

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791072

研究課題名（和文） B1-B細胞の抑制性機能に関する検討

研究課題名（英文） Analysis about the regulatory function of B1-B cells

研究代表者

藤本 徳毅 (FUJIMOTO NORIKI)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：50378460

研究成果の概要（和文）：

天疱瘡などの自己免疫性疾患ではグロブリン大量療法の奏功する例が多いことが分かっているが、その作用機序はあまり分かっていない。また、効果が短期間しか持続しない例も多い。そこで、免疫反応を抑制する働きのあるサイトカインである IL-10 を産生する末梢血中の B 細胞が、天疱瘡に対するグロブリン大量療法の前後で変化するかを検討したところ、長期的に効果の持続する例では治療後に比率が増加していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Although intravenous immunoglobulins treatment is effective for various autoimmune diseases such as pemphigus, the exact mechanism of the therapy is unknown. Moreover, the efficacy is observed for limited periods in many cases. I evaluated the fluctuation of circulating IL-10 secreting B lymphocytes associated with intravenous immunoglobulins treatment. IL-10 secreting B cells were increased after the therapy in a case of pemphigus in which long-term clinical remission was achieved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：免疫学、制御性機能、B1-B細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚科領域における重篤な疾患である全身性エリテマトーデスや皮膚筋炎は膠原病の 1 種であり、病因としては免疫寛容の破綻が示唆されているが、あまり解明されていない。全身性エリテマトーデスのモデルマウスには(NZB×NZW)F1 マウスがあり、B1-B 細

胞の機能に異常があると以前より報告されている。一方、皮膚筋炎と B1-B 細胞の関連を解析した報告は見あたらない。そのため、B1-B 細胞に注目した。

(2) B1-B 細胞は、B220+CD5+の表面形態を有し、IgM を高発現することから通常の B 細

胞 (B2-B 細胞) と区別される。B1-B 細胞は、細菌感染やウイルス感染において、適応免疫系が働くよりも早期に重要な役割を果たすといわれている。マウスの腹腔内に豊富に存在し、ヒトでは末梢血中にも存在することが知られているが、ヒト B1-B 細胞に関する論文はほとんど見あたらない。

(3) 全身性エリテマトーデスと皮膚筋炎は異なる疾患であるが、ともに多彩な皮疹を生じ、時に類似の皮疹を呈する。皮疹およびその病理組織像が診断に大きな比重をしめるが、病理組織標本の H.E 染色のみでは、類似の所見を認めるため両者を明確に鑑別することができない。蛍光抗体直接法でループスバンドテストを施行すれば、ある程度鑑別することができるが、そのためにはホルマリン固定していない凍結標本が必要とされてきた。免疫組織化学染色はホルマリン固定後でもできるが、既存の表面マーカーでは両者を鑑別できない。しかし、B1-B 細胞の特異的な表面マーカーは見つかっていないため、全身性エリテマトーデスや皮膚筋炎といった膠原病、特にその皮疹に B1-B 細胞がどれほど関与しているかも解析されていない。B1-B 細胞の特異マーカーが見つければ、ホルマリン固定した皮膚病理組織標本を用いて、免疫組織化学染色で皮膚への B1-B 細胞の浸潤の程度、様式を解析することができ、上記の鑑別に用いることができるだけでなく、その病態の解明に大きく寄与できる可能性が高いと考えられる。

(4) これまでの自らの研究では、マウスの腹腔内 B1-B 細胞を *in vitro* で CpG 刺激すると、MHC の発現には変化がないが、副刺激分子である CD86 の発現は一旦増加し 48 時間後には逆に減少することが判明している。また、腹腔内 B1-B 細胞は、細胞表面の B7-DC や CD70 の発現が 2 峰性であることから、単一な集団ではなく複数の機能の異なる亜集団で構成されている可能性があることが判明している。

2. 研究の目的

(1) マウス B1-B 細胞と CD1d^{hi}CD5⁺B 細胞の違いを検討する。

(2) 人の自己免疫性疾患に B1-B 細胞 (もしくは抑制性 B 細胞) が関与しているか検討する。

(3) マウス B1-B 細胞の特異的表面マーカーを発見し、可能であれば特異抗体を作成する。

3. 研究の方法

(1) BALB/c マウスか C57/B6 マウスの腹腔内細胞と脾臓細胞を回収し、*in vitro* で PMA と ionomycin もしくは抗 CD40 抗体と CpG で刺激後に表面抗原を染色し、固定後に細胞内染色して IL-10 産生細胞のフェノタイプをフローサイトメーターで解析する。B1-B 細胞と CD1d^{hi}CD5⁺B 細胞の関係を細胞表面抗原より検討する。また、IL-10 を産生 B 細胞が均一な集団でありソーティングできるのであれば、ソーティングして回収して mRNA を抽出し、マイクロアレイで IL-10 産生 B1-B 細胞に特異的に発現している表面蛋白遺伝子を同定する。

(2) ヒト末梢血中の IL-10 産生 B 細胞を同定するための刺激方法を確立するため、健康人ヒトより採血して単核球を分離し、*in vitro* で種々の方法で刺激する。細胞内染色して IL-10 産生 B 細胞の比率をフローサイトメーターで解析する。

(3) ヒト自己免疫疾患患者と健康人の末梢血単核球中の IL-10 産生 B 細胞の比率の差をフローサイトメーターで解析する。また、自己免疫疾患に対するガンマグロブリン大量療法の効果を検討するため、IL-10 産生 B 細胞の比率の変化を治療の前後でフローサイトメーターを用いて解析する。

4. 研究成果

(1) 2009 年度

①細胞内のサイトカインを染色してフローサイトメーターで解析することにより、マウスの脾臓にも IL-10 を産生する B 細胞が存在することを確認した。この細胞は、LPS や CpG などによる Toll-like receptor 刺激だけでは IL-10 を産生せず、PMA と ionomycin による刺激が必要であった。脾臓の B 細胞では、過去の報告のように CD1d の発現が高い CD1d^{hi}CD5⁺B 細胞が IL-10 を産生するが、IL-10 の産生は CD9 や CD38 の発現とも相関する可能性があることが判明した。また、IL-10 産生細胞が全て CD1d の発現が高い訳ではなかった。一方、マウスの腹腔内に存在する B1-B 細胞では、CD1d の発現と IL-10 の産生には相関がなかった。また、B1-B 細胞は刺激早期に IL-10 を産生し、CpG により 48 時間 *in vitro* で培養して CD86 の発現が低下した細胞では、ほとんど IL-10 を産生しなかった。その他の表面分子の発現も解析したが、フェノタイプの違いからはマウスの脾臓 CD1d^{hi}CD5⁺B 細胞と腹腔内 B1-B 細胞の明らかな相関を見いだせなかった。そのため、マイクロアレイによる mRNA の解析も施行できなかった。

②IL-10を産生するB細胞は、ヒトの末梢血中にも少数ながら存在することが判明した。しかし、CD1dは発現しておらずCD5も陰性であった。マウスのCD1dhiCD5+B細胞やB1-B細胞とは異なるフェノタイプであると考えられた。また、自己抗体産生により水疱を形成する自己免疫性水疱症患者の末梢血中にもIL-10産生B細胞の存在が確認できたため、健康人との頻度・機能の差異を検討したが、数人の検討では明らかな差はみられなかった。

(2) 2010年度

①マウスの脾臓のB細胞は、過去の報告のようにCD1dの発現が高いCD1dhiCD5+B細胞がIL-10を産生した。IL-10産生細胞に特異的に発現しているその他の表面分子を捜したところ、CD9とB7-DCがIL-10を産生しない細胞では発現していないのに対して、IL-10を産生する細胞では発現する細胞と発現しない細胞がみられた。IL-10を産生する細胞に特異的に発現する分子がないか、多数の表面抗原を染色して、これらの分子の発現とIL-10産生能との関係を検討したが、IL-10産生細胞に特異的な表面抗原の同定には至らなかった。腹腔内に存在するB1-B細胞は、PMA+ionomycinの刺激だけでも数時間の刺激でかなりの比率でIL-10を産生する。脾臓細胞ではLPSで先に48時間刺激するとIL-10産生細胞が増加するという報告があるが、腹腔内B1-B細胞はTLR刺激(CpG)で48時間先に刺激すると、むしろIL-10産生細胞は減少した。また、CD1dの発現とIL-10の産生にも相関がなく、マウスの脾臓CD1dhiCD5+B細胞と腹腔内B1-B細胞は、IL-10産生に関してはかなり違う性質を示すことが分かった。

②ヒトの末梢血中のB細胞は、マウスと同様の刺激ではIL-10を産生しないが、BrefeldinA存在下にPMA+ionomycinで20から24時間刺激すると、細胞内染色でIL-10産生細胞を同定できた。自己免疫性水疱症患者、皮膚筋炎患者と健康人で末梢血中のIL-10産生B細胞の比率を比較したが、優位な差は認めなかった。治療に伴うIL-10産生B細胞の変化に関しては、天疱瘡1例、血管炎1例の検討では、グロブリン大量療法による治療の直前と直後では、IL-10産生B細胞に優位な差は認めなかった。

(3) 2011年度

①マウス脾臓中のCD1dhiCD5+B細胞は、PMA+ionomycinで*in vitro*で4-5時間刺激すればかなりの比率でIL-10を産生することが分かっている。しかし、ヒト末梢血中のB細胞はマウスと同様の刺激方法ではほとんどIL-10

を産生しない。そこで、ヒト末梢血中B細胞の*in vitro*でのIL-10産生を細胞内染色で検出できる条件を再度検討した。CpGで48時間刺激後にBrefeldinA存在下にPMA、ionomycinで5時間刺激する方法や、初めからBrefeldinA存在下にPMA、ionomycinおよびCpGで5時間刺激する方法でIL-10産生B細胞分画を同定できると最近の論文では報告されているが、CpGを併用しなくてもPMA+ionomycinで20時間刺激(最後の4-5時間のみBrefeldinAを使用)で十分にIL-10産生細胞が検出できることが判明した。また、IL-10産生B細胞はCD5陽性であるとする報告があるが、健康人で検討したところCD5陰性の集団が主であった。従来報告されている方法では長時間の培養を要する方法やCpGでの刺激を要するという特殊な条件での培養方法を用いていたため、自然な生体内での動態を反映していない細胞集団を検討していることになる可能性がある。しかし、今回の研究で見いだした方法は、従来の方法よりも自然な方法であり、この方法を用いて自己免疫疾患患者におけるIL-10産生B細胞の検討をこれから行っていくことで、疾患の原因の解明については治療法に繋がっていくと考える。

②グロブリン大量療法がヒトIL-10産生B細胞に与える影響を検討した。グロブリン大量療法で治療した成人川崎病患者において、治療の前後での末梢血中のIL-10産生B細胞分画の比率の変化を経時的に検討した。治療により速やかに症状は軽快し、その後も再燃は認めなかったが、末梢血中のIL-10産生B細胞分画の比率は経過中大きな変化はみられなかった。また、グロブリン大量療法で治療した天疱瘡患者でも同様に末梢血中のIL-10産生B細胞分画の比率の変化を経時的に検討した。グロブリン大量療法は臨床的に短期的な効果が得られたが、ほとんどの症例で自己抗体の再上昇や臨床症状の増悪によりステロイドの再増量を余儀なくされた。そのような症例では、治療の前後で末梢血中のIL-10産生B細胞分画の比率に変化はみられなかった。しかし、グロブリン大量療法で長期寛解が得られた天疱瘡患者においては、治療後にIL-10産生B細胞分画の増加を認めた。この結果は、天疱瘡患者に対するグロブリン大量療法の作用に、IL-10産生B細胞が重要な役割を果たしていることを示唆している。このような報告はいままでになされておらず、グロブリン大量療法の作用機序の今後の解明につながるものと考ええる。

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1件)

- ① Fujimoto N, Teramura K, Tanaka T.
Adult Kawasaki disease: Evaluating the fluctuation of circulating lymphocytes associated with i.v. immunoglobulin treatment.
J Dermatol. Mar 6. 2012 [Epub ahead of print]、査読有り

[学会発表] (計1件)

- ① 藤本徳毅、Analysis of regulatory B cells in high-dose intravenous immunoglobulin for pemphigus、第36回日本研究皮膚科学会学術大会・総会、2011.12.09、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 徳毅 (FUJIMOTO NORIKI)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：50378460

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

塚本 裕子 (TSUKAMOTO YUKO)
滋賀医科大学・皮膚科・実験助手
研究者番号：なし