

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04746

研究課題名(和文) B細胞による免疫抑制の分子機構と病理的意義

研究課題名(英文) The mechanism of immune regulatory function of B cells and its pathologic significance

研究代表者

馬場 義裕 (Yoshihiro, Baba)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：20415269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫反応を抑制するIL-10産生B細胞の性状および抑制機序は未解明である。そこで、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いて、それら疑問にアドレスした。IL-10レポーターマウスにEAEを発症させると、所属リンパ節にIL-10産生プラズマブラストが誘導されることから、本サブセットを単離して網羅的遺伝子発現解析をすることにより、特徴的な遺伝子発現を同定した。特異的に発現が上昇する分子の一つに焦点をあて、各B細胞サブセットでの発現パターンを明らかにし、本分子のB細胞特異的欠損マウスを作成した。本マウスは胚中心B細胞増加と、自己抗体産生が認められたことから、免疫寛容に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：B cells can suppress autoimmunity by secreting interleukin-10 (IL-10). Although subpopulations of splenic B lineage cells are reported to express IL-10 in vitro, the identity of IL-10-producing B cells with regulatory function in vivo remains unknown. By using IL-10 reporter mice, we found that plasmablasts in the draining lymph nodes (dLNs), predominantly expressed IL-10 during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). We purified these plasmablasts and performed global gene expression profiling of them. We identified a unique gene expression pattern in IL-10+ plasmablasts. Then, we focused on one of the genes and generated its B cell-specific knock out mice. Mice lacking the gene had an increase of germinal center B cells and produced autoantibodies. These data suggest that the gene contributes to B cell tolerance.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞 IL-10 自己免疫

### 1. 研究開始当初の背景

B細胞は液性免疫の中心的役割を担っており、抗体産生が重要であることは広く知られている。しかし、それだけでなく、自己免疫疾患や炎症反応を抑制するB細胞(制御性B細胞)の存在が明らかになり、非常に注目されている。特に、抗炎症性サイトカインIL-10を産生するB細胞は多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性大腸炎、I型糖尿病といった自己免疫疾患モデルマウスを用いた研究から、これら炎症反応を抑制することが明らかになっている。抑制機能を有するB細胞の研究は、その新規性に加え、基礎免疫学および臨床医学的な重要性から、国内外を問わず精力的に研究が行われている。しかし、IL-10産生制御性B細胞の性状および抑制メカニズムは未解明である。

### 2. 研究の目的

多発性硬化症のマウスモデル系である実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いて、生体内におけるIL-10産生B細胞プラズマブラストのcharacterizeとその作用機序を明らかにする。また、IL-10以外の制御性B細胞の抑制機序の探索も試みる。

### 3. 研究の方法

(1) IL-10レポーターマウスにEAEを誘導し、IL-10産生プラズマブラストの性状を調べ、網羅的遺伝子発現解析によりその集団の正体を明らかにする。

(2) IL-10以外の新規抑制因子を同定し、病態的意義を明らかにする。

(3) ヒトIL-10産生B細胞分化誘導法を開発する。

### 4. 研究成果

野生型およびIL-10-Venusレポーターマウスに、EAEを誘発させ、14日後の脾臓や所属リンパ節、脊髄から細胞を単離して各種B細胞集団のIL-10(Venus)の発現レベルを測定したところ、所属リンパ節に局在するCD138+CD44<sup>hi</sup>細胞が主にIL-10を発現することから、本サブセットおよびCD19+B細胞をcell sorterにより単離し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、IL-10産生プラズマブラストに特徴的な遺伝子発現パターンを見出した(図1)。

その中でも免疫抑制に関わる分子Xに着目し、解析を進めた。分子Xの発現を様々なB細胞サブセットや臓器別(脾臓、骨髄、リンパ節、腹腔、胸腔、肺)に詳細に検証したところ、プラズマブラストとB-1細胞に発現することが判明した。また、分子Xはin vitroでのLPS、BCR刺激においても発現が増強されることもわかった。

脳脊髄炎マウスの所属リンパ節

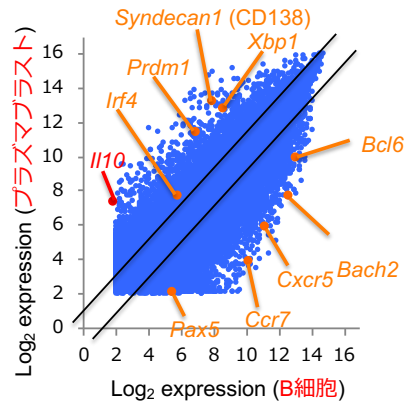


図1) プラズマブラスト遺伝子発現解析

分子XのB細胞特異的ノックアウトマウス(CD19-creとXのfloxマウスの交配)の樹立を行った。ノックアウトマウスでは腸間膜リンパ節の腫脹がみられた他、胚中心B細胞の数が増加していることが観察された。さらに、加齢とともに自己抗体が検出された。以上から、分子XがB細胞の免疫寛容に関与する可能性が示唆された。

健康人由来の末梢血からB細胞を単離し、CpG、IL-2、IL-6、I型インターフェロンで培養すると、効率よくIL-10産生CD38+CD271<sup>low</sup>プラズマブラストが誘導されること、ならびに、未熟B細胞がIL-10産生プラズマブラストの前駆細胞になることがわかった。医学応用を見据え、前駆細胞およびIL-10産生プラズマブラストが増殖する条件を検討した。ストローマとの共培養することにより、前駆細胞が未分化のまま増殖することが判明した。プラズマブラストに関しては、最適条件を決定するには至らなかった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7件)

1. Kondo Y, Higa S, Iwasaki T, Matsumoto T, Maehara K, Harada A, Baba Y, Fujita M, Ohkawa Y. Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. *PLoS One*. e0191532 (2018).
2. Hosen N, Matsunaga Y, Hasegawa K, Matsuno H, Nakamura Y, Makita M, Watanabe K, Yoshida M, Satoh K, Morimoto S, Fujiki F, Nakajima H, Nakata J, Nishida S, Tsuboi A, Oka Y, Manabe M, Ichihara H, Aoyama Y, Mugitani A, Nakao T, Hino M, Uchibori R, Ozawa K, Baba Y, Terakura S, Wada N, Morii E, Nishimura J, Takeda K, Oji Y, Sugiyama H, Takagi J, Kumanogoh A. The activated conformation

- of integrin  $\beta 7$  as a target for multiple myeloma-specific chimeric antigen receptor T cell therapy. *Nat. Med.* 12, 1436-1443. (2017).
- Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Iino K, Adachi T, Baba Y, Kurosaki T, Ono K, Ito H. Stromal interaction molecule 1 haploinsufficiency causes maladaptive response to pressure overload. *PLoS One.* 12, e0187950 (2017).
  - Lim HM, Woon H, Han JW, Baba Y, Kurosaki T, Lee MG, Kim JY. UDP-Induced Phagocytosis and ATP-Stimulated Chemotactic Migration Are Impaired in STIM1-/- Microglia In Vitro and In Vivo. *Mediators Inflamm.* 8158514 (2017).
  - Morimoto K, Baba Y, Shinohara H, Kang S, Nojima S, Kimura T, Ito D, Yoshida Y, Maeda Y, Sarashina-Kida H, Nishide M, Hosokawa T, Kato Y, Hayama Y, Kinehara Y, Okuno T, Takamatsu H, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Kurosaki T, Toyofuku T & Kumanogoh A. LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF- $\kappa$ B activation. *Sci. Rep.* 6, 25738; doi: 10.1038/srep25738 (2016).
  - Ohmi Y, Ise W, Harazono A, Takakura D, Fukuyama H, Baba Y, Narazaki M, Shoda H, Takahashi N, Ohkawa Y, Ji S, Sugiyama F, Fujio K, Kumanogoh A, Yamamoto K, Kawasaki N, Kurosaki T, Takahashi Y & Furukawa K. Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. *Nat. Commun.* 7:11205 doi: 10.1038/ncomms11205 (2016).
  - Baba Y & Kurosaki T. Role of Calcium Signaling in B Cell Activation and Biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 393, 143-174 (2016).

[学会発表] (計 5件)

- 馬場義裕 : 「胚中心 B 細胞におけるカルシウム流入の役割」生体機能と創薬シンポジウム 2017 (京都) 2017 年 8 月 24 日
- 馬場義裕 : 「B 細胞による炎症制御機構」免疫不全症研究会 (福岡) 2017 年 7 月 29 日
- 馬場義裕 : 「炎症を制御する IL-10 産生 B 細胞の誘導機序」第 43 回 日本臨床免

疫学総会 (兵庫) 2016 年 10 月 22 日

- 馬場義裕 : 「B 細胞ストア作動性カルシウム流入による自己免疫性炎症反応の制御機構」日本薬学会第 135 回年会 (兵庫) 2016 年 3 月 27 日
- Baba Y : 「Regulatory function of B cells in autoimmune inflammation.」The 7th International Symposium of WPI-IFReC. (Osaka) 2016 年 1 月 23 日

[図書] (計 3件)

- 馬場義裕 : 「抗体の多様性」「抗体のクラススイッチ」「B 細胞抗原受容体」「抗原-抗体反応と免疫複合体」免疫ペディア 第 4 章 (羊土社) 2017
- 馬場義裕 「B 細胞ストア作動性カルシウム流入による自己免疫性炎症反応の制御機構」YAKUGAKU ZASSHI 薬学雑誌 2016;136(3):473-8.
- 馬場義裕 「免疫反応を抑制する B 細胞：制御性 B 細胞」ライフサイエンス領域融合レビュー 2016

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
<https://immunegenomebio.localinfo.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
馬場 義裕 (BABA YOSHIHIRO)  
九州大学 生体防御医学研究所・免疫ゲノム生物学分野・教授

研究者番号：20415269

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )