

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 2 月 6 日現在

機関番号 : 12601
研究種目 : 若手研究 (B)
研究期間 : 2011~2013
課題番号 : 24791137
研究課題名 (和文) 乾癬マウスモデルにおける B 細胞の役割の解明と治療への応用
研究課題名 (英文) The role of B cells in a murine model of human psoriasis
研究代表者 築場 広一 (YANABA, Kouichi) 東京大学・医学部附属病院・助教 研究者番号 : 80385369
交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要 (和文) : インターロイキン (IL)-10 は免疫反応を沈静化する抑制性サイトカインのひとつであるが、IL-10 を産生する B 細胞はマウスでは脾臓に存在し CD1d^{hi}CD5⁺CD19^{hi} という表現型を示し、レギュラトリ-B 細胞として各種自己免疫疾患や炎症性疾患の制御に重要な働きを担っている。本研究では、野生型マウスとレギュラトリ-B 細胞を欠損した CD19 ノックアウトマウスに、乾癬のモデルであるイミキモド誘発性乾癬様皮膚炎を誘導し解析を行った。B10 細胞を欠損する CD19 ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べて乾癬様皮膚炎は重症化した。脾臓に存在するレギュラトリ-B 細胞は乾癬様皮膚炎の誘導後に血中、所属リンパ節に移動し、インターフェロン γ 、IL-17 の産生を抑制することで乾癬様皮膚炎を制御すると考えられた。野生型マウスのレギュラトリ-B 細胞を CD19 ノックアウトマウスに移植することにより、乾癬様皮膚炎は野生型マウスと同程度にまで軽減することができた。以上のことからレギュラトリ-B 細胞が乾癬モデルにおいて、炎症の制御に重要な働きを担っていると考えられた。さらに将来の乾癬に対するレギュラトリ-B 細胞を用いた治療が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Psoriasis is an inflammatory cutaneous disorder characterized by marked epidermal thickening with T helper 1 and 17 cell infiltration. At present, the contribution of B cells to the pathogenesis of psoriasis is unclear. In mice, topical application of imiquimod induces inflamed skin lesions resembling human psoriasis and serves as an experimental animal model for human psoriasis. In this study, we have shown that imiquimod-induced skin inflammation was more severe in CD19-deficient mice than in wild-type mice. These inflammatory responses were negatively regulated by a unique interleukin-10-producing CD1d^{hi}CD5⁺ regulatory B cell subset (B10 cells) that was absent in CD19-deficient mice and represented only 1-2% of splenic B220⁺ cells in wild-type mice. Splenic B10 cells entered the circulation and migrated to draining lymph nodes during imiquimod-induced skin inflammation, thereby suppressing interferon- γ and interleukin-17 production. Furthermore, adoptive transfer of these B10 cells from wild-type mice reduced inflammation in CD19-deficient mice. The present findings provide direct evidence that B10 cells regulate imiquimod-induced skin inflammation and offer insights into regulatory B cell-based therapies for the treatment of psoriasis.

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 : 乾癬、B細胞、マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 乾癬の病態解明および新規治療法開発の必要性

乾癬は炎症性角化症の代表的疾患であり、全

身に紅色局面を形成する。乾癬は皮膚症状が大部分を占め、他の臓器をおかすことは少ないが、患者は社会生活上で大きな制約を受けており、生活の質の低下が問題となる。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の全身投与などが行われるが、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、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薬の開発が望まれている。

(2) 乾癬の病態：過剰な免疫反応に対する抑制メカニズム異常の可能性

乾癬では遺伝的要因と環境因子が複雑に絡み合い、何らかの抗原が皮膚の免疫担当細胞を介して局所での過剰な免疫反応を引き起こし、発症と炎症の持続に関与していると考えられている。しかし健常人には免疫反応を抑制するシステムが働いており、過剰に起こった免疫反応はやがて沈静化するが、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：イミキモド誘導性乾癬

今まで乾癬を研究するうえで有効な動物モデルは存在したが、いずれも誘導に複雑な手技を要するため、どの施設でも利用可能というものではなかった。しかしながら近年、Toll-like receptor 7 および 8 を活性化するイミキモド含有クリームを利用した乾癬のマウスモデルが開発された (van der Fits, et al: *J Immunol* 182;5836-45, 2009)。マウスの背部に5%イミキモド含有クリームを6日間連続で塗布することで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。

(4) IL-10 産生制御性 B 細胞

B 細胞を除去することにより遅延型過敏反応が増強されることが 1974 年に報告され、初めて免疫反応を抑制する B 細胞の存在が指摘された。その後、主に B 細胞を欠損したマウスを用いた研究で、多発性硬化症や炎症性腸疾患が重症化することが示されたが、そのメカニズムについては長い間不明のままであった。IL-10 は免疫反応を抑制するサイトカインとして知られており、T 細胞、マクロファージ、肥満細胞、好酸球、ケラチノサイトなど様々な細胞によって産生され、Th1、Th2 の両方を抑制し、さらに樹状細胞の抗原提示やマクロファージからのサイトカイン産生を減少させる。近年になり、B 細胞が IL-10

を産生することにより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次第に明らかにされてきた。

IL-10 を産生する制御性 B 細胞がどの B 細胞サブセットに属するのかといった点については、過去に数多くの報告がなされてきた。例えば B-1a 細胞 (CD5⁺) や、marginal zone B 細胞 (CD1d^{hi}CD21^{hi})、あるいは T2-marginal zone precursor B 細胞 (CD21^{hi}CD23^{hi}) などの B 細胞サブセットが IL-10 を産生するとの報告がなされてきたが、これらの結果は相矛盾しておりその解明が待たれていた。研究代表者は過去に IL-10 を産生する制御性 B 細胞の表面マーカーは CD1d^{hi}CD5⁺であり、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, Yanaba K, et al. *Immunol Rev* 224; 201-14, 2008)。CD19 は B 細胞に特異的に発現するシグナル伝達物質であるが、CD19 ノックアウトマウスは IL-10 産生制御性 B 細胞を欠如することから、制御性 B 細胞の分化には CD19 の発現が重要であることを明らかにした。さらに重要なことは、制御性 B 細胞を欠如している CD19 ノックアウトマウスでは T 細胞依存性炎症反応である接触皮膚炎が増悪することを見だし、制御性 B 細胞の *in vivo* における重要性を明らかにした。またマウスの多発性硬化症モデルにおいても、この制御性 B 細胞は同様に 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。興味深いことに、ヒトにおいて B 細胞を特異的に除去する抗 CD20 抗体を投与された、元来乾癬の既往がない患者に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 細胞の機能異常や減少が自己免疫疾患の病態に関与している可能性もあり、今後のさらなる研究が期待されている。

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がまだ確立していないため、乾癬に対する副作用の少ない、病態に密接に関連した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・進行における IL-10 産生制御性 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。そのため、IL-10産生制御性B細胞を欠如するCD19ノックアウトマウスに乾癬を誘導し、炎症の重症度の評価および病態の解析を行う。さらに、IL-10産生制御性B細胞の機能異常や減少が、乾癬の病態に関与しているかどうかについても検討を行う。

3. 研究の方法

(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）を背部皮膚に塗布する。コントロール群には同量のワセリンを塗布する。これを6日間連日で行う。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段階で評価する。

(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する。

(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う。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°C、10分間反応させ、非特異的な染色をブロックする。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時間反応させる。切片は次いで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分間反応させる。次いでhorseradish peroxidase標識アビジン-ビオチン複合体と反応させる。各反応間で、切片はPBSで3回洗浄を行う。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る。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する。

(4) IL-10産生制御性B細胞の投与による乾癬の治療

乾癬発症マウスの脾臓よりフローサイトメトリーを用いて制御性B細胞を含むB細胞サブセット（CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺）を採取する。これを2,000,000個ずつ乾癬発症早期のマウスに経静脈的に投与し、その後の皮膚炎への影響を評価する。

4. 研究成果

CD19ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて、紅斑、鱗屑、皮膚肥厚、総合重症度スコアすべてにおいて重症となった。またCD19ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞のいずれも多く浸潤していた。さらに野生型マウスより採取した制御性B細胞を含むB細胞サブセット（CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺）をCD19ノックアウトマウスに移植することにより、皮疹を有意に軽減することができた。

結論としてCD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺制御性B細胞はイミキモド誘導性乾癬モデルにおいて皮膚炎を抑制することが分かった。本研究の成果は乾癬に対するB細胞をターゲットとした治療応用への基礎的情報になると考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

Yanaba K, Kamata M, Ishiura N, Shibata S, Asano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Tedder TF, Sato S: Regulatory B cells suppress imiquimod-induced, psoriasis-like skin inflammation, *J Leukoc Biol*, 94:563-573, 2013. doi: 10.1189/jlb.1112562.

[学会発表] (計 2件)

(1) Yanaba K, Asano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono M, Tedder TF, Sato S: Interleukin-10-producing regulatory B cells (B10 cells) ameliorate psoriasis in mice. Concurrent Oral session "Autoimmunity and Inflammation" The 42nd annual meetings of the European Society for Dermatological Research 2012/9/19-22, Venice Lido Congress Centre, Venice, Italy.

(2) Yanaba K, Tedder TF, Sato S: IL-10-producing regulatory B cells ameliorate psoriasis in mice. ワークショップ“皮膚免疫”. 第41回日本免疫学会総会・学術大会 2012/12/5-7, 神戸国際会議場 (神戸市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)
なし

○取得状況 (計 0件)
[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築場 広一 (YANABA Koichi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80385369

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし