

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301
 研究種目：若手研究
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K17764
 研究課題名（和文）乾癬の病態における制御性B細胞の役割の解明

研究課題名（英文）A role of regulatory B cell in psoriasis

研究代表者

水牧 貴恵（Mizumaki, Kie）

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：30802813

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：B細胞特異的PTEN欠損マウスではrmIL-23投与による乾癬様皮疹が抑制された。制御性B細胞は7日目をピークに増加しており、制御性T細胞は15日目の炎症の後期に向けて緩徐に増加していた。B細胞特異的PTEN欠損マウスの皮膚病変部では、IL-17A陽性CD4陽性T細胞の割合が減少していた。B細胞特異的PTEN欠損マウスで主にIL-10を産生しているB1b細胞を野生型マウスに移入したところ皮膚の炎症所見が抑制された。以上から、脾臓、所属リンパ節で増加した制御性B細胞が、制御性T細胞への分化を促進させ、皮膚病変部でのTh17細胞への分化を抑制することでIL-23誘導性皮膚炎を抑制したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B細胞特異的PTEN欠損マウスでは、脾臓、所属リンパ節で増加した制御性B細胞が、ナイーブT細胞から制御性T細胞への分化を促進させ、皮膚病変部のTh17細胞への分化を抑制することでIL-23誘導性皮膚炎を抑制していると考えられた。本研究の結果により、B細胞特異的PTEN欠損マウスにおいて制御性B細胞が乾癬に対して抑制的に働く可能性が示唆され、制御性B細胞を標的とした治療が、乾癬の新たな治療戦略になる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate the role of Regulatory B cells (Bregs) in a model of IL-23-mediated psoriasis-like inflammation in B cell-specific PTEN-deficient mice, in which Bregs are significantly expanded. IL-23-mediated psoriasis-like inflammation was suppressed in B cell-specific PTEN-deficient mice along with decreased ear thickness and epidermal thickness on day 15. mIL-23-injected B cell-specific PTEN-deficient mice showed expanded regulatory T cells (Tregs) in the spleen and draining lymph nodes along with increased Bregs. Further, T helper (Th) 17 differentiation in the rmIL-23-injected ear was suppressed in B cell-specific PTEN-deficient mice. Moreover, adoptive transfer of B1b cells suppressed IL-23-mediated psoriasis-like inflammation. These results indicate that increased Bregs suppress IL-23-mediated psoriasis-like inflammation through Treg expansion and inhibition of Th17 differentiation. Thus, targeting Bregs may be a feasible treatment strategy for psoriasis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 制御性B細胞 B細胞 IL-23

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、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

乾癬は鱗屑を伴う角化性紅斑が全身に散布する炎症性角化症である。根治的な治療が存在せず、その皮膚症状が生涯に渡って続くため、患者の生活の質は著しく障害される。近年の研究では IL-23/Th17 経路が病態の中心的な役割を担っていることが明らかになっており、関連するサイトカインを標的とした生物学的製剤が乾癬に著効することが示されている。

一方で、B 細胞は抗体を産生し液性免疫において重要な役割を果たす。近年、B 細胞の中で免疫反応を抑制する働きを持つ IL-10 産生性制御性 B 細胞の存在が明らかになった。我々はこれまでの研究で、制御性 B 細胞は接触過敏反応や多発性硬化症・強皮症のモデルマウスにおいて炎症や免疫応答を抑制すること、制御性 B 細胞の制御機構において PI3K/AKT 経路が重要な役割を果たしており、抑制因子である PTEN を B 細胞特異的に欠損させたマウス（B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス：CD19^{cre/wt}PTEN^{loxp/loxp} マウス）では IL-10 産生性制御性 B 細胞が著増していることなどを明らかにしてきた。

乾癬における制御性 B 細胞の役割は未だ明らかになっていないが、リツキシマブによる B 細胞除去療法後に乾癬を発症したという報告がある。申請者は慢性炎症性皮膚疾患である乾癬と制御性 B 細胞の関連を解明することでこの分野のさらなる発展を目指すことができると考え、乾癬における制御性 B 細胞の役割について検討することとした。

2．研究の目的

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス（CD19^{cre/wt}PTEN^{loxp/loxp} マウス）を用いて、乾癬における制御性 B 細胞の役割を解析する。

3．研究の方法

(1) IL-23 誘導性乾癬皮膚炎モデルマウスの作成

乾癬の病態の中心となる細胞は Th17 細胞であり、ナイーブ T 細胞より誘導された Th17 細胞は樹状細胞から産生される IL-23 によって維持される。実際にマウス皮膚に IL-23 の皮下注射を行うことで乾癬様の皮疹と IL-17A の発現が誘導されることが示されている。B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス（CD19^{cre/wt}PTEN^{loxp/loxp} マウス）およびコントロールマウス（CD19^{cre/wt} マウス）の耳介に 0.5 µg の recombinant mouse (rm)IL-23 を 1 日おきに計 16 日間皮内投与し、乾癬様皮膚炎を誘導した。

(2) 乾癬モデルマウスにおける脾臓、所属リンパ節、皮膚に浸潤する細胞の解析について：

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス（CD19^{cre/wt}PTEN^{loxp/loxp} マウス）およびコントロールマウス（CD19^{cre/wt} マウス）に rmIL-23 を投与し、15 日目の皮膚病変部を病理組織学的、免疫組織学的に評価した。また 0、7、15 日目の脾臓、所属リンパ節、皮膚病変部における制御性 B 細胞、制御性 T 細胞、Th17 細胞をフローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン染色により解析した。

(3) 細胞移入実験：

磁気細胞分離装置を用いて B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス（CD19^{cre/wt}PTEN^{loxp/loxp} マウス）および野生型マウスの脾臓からそれぞれ B 細胞を抽出した。さらにそこから B1 B 細胞（CD1d^{int}CD5⁺

B1 B 細胞) と follicular B 細胞(CD1d^{int}CD5⁻ follicular B 細胞)にセルソーターを用いて分離した。これを野生型マウスに経静脈的に投与し、その後の炎症への影響を評価した。

(4) 統計学的解析について

すべてのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で示した。2 群間の比較では t 検定を用い、3 群間以上の比較では多重比較検定を用いて評価した。

4 . 研究成果

(1) 病理組織学的評価

rmIL-23 をマウスの耳介皮内に投与すると、耳介肥厚とともに、過角化、表皮肥厚、真皮層の炎症細胞浸潤といった乾癬様皮疹を誘導することができたが、この所見は B 細胞が著増している B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス(CD19^{cre/wt}PTEN^{loxp/loxp} マウス)では所見が軽度であった(図 1)。また、耳介全体の厚さ、表皮の厚さを比較したところ、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは厚さが有意に減少していた(図 2)。

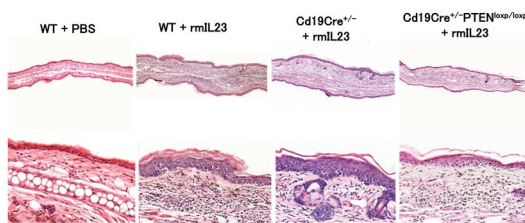


図 1 : 耳介皮膚の病理組織所見 (倍率 × 40, 200)

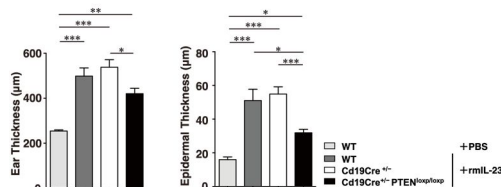


図 2 : 耳介・表皮の厚さの比較 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

(2) 免疫組織学的評価

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス(CD19^{cre/wt}PTEN^{loxp/loxp} マウス)の耳介皮膚病変部ではコントロールマウスと比較して CD4⁺ T 細胞、F4/80⁺ マクロファージが減少していた(図 3)。

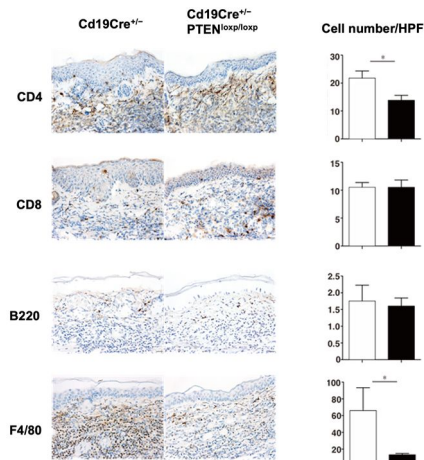


図 3: 耳介皮膚の免疫組織学的所見(CD4⁺ T 細胞・CD8⁺ T 細胞・B 細胞・F4/80⁺ マクロファージ (倍率 × 200) * $P < 0.05$.

(3) 細胞内サイトカイン染色による脾臓の制御性 B 細胞、制御性 T 細胞の解析

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス (CD19^{Cre}/wtPTEN^{loxP/loxP} マウス) では、脾臓、所属リンパ節における制御性 B 細胞が著増しており、rmIL-23 の投与により Day7 をピークに増加していた。B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは制御性 T 細胞も増加しており、制御性 B 細胞の増加に伴い、15 日目の炎症の後期に向けて徐々に増加していた(図 4.5)。

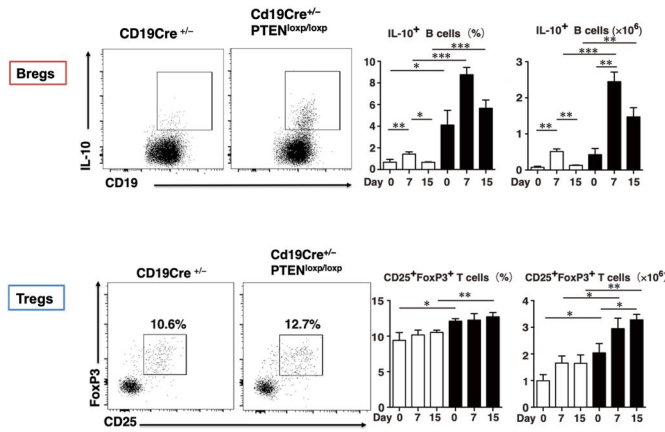


図 4：細胞内サイトカイン染色による脾臓の制御性 B 細胞、制御性 T 細胞の解析

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

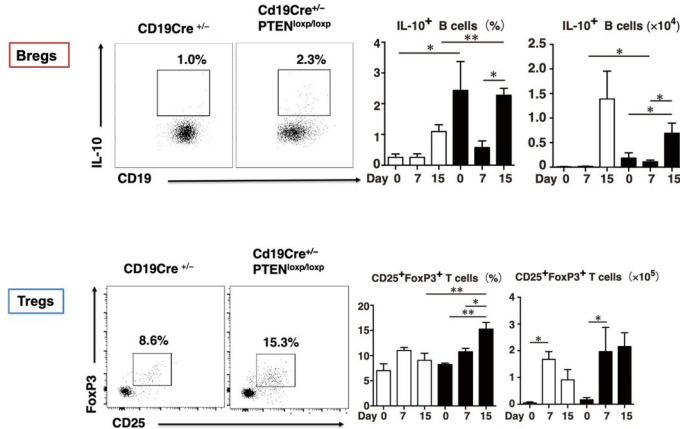


図 5：細胞内サイトカイン染色による所属リンパ節の制御性 B 細胞、制御性 T 細胞の解析

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

(4) 皮膚病変部における IL-17A 陽性 CD4 陽性 T 細胞

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスの皮膚病変部では IL-17A 陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合が減少していた(図 6)。

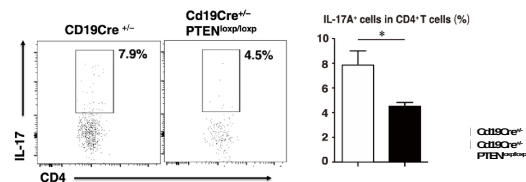


図 6：細胞内サイトカイン染色による耳介皮膚病変部の IL-17A 陽性 CD4 陽性 T 細胞の解析

* $P < 0.05$

(5)養子移入実験

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスの脾臓から抽出した B1 B 細胞 (CD1d^{int}CD5⁺ B1 B 細胞) と follicular B 細胞(CD1d^{int}CD5⁻ follicular B 細胞)における IL-10 産生性制御性 B 細胞の比率を解析した。B1 B 細胞 (CD1d^{int}CD5⁺ B1 B 細胞) は制御性 B 細胞を 60%以上含んでいるのに対し、 follicular B 細胞(CD1d^{int}CD5⁻ follicular B 細胞)では 1%以下であった (図 7)。

B1 B 細胞 (CD1d^{int}CD5⁺ B1 B 細胞) と follicular B 細胞(CD1d^{int}CD5⁻ follicular B 細胞)をそれぞれ野生型マウスに経静脈的に投与し、rmIL-23 を投与して乾癬モデルマウスを誘導したところ、B1 B 細胞 (CD1d^{int}CD5⁺ B1 B 細胞) を移入したマウスでは皮膚の炎症所見が抑制された (図 8)。

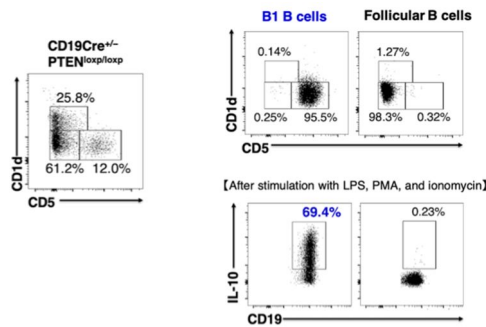


図 7: B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスの B 細胞のサブセット解析

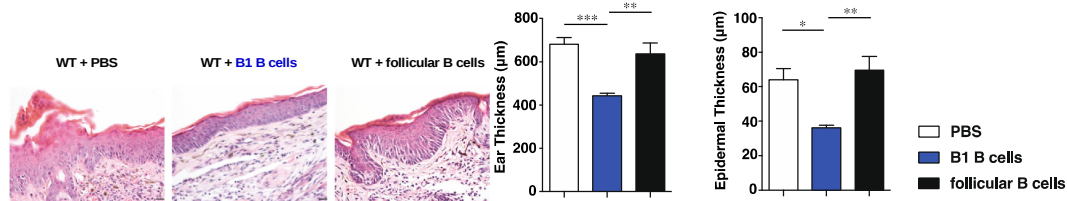


図 8: 耳介皮膚の病理組織所見、耳介・表皮の厚さの比較 (倍率×40, 200)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

(5)まとめ

本研究の結果から、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス (CD19^{cre/wt}PTEN^{lox/lox} マウス) では、脾臓、所属リンパ節で増加した制御性 B 細胞が、ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞への分化を促進させ、皮膚病変部の Th17 細胞への分化を抑制することで IL-23 誘導性皮膚炎を抑制していることが明らかになった。本研究の結果により B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス (CD19^{cre/wt}PTEN^{lox/lox} マウス) において、制御性 B 細胞が乾癬に対して抑制的に働いている可能性が明らかになり、制御性 B 細胞を標的とした治療が、乾癬の新たな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1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizumaki Kie, Horii Motoki, Kano Miyu, Komuro Akito, Matsushita Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Suppression of IL-23-mediated psoriasis-like inflammation by regulatory B cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81588-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kie Mizumaki, Miyu Kano, Takashi Matsushita
2. 発表標題 Suppression of IL-23-mediated psoriasis-like inflammation by regulatory B cells
3. 学会等名 The 45th annual meeting of the Japanese society for Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------