

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659523

研究課題名(和文)線維化を抑制する新しい制御性B細胞サブセットの同定

研究課題名(英文)Identification of new regulatory B cell subsets suppressing fibrosis

研究代表者

藤本 学 (Fujimoto, Manabu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90272591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：免疫反応を抑制するB細胞の新しいサブセットとしての「制御性B細胞」が、線維化を抑制しているかどうか、また、どのような機序により抑制するか、さらにこのような制御性B細胞はこれまでに報告されたものと同様の細胞群であるかどうかを検討した。異なる系統マウスの骨髄移植による皮膚硬化型慢性移植片対宿主病(graft versus host disease: GVHD)にて、制御性B細胞を欠損するCD19欠損マウスがドナーの場合、GVHDは著明に悪化し、これは野生型の制御性B細胞移入により改善された。これより、制御性B細胞の線維化における抑制効果が示された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have clarified the protective role of regulatory B cells (Bregs) in various inflammatory and autoimmune diseases. In this study, we studied the role of Bregs in fibrotic diseases using sclerodermatous chronic graft-versus-host disease (Scl-cGVHD) model, which is characterized by fibrosis and autoimmune features resembling those of systemic sclerosis (SSc). CD19-deficient (CD19^{-/-}) mice were used as donors or recipients in this model. CD19^{-/-} donors induced more severe Scl-cGVHD than wild-type donors, while CD19^{-/-} recipients showed no significant differences compared with wild-type recipients. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) were not reconstituted by CD19^{-/-} donor cells, and early adoptive transfer of B10 cells attenuated the augmented manifestations of CD19^{-/-} donor-induced Scl-cGVHD. Therefore, donor-derived B10 cells have a suppressive role in Scl-cGVHD development.

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：線維化 皮膚免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) B 細胞は感染症や自己免疫疾患をはじめとする様々な炎症・免疫疾患において、主として抗体産生という液性免疫を担当することにより、中心的な役割を果たしていることはよく知られている。ところが、近年、これまで B 細胞が関与するとは考えられていなかったような病態（たとえば動脈硬化：Ait-Oufella et al, J Exp Med, 2010）においても重要な役割をもっていることが示されてきている。このように B 細胞がこれまで想定されていた以上に多彩な働きをもつ機序として、従来から知られている抗体産生のみならず、サイトカイン産生や抗原呈示などの役割も重要であることが示されている。

(2) B 細胞のこれらの機能は、通常免疫反応を増強する方向に作用するが、その一方で、近年、免疫反応を抑制する「制御性 B 細胞」の存在がわれわれや他のグループにより明らかにされてきた（Fillatreau et al, Nat Immunol, 2002; Mizoguchi et al, Immunity, 2002 など）。われわれは、接触過敏反応や自己免疫疾患において抑制的に作用する制御性 B 細胞が脾臓辺縁帯の CD1d^{hi}CD5⁺B 細胞や腹腔内 B-1a 細胞の中に存在することを報告した（Watanabe et al, Am J Pathol, 2007, Matsushita et al, J Clin Invest, 2008, Yanaba et al, Immunity, 2008, Watanabe et al, J Immunol, 2010）。制御性 B 細胞は「免疫系のブレーキ」の一つであり、これが破綻した場合は深刻な病態を惹起しうる。

(3) 線維化をきたす病態は、全身性強皮症をはじめとして種々の疾患で認められる。しかしながら、線維化を抑制する治療法は現在のところ有効なものが少なく、新しい方向からのアプローチが求められていた。われわれは、線維化を制御性 B 細胞によって抑制する可能性を追求するために、線維化のマウスモデル

であるブレオマイシン誘導皮膚・肺線維症モデルを用いて、B 細胞による抑制効果を検討した。すると B 細胞欠損マウスでは、線維化が著明に増悪し、野生型 B 細胞の移入により軽快がみられ、B 細胞が線維化抑制効果をもっていることが示唆された。しかしながら、このような抑制効果をもつ B 細胞は、これまで報告されてきた制御性 B 細胞の表現型と異なる新しいサブセットであることも示唆された。一方、B 細胞全部を除去する実験系では線維化は著明に増悪することから、B 細胞には線維化においても増強と抑制の「二面性」を有すると考えられた。このように、線維化を抑制する新しい制御性 B 細胞のサブセットを同定することは、線維化に対する新しい治療法を開発できる可能性があるため、本研究を計画した。

2. 研究の目的

免疫反応を抑制する B 細胞の新しいサブセットとしての「制御性 B 細胞」が、線維化を抑制しうるかどうか、また、どのような機序により抑制するか、さらにこのような制御性 B 細胞はこれまでに報告されたものと同様の細胞群であるかどうかを検討することを目的とした。もし、新しい制御性 B 細胞サブセットであれば、その特異的表面マーカーや特異的転写因子をも明らかにしたいと考えた。このようなアプローチは、今なお難治性疾患であり根本的な治療法のみならず大多数に有効性を示す治療法すら存在しない強皮症をはじめとする線維化疾患に対する新しい治療法や創薬に結びつけられる可能性があると考えられた。

3. 研究の方法

(1) 皮膚硬化のマウスモデルとして、異系統マウス間の骨髄移植による皮膚硬化型慢性移植片対宿主病（graft versus host disease: GVHD）を用いた。

(2) B 細胞特異的細胞表面分子である CD19 を欠損した B10.D2 マウスおよび CD19 を欠損した BALB/C マウスを、C57BL/6 系統の CD19 欠損マウスをそれぞれの野生型マウスに backcross することにより作製した。

(3) 野生型 B10.D2 マウスあるいは CD19 を欠損した B10.D2 マウスをドナーマウスとして、また野生型 BALB/C マウスあるいは CD19 を欠損した BALB/C マウスをレシピエントマウスとして、レシピエントマウスを放射線照射した後に骨髄移植を行い、皮膚硬化型慢性 GVHD を誘導し、その解析を行った。評価には、臨床スコアおよび病理組織学的所見を用いた。

(4) B 細胞を、細胞表面マーカーを染色した後に高速セルソーターにより分離し、移入実験を行い、制御性 B 細胞あるいは通常の B 細胞の移入による治療効果の検討を行った。

(5) 制御性 B 細胞および T 細胞の *in vitro* の共培養を行い、T 細胞の増殖およびサイトカイン産生を、それぞれ CFSE 染色および ELISA により評価した。

4. 研究成果

(1) CD19 欠損 B10.D2 マウスの骨髄および脾臓を、放射線照射された BALB/c マウスに移入したところ、ドナー由来の制御性 B 細胞だけが欠損しているために、コントロール群に比べてより重症の皮膚硬化型慢性 GVHD を発症した (図 1)。

一方、B10.D2 マウスの骨髄および脾臓を、放射線照射された CD19 欠損 BALB/C マウスに移入した場合は、レシピエント由来の制御性 B 細胞だけが欠損していることになるが、コントロール群と比べて有意な差は示されなかった。以上の結果より、皮膚硬化型慢性 GVHD マウスの抑制機序において、ドナー由

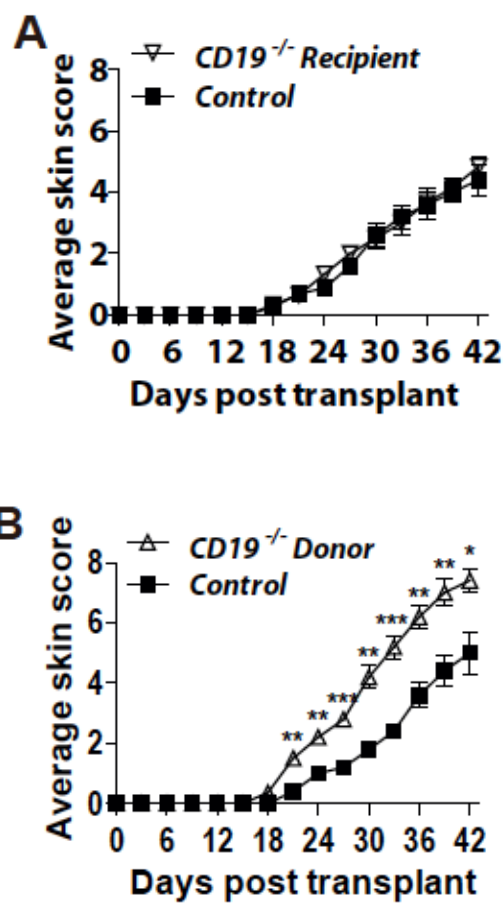


図 1 皮膚硬化型慢性 GVHD の重症度スコア

来の制御性 B 細胞が存在することが重要であることが示された。

(2) 野生型マウスドナーによるコントロール群と CD19 欠損マウスドナー群の皮膚硬化型慢性 GVHD の背部皮膚および、肺での線維化を組織学的に検討したところ、CD19 欠損ドナー群では IL-10 産生制御性 B 細胞が存在しないことにより、制御性 B 細胞によって炎症反応および線維化を抑制する作用が減弱し、その結果としてより高度な線維化が認められた (図 2)。

さらに CD19 欠損 B10.D2 マウスを使用して、ドナー由来の制御性 B 細胞を欠損した皮膚硬化型慢性 GVHD マウス (CD19 欠損ド

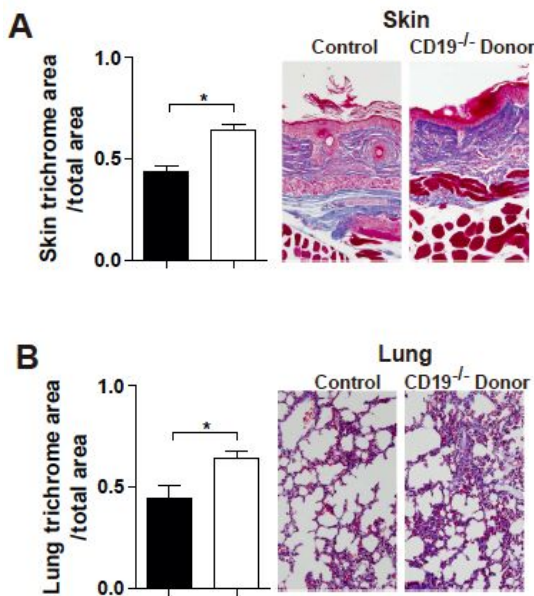


図2 野生型マウスおよび CD19 欠損マウスをドナーとした皮膚と肺の GVHD の相違

ナー)に野生型マウス由来の制御性 B 細胞を豊富に含む分画 (CD1d^{hi}CD5⁺ B 細胞) と野生型マウス由来の通常の B 細胞のみが含まれる分画 (CD1d^{lo}CD5⁻ B 細胞) を、それぞれ骨髄移植と同日に移植したところ、野生型マウス由来の制御性 B 細胞を含む分画 (CD1d^{hi}CD5⁺ B 細胞) を移植した群では、皮膚硬化型慢性 GVHD の有意な改善効果が認められた (図3)。しかしながら、移植後 21 日目に野生型マウス由来の制御性 B 細胞 (CD1d^{hi}CD5⁺ B 細胞) を移植した場合においては、もはや皮膚硬化型慢性 GVHD の有意な改善効果は認められなかった。

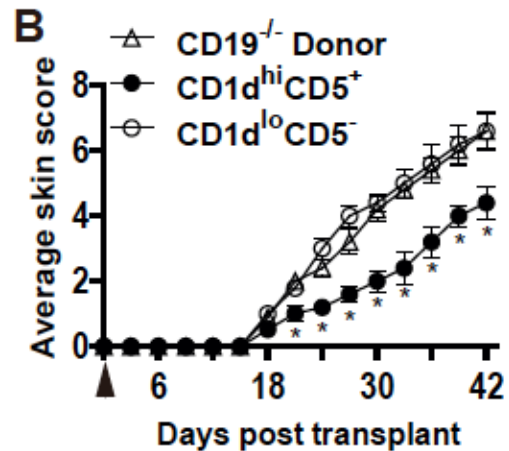
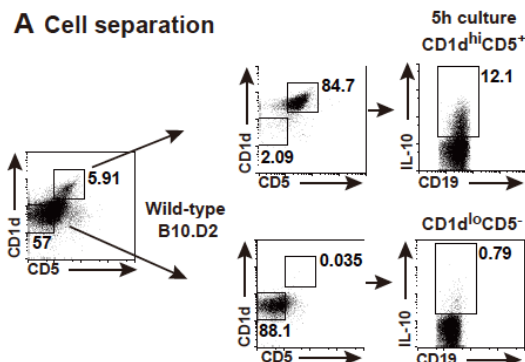


図3 制御性 B 細胞を含む分画あるいは通常の B 細胞分画の移入による皮膚硬化型慢性 GVHD の改善効果

(3) 皮膚硬化型慢性 GVHD における制御性 B 細胞の抑制機序の解明のため、制御性 B 細胞を T 細胞と共培養し解析した。制御性 B 細胞と CD4⁺T 細胞の共培養の実験系にて、制御性 B 細胞は CD4⁺T 細胞の細胞増殖抑制効果は認めないものの、サイトカイン産生能 (IFN- γ) を有意に抑制した。

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 5 件)

Le Huu D, Kimura H, Date M, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Hau KT, Fujimoto M, Takehara K, Matsushita T. Blockade of Syk Ameliorates the development of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *J Dermatol Sci*, 2014;74:214-21. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.02.008. 8 査読あり)

Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF, Fujimoto M. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of

murine sclerodermatous chronic
graft-versus-host disease. *Blood*,
2013;121:3274-83. doi:
10.1182/blood-2012-11-465658 (査読あ
り)

Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi
Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M.
FTY720 ameliorates murine Scl-cGVHD
by promoting expansion of splenic
regulatory cells and inhibiting immune cell
infiltration into skin. *Arthritis Rheum*.
2013;65:1624-35. doi: 10.1002/art.37933.
(査読あり)

Ueda-Hayakawa I, Hasegawa M,
Hamaguchi Y, Takehara K, Fujimoto M.
Circulating gamma/delta T cells in systemic
sclerosis exhibit activated phenotype and
enhance gene expression of proalpha2(I)
collagen of fibroblasts. *J Dermatol Sci*.
2013;69:54-60. doi:
10.1016/j.jdermsci.2012.10.003. (査読あ
り)

Arai M, Ikawa Y, Chujo S, Hamaguchi Y,
Ishida W, Shirasaki F, Hasegawa M,
Mukaida N, Fujimoto M, Takehara K.
Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1
regulate skin fibrosis in the mouse model
of cytokine-induced systemic sclerosis. *J
Dermatol Sci*, 2013;69:250-8. doi:
10.1016/j.jdermsci.2012.10.010. (査読あ
り)

[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]

ホームページ等

<http://dermatology-tsukuba.org>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤本 学 (FUJIMOTO, Manabu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：9 0 2 7 2 5 9 1