

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670521

研究課題名(和文)皮膚疾患における制御性B細胞を用いた治療法の開発

研究課題名(英文)Development of therapy for skin diseases by utilizing regulatory B cells

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

研究成果の概要(和文)：マイクロアレイによる解析にて候補となったPTENがB細胞特異的に欠損するマウスを作製し、制御性B細胞の解析を行った。このようなB細胞特異的PTENコンディショナルノックアウトマウスでは、脾臓B1細胞に相当する新たな制御性B細胞が著増しており、この制御性B細胞がIL-10産生を介して免疫反応を強力に抑制することが明らかになり、自己免疫疾患や悪性腫瘍における新たな治療標的になりうると考えられた。また、制御性B細胞に共通する新たな表面マーカーも同定された。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis suggested that PTEN is involved in the signal transduction of regulatory B cell development. Conditional knock-out mice that has no PTEB expression specifically in B cells were generated. In this mouse, a novel regulatory B cell subset was identified in B-1 cell population. This subset has potent suppressing capability in various immune responses, and thus is considered as a potential target in treating autoimmune diseases and cancers. Additionally, new cell surface markers for regulatory B cells are identified.

研究分野：皮膚科学

キーワード：免疫

## 1. 研究開始当初の背景

生体免疫機構は、様々な皮膚疾患の惹起や終息に参与している。そのなかで B リンパ球は、種々の感染症、蕁麻疹、自己免疫性水疱症、膠原病をはじめとする諸疾患において、液性免疫担当細胞として抗体産生によって中心的な役割を果たしているが、近年、B 細胞には、抗体産生以外にもサイトカイン産生、抗原提示、T 細胞や樹状細胞の分化や機能の制御など様々なはたらきをもつことが明らかにされてきており、古典的に「抗体」によって考えられてきたよりも幅広い疾患群において B 細胞が関わっている可能性が示唆される。このことは、臨床的には、近年可能になった抗 CD20 抗体をはじめとする B 細胞標的療法が、従来予想された以上の数多くの疾患において有効性が示唆されていることから窺える。

生体免疫機構には、炎症を終息させ、自己に対する寛容を維持するための装置として「抑制性細胞」のサブセットが重要であり、「ブレーキ」の役割をもつ抑制性因子の破綻は自己免疫疾患をはじめとする深刻な病態の発症を引き起こしうる。一方、これらの抑制因子は悪性腫瘍の増殖・進展にも大きく関わっている。近年、B 細胞のなかに抑制性の機能をもつ「制御性 (regulatory) B 細胞」が存在することがわれわれや他のグループから報告され、解析されてきた (Fillatreau et al, Nat Immunol, 2002; Mizoguchi et al, Immunity, 2002 など)。われわれは、B 細胞特異的な細胞表面蛋白で B 細胞のシグナル伝達をコントロールする中心的な分子である CD19 を欠損したマウスにおいて接触過敏反応が著明に亢進していることを見出し、制御性 B 細胞はマウス脾臓の marginal zone (MZ) B 細胞の分画中に存在し、 $CD5^+CD1d^{high}CD23^{low}CD21^{high}$  の表現型をもち、IL-10 の産生が必要であること、CD19 欠損マウスでは制御性 B 細胞が

欠損していることを示した (Watanabe et al, Am J Pathol, 2007, Yanaba et al. Immunity, 2008)。制御性 B 細胞は多発性硬化症モデルである実験性自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) や SLE、強皮症の動物モデルにおいても重要な抑制性の役割をもつことが観察され、(Matsushita et al, Am J Pathol, 2006, Watanabe et al, J Immunol, 2010, Le Huu et al. Blood, 2013) B 細胞除去療法は制御性 B 細胞を除去した場合には病態の悪化を招きうることを明らかにした (Matsushita et al, J Clin Invest, 2008, Haas & Watanabe et al, J Immunol, 2010)。

## 2. 研究の目的

近年、免疫反応において制御性 B 細胞の重要性が明らかにされ、自己免疫疾患や腫瘍免疫など種々の病態で大きな役割を果たすこともわかってきた。さらに、複数の制御性 B 細胞のサブセットが存在することも示唆されている。本研究は、制御性 B 細胞の臨床応用を目指した治療への利用の基礎を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

マウスは、野生型 C57BL/6 マウスおよび C57BL/6 バックグラウンドの  $Cd19Cre^{+/-}$  マウス、 $Pten^{loxP/loxP}$  マウス、および  $\mu$ MT マウス (B 細胞欠損マウス) を Jackson 研究所より購入し使用した。 $Cd19Cre^{+/-}$  マウスと  $Pten^{loxP/loxP}$  マウスを交配して、B 細胞特異的 Pten 欠損マウスを作製し、種々の解析を行った。

## 4. 研究成果

はじめに、制御性 B 細胞で重要なシグナル伝達経路を同定するために、野生型マウス IL-10 産生 B 細胞と非産生 B 細胞との間でマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行ったところ、いくつかの分子の高発現

が認められた。特に PI3 キナーゼ経路の分子の発現異常が目立っていたため、PI3 キナーゼ経路について検討を行うこととした。

PI3 キナーゼおよび下流の Akt の活性をそれぞれ阻害する LY290042 と Triciribine を前処理に用いたところ、B 細胞の IL-10 産生条件において、IL-10 産生は完全に阻害された。したがって、PI3 キナーゼ経路の活性化が制御性 B 細胞の IL-10 産生に必須であることが示された。

そこで、PI3 キナーゼ経路を拮抗的に制御する PTEN を B 細胞特異的に欠損させたマウスを作製し、IL-10 産生制御性 B 細胞について解析を行った。B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは、脾臓の MZ B 細胞および B1 細胞の分画が著増しており、また末梢血、リンパ節、脾臓、腹腔内の IL-10 産生 B 細胞もコントロール群マウスに比べて有意に増加していた。したがって、PI3 キナーゼ経路は制御性 B 細胞の分化に重要な役割を果たしていることが示された。

次に、B 細胞における PI3 キナーゼ経路の活性化亢進の皮膚アレルギー疾患における影響を評価するために、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスを用いて接触過敏反応を検討した。通常のとおり、DNFB により感作した後に再塗布により惹起すると、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスではコントロール群マウスに比べて耳介の腫脹が約 50%に減少した。さらに、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは、皮膚病変部に浸潤する FoxP3 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞の割合が有意に増加していた。したがって、PTEN 欠損 B 細胞が、接触過敏反応の抑制に関与している可能性が示唆された。これを直接的に検証するために、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスおよびコントロールマウスから B 細胞を精製し、B 細胞欠損マウス ( $\mu$ MT マウス) に移入して、同様に接触過敏反応を評価した。野生型マウスの B 細胞を移入された  $\mu$ MT マ

ウスは、PTEN 欠損 B 細胞を移入された  $\mu$ MT マウスに比べて耳介の腫脹が有意に亢進していた。

さらに、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスにおける脾臓の IL-10 産生 B 細胞の分画を解析した。これまでの研究では、IL-10 産生制御性 B 細胞の多くは CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> の分画 (MZ-B10 細胞) に含まれると考えられていたが、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスの IL-10 産生 B 細胞は主に CD1d<sup>int</sup>CD5<sup>hi</sup> の表現型をもつ B-1 細胞であり、B1-B10 細胞と呼ぶことにしたい。そこで、この B1 B10 細胞を精製して、前述の実験と同様に  $\mu$ MT マウスに移入して接触過敏反応を検討した。その結果、B1 B10 細胞も強力な抑制効果をもつことが明らかにされた。この B1 B10 細胞は、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスのみならず、野生型マウスにも認められた。さらに、B1-B10 細胞は脾臓、腹腔内のみならず、末梢血、リンパ節にも認められた。一方で、MZ-B10 細胞は腹腔内、末梢血、リンパ節には認められなかった。以上より、B1-B10 細胞は新しい制御性 B 細胞サブセットと考えられ、生体内における免疫抑制に重要な役割を担っていることが示唆された。

MZ-B10 細胞と B1-B10 細胞に共通した B10 細胞全体の細胞表面マーカーを検討した。前述のマイクロアレイによる遺伝子発現解析により候補となった CD9 および CD80 について検討したところ、CD9<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> の B 細胞分画には両方の B10 細胞分画が含まれ、CD9<sup>-</sup>CD80<sup>-</sup> の B 細胞分画よりも 30 倍以上高頻度に B10 細胞が存在することが明らかになった。したがって、CD9 および CD80 は B10 細胞に特異性の高いマーカーと判断され、この組み合わせにより特異性高く B10 細胞を標識することができることが示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Naka K, Hirao A, Muramatsu M, Takehara K, Fujimoto M. A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses an allergic disease via PI3K-Akt pathway activation. *J Aller Clin Immunol*. In press. 査読あり
2. Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M. Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: association with autoantibody production and disease activity. *Rheumatology*. 2016;55:263-7. 査読あり
3. Kobayashi T, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Matsushita T. B cells promote tumor immunity against B16F10 melanoma. *Am J Pathol*. 2014;184:3120-9. 査読あり
4. 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. 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)

## 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：90272591