

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860800

研究課題名(和文) 制御性B細胞におけるIL-10産生機構の解明

研究課題名(英文) Identification of mechanisms for IL-10 production by regulatory B cells

研究代表者

山崎 奈穂(鈴木奈穂)(Yamazaki, Nao)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・免疫制御研究部・上級研究員

研究者番号：20646848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞亜集団である制御性B細胞はIL-10産生を介して強い抗炎症機能を持つが、IL-10産生機構のその全貌は不明であった。申請者は、IL-10レポーターマウスを用いて、IgM+形質細胞がIL-10の主な産生源であることを見出した。また、B細胞におけるIl10の発現は形質細胞分化の必須分子であるBlimp1と強く相関し、遺伝子導入実験からBlimp1がIl10の発現を誘導することを明らかにした。また、IL-10産生性形質細胞は、B細胞が抗原刺激を受けた際にIgG+形質細胞へ分化する過程および抗原特異的IgGの産生をサポートする機能を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have identified a new population of phenotypic IgM+B220^{lo}CD138^{hi} cells responsible for marked IL-10 production in murine bone marrow and spleen. These cells predominantly secrete IgM and had characteristics of long-lived plasma cells. We found that IL-10 production was strongly correlated with the expression level of Prdm1 (encoding the Blimp-1 protein), an essential regulator of plasma cell development. Furthermore, transduction of Prdm1 induced Il10 expression in naive B cells. Immunoglobulin class-switching recombination events resulted in the downregulation of both Il10 and Prdm1 expression in differentiating B cells. Thus, the prolonged elevation of Blimp-1 expression during the formation of IgM+CD138^{hi} cells without class-switching elicited IL-10 production. Adoptive transfer of Il10-deficient B cells into B cell-deficient mice demonstrated that IgM+CD138^{hi} cell-derived IL-10 supported class-switched plasma cells and their antibody production in response to antigen challenge.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞 形質細胞 IL-10

1. 研究開始当初の背景

申請者らの研究グループは脂肪組織中に抗炎症サイトカインである IL-10 を産生するユニークな B 細胞集団が存在し、肥満に伴う慢性炎症を抑制する機能があることを報告した(Nishimura et al. 2013)。B 細胞は液性免疫応答を介して免疫を促進的に制御する他、抗原提示能やサイトカイン産生能を介して T 細胞の活性化にも重要な機能を有する。一方、制御性 B 細胞と呼ばれる IL-10 産生 B 細胞が免疫応答の結果誘導され、IL-10 を介してマクロファージからの炎症性サイトカイン産生や T 細胞の活性化を抑制することが知られている(Yanaba et al. 2008)。制御性 B 細胞は、骨髄や脾臓、リンパ系組織内に非常に低頻度で存在し *in vitro* での刺激によって IL-10 産生能を獲得することが報告されているが、*in vivo* において B 細胞がどのようなメカニズムで IL-10 を産生するのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者は、脂肪組織に存在する IL-10 産生性 B 細胞を用いて B 細胞において IL-10 産生を誘導する master regulator を同定すること、および制御性 B 細胞の分化過程を解明することを目的とした。また、この制御性 B 細胞は脂肪組織に特異的に存在することから、肥満とそれに伴う慢性炎症ならびに糖尿病治療のターゲットとなりうることを予想されたため、その治療効果を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) IL-10 産生細胞の表現系を同定するために、IL-10 Venus レポーターマウスを導入し、脂肪組織をはじめとした全身組織をフローサイトメトリーにより解析した。また、Venus 陽性細胞における遺伝子発現状態を把握するためにマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。次に、*1110* 発現に関与すると考えられる候補遺伝子をピックアップし、レトロウイルスを用いて B 細胞に強制発現系のシステムを構築した。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて候補遺伝子のノックアウトマウスを作製した。

(2) IL-10 産生 B 細胞の機能を評価するために、*1110* 欠損マウス由来の骨髄と B 細胞欠損マウス由来の骨髄を 1:9 の割合で致死量放射線照射した正常マウスに移植し、B 細胞特異的 *1110* 欠損マウスを作製した。このマウスに NP-CGG 等の抗原刺激を加え、抗原特異的な抗体産生量をコントロールマウスと比較した。

4. 研究成果

(1) 申請者は、まず *1110* の発現をモニターできる IL-10Venus (IL10V) マウスの脂肪組織および全身をフローサイトメーターにより解析した。その結果、脂肪組織における B 細胞において Venus の発現は確認できなかった。一方、骨髄と脾臓では顕著に Venus の発現が高い新規の B 細胞集団を見出した。この Venus 陽性細胞は、IgM⁺B220^{lo}CD138^{hi} の表現系を示し、形態学的にも抗体産生を担う形質細胞であることが確認された(図 1)。さらにマイクロアレイ解析から、Venus 陽性細胞はナイーブ B 細胞と比較して形質細胞に特徴的な *Xbp1*, *Prdm1*, *Irf4* の発現が高いことが分かった。Venus 陽性形質細胞は細胞表面の IgM 発現および IgM 分泌能が高く、免疫グロブリンクラススイッチ組換えが起こらずに分化した細胞であることが推察されたことから、申請者はクラススイッチ組換えが *1110* 発現を抑制するのではないかと考えた。

(2) ナイーブ B 細胞に *in vitro* で IL-4 や CD40L などのサイトカイン添加によりクラススイッチを誘導したところ、*1110* 発現が抑制されることが確認された。しかしながら、クラススイッチ組換えの master regulator である *Aicda* が *1110* 発現を抑制する可能性を検討するために、*1110V* かつ *Aicda* 欠損マウスの B 細胞を解析したが、Venus 陽性率はコントロールと相違なかったことから、*Aicda* は *1110* 発現に関与していないことが明らかになった。

(3) ナイーブ B 細胞にクラススイッチ組換えを誘導しない場合 (LPS 刺激) と誘導した場合 (LPS plus IL-4 刺激) の遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、形質細胞分化に必須分子である B Imp-1 (遺伝子名 *Prdm1*) の発現が *1110* と強く相関することが明らかになった。また、ナイーブ B 細胞に LPS 刺激を施した場合は *1110* とともに *Prdm1* の発現が誘導されるのに対し、LPS plus IL-4 刺激の場合は両者の発現が顕著に抑制された。ナイーブ B 細胞にレトロウイルスを用いて *Prdm1* を強制発現させてみると、同時に IL-4 や CD40L によってクラススイッチを誘導した状態においてもコントロールと比較して *1110* 発現が誘導されていたことから、B Imp-1 が直接的に *1110* 発現を誘導することが示唆された。

(4) 生体内における IL-10 産生性形質細胞の機能を評価するために、申請者は B 細胞特異的 *1110* 欠損マウスを作製した。各 B 細胞サブセットのうち *1110* 発現は形質細胞でしか確認されないため、当該マウスは実質的に形質細胞特異的 *1110* 欠損マウスとみなされる。申請者は、このマウスにハプテン抗原 NP-CGG と Alum アジュバントを混合して皮下投与し、

経時的に抗原特異的抗体産生量をモニターした。その結果、B細胞特異的 *I110* 欠損マウスではコントロールマウスと比較して顕著に抗原特異的 IgG の産生量が低下したと同時に脾臓および骨髄における IgG スイッチ済み形質細胞の数が減少していた。一方、IgM の産生量は若干増加していた(図2)。この結果は、IgM 陽性形質細胞は IL-10 産生を介して抗原刺激に反応してクラススイッチを経た IgG 陽性形質細胞の生成および生存維持をサポートしていることが示唆された。

以上のことから、B細胞分化の過程において、TLR や IL-21 の刺激が加わるとナイーブ B 細胞では Blimp-1 の発現が急速かつ強力に誘導され、クラススイッチを経ずに IgM 陽性の形質細胞に分化するとともに IL-10 を産生する。一方、IL-4 や CD40 の刺激が加わると Blimp-1 の発現は抑制されるため IL-10 の産生も阻害され、*Aicda* の発現が誘導されてクラススイッチが起こる。IgM 陽性の形質細胞は IL-10 産生によって後者の B 細胞分化および液性免疫応答をサポートする役割を担うことが示唆された(図3)。本研究成果によって明らかになった現象は、様々な抗原刺激時(細菌やウイルス感染、ワクチン接種等)の抗体産生効率に影響することが推察され、将来的にワクチン接種時の効率を高めるためのアジュバント開発などに応用される可能性が期待される。

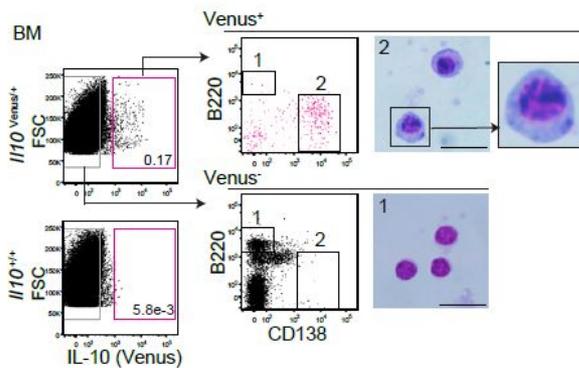


図 1. IL10V マウスの骨髄における Venus 陽性細胞

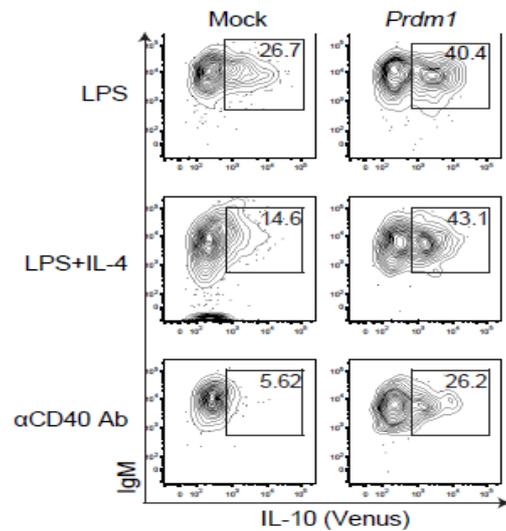


図 2. IL10V ナイーブ B 細胞に左に示す条件下でコントロール(Mock)または Prdm1 を導入して 2 日後の Venus 発現

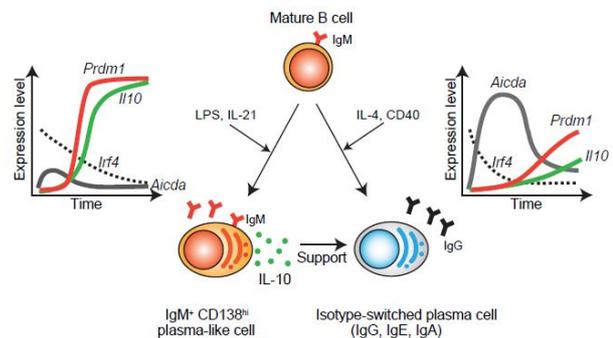


図 3. B 細胞分化と IL-10 産生機構

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)

Suzuki-Yamazaki N, Yanabu-Takanashi R, Okamura T, Takaki S. IL-10 production in murine IgM⁺ CD138^{hi} cells is driven by Blimp-1 and downregulated in class-switched cells. *European Journal of Immunology*. 査読有. 2017. Mar; 47(3):493-503. DOI: 10.1002/eji.201646549.

[学会発表](計 2 件)

Yamazaki Nao. IgM⁺ plasma cells contribute to the sufficient production of IgG by secreting IL-10 and IL-13. 第 43

回日本免疫学会学術集会. 2014年12月10日.
国立京都国際会館

Yamazaki Nao. IL-10 derived from
IgM⁺CD138^{hi} cells support the
antigen-specific antibody production. 第
45回日本免疫学会学術集会. 2016年12月6
日. 沖縄コンベンションセンター

〔図書〕(計 1件)

山崎 奈穂 「iPS細胞をもちいた造血幹
細胞の作製と有効性・安全性評価」『iPS細胞
の最新技術開発』(株)技術情報協会、2016
年8月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 奈穂 (YAMAZAKI Nao)
国立国際医療研究センター・免疫制御研究
部・上級研究員
研究者番号：20646848

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし