

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 16 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860868

研究課題名(和文)免疫複合体病におけるB細胞の役割の解明と治療応用

研究課題名(英文)The role of B cells in immune complex-induced tissue injury

研究代表者

築場 広一 (YANABA, KOICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：80385369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：(背景)制御性B細胞の免疫複合体病における役割を制御性B細胞を持たないCD19ノックアウトマウス(KO)にアルサス反応を惹起することにより検討する。(方法)腹腔逆アルサス反応を野生型マウスおよびCD19KOに惹起する。(結果)腹腔アルサス反応における白血球浸潤はCD19KOで有意に増加していた。またそれに伴い腹腔回収液中のIL-6濃度は上昇する一方、IL-10濃度は低下していた。(結論)制御性B細胞は腹腔アルサス反応における白血球浸潤を抑制するとともに、IL-6を抑制し免疫複合体病の制御を担っている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：(Background) To examine whether IL-10-producing regulatory B cells play a role in immune complex-induced tissue injury using reverse passive Arthus reaction. (Methods) Cutaneous and peritoneal reverse passive Arthus reaction was examined in mice lacking CD19, which have few regulatory B cells. (Results) CD19 deficiency had no effect on cutaneous reverse passive Arthus reaction. By contrast, enhanced neutrophil infiltration was observed in CD19<sup>-/-</sup> mice, whereas mast cell infiltration was comparable between wild-type and CD19<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, the increased peritoneal inflammatory responses by CD19 loss were associated with the increased IL-6 release, whereas inversely correlated with the reduced IL-10 secretion. (Conclusion) IL-10-producing regulatory B cells might play an inhibitory role in immune complex-induced tissue injury.

研究分野：皮膚科

キーワード：免疫複合体病 B細胞 アルサス反応

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 免疫複合体病の病態解明及び新規治療法開発の必要性

免疫複合体の関与が病因として想定されている疾患としては、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、結節性多発動脈炎を始めとする血管炎症候群などの膠原病が主体である。これらの免疫複合体病は我が国の特定疾患、いわゆる難病に指定されており国民の健康を侵す重大な疾患である。ステロイドや免疫抑制剤による治療によって、これら免疫複合体病の予後は改善されつつあるものの、治療抵抗性の症例も少なからず存在するため結節性多発動脈炎では5年生存率が50～60%と不良である。更にこれらの免疫抑制療法は大きな副作用を伴うため、たとえ疾患の改善がある程度見られたとしても患者のQOLは著しく阻害されていた。このように従来の治療法の効果は十分ではなく、新たな観点からの新規治療法の開発が切に望まれている。

### 2) 免疫複合体病の病態解明のための動物モデル：アルサス反応を用いた解析

免疫複合体が炎症を惹起する機序を解明するためには、適切な動物モデルが必要となる。免疫複合体による炎症は、1903年にArthusにより、感作したウサギにウマ血清を皮内注射する方法によりアルサス反応として記載された。その後、その簡便性と再現性のよさから、抗体を皮膚に注射し、抗原を静注する逆アルサス反応 (reverse passive Arthus reaction) が現在では最も広く用いられているアルサス反応である。アルサス反応では、好中球・肥満細胞の血管周囲への著明な浸潤、好中球核破片の存在、血管壁のフィブリノイド変性などといった、ヒトの血管炎と同様の病理組織学的所見が認められ、免疫複合体病の適切な動物モデルとされている。

### 3) 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<sup>+</sup>)や、marginal zone B細胞(CD1d<sup>hi</sup>CD21<sup>hi</sup>)あるいはT2-marginal zone precursor B細胞(CD21<sup>hi</sup>CD23<sup>hi</sup>)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<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>であり、その他のB細胞の表面マーカーはCD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>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)。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。加えてマウスの多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、乾癬モデルにおいても、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、臨床症状を軽快させることを示した

## 2. 研究の目的

本研究の目的は免疫複合体病のマウスモデルであるアルサス反応の病態形成・進行におけるB細胞および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アルサスを誘導し、炎症の重症度の評価および病態の解析を行う。

## 3. 研究の方法

1) 本研究に必要なCD19ノックアウトマウス、およびその野生型マウスであるC57BL/6マウスは、米国Jackson Labより購入され、東京大学皮膚科学教室にて繁殖している。CD19ノックアウトマウスは各遺伝子についてホモ接合体同士での繁殖が行われているため、基本的にはスクリーニングの必要はないが、本研究ではさらに抗マウスCD19抗体を用いて末梢血におけるB細胞を染色し、フローサイトメトリーにてB細胞におけるCD19の発現を確認する。それぞれのマウスはC57BL/6バックグラウンドへ5～10世代戻し交配済みである。7～12週齢のマウスを以下の実験に用いた。

### 2) 皮膚逆アルサス反応の誘導と評価

#### a) 皮膚逆アルサス反応の誘導

マウスはエーテル麻酔をかけた後、背部の皮膚の毛を剃毛し消毒した。ニワトリ卵白アルブミンに対するウサギIgG型抗体(2mg/ml)および陰性コントロールとして精製ウサギIgG(2mg/ml)各30μlをマウスの背部皮膚に皮内注射した。その直後に抗原であるニワト

リ卵白アルブミン(2 mg/ml) 400  $\mu$ lをマウス尾静脈から静注し、皮膚にて免疫複合体を形成させ炎症を惹起させた。

#### b) 皮膚浮腫の測定

浮腫を測定するため抗原であるニワトリ卵白アルブミンには0.2% Evans blueを添加しておく。抗体および抗原投与4時間後、マウスの背部のEvans blueで青染された皮膚を測定することによって皮膚浮腫を定量化する。血清蛋白に結合することから滲出したEvans blueの面積を評価する事で血管透過性の変化を定量化できる。青色スポットの長径と短径を測定し、その平均値を解析に用いた。

#### c) 皮膚出血の測定

抗体および抗原投与8時間後、マウスの背部皮膚の出血を測定することによって皮膚出血を定量化した。出血斑の長径と短径を測定し、その平均値を解析に用いた。

### 3) 腹腔逆アルサス反応の誘導と評価

#### a) 腹腔逆アルサス反応の誘導

ニワトリ卵白アルブミンに対するウサギIgG型抗体(2 mg/ml)および陰性コントロールとして精製ウサギIgG(2 mg/ml)各400  $\mu$ lを腹腔内注射した。その直後に抗原であるニワトリ卵白アルブミン(2 mg/ml) 400  $\mu$ lを尾静脈から静注し、腹腔内にて免疫複合体を形成させ炎症を惹起させた。

#### b) 浸潤細胞の評価

抗体および抗原投与4時間後、8時間後に腹腔中に含まれる好中球(Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>)、肥満細胞(c-kit<sup>+</sup>)をフローサイトメーターを用いて評価を行った。具体的には、5mlの0.1%Bovine serum albuminを含んだPhosphate buffered salineを腹腔内に注入し、よく攪拌した後に回収した。回収液中に含まれる細胞数をカウンティングチャンバーを用いて計測した後、遠心分離器を用いて1,500 rpm, 4にて遠心し細胞を単離し氷上に移して、c-kit、CD11b、Gr1に対する蛍光色素標識抗体を加えよく懸濁し、30分間氷上でインキュベートした。洗浄バッファーを加えて1,500 rpm, 4にて遠心し細胞を分離した後、フローサイトメーターを用いて表面マーカー発現の解析を行った。

#### c) 腹腔回収液のサイトカイン濃度の評価

マウスはエーテル麻酔をかけた後、腹部の皮膚の毛を剃毛し消毒した。アルサス反応誘導前、誘導後の腹腔回収液におけるサイトカインをELISA法にて定量的に測定した。サイトカインとしては、アルサス反応に関与していると考えられるIL-6、逆にアルサス反応を抑制すると考えられるIL-10を測定した。

具体的にはまず5mlの0.1%Bovine serum albuminを含んだPhosphate buffered salineを腹腔内に注入し、よく攪拌した後に回収し

た。遠心分離器を用いて上清の回収をおこなった。上清に含まれているサイトカイン濃度をELISAを用いて測定した。測定にはR&D社より発売されているキットを使用した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 皮膚逆アルサス反応

皮膚逆アルサス反応を誘導し4時間後にEvans blueで青染された皮膚を測定することで浮腫を、8時間後に出血斑を測定した。浮腫は野生型マウスで11.7mm、CD19ノックアウトマウスで9.9mm、出血斑は野生型マウスで5.0mm、CD19ノックアウトマウスで5.2mmであり、いずれも両群間に有意差はみられなかった。

##### 2) 腹腔逆アルサス反応

腹腔逆アルサス反応を誘導し4時間後、8時間後の腹腔回収液中の好中球、肥満細胞数を比較した。4時間後の好中球数は野生型マウスで $10.8 \pm 1.9 \times 10^4$ 、CD19ノックアウトマウスで $24.5 \pm 5.1^4$ ( $P < 0.05$ )、8時間後の好中球数は野生型マウスで $29.3 \pm 5.9 \times 10^4$ 、CD19ノックアウトマウスで $98.4 \pm 26.3^4$ ( $P < 0.05$ )とCD19ノックアウトマウスで有意に増加していた。肥満細胞数は両群間で有意差はみられなかった。出血斑は野生型マウスで5.0mm、CD19ノックアウトマウスで5.2mmであり、いずれも両群間に有意差はみられなかった。

##### 3) 腹腔回収液中のサイトカイン濃度

腹腔逆アルサス反応を誘導し4時間後、8時間後の腹腔回収液中のIL-6、IL-10の濃度をELISAにて検討した。4時間後のIL-6濃度は野生型マウスでCD19ノックアウトマウスに比べて有意に上昇していたが( $P < 0.05$ )、8時間後では有意差はみられなかった。4時間後のIL-10濃度は逆にCD19ノックアウトマウスで野生型マウスに比べて有意に上昇していたが( $P < 0.05$ )、8時間後では有意差はみられなかった。

結論) 制御性B細胞はIL-10の産生を介してIL-6産生を抑制し、好中球の浸潤を抑制することで免疫複合体による組織障害を制御している可能性が示唆された。

#### 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 0件)

なし

〔学会発表〕(計 0件)

なし

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築場広一 (YANABA KOICHI)

東京慈恵会医科大学

医学部 講師

研究者番号：80385369

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし