

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590942

研究課題名(和文) 制御性B細胞による腸管免疫抑制機構とその破綻による腸炎発症機序の解明

研究課題名(英文) Role of regulatory B cells in chronic intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn's disease

研究代表者

石原 俊治 (Ishihara, Shyunji)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80263531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：クローン病(CD)の病態における制御性B細胞(Breg)の機能解析をおこない、Bregの腸炎抑制機序を解明した。マウス腸管のB細胞には、CpG DNAに反応してIL-10を産生するB細胞サブセットが存在し、主にCD19^{high}CD1d^{high}のポピュレーションに含まれていた。CDモデルマウス(SAMP1/Yit)の腸管B細胞、およびヒトCD患者末梢血B細胞はCpG刺激に対して低応答性であり、IL-10の産生量が低値であった。さらに、SAMP1/Yitマウスの腸管CD4陽性T細胞とB細胞をSCIDマウスに移入した実験腸炎モデルにおいて、Bregが腸炎抑制に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The role of regulatory B cells (Bregs) producing IL-10 in the pathogenesis of Crohn's diseases (CD) remains unknown. We investigated IL-10 production in B cells from CD patients, as well as immunoregulatory functions of Bregs in experimental colitis mouse models. CpG DNA-induced IL-10 production was decreased in B cells from CD patients, as compared to those from healthy controls, while Bregs were found to be enriched in a population of CD19^{hi} and CD1d^{hi} B cells isolated from both human and mouse samples. The severity of intestinal inflammation was increased in the Breg-depleted mice, with similar results also found in adoptive transfer colitis model mice even after regulatory T cells (Tregs) depletion. Our findings show that Bregs reduced experimental colitis regardless of the presence or absence of Tregs. These results suggest that a deficiency or decrease of Bregs function exacerbates intestinal inflammation, which may be associated with the pathogenesis of CD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・下部消化管学(小腸、大腸)

キーワード：制御性B細胞 炎症性腸疾患 自然免疫 IL-10 クローン病モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) CD と潰瘍性大腸炎 (UC) などの炎症性腸疾患 (IBD) は、本邦において近年急速に患者数が増加しており、それとともに難治化、重症化する症例が増えてきている。現在までに様々な抗炎症薬や免疫調節剤が開発され使用されてきたが、それらの効果はいまだ十分なものとはいえず、新たな治療法の開発を念頭においた病態解明が必要である。

(2) B 細胞は、抗体産生、抗原提示、サイトカイン産生など多様な機能を有しており、生体において液性免疫の中心を担っている。しかし一方では、B 細胞による自己抗体産生やアレルギー誘導は様々な免疫疾患の発症につながることから、B 細胞は pathogenic な細胞としての側面を持ち、B 細胞依存性の過剰免疫応答を標的とした治療法開発も進められてきた。近年、従来から考えられてきたこれらの B 細胞の機能とは別に、免疫や炎症を負に制御する新規の B 細胞サブセットとして“制御性 B 細胞 (Breg)”の概念が報告されてきた。本サブセットは、細菌の非メチル化 CpG DNA などの抗原の刺激に対して、免疫抑制性のサイトカインである IL-10 を産生することを特徴とし、炎症性サイトカイン産生やヘルパー T 細胞依存性の免疫応答を負に制御することが明らかとなっている。申請者らは、マウスの腸管 B 細胞の機能解析をおこなっている過程で、腸管 B 細胞の中に CpG DNA 刺激に依存して IL-10 を豊富に産生する制御性 B 細胞のサブセットが存在することを明らかにした。(*Immunology*. 2010)。ここまでの研究で、CD の病態に Breg の機能異常が関連するという新知見を得たが、腸管炎症における Breg の詳細な機能は不明であった。

2. 研究の目的

(1) IBD 患者の末梢血 B 細胞を用いた実験によって、ヒト IBD の病態における Breg の関与を検討する。

(2) SAMP1/Yit マウスの腸管 CD4 陽性 T 細胞を免疫不全マウスである SCID マウスに移入した慢性腸炎モデルを作製し、B 細胞存在の腸炎の発症と増悪における Breg の機能解析をおこなう。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血を用いた検討

マウスの実験結果を踏まえ、ヒト IBD 患者の末梢血 B 細胞の CpG DNA 刺激時の IL-10 産生能を健常人と比較した。クローン病 30 人、潰瘍性大腸炎 30 人、健常人 45 人を対象とした。対象者の末梢血単核球から CD19 抗体磁気ビーズを用いて B 細胞を分離・培養し、CpG DNA 刺激後 72 時間で IL-10 を EIA で測定した。

(2) マウス腸炎モデルを用いた検討

腸炎の作製

SAMP1/Yit の腸管膜リンパ節 (MLN) から単核球を調整し、CD4 の抗体磁気ビーズを用いて CD4⁺T 細胞を分離し SCID マウスの腹腔内へ移入することで腸炎モデルを作製した。(5×10^5 /mouse) (Burns, *Gastroenterology*. 2001)。T 細胞移入後は経時的に体重変化を観察し、8 週後に摘出した回腸および大腸の病理組織によって腸炎発症を評価した。

B 細胞の共移入の効果

上記モデルに B 細胞を co-transfer することによって腸炎の発症や増悪の程度を検討した。移入 B 細胞は SAMP1/Yit およびコントロールの AKR/J の腸管膜リンパ節 (MLN) から分離した。CD19 の抗体磁気ビーズによって高純度の B 細胞ポピュレーションを分離した。さらに Breg 分画 (CD1d^{high}CD19^{high}) と Breg 除去分画についても各々調整した。B 細胞 (5×10^6 /mouse) は CD4⁺T 細胞の移入と同時期に尾静脈から投与し、8 週後に回腸および大腸を摘出し、病理組織、サイトカイン産生によって腸炎の重症度を評価した。

Breg の抗炎症効果における制御性 T 細胞 (Treg) の存在の関与
慢性腸炎モデルを作製時に CD4⁺T 細胞から Treg 分画 (CD4⁺CD25⁻) を除去したマウスモデ

ルを作製し、全 B 細胞を共移入した時の腸炎抑制効果を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト末梢血を用いた検討

フローサイトメトリーを用いた検討では、ヒトの IL-10 産生 Breg サブセットはマウスと同様に CD1d^{high}CD19^{high} 分画に存在した。測定した IL-10 値はクローン病と潰瘍性大腸炎患者のいずれの群も健常人に比べて低値であったが、特にクローン病では顕著な結果であった。対象とした IBD 患者の臨床重症度、血液検査、治療内容などを考慮して、多変量解析もおこなったが、IL-10 産生が低値になる最も有意な因子はクローン病の存在であった。

(2) マウス腸炎モデルを用いた検討

腸炎の作製

SAMP1/Yit の腸管膜リンパ節 (MLN) から分離した CD4⁺T 細胞を CID マウスの腹腔内へ移入することによって、移入後 4 週頃から徐々に体重減少が認められるようになり、7-8 週時において、腸管短縮、組織学的な炎症、炎症性サイトカイン産生が有意に認められた。本モデルを用いて以下の実験をおこなった。

B 細胞の共移入の効果

上記モデルに全 B 細胞を co-transfer したモデルでは、SAMP1/Yit マウス由来の B 細胞移入が明らかに腸炎を増悪させた。さらに、Breg 分画と Breg 除去分画についても各々移入したモデルにおいては Breg 除去分画移入によって腸炎は明らかに重症となった (病理組織学的検討および IL-1 α 、MIP-2 産生による評価)。炎症局所における B 細胞の局在を検討する目的で CD19 抗体を用いた免疫染色をおこなったところ、大腸の粘膜固有層内に CD19 陽性細胞を確認した。

Breg の抗炎症効果における制御性 T 細胞 (Treg) の存在の関与
腸炎作成時に Treg 分画 (CD4⁺CD25⁻) を除去したマウス腸炎モデルを作製して、Treg 除去

による B 細胞を co-transfer の効果を検討した。本検討では、Treg 除去によって作製したモデルで腸炎が悪化した。B 細胞による炎症抑制効果に差は認められなかった。

5. 考察

マウス腸管の粘膜固有層や腸間膜リンパ節に IL-10 を産生する Breg が存在することが示された。CD1d^{high}CD19^{high} のポピュレーション中に Breg が存在する可能性が示唆されたが、本マーカーが Breg を規定する絶対的な細胞表面とは言えず、今後のさらなる検討が必要と考えられた。クローン病モデルマウスである SAMP1/Yit マウスの腸間膜 B 細胞が CpG DNA 刺激に対して、IL-10 産生能が低いという新規の知見が得られ、この現象は、ヒトのクローン病の末梢血 B 細胞を用いた検討からも明らかとなった。SAMP1/Yit マウスの腸管 CD4 陽性 T 細胞と B 細胞を SCID マウスに移入した実験腸炎モデルにおいて、Breg が腸炎抑制に関わる可能性を示唆する結果が得られたことも合わせると、Breg の機能がクローン病の病態に関与していることが示唆された。また、Breg の炎症抑制効果には、必ずしも Treg の存在が必要でないことも明らかとなった。しかし、何故、クローン病において Breg の機能低下がみられるのかという点は明らかにされておらず、Breg の分化や体内動態、さらに自然免疫応答に関わる細胞内シグナルなどについて今後検討する必要があると考えられた。

6. 主要な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Oka A, Ishihara S, Mishima Y, Tada Y, Kusunoki R, Fukuba N, Yuki T, Kawashima K, Matsumoto S, Kinoshita Y: Role of regulatory B cells in chronic intestinal inflammation: association

with pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 20:315-28, 2014. (DOI: 10.1097/01.MIB.0000437983.14544.d5.) (査読有)

Kawashima K, Ishihara S, Yamamoto A, Ohno Y, Fukuda K, Onishi K, Kinoshita Y: Development of diffuse alopecia with psoriasis-like eruption during the administration of infliximab for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 19:E33-4, 2013. (DOI: 10.1002/ibd.22922.) (査読有)

Ishihara S, Tada Y, Fukuba N, Oka A, Kusunoki R, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kinoshita Y: Pathogenesis of irritable bowel syndrome - review regarding associated infection and immune activation. *Digestion.* 87:204-11, 2013. (DOI: 10.1159/000350054.) (査読有)

Mishiro T, Kusunoki R, Otani A, Ansary MM, Tongu M, Harashima N, Yamada T, Sato S, Amano Y, Itoh K, Ishihara S, Kinoshita Y: Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8. *Lab Invest.* 93:834-43, 2013. (DOI: 10.1038/labinvest.2013.70.) (査読有)

Tada Y, Ishihara S, Ito T, Matsui K, Sonoyama H, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Mishima Y, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Sato S, Adachi K, Ikeuchi H, Kinoshita Y: Successful use of maintenance infliximab for nephropathy in a patient with secondary amyloidosis complicating

Crohn's disease. *Intern Med.* 52:1899-902, 2013. (査読有)

Kawashima K, Ishihara S, Doi K, Uemura Y, Ohno Y, Fukuda K, Onishi K, Tada Y, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Yuki T, Kinoshita Y: Ulcerative colitis associated with isolated unilateral hypoglossal nerve palsy. *Intern Med.* 51:3135-7, 2012. (査読有)

Kusunoki R, Ishihara S, Aziz M, Oka A, Tada Y, Kinoshita Y: Roles of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation. *Digestion.* 85:103-7, 2012. (DOI: 10.1159/000334679.) (査読有)

Otani A, Ishihara S, Aziz MM, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Ansary MM, Kinoshita Y: Intrarectal administration of milk fat globule epidermal growth factor-8 protein ameliorates murine experimental colitis. *Int J Mol Med.* 29:349-56, 2012. (DOI: 10.3892/ijmm.2011.866.) (査読有)

岡 明彦、石原俊治、木下芳一：炎症性腸疾患における制御性B細胞の役割。 *G.I. Research* 20:479-485.2012(査読無)

Kusunoki R, Ishihara S, Sato M, Sumita Y, Mishima Y, Okada M, Tada Y, Oka A, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Sato S, Amano Y, Murakawa Y, Kinoshita Y: Rare case of Takayasu's arteritis associated with Crohn's disease. *Intern Med.* 50:1581-5, 2011.

Li YY, Ishihara S, Aziz MM, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Yuki T, Amano Y, Ansary MU, Kinoshita Y: Autophagy is required for toll-like receptor-mediated interleukin-8 production in intestinal epithelial

cells. Int J Mol Med. 27:337-44, 2011.
(DOI: 10.3892/ijmm.2011.596.)

岡 明彦、石原俊治、木下芳一：制御性
B 細胞からみた IBD 治療へのアプローチ。
IBD Research 5:259-64, 2011. (査読無)

[学会発表] (計 5 件)

Ishihara S Tada Y, Fukuba N, Sonoyama
H, Oka A, Kusunoki R, Oshima N,
Moriyama I, Yuki T, Kawashima K,
Kushiya Y, Fujishiro H, Kinoshita Y:
Susceptibility for
colitis-associated cancer
development in SAMP1/Yit mice. United
European Gastroenterology Week (UEGW).
Berlin (International Congress
Centrum (ICC Berlin)), Germany,
2013.10.16.

Kawashima K, Ishihara S, Sonoyama H,
Tada Y, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N,
Oshima N, Moriyama I, Yuki T,
Kinoshita Y: Elevated matrix
metalloproteinase-3 Levels in serum
correlated with Crohn ' s disease
severity: efficacy as clinical
biomarker. United European
Gastroenterology Week (UEGW). Berlin
(International Congress Centrum (ICC
Berlin)), Germany, 2013.10.15.

Tada Y, Ishihara S, Kinoshita Y:
Down-regulation of serotonin reuptake
transporter gene expression in
colonic mucosa during inflammation
and healing phases of inflammatory
bowel disease. United European
Gastroenterology Week (UEGW).
Amsterdam (Amsterdam RAI),
Netherlands, 2012.10.23.

Kawashima K, Ishihara S, Oka A, Fukuba
N, Ryusaku K, Tada Y, Tamagawa Y, Yuki

T, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y:
Effects of pH-dependent release
formulation of mesalazine on active
ulcerative colitis resistant to
time-dependent release formulation of
mesalazine. United European
Gastroenterology Week (UEGW).
Amsterdam (Amsterdam RAI),
Netherlands, 2012.10.23.

Oka A, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y,
A.U. Mesbah, Fukuba N, Moriyama I,
Yuki T, Kawashima K, Kinoshita Y:
Regulatory role of CD19^{high}CD1d^{high} B
cells in intestinal inflammation:
association with pathogenesis of
Crohn ' s disease. United European
Gastroenterology Week (UEGW).
Amsterdam (Amsterdam RAI),
Netherlands, 2012.10.22.

7 . 研究組織

(1) 研究代表者

石原 俊治 (Shunji Ishihara)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80263531