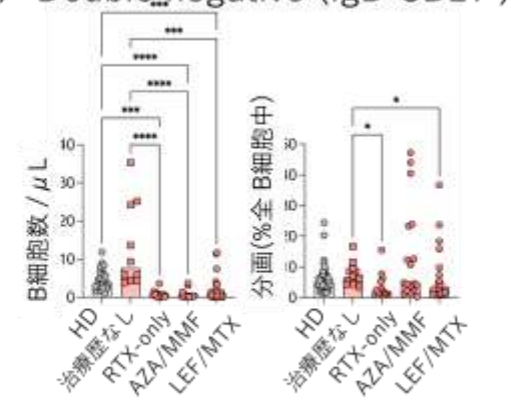
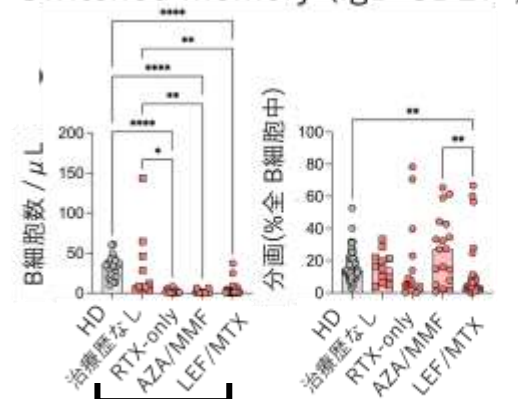
Switched memory (IgD⁻CD27⁺)

Double negative (IgD⁻CD27⁻)

Plasmablasts (CD38⁺⁺CD27⁺⁺)

[Marginal zone-like, Switched memory]
AZA/MMFでの分画は上昇。一方, RTX onlyやLEF/MTXは上記+Double negative分画は減少。

[Plasmablasts]
絶対数はHDと比べてRTX treated AAVは減少, 分画はAAVとHDに差はない

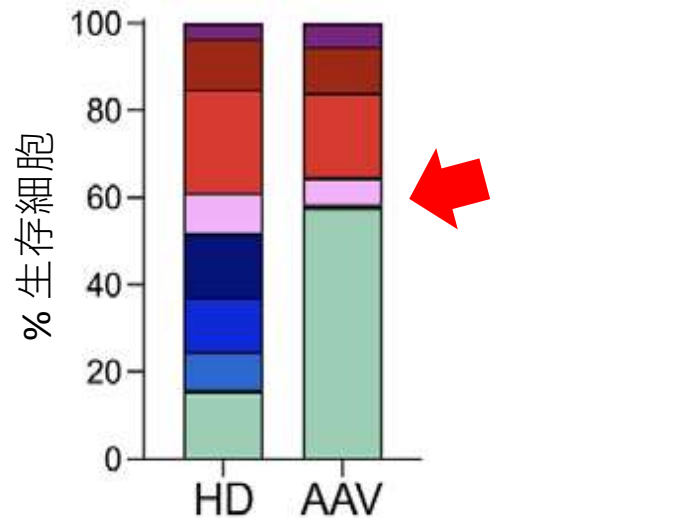
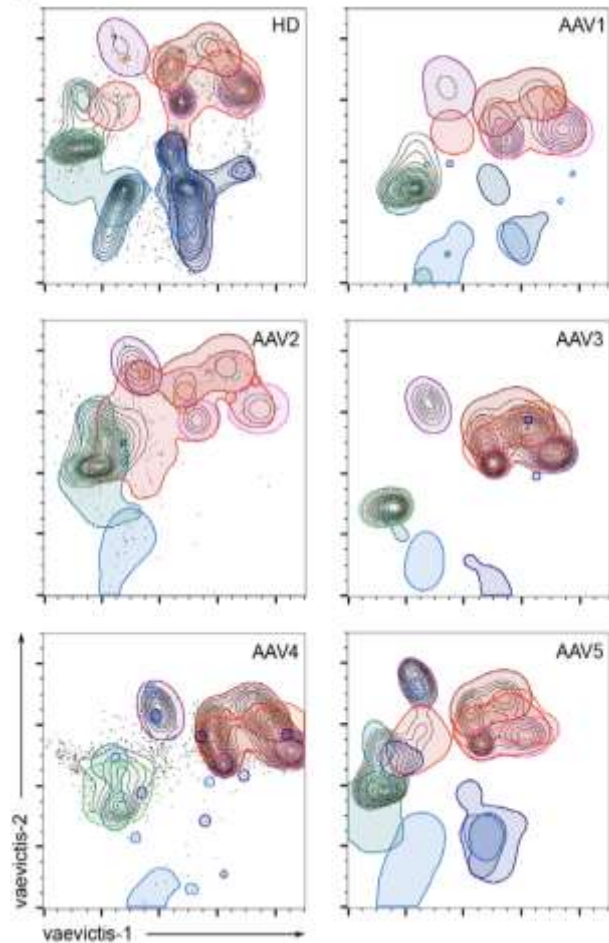


RTX後の維持療法

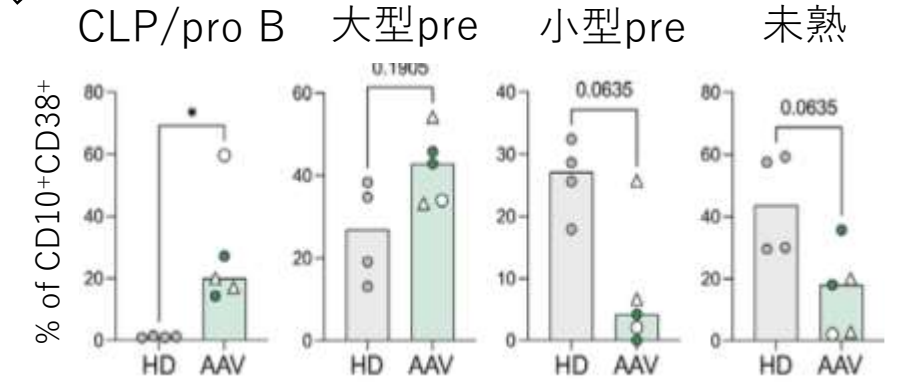
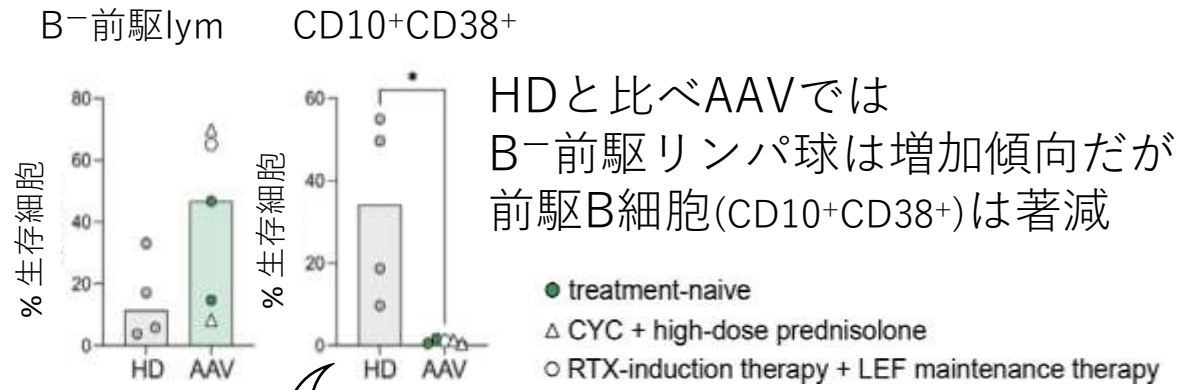
骨髓穿刺液(BM)の解析 BM 7検体(GPA n=3; MPA n=1; EGPA n=3)

Mass cytometry(CyTOF) ;

AAV5検体とHDでHSC~Transitional B cellsの分化段階を解析.

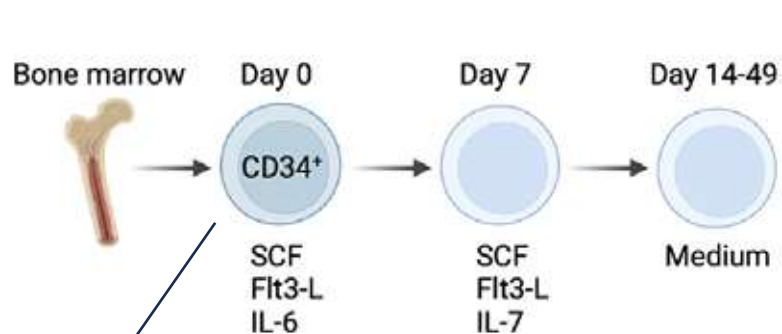


HDと比べAAVでは前駆B細胞 (CLP, pro B, 大型/小型pre B, 未熟) が著明に減少/消失.

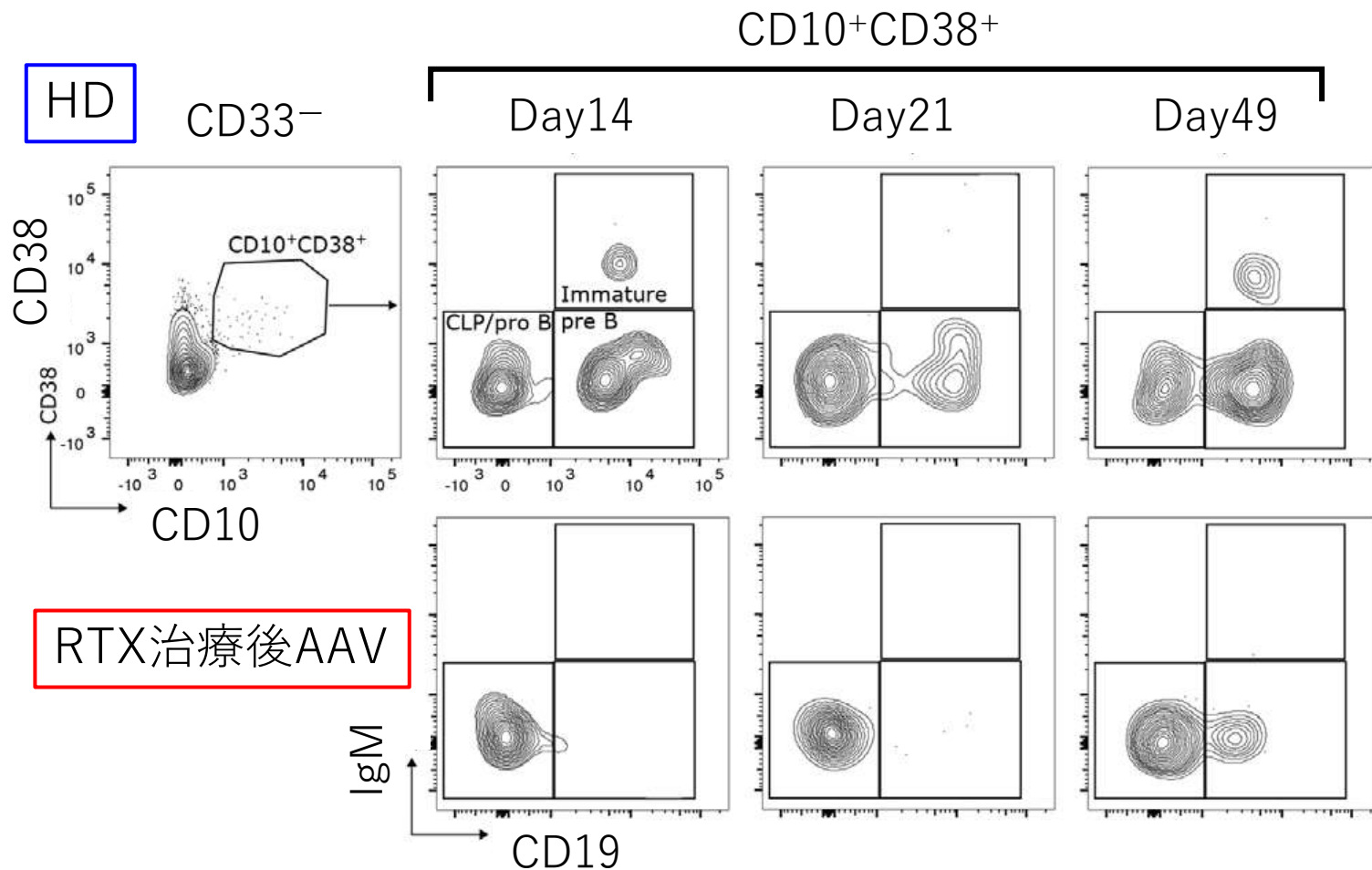


前駆B細胞内の分布に差はない。HSC→ B cellsへの移行に障害の可能性.

*In vitro*でB細胞分化能力を測定

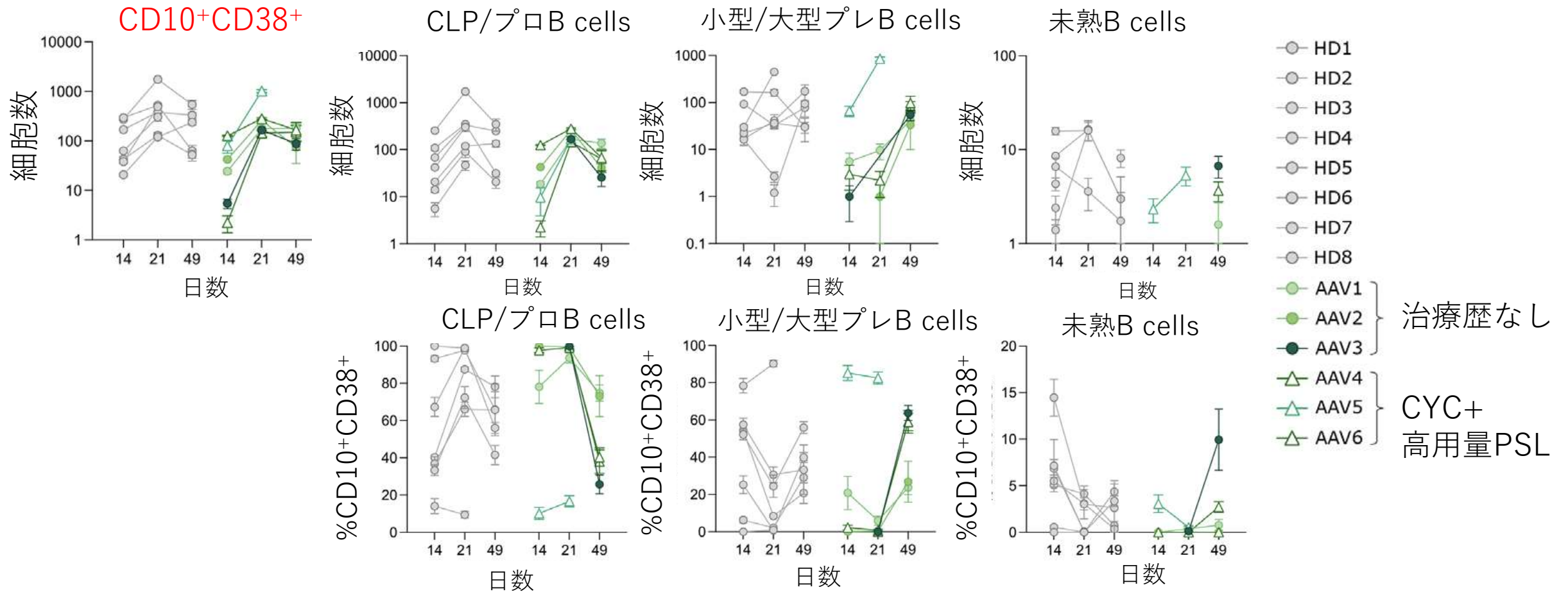


- HSCs
- CLP, プロB (CD10⁺CD38⁺CD19⁻IgM⁻)
- 小型/大型プレB (CD10⁺CD38⁺CD19⁺IgM⁻)



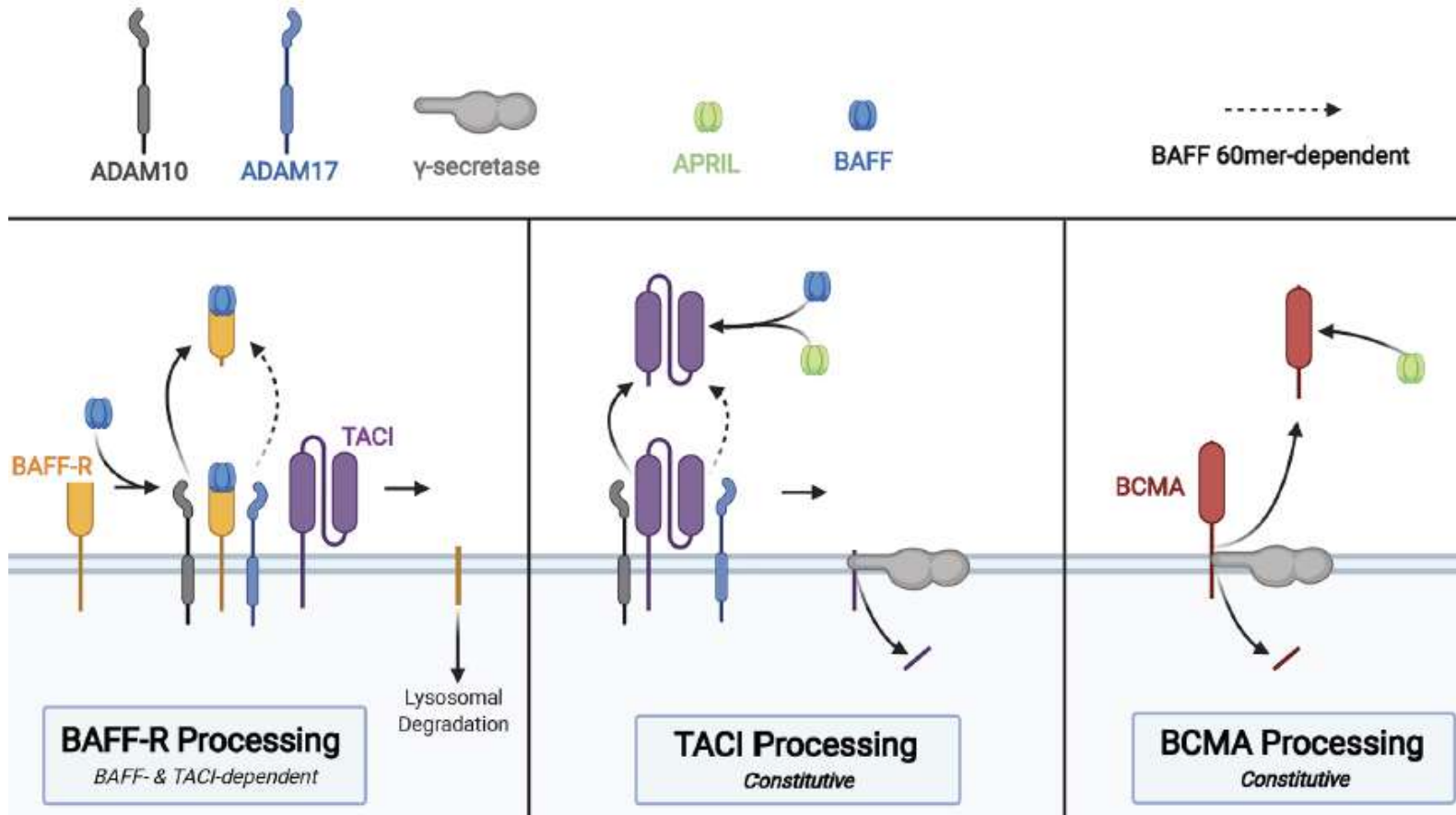
- HDでは Day14から未熟 B cellsを認めた。
- RTX-treated AAVの1例はDay7で増殖できず、以降の分析ができなかった。

In vitroでB細胞分化能力を測定



- 残りのAAV 6例 (CYC+高用量PSL使用3例と未治療3例)とHDで比較.
- AAVでは, CD10+CD38+Bcellsの発育効率・細胞数が低かった (治療とは無関係).
- AAVでは, その他の発達段階のB cellsもHDと比較して細胞数が少なかった.

BAFF-R, TACI, BCMAと膜プロセッシング



[BAFF-Rの膜プロセッシング] BAFFの結合でADAM10/17によるBAFF-Rのプロセッシングを誘導する. BAFF-Rの膜結合型C末端断片はエクストドメインの切断後リソソームで分解される.

[TACIの膜プロセッシング] ADAM10で切断, 続いてγ-セクレターゼによって膜結合型C末端断片が切断される. 可溶性TACI(sTACI)やTACI-FcはBAFFとAPRILに結合しNFκBの活性化とB細胞の生存を低下させる.

[BCMAの膜プロセッシング] BCMAはγ-セクレターゼで切断され, 可溶性BCMA(sBCMA)を放出. sBCMAはAPRILに結合するとAPRIL誘導性NFκBの活性化を阻害できるが, BAFF誘導性NFκB活性化は阻害できない.

BAFF-R

末梢Bcells 生存を仲介し, Transitional Bcellsの成熟をサポートする

TACI

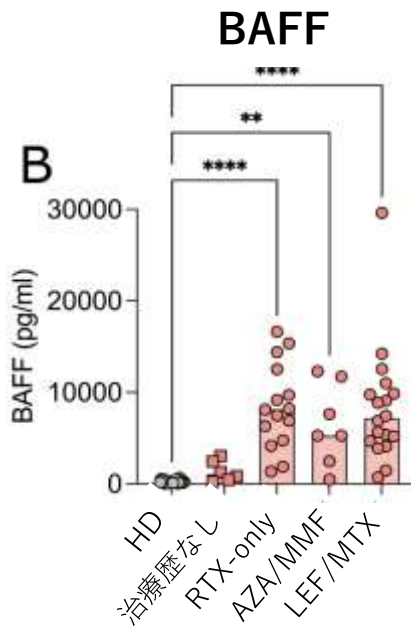
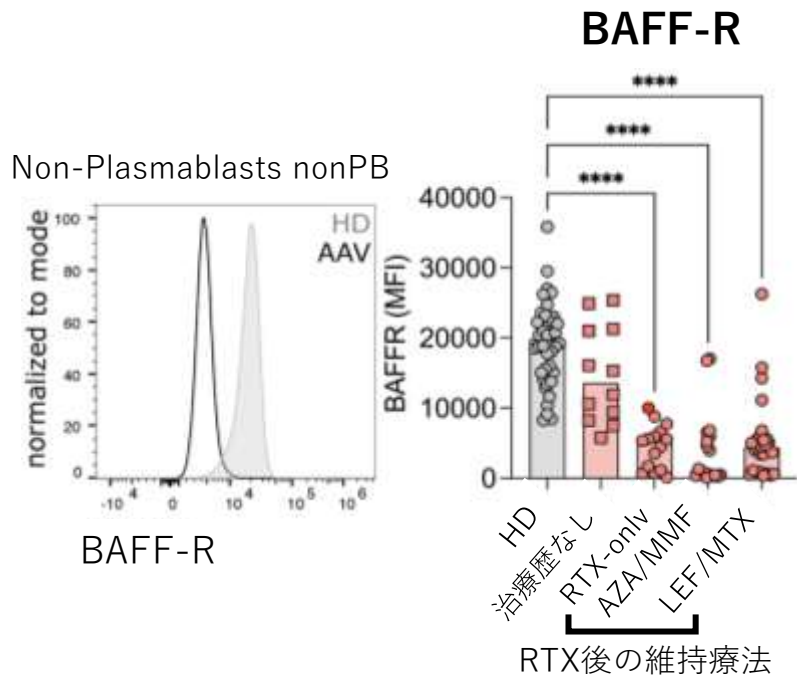
B細胞活性化を負に制御

BCMA

BAFF/APRILに結合し形質細胞生存に関与

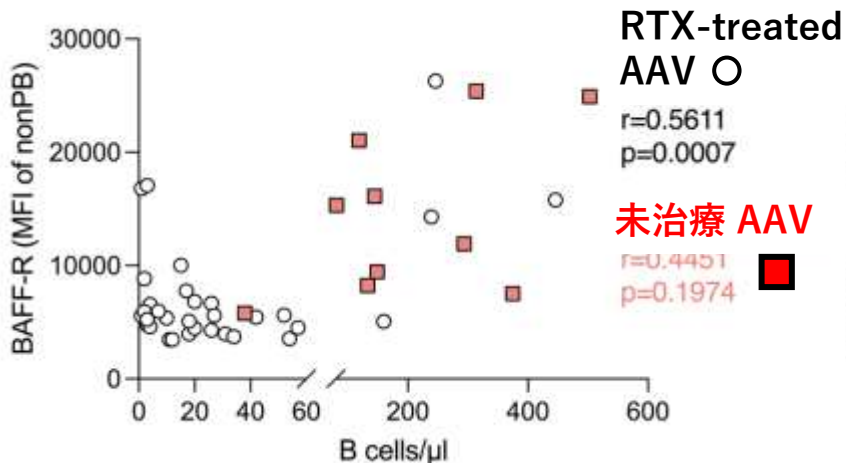
[Front. Immunol. 11:622114.]

AAVにおけるBAFF, BAFF-Rの発現

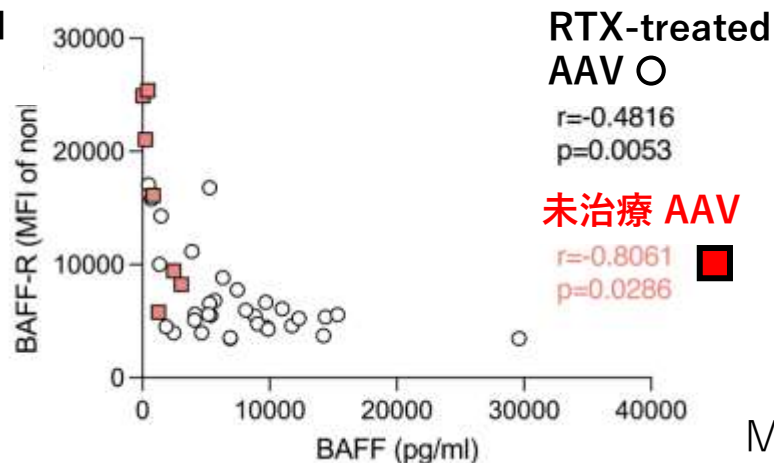


- BAFF-R発現は,未治療AAVでHDより低い. RTX-treated AAV例で有意に低下する.
- 血清BAFFは, RTX-treated AAVでHDや未治療AAVより高い.

BAFF-RとB細胞数の相関



BAFF-RとBAFFの相関

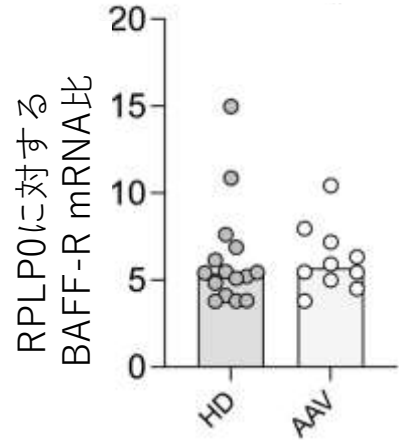


- BAFF-R発現は, RTX-treated AAVのB cells数と正の相関
- BAFF-R発現は, 血清BAFF (AAV未治療およびRTX-treated AAV) と逆相関.

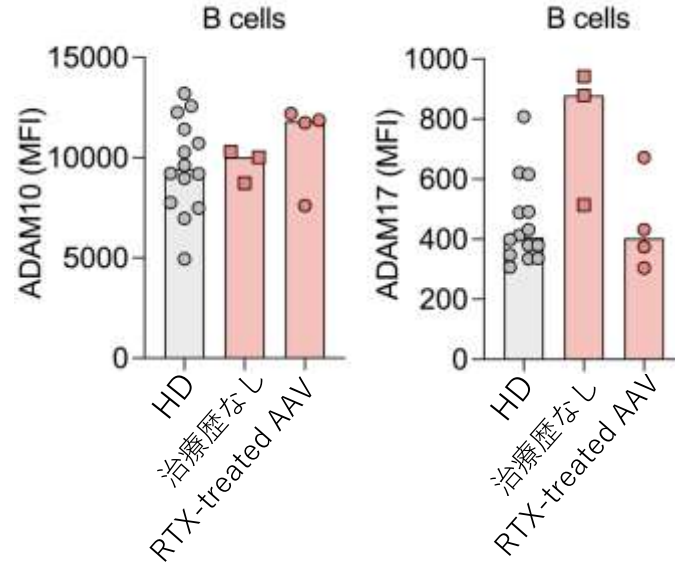
MFI; mean fluorescence intensity, 平均蛍光強度

AAVにおけるBAFF-Rプロセッシング

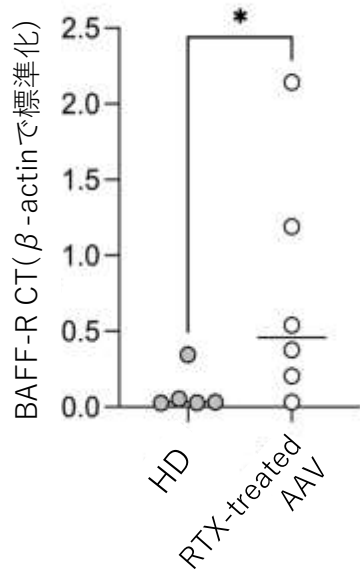
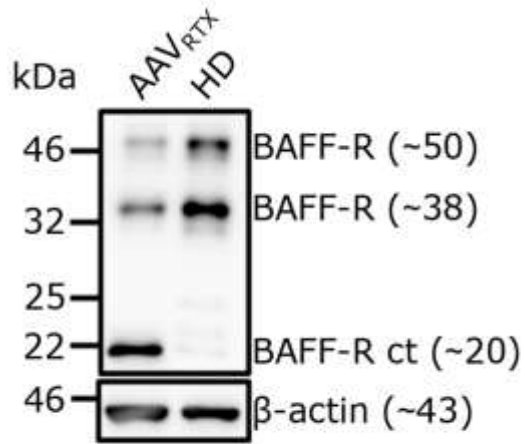
BAFF-R mRNA



- BAFF-R mRNA発現量はRPLP0(Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0;ハウスキーピング遺伝子)の相対比でも有意な差はなかった。



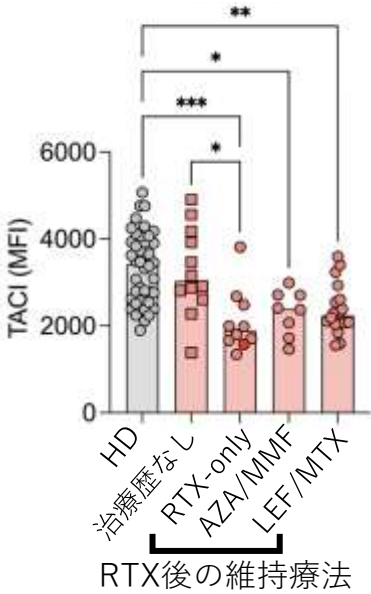
- BAFF-RプロセッシングはTACI-BAFF結合で誘導されるADAM10やADAM17で実行。
Cell Rep. 2017;18(9):2189-2202.
- HDと比較しAAVではADAM10の発現は変わらず, ADAM17でAAV2例のみ発現亢進。



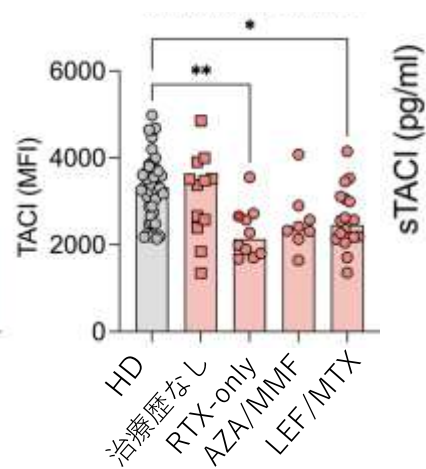
- BAFF-Rの細胞外ドメインが脱落し, 細胞表面C末端(BAFF-R CT)を測定することでBAFF-Rプロセッシングを解析。
[Cell Rep. 2017;18(9):2189-2202.]
- RTX-treated AAVでBAFF-R発現が少ない6例をHDと比較すると, BAFF-R CTは上昇していた。
→BAFF-Rプロセッシングでの脱落が, BAFF-R発現量低下の可能性。

AAVにおけるTACIの発現

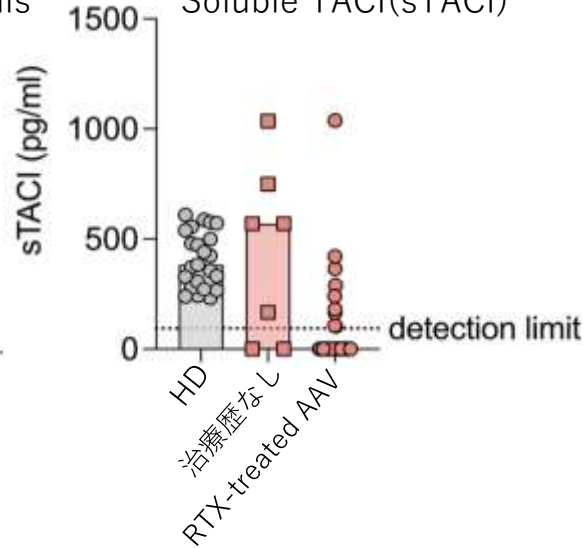
MZ-like B cells



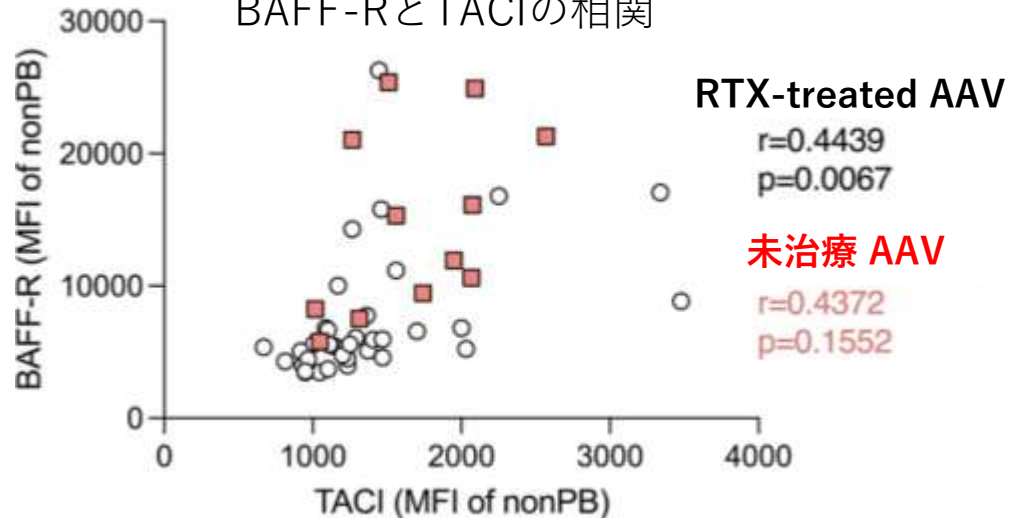
Switched memory B cells



Soluble TACI(sTACI)



BAFF-RとTACIの相関



- MZ-like/switched memory B cellsのTACI発現は、未治療AAVはHDと変わらないが、RTX-treated AAVは減少。

- 血中の可溶性TACI(sTACI)は上昇しなかった。

- RTX-treated AAVにおけるBAFF-RとTACIは正の相関があった。

AAV B細胞の培養実験

Day 0
Isolated B cells



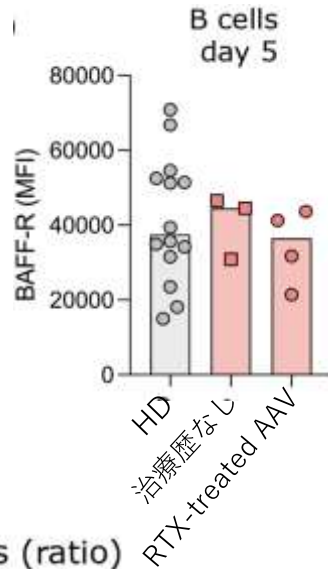
IMDM + 3% FCS
+/- 50 ng/ml BAFF



Day 5

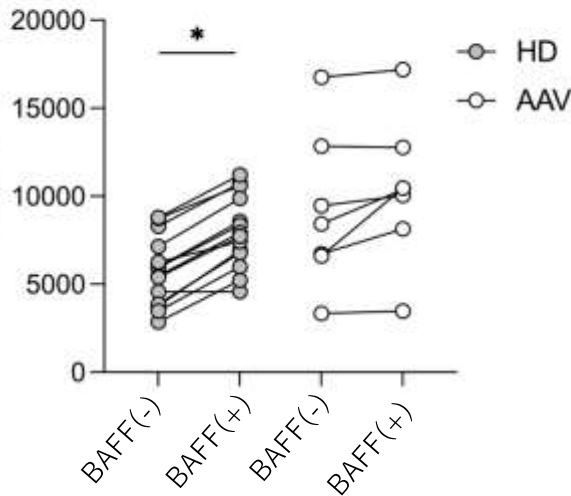


Analysis by
flow cytometry

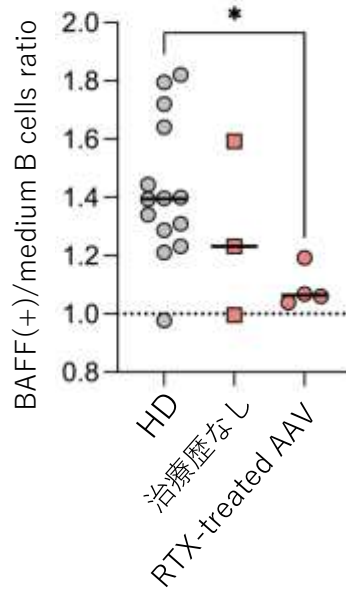


IMDM(培地)+3%FCSに50ng/mL BAFF(+/-)で AAVのB細胞を培養し, Day5にflow cytometryで解析.

B cells (counts)
day 5



B cells (ratio)
day 5



BAFF(+)
の
場合,
HD
と
比較
して
RTX-
treated
AAV
の
生
存
B
cells
数
は
増
え
ず,
BAFF
(+)
/
medium
B
細胞
比
は
減
少
し
て
い
た。
→
BAFF
を
加
え
て
も
AAV
の
生
存
B
細胞
は
増
え
な
か
つ
た。

まとめ

	未治療AAV	RTX-treated AAV
B細胞数	HDと比較して著変なし	HDや未治療AAVより減少
B細胞枯渇期間	—	B細胞数と反比例
Transitional B細胞	HDと比較して減少	RTX-onlyやLEF/MTXと比較してAZA/MMF群は有意に減少
Marginal zone-like B細胞	HDと比較して減少	HDや未治療AAVと比較して絶対数は有意に減少 HDと比較して分画はRTX-onlyやLEF/MTX群で有意に減少 LEF/MTXと比較して分画はAZA/MMF群で有意に上昇
Plasmablasts	HDと比較して減少	HDと比較して絶対数は減少, 分画は有意差なし
Double negative (Extra follicular) B細胞	HDと比較して上昇	未治療AAVと比較して分画はRTX-onlyやLEF/MTX群で有意に減少
Switched memory B細胞		HDと比較して分画はLEF/MTX群で有意に
CD10⁺CD38⁺ (CLP/プロ/プレ/未熟) B細胞	HDと比較して細胞数や発育効率 有意に減少	
BAFF-R	HDと比較して発現低い傾向	HDと比較して有意に低下 B細胞数と正の相関
BAFF	BAFF-R発現と逆相関	未治療AAVと比べて上昇の傾向 HDと比べて有意に上昇 BAFF-R発現と逆相関
BAFF-R CT	—	BAFF-R発現低下例では有意に上昇していた
TACI	HDと比較して著変なし	HDと比べて有意に減少 BAFF-R発現と正の相関

Discussion

RTX治療AAVのB細胞数とB細胞枯渇期間が反比例。

- HSCは厳密に制御された環境であり, SCF (幹細胞因子; stem-cell factor), IL-7, CXCL12などのシグナルがB細胞発達に不可欠である.
- Flt3シグナル伝達の調節はHSC・CLPの増殖や以降の発達を制御する.
AAVの血清でFlt3 Ligandの変化が報告されている.

[Annals of the Rheumatic Diseases 2017;76:332.]

→シグナル伝達経路が関与している可能性が示唆される。

Discussion

未治療AAVのTransitional B細胞が低下してもNaïve B細胞数低下に繋がらなかった。

- Transitional B細胞(3日)とNaïve B細胞(3ヶ月)の異なる半減期の影響を示唆

AAVでMZ-B細胞数減少と, BAFF-R発現低下を認めた。

- BAFF-R依存的にMZ B細胞は生存・成熟し, 双方の関連性を示唆。

[Front Immunol. 2018;9:2285.]

RTX治療を受けたAAVでのBAFF-R発現が低かった。

- 未熟B細胞が効率的に成熟B細胞段階に進んでいないかもしれない。

Discussion

異なる免疫抑制剤RTX治療後のAZAとMMFは最も長いB細胞再増殖期間と移行増殖時間やB細胞の顕著な減少と関連していた。

- MMFはIMPDH阻害を介してDNA合成を抑制しB細胞増殖を阻害(*in vitro*).

[PLoS ONE 2020;15:e0235743.]

→各免疫抑制剤によるB細胞再増殖/分化との関連は更なる研究が必要。

Discussion

CYCはCYCを受けていない患者と比較してB細胞数の減少やB細胞枯渇時間の短縮をもたらさなかった。

- CYCはB細胞枯渇と血清抗体価の低下と関連するが, [PLoS ONE 2012;7:e37626.]
本研究でのCYCのB細胞への影響は小さかったと推定される。

[Limitation]

- AAVのB細胞動態とRTXがB細胞への影響するメカニズムが不明
- BM解析できたAAVが7例と少数で, 穿刺の”適応”を作ったことで選択バイアスを生んだ可能性がある。
- BM-末梢B細胞間の生存/増殖の背後にある分子メカニズムが定義されていない。