

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460570

研究課題名(和文) 自然免疫様Bリンパ球の分化，機能発現の制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism for the differentiation and function of innate-like B cells

研究代表者

藤間 真紀 (Touma, Maki)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：40542246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫シグナルに対して迅速な応答性を示す腹腔のB-1細胞や脾臓の辺縁帯B細胞は自然免疫様B細胞と呼ばれている。これらのB細胞亜集団の分化に必要な非典型的I B分子I BNSに着目して自然免疫様B細胞の分化と機能制御のメカニズムを探った。その結果、B-1細胞や辺縁帯B細胞の分化に重要であるとされているB細胞受容体シグナル強度の調節にI BNSが関与することが示唆された。また、自然免疫様B細胞はIL-10産生B細胞サブセットとしても知られているが、本研究では、Toll様受容体を介したB細胞でのIL-10の産生にI BNSが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal B-1 cells and splenic marginal zone B cells that show rapid response to innate immune signals are called innate-like B cells. We investigated regulatory mechanisms for the differentiation and function of innate-like B cells focused on the role of I BNS that is an atypical I B molecule necessary for differentiation of these B cells. As a result, it was suggested that I BNS is involved in the control of signal intensity via B cell receptor, which is considered important for differentiation of B-1 cells and marginal zone B cells. Innate-like B cells are also known as IL-10-producing B cell subsets. In this study, it was revealed that I BNS is selectively required for IL-10 production in B cells responding to Toll-like receptor signals.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは、侵入した異物に即座に反応する自然免疫系と、反応は遅れるが異物の特異的認識を伴う獲得免疫系の2つに大別されてきた。典型的なTおよびBリンパ球が獲得免疫を担うのに対し、自然免疫を担うリンパ球サブセットも存在する。後者に属する自然リンパ球は自然免疫細胞と獲得免疫細胞の中間的性質を持ち、迅速にエフェクター機能を発揮し、自然免疫と獲得免疫の橋渡しを担うユニークな細胞として近年注目されている。Bリンパ球にもこのような特徴を有する細胞群が存在し、腹腔などに存在するB-1細胞と脾臓の辺縁領域に局在するB細胞(辺縁帯B細胞)などが自然免疫様B細胞(innate-like B cells)と呼ばれている。これらのB細胞群は、細菌やウイルスなどの微生物を広範に認識するセンサーを持ち、種々の微生物成分などに対して素早く応答し、感染の初期応答に関与する。また、これらの細胞が産生する自然抗体は自己抗体を含み、過剰な自然抗体が自己免疫疾患の要因になることも知られており、自然免疫様リンパ球の機能を制御することが新たな免疫療法に繋がると考えられる。

自然免疫様B細胞の分化において鍵となる分子のひとつとして、私達はユニークなNF- $\kappa$ B制御因子、IkBNSに着目した。IkBNSは胸腺細胞のネガティブセレクション誘導時に発現誘導される新規の因子として発見され、今では種々の免疫細胞で発現することが知られている。これまでに私達は、IkBNSを欠損させたマウスでは腹腔B-1細胞の消失と辺縁帯B細胞の分化遅延と機能低下など、自然免疫様B細胞の発生と機能に障害を起こすことを見出し報告している。

そこで本研究では、自然免疫様B細胞の分化に重要であるIkBNS分子の役割に焦点を当てながら、自然免疫様B細胞の分化と機能制御のメカニズムを明らかにすることで、自然免疫系と獲得免疫系をつなぐこれらの細胞の役割とその制御機構の解明を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の3つの課題に取り組み、自然免疫様の機能を有するリンパ球の分化や機能の制御機構を明らかにすることを目的とした。また、NF- $\kappa$ Bの活性調節因子であるIkBNSが自然免疫様B細胞の分化と機能に重要な分子であることから、生体の恒常性維持や免疫疾患におけるIkBNSの関与について検討した。

(1) 自然免疫様B細胞の発生・分化におけるIkBNSの作用機序の解明

(2) 自然免疫様B細胞の機能制御のメカニズムの解明

(3) 自己免疫の発症および病態における

自然免疫様B細胞の関与とその作用メカニズムの解明

## 3. 研究の方法

(1) 自然免疫様B細胞の発生・分化におけるIkBNSの機能解析

NF- $\kappa$ Bの核内制御因子のひとつであるIkBNSは、内因的な自然免疫様B細胞の分化と機能発現に必要であることから、これらの細胞群の発生・分化メカニズムを探る手がかりの一つとして、IkBNSに着目した。

IkBNS欠損マウスでは腹腔のB-1細胞と脾臓の辺縁帯B細胞の分化や機能に障害が見られる。また、これらのB細胞の分化にはB細胞受容体シグナルの強度が重要であることが示唆されていることから、B細胞受容体シグナル伝達におけるIkBNSの関与を調べることで、自然免疫様B細胞の分化におけるIkBNSの作用機序の解明を目指した。

(2) IkBNSによる自然免疫様B細胞の機能制御機構の解析

迅速な抗体産生に備えて予備的活性化状態を維持する自然免疫様B細胞群に共通する機能制御メカニズムを明らかにする目的で、野性型B細胞とIkBNS欠損B細胞をリポ多糖(LPS)で刺激し、誘導される遺伝子の網羅的発現解析を行った。

LPS刺激した野性型B細胞とIkBNS欠損B細胞の網羅的遺伝子発現解析の結果、IkBNS欠損B細胞では*Il10*遺伝子の発現レベルが野性型B細胞よりも顕著に低いことが明らかとなった。そこで、自然免疫様B細胞におけるIL-10の産生動態と、IL-10を産生する制御性B細胞の分化におけるIkBNSの役割を詳細に解析した。

(3) 自己免疫の発症および病態における自然免疫様B細胞の機能解析

自己抗体を含む自然抗体を産生する自然免疫様B細胞が自己免疫の発症と病態にどのように関与するかを、自己免疫疾患モデルマウスを用いて検討した。本研究では、ヒトのA型(血中抗壁細胞抗体陽性)胃炎のモデルである、新生仔マウスの胸腺摘出によって誘発される自己免疫性胃炎を用いた。この臓器特異的自己免疫疾患モデルは、マウスの系統によって発症誘導率がことなるため、好発系であるBalb/c系統を用いた。また、血清中の自然抗体価が著しく低いIkBNS欠損マウスに自己免疫性胃炎を誘導して、自己免疫の発症における自然抗体の役割を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 自然免疫様B細胞の発生・分化におけるIkBNSの役割

IkBNS欠損マウスではB-1細胞が分化せ

ず、脾臓の辺縁帯 B 細胞の分化も遅延することから、これらの自然免疫様 B 細胞の分化に I $\kappa$ BNS が重要であることが推察される。これらの B 細胞亜集団の分化には B 細胞受容体 (BCR) シグナルの強度が重要であると考えられていることから、B 細胞分化における BCR シグナル強度の制御に I $\kappa$ BNS が関与している可能性について検討した。

野性型 B 細胞と I $\kappa$ BNS 欠損 B 細胞を抗 IgM 抗体で刺激し、BCR 下流のシグナリング経路の活性化状態を比較した。その結果、I $\kappa$ BNS 欠損 B 細胞では BCR 刺激による NFATc1 の発現低下と NF- $\kappa$ B 活性の低下が見られた。

カルシウムイオン依存性のシグナル伝達因子 / 転写因子である NFATc1 は B-1 細胞分化への関与が指摘されていることから、I $\kappa$ BNS 欠損による B-1 細胞分化の障害は NFATc1 の発現低下によるものである可能性について検討した。しかし、NFATc1 と I $\kappa$ BNS との直接的な相互作用は認められず、I $\kappa$ BNS の欠損がなぜ NFATc1 の発現低下につながるのか、また、NFATc1 の発現レベルと B-1 細胞の分化誘導との関係は今後の課題として残った。

一方、I $\kappa$ BNS と NF- $\kappa$ B 分子の直接的相互作用は以前の研究で証明されている。NF- $\kappa$ B は B 細胞の分化決定に重要であることが知られていることから、BCR を介したシグナル伝達において、I $\kappa$ BNS による NF- $\kappa$ B 活性の調節が自然免疫様 B 細胞の分化に重要であると推察された。

## (2) 自然免疫様 B 細胞の機能制御のメカニズムの解明

自然免疫様 B 細胞は、B 細胞受容体による抗原受容の他、自然免疫系の抗原受容体である Toll 様受容体を介した刺激でも速やかに活性化し、抗体や種々のサイトカインを産生する。そこで、自然免疫刺激による B 細胞の活性化に I $\kappa$ BNS がどのように関与するのかを調べるために、野性型 B 細胞と I $\kappa$ BNS 欠損 B 細胞を LPS で刺激し、それぞれの細胞で発現誘導される遺伝子を網羅的に解析した。

その結果、LPS 刺激の 6 時間後、24 時間後では、野性型 B 細胞と比べて I $\kappa$ BNS 欠損 B 細胞でより発現が上昇している遺伝子が多数検出された。この中には、サイトカインやケモカインシグナリングに関与する遺伝子が含まれており、I $\kappa$ BNS の欠損によって、NF- $\kappa$ B の標的遺伝子群の発現が増強されることが推察された。このことから、I $\kappa$ BNS は B 細胞の Toll 様受容体応答において、様々な遺伝子の発現誘導に関与しているといえる。

一方、野性型 B 細胞と I $\kappa$ BNS 欠損 B 細胞の最も顕著な違いは、抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現で見られ、I $\kappa$ BNS

欠損 B 細胞での *Il10* 遺伝子の発現レベルは野性型 B 細胞よりも有意に低いことがわかった。

近年、主に IL-10 を産生することで、炎症反応や免疫応答を抑制する B 細胞亜集団 (制御性 B 細胞, Breg) の存在が注目されており、B-1 細胞や辺縁帯 B 細胞、CD19<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>の表現型を持つ B10 細胞などいくつかの Breg サブセットが報告されている。そこで、I $\kappa$ BNS 欠損マウスでこれら Breg サブセットを解析したところ、B-1 細胞や辺縁帯 B 細胞のみならず、脾臓の B10 細胞の存在比率や分化率が低下していることがわかった。

また、I $\kappa$ BNS 欠損マウスの辺縁帯 B 細胞や B10 細胞は LPS など種々の Toll 様受容体のアゴニストによって誘導される増殖活性や抗体産生量、形質細胞への分化率、IL-10 産生細胞の分化率が野性型細胞と比べて著しく低いことがわかった。

IL-10 産生 B 細胞の分化メカニズムには未だ不明な点も多いが、形質細胞分化のマスター転写因子である *Blimp1* と *Irf4* が重要であるとされている。I $\kappa$ BNS 欠損マウスの辺縁帯 B 細胞や B10 細胞では、LPS 刺激による *Blimp1* と *Irf4* の発現誘導レベルが野性型の細胞よりも低く、これが I $\kappa$ BNS 欠損による B 細胞での IL-10 産生の低下の一因であると推察された。

以上のことから、I $\kappa$ BNS は自然免疫様 B 細胞の分化だけでなく、Toll 様受容体を介した B 細胞の活性化と抗体産生、IL-10 産生に重要であることが示された。

## (3) 自己免疫の発症および病態における自然免疫様 B 細胞の関与とその機能制御の検討

自己免疫の発症と病態形成における自然免疫様 B 細胞とそれらが産生する IgM 自然抗体の役割を明らかにする目的で研究を行った。自己免疫疾患のモデルとして、新生仔胸腺摘出による制御性 T 細胞の減少に起因する自己免疫性胃炎を用いた。

これまでに IgM 自然抗体は自己抗原のクリアランスにはたらき、自己免疫の抑制に関与することを示唆する報告もあることから、IgM 抗体価が著しく低い I $\kappa$ BNS 欠損マウスでの胃炎の発症率の亢進、または早期の発症を予想した。そこで、新生仔胸腺摘出によって野生型 Balb/c と Balb.I $\kappa$ BNS 欠損マウスに自己寛容の破綻を誘導し、自己免疫性胃炎の発症率と病態を調べた。

その結果、I $\kappa$ BNS 欠損マウスでは胃の壁細胞に対する自己抗体の産生率と胃炎の発症率が野性型マウスよりも有意に高くなった。また、病理組織学的解析による胃炎の重篤度は野生型マウスと同等であったが、I $\kappa$ BNS 欠損マウスでは野性型マウスの胃炎で顕著に見られる胃の腫脹度が有意に小さかった。

そこで、このような胃炎の発症率と病態の変化がI $\kappa$ BNS欠損マウスでのIgM自然抗体の欠損に起因するのか検証を試みた。新生仔胸腺摘出後から2ヶ月齢まで腹腔に水を投与する低張処理を行うことで、野性型マウスの腹腔B-1細胞の除去処理をし、胃炎の発症率と病態を解析した。研究期間中では十分な個体数でのデータ取得に至らなかったが、低張処理群では胃炎の発症率は増加傾向にあったが、胃の腫脹度も大きかった。そのため、自己免疫性胃炎の発症には自然免疫様B細胞が産生する自然抗体が抑制的に働くことが推察された。

しかし、自然抗体の胃炎の病態への関与は未だ不明であり、今後は、このような自己免疫の病態形成の違いに自然免疫様B細胞や自然抗体が関与するのかを明らかにする予定である。

#### 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 7件)

1. Xing Y, Tian Y, Kurosawa T, Matsui S, Touma M, Yanai T, Wu Q and Sugimoto K. CCL11-induced eosinophils inhibit the formation of blood vessels and cause tumor necrosis. *Genes to Cells*. 2016; 21(6): 624-38. 査読有り
2. Miura M, Hasegawa N, Noguchi M, Sugimoto K, Touma M. The atypical I $\kappa$ B protein I $\kappa$ B<sub>NS</sub> is important for Toll-like receptor-induced IL-10 production in B cells. *Immunology*. 2016; 147(4): 453-63. 査読有り
3. Xing Y, Tian Y, Kurosawa T, Matsui S, Touma M, Wu Q and Sugimoto K. Inhibition of blood vessel formation in tumors by IL-18-polarized M1 macrophages. *Genes to Cells*. 2016; 21(3): 287-95. 査読有り
4. Saito T, Suenaga S, Fujii M, Kushida Y, Kawauchi Y, Suzuki K, Touma M, Hosono M. Induction of autoimmune gastritis by neonatal thymectomy requires autoantibodies and is prevented by anti-Fc $\gamma$ R antibodies. *Cellular Immunology* 2016; 300: 1-8. 査読有り
5. Hirose S, Touma M, Go R, Katsuragi Y, Sakuraba Y, Gondo Y, Abe M, Sakimura K, Mishima Y, Kominami R. Bcl11b prevents the intrathymic development of innate CD8 T cells in a cell intrinsic manner. *Int Immunol*. 2015; 27(4): 205-15. 査読有り
6. Kushida Y, Ishida JY, Fujii M, Touma M, Hosono M. Population Doublings of Murine CD4<sup>+</sup> memory T cells during continuous antigen stimulation *in vivo*. *Cellular Immunology*, 2014; 292(1-2):

45-52. 査読有り

7. Fujii M, Suzuki K, Suenaga S, Wakatsuki M, Kushida Y, Touma M, and Hosono M. A dominant trait linked to chromosome 1 in DBA/2 mice for the resistance to autoimmune gastritis appears in bone marrow cells. *Exp Anim*. 2014; 63(2): 155-67. 査読有り

〔学会発表〕(計 3件)

1. 石附 充, 渡邊 暁哉, 藤間 真紀, 核内 I $\kappa$ B 分子、I $\kappa$ BNS の欠損による自己免疫性胃炎の病態変化 第39回日本分子生物学会年会, 平成28年11月30日~12月2日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), ポスター発表,
2. Touma M, Ishizuki M. I $\kappa$ BNS is an essential mediator of Toll-like receptor-induced B cell responses. International Congress of Immunology 2016 (ICI2016), 21-26 August, Melbourne (Australia)
3. Tian Y, Xing Y, Matsui S, Kurosawa T, Touma M, Sugimoto K. The roles of miR342 in regulating MS-K tumor growth. 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 2015年12月1~4, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔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://bio.sc.niigata-u.ac.jp/research.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤間 真紀 (TOUMA MAKI)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号: 40542246