

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16325

研究課題名(和文) イミキモド誘導性乾癬モデルマウスにおける抗原特異的制御性B細胞の役割

研究課題名(英文) The role of antigen-specific regulatory B cells in imiquimod-induced psoriasis model mice

研究代表者

吉崎 麻子 (Yoshizaki, Asako)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00530411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬は全身性の炎症を背景に皮疹を呈する、慢性の炎症性皮膚疾患である。皮疹のみならず、関節炎やぶどう膜炎を高率に合併するため、乾癬の病態の発症には自己免疫の関与が示唆されている。B細胞は自己抗体を産生することによって自己免疫に関与していると考えられてきたが、最近、その他にも様々な機能を有しており、自己免疫において中心的な役割を担っていることが分かってきた。多くの研究者らによって、一部のB細胞群はインターロイキン10を産生することにより炎症反応を制御することが明らかとされた。今回の研究によって乾癬においても制御性B細胞は乾癬の病態に対して抑制的に働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬において、制御性B細胞と抗原特異性を検討した研究はこれまで報告が全くなく、極めて独創性の高い研究といえる。抗原特異的制御性B細胞は抗原特異的に作用することで、免疫抑制作用を強める。制御性B細胞を用いたイミキモド乾癬モデルに対する養子移入実験は、乾癬における病態が抗原特異的な免疫反応によって制御されているかを明確化し、新規治療ターゲットの探索を目指す点も独創性を高めている。さらには乾癬において、難化の原因として制御性B細胞の機能不全が存在する可能性を考える場合においても本研究は重要である。

研究成果の概要(英文)：Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease that presents with rashes in the background of systemic inflammation. Not only rashes but also arthritis and uveitis are associated at a high rate, it is suggested that the pathogenesis of psoriasis is involved in autoimmunity. B cells have been thought to be involved in autoimmunity by producing autoantibodies. In addition, recently studies have shown that they have various other functions and play a central role in autoimmunity. Many researchers have shown that some B cell populations control the inflammatory response by producing interleukin-10. The present study suggested that regulatory B cells also suppress the pathogenesis of psoriasis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 B細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 乾癬の病態解明と新規治療法開発の重要性

乾癬は全身に鱗屑を付す紅色局面を形成する、代表的な炎症性角化症である。乾癬は皮膚症状が主要症候であるが、自己免疫を背景としており、関節炎やぶどう膜炎といった全身諸臓器の合併症を呈するため、患者の QOL は著しく障害されている。いまだ病因は解明されておらず、現時点では乾癬を完治させる根本的な治療法は存在しない。治療にはステロイド外用やシクロスポリン内服、さらには生物学的製剤を用いたサイトカイン除去療法などが行われるが、このような免疫抑制療法には大きな副作用を伴う可能性があり、さらには治療に抵抗性の患者も存在することから乾癬の病態生理の解明とそれに基づいた有効性の高い新規治療法の開発が切に望まれている。

(2) 乾癬における免疫異常

乾癬は、遺伝的要因と環境因子が複雑に絡み合っており、そのメカニズムは未だ十分に明らかとなっていない。しかしながら、一つの仮説として、何らかの抗原が皮膚において免疫担当細胞を活性化し、引き続いて惹起される過剰な免疫反応が、発症と炎症の持続に関与していると考えられている。しかし通常は一旦生じた免疫反応は、負のフィードバック機構を通じてやがて沈静化する。乾癬ではこの免疫抑制の過程に何らかの異常が生じている可能性がある。

(3) 乾癬の動物モデル

これまでも乾癬を研究するうえで有効な動物モデルはいくつか存在したが、遺伝子改変を用いたものであったり、誘導に複雑な手技を要するなどの理由から、必ずしもヒトの乾癬を反映しているとは言い難く、また、どの施設でも利用できるというものではなかった。しかしながら近年、イミキモド誘導性乾癬モデルが開発され、広く利用されている (van der Fits, et al: J Immunol 182; 5836-45, 2009)。イミキモドを皮膚へ塗布することにより、toll-like receptor 7 と 8 が活性化され、ヒトの乾癬に類似した鱗屑を伴う紅色局面の形成を誘導することができる。組織学的にもヒトの乾癬に特徴的な角質増生、表皮の肥厚、表皮内微小膿瘍、真皮上層の血管周囲性炎症細胞浸潤、真皮乳頭の血管の増殖を呈する。このモデルは、簡便な外部からの刺激によって、免疫担当細胞の異常活性化と乾癬様の皮疹を誘導できるモデルであり、ヒト乾癬の病態を良く反映していると考えられる。

(4) 制御性 B 細胞

B 細胞は自己抗体を産生することによって自己免疫に関与すると考えられてきたが、研究が進むにつれ、その他にも様々な機能を有しており、自己免疫疾患において中心的な役割を担っていることが分かってきた。近年になり、IL-10 を産生する B 細胞が自己免疫や炎症反応の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとされ、研究代表者の所属するグループは、CD1dhiCD5+ という表面マーカーを同定し、この制御性 B 細胞は、その他の B 細胞と明瞭に識別できるサブセットに属していることを世界に先駆けて報告した (Yanaba K, et al.: Immunity 28; 639-50, 2008, Bouaziz JD, et al. Immunol Rev 224; 201-14, 2008)。またマウスの多発性硬化症モデルにおいて、この制御性 B 細胞は IL-10 産生により免疫反応を抑制し、神経症状を軽快させることを示した (Matsushita T, Yanaba K, et al. J Clin Invest, 118; 3420-30, 2008)。さらにマウスにおける潰瘍性大腸炎モデルにおいても、この B 細胞は IL-10 産生によって腸炎を制御していることを証明した (Yanaba K, et al: Am J Pathol, 178; 735-43, 2011)。この IL-10 産生制御性 B 細胞は、乾癬をはじめとする様々な皮膚疾患においても同様に炎症の抑制に重要な役割を果たしていると推測される。実際に CD1dhiCD5+B 細胞をイミキモド誘導性乾癬モデルに移植したところ、乾癬の症状は顕著に抑制され、一方、制御性 B 細胞が少ないことが知られている CD19 欠損マウスでは、乾癬の症状は著明に増悪していた (Yanaba K, et al.: J Leukoc Biol, 94; 563-73, 2013)。興味深いことに、ヒトにおいても B 細胞を特異的に除去する抗 CD20 抗体を投与された患者のうち、元来乾癬の既往がない患者に新規の乾癬が発症した例が報告されている。また、この IL-10 産生制御性 B 細胞の機能異常や数の減少が自己免疫疾患の病態に関与している可能性も多数報告されている。

(5) 制御性 B 細胞の作用機序解明と臨床応用

種々の自己免疫疾患あるいは炎症性疾患に対して抗炎症作用を示す制御性 B 細胞であるが、その作用機序の多くは未だに不明確である。制御性 B 細胞の抗炎症作用は IL-10 依存的に発揮されることは多くの研究から示されているものの、その産生量は極めて微量であり、制御性 B 細胞がどのような機序で炎症反応を抑制するのかの解明が課題であった。研究代表者の所属するグループは生体外で制御性 B 細胞を増殖する方法を確立し、多発性硬化症のモデルにおいて MHC class II と T 細胞受容体が、制御性 B 細胞の機能発現に重要であることを見いだした (Yoshizaki A et al.: Nature, 491; 264-8, 2012)。このことは制御性 B 細胞が抗原特異的な免疫反応抑制効果を有することを示している (図 2)。乾癬においては自己抗原は不明であり、制御性 B 細胞が抗原特異的に炎症反応を抑制するかは全く明らかとなっていない。

2. 研究の目的

前述の通り、難治性皮膚疾患である乾癬に対する治療法は未だ確立していないため、乾癬の新たな病態理解に基づく副作用の少ない新規治療法の開発は、患者や患者の家族のみならず、医療関係者からも切に望まれている。本研究の目的は乾癬のマウスモデルであるイミキモド誘導性乾癬の病態形成と進行における自己抗原特異的制御性 B 細胞の役割を明らかにし、新規治療法の開発に結びつけることである。このため、本研究では野生型マウスを用いてイミキモド誘導性乾癬を作成し、それぞれから得られる制御性 B 細胞を乾癬モデルに養子移入した後に、炎症の重症度を評価する。乾癬において、制御性 B 細胞と抗原特異性を検討した研究はこれまで報告が全くなく、極めて独創性の高い研究といえる。抗原特異的制御性 B 細胞は抗原特異的に作用することで、免疫抑制作用を強める。制御性 B 細胞による養子移入実験は、乾癬における病態が抗原特異的な免疫反応によって制御されているかを明確化し、新規治療ターゲットの探索を目指す点も独創性を高めている。さらには乾癬において、難治化の原因として制御性 B 細胞の機能不全が存在する可能性を考える場合においても本研究は重要である。

3. 研究の方法

イミキモドを野生型 C57BL/6 マウスおよび AID 欠損マウスに塗布することで乾癬を発症させ、皮疹の重症度を評価した。さらに、皮膚への好中球、リンパ球、マクロファージなどの炎症細胞浸潤を検討した。また、脾臓、所属リンパ節における各種サイトカインの発現や制御性 B 細胞の増減を評価することによって、B 細胞および制御性 B 細胞が乾癬に関与しているかどうかを解析した。加えて皮膚、脾臓、表在リンパ節における各種サイトカインの発現や、IL-10 産生制御性 B 細胞の増減を評価することによって、サイトカインおよび制御性 B 細胞が乾癬に関与しているかを解析した。さらには、野生型マウスと AID 欠損マウスから得られた制御性 B 細胞を乾癬モデルマウスに養子移入することにより、それぞれの皮疹の重症度、炎症細胞浸潤数、サイトカイン発現量を比較した。

(1) 乾癬の誘導と皮疹の重症度の評価

マウスの背部を剃毛し、5%イミキモド含有クリーム（ベセルナクリーム；持田製薬）を背部皮膚に塗布してイミキモド誘導乾癬モデルを作成した。コントロール群には同量のワセリンを塗布した。これを6日間連日で施行した。皮疹の重症度は、紅斑、鱗屑、皮膚肥厚の3項目について0（なし）、1（軽度）、2（中等度）、3（高度）、4（重度）の5段階で評価した。

(2) 乾癬の組織学的評価

乾癬誘導7日後に4ミリデルマパンチ（マルホ）を用いて背部皮膚を採取し、3.5%パラホルムアルデヒド固定後、パラフィン包埋し、6 μ m 切片をヘマトキシリン&エオジン染色し、病理組織学的に比較した。

(3) 免疫組織学的解析

皮膚および肺に浸潤してきた炎症細胞数を測定するために免疫組織学的解析を行った。乾癬誘導7日後のマウスから採取した皮膚を一部を凍結し、厚さ6 μ mの切片を作製し、アセトン固定した後にPBSで希釈した10%正常ウサギ血清と37 $^{\circ}$ C、10分間反応させ、非特異的な染色をブロックした。切片は次いでマクロファージ特異的な抗体であるF4/80、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗B220抗体と室温で1時間反応させた。非特異的な染色のためのコントロールとしてラット免疫グロブリンGを用いた。その後、切片はビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンG二次抗体と室温で、20分間反応させた。次いでhorseradish peroxidase 標識アビジン-ビオチン複合体と反応させた。各反応間で、切片はPBSで3回洗浄を行った。切片は3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride と hydrogen peroxide と反応させることによって発色させた。また、メチルグリーンでcounterstainを行う。浸潤細胞は400倍の拡大率で1検体中10箇所をランダムに選び測定した。各解析についてそれぞれ最低10匹のマウスを用いた。

(4) Real-time PCR によるサイトカインの mRNA 発現の定量的解析

乾癬誘導前、乾癬誘導7日後の患部皮膚、脾臓、所属リンパ節におけるサイトカインの mRNA 発現を real-time PCR 法にて定量的に測定した。サイトカインとしては、乾癬発症、増悪に関与していると考えられるインターフェロン γ 、IL-12、IL-17、TNF- α など、逆に乾癬を軽快させると考えられる IL-10、TGF- β などを測定した。

具体的にはまず全 RNA を凍結皮膚、脾臓、所属リンパ節組織より QIAGEN RNeasy spin column (QIAGEN 社) を用いて単離した。RNA はその後 cDNA に Reverse Transcription System (Promega 社) にて逆転写された。プライマーとプローブは Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents (Applied Biosystems) にてデザインした。Real-time PCR は以下の条件で ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて行った；50 $^{\circ}$ C、2分間を1サイクル、95 $^{\circ}$ C、10分間を1サイクル、92 $^{\circ}$ C、15秒間を40サイクル。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) を用いて mRNA を標準化した。GAPDH PCR 産物と比較して、ターゲットとなる転写産物の相対発現量を Ct method にて算出した。つまり、fold induction は $2^{-[Ct]}$ と定義され、ここで Ct は threshold cycle, つまりサンプルの比較蛍光がバックグラウンド蛍光をこえるサイクル数をさす。 $Ct = [\text{ターゲットとなる遺伝子の Ct (発現量不明のサンプル)} - \text{GAPDH の Ct (発現量不明のサンプル)}] - [\text{ターゲットとなる遺伝子の Ct (キャリアプレータのサンプル)} - \text{GAPDH の Ct (キャリアプレータのサンプル)}]$ 。コントロール抗体投与群ないしは野生型マウスにおけるサイトカイン mRNA 発現量をキャリアプレータとして使用した。それぞれのサンプルは triplicate で流し、平均の Ct を解析に使用した。各解析についてそれぞれ最低 10 匹のマウスを用いた。

(5) 細胞内 IL-10 染色による IL-10 産生制御性 B 細胞の解析

乾癬誘導前、乾癬誘導 7 日後の患部皮膚、脾臓、所属リンパ節における IL-10 産生制御性 B 細胞数を、フローサイトメーターを用いた細胞内サイトカイン染色により評価した。具体的にはまず各組織を摘出した後に、RPMI medium (Gibco 社製) 中にて組織をほぐして細胞を湧出させた。遠心分離器を用いて 1,500 rpm, 4 にて遠心し細胞を単離した後、塩化アンモニウム溶血剤を用いて赤血球を溶血し単核球を単離した。それらを 10 $\mu\text{g/ml}$ Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich 社製)、50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate, 500 ng/ml ionomycin (Sigma-Aldrich 社製)、2 μM monensin (eBioscience 社製) を添加した complete medium (10% fetal calf serum, 200 U/ml penicillin, 200 U/ml streptomycin, 4 mM L-glutamin, $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 2-mercaptoethanol を含んだ RPMI medium; 全て Gibco 社製) にて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ インキュベーターを用いて 5 時間刺激した。洗浄バッファー (1% BSA を含む PBS) を加え 1,500 rpm, 4 にて遠心し細胞を分離した後氷上に移して、biotin で標識した抗マウス CD19 抗体を加えよく懸濁し、30 分間氷上でインキュベートした。洗浄バッファーを加えて 1,500 rpm, 4 にて遠心し、phycoerythrin-Cy5 で標識した streptavidin を加えよく懸濁し、30 分間氷上でインキュベートすることにより B 細胞表面を染色した。洗浄バッファーを加えて 1,500 rpm, 4 にて遠心し細胞を分離した後、BD Cytotfix/Cytoperm (BD PharMingen 社製) を加えよく懸濁し、30 分間氷上でインキュベートした。これにより細胞膜を透過させると同時に固定も行った。Perm/Wash buffer (BD PharMingen 社製) を加えて洗浄し 1,500 rpm, 4 にて遠心し細胞を分離した後に、phycoerythrin で標識した抗マウス IL-10 抗体を加えてよく懸濁し、30 分間氷上でインキュベートし細胞内 IL-10 染色を行った。Perm/Wash buffer (BD PharMingen 社製) を加えて洗浄し 1,500 rpm, 4 にて遠心し細胞を分離した後に洗浄バッファーを加えよく懸濁し、フローサイトメーターを用いて B220 陽性 B 細胞における IL-10 の発現の解析を行った。各解析についてそれぞれ最低 10 匹のマウスを用いた。

(6) 細胞内サイトカイン染色によるサイトカイン産生 T 細胞の解析

乾癬誘導後の脾臓、表在リンパ節から細胞を単離し、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞の IL-17A、IL-4 および IFN- γ の産生を、細胞内サイトカイン染色により評価し、B 細胞の乾癬における T 細胞のサイトカインプロファイルへの影響を検討した。各解析についてそれぞれ最低 10 匹のマウスを用いた。

(7) 制御性 B 細胞の養子移入実験

野生型マウスの脾臓から CD1dhiCD5⁺細胞を制御性 B 細胞として、セルソーターで抽出した。得られた制御性 B 細胞を 2×10^6 個、イミキモド塗布前日のマウスに尾静脈から養子移入を行った。また、乾癬誘導後のマウス脾臓から抽出された制御性 B 細胞を用いて、同様の養子移入を行った。さらに制御性 B 細胞を乾癬発症後期のマウスにも養子移入し、病態の完成した乾癬に対する影響も検討した。各解析についてそれぞれ最低 10 匹のマウスを用いた。

4. 研究成果

イミキモド誘発乾癬モデルの表皮肥厚はコントロール群に比較して有意であった。組織学的にもイミキモド誘発乾癬モデルにおいて、コントロール群と比較した有意な表皮肥厚が確認された。免疫染色の結果からは、イミキモド誘発乾癬モデルにおいて、コントロール群と比較して炎症細胞浸潤の著明な増加が認められた。Real time RT-PCR を用いた、皮膚の RNA 発現解析では、イミキモド誘発乾癬モデルにおいて、コントロール群よりも有意な炎症性サイトカインの発現亢進が認められた。イミキモド誘発乾癬モデルおよびコントロール群における脾臓中 B 細胞の解析では、イミキモド誘発乾癬モデルにおいて、IL-10 産生性の制御性 B 細胞の増加が認められた。野生型マウスから得られた制御性 B 細胞をイミキモド誘発乾癬モデルマウスへ養子移入したところ、表皮肥厚、炎症性サイトカインの発現の両者が抑制されたものの、コントロールマウスよりも依然として高値であった。

以上のことから、乾癬の病態において、制御性 B 細胞は重要な役割を果たすことが示唆された。制御性 B 細胞に焦点を当てた治療は、新たな乾癬の治療戦略になる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Kuzumi A, Yoshizaki A, Fukasawa T, Ebata S, Miura S, Yoshizaki A, Sumida H, Asano Y, Sato S. Serum levels of human α -defensin 2: possible association with fibrosis and vasculopathy in patients with systemic sclerosis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 査読有、2019、 in press

Noda M, Tsunemi Y, Masui Y, Yoshizaki A, Ohmatsu H, Takazawa Y, Ishii N. Leprosy with spontaneous type 1 lepra reaction as an initial cutaneous manifestation: a case from Japan. Eur J Dermatol. 査読有、2018、843-844

Numajiri H, Yoshizaki A, Fukasawa T, Ebata S, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Miura S, Hirabayashi M, Yoshizaki A, Sumida H, Asano Y, Kazoe Y, Mawatari K, Kitamori T, Sato S. Rapid alteration of serum interleukin-6 levels may predict the reactivity of i.v. cyclophosphamide pulse therapy in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. J Dermatol. 査読有、45 巻、2018、1221-1224

Kuzumi A, Yoshizaki A, Toyama S, Fukasawa T, Ebata S, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Miura S, Hirabayashi M, Yoshizaki A, Asano Y, Sato S. Serum interleukin-34 levels in patients with systemic sclerosis: Clinical association with interstitial lung disease. J Dermatol. 査読有、28 巻、2018、314-319

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者 無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。