

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82406

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893328

研究課題名(和文) 貪食B細胞の免疫能に関する研究

研究課題名(英文) Immunological properties and functions of phagocytic B cells

研究代表者

中島 正裕 (NAKASHIMA, Masahiro)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・助教)

研究者番号：70738103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、主にpHrodoにて標識された肺炎球菌を用いて、これをin vitroにて貪食したマウスB細胞(以下、貪食B細胞と省略)を分取し、貪食B細胞が生体に及ぼす影響を検証した。貪食B細胞は莢膜多糖類に特異的なanti-PPS IgMを産生した。貪食B細胞をマウスに移入すると、肺炎球菌の表面タンパクに特異的なanti-PspA IgGが血中にて検出された。貪食B細胞が十分量投与されたマウスでは、致死量の肺炎球菌投与に対して抵抗性を獲得した。

これらの知見は、B細胞が自身でanti-PPS IgMを産生するとともに、抗原提示細胞として獲得免疫を誘導することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that mammalian B cells could phagocytose bacterial pathogen although their physiological functions have not been clarified. The present research was aimed at elucidating their functions in the host defense against bacterial infection, especially focused on the acquired immune responses, mainly by sorting B cells positive for pHrodo- or FITC-labeled Streptococcus pneumoniae. Phagocytic B cells not only produced IgM specific for pneumococcal polysaccharide (anti-PPS IgM) by themselves, but also induced transferred mouse to produce IgG specific for pneumococcal surface protein A (anti-PspA IgG). When transferred with sufficient number of B cells positive for FITC-labeled bacteria, they acquired resistance to fatal dose of bacteria with intravenous injection. These findings suggest that phagocytic B cells themselves produce anti-PPS IgM, while they would initiate acquired immune responses as antigen presenting cells likewise other phagocytic cells.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞 貪食 獲得免疫 莢膜多糖類 肺炎球菌表面タンパク

1. 研究開始当初の背景

(1) 液性免疫の主役である B 細胞は、分化・発達、自然抗体の産生、T 細胞に非依存的な刺激による活性化、T 細胞との相互作用による B 細胞のクラス変換、親和性の成熟など液性免疫の獲得（抗体産生）に関して膨大な検討がなされてきた。一方、自然免疫機能に関しては、自然抗体（natural IgM）産生に関する検討が主であり、B 細胞は一般的に貪食能を有しないと考えられている。近年ようやくウイルスなどの微細粒子を貪食（endocytosis）した際の応答が議論されるようになった。

本研究の契機となったのは、申請者がマウス肝臓 B 細胞の貪食殺菌能を見出した（J.L.B. 2012）ことにある。これは、病原体微生物の貪食から特異的抗体の産生に至る過程において、B 細胞は獲得免疫の final effector としてだけでなく、初期の感染応答である貪食にも直接的に従事していたことを示唆するものである。

(2) van Ham SM らは、細胞内寄生菌である *Salmonella Typhimurium* をヒト末梢血 B 細胞内に感染（寄生）させた際に B 細胞がサルモネラに特異的な IgM 抗体を産生するだけでなく、T 細胞にも抗原提示することを報告している（Souwer, J Immunol. 2009）。これは、B 細胞は能動的に細胞内に細菌を取り込んだ後、細菌に特異的な抗体を産生したり、マクロファージのような抗原提示細胞として機能する可能性を推測させる。B 細胞の抗原提示は、これまで脾臓やリンパ節内にて自らが表出する抗体の親和性が成熟する際に議論されることはあったが、マクロファージが Th1 応答を誘導するような状況にて議論されることは殆どみられなかった。

(3) *Streptococcus pneumoniae*（肺炎球菌）は成人における市中肺炎の原因菌として第 1 位を占めるが、高齢者および小児には多糖類から構成される莢膜抗原（pneumococcal polysaccharide: PPS）を用いた予防接種が積極的に行われており、その有効性が確認されている。肺炎球菌の表面には抗原性を有する部位として、PPS だけでなく表面タンパク抗原（pneumococcal surface protein A: PspA）を有することが知られる。PPS は成熟 B 細胞の細胞表面 IgM 分子を同時に架橋し、胸腺非依存的に抗体産生を促す（Thymus-independent antigen: TI-2 antigen）ことが知られる一方、PspA は T 細胞を介して産生されるものと考えられている。

2. 研究の目的

B 細胞は細菌を貪食するという知見は、細菌感染時の免疫応答の広範囲にわたって連続

的に B 細胞が関与する可能性を示唆する。上述のサルモネラによる B 細胞への細胞内寄生は、B 細胞表面 IgM とサルモネラ LPS に対するそれぞれの抗体を結合させたテトラマー複合体を添加しないと成立しないため、生理的とはいえない現象を捉えている。それでも、この場合と同様に B 細胞は細菌を貪食した後に特異的抗体を産生したり、他の抗原提示細胞のように獲得免疫を誘導する可能性が否定できない。既に述べたように肺炎球菌はヒトにおいてワクチン投与による感染予防効果が得られるため、マウスにおいても獲得抗体が得られれば感染予防が可能と考えた。そこで本菌を用いて、貪食した B 細胞が有する機能や生体に及ぼす影響をマウスにて検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 正常（C57BL/6）マウスの肝臓/脾臓単核球から磁気細胞分離装置を用いて B 細胞を分取する。MACS にて IgM 陽性細胞を positive sorting するか iMAG にて CD5 陰性 B 細胞を separation するかのいずれかを採用した。これに肺炎球菌を添加して約 1~2 時間培養する。蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーなどにて解析する場合、肺炎球菌は予め FITC や食細胞の phagolysosome などの酸性環境にて蛍光発色する pHrodo を用いて標識した（以下、FITC-*St.pneumoniae* および pHrodo-*St.pneumoniae* と省略）。本菌は貪食抵抗性を示すため、培養液にはオプソニン化のためマウス血清を予め添加した。培養後の B 細胞について蛍光顕微鏡だけでなく電子顕微鏡などにて観察したり、セルソーターにて pHrodo-*St.pneumoniae*⁺IgM⁺ cells（以下、貪食 B 細胞と省略）や pHrodo-*St.pneumoniae* IgM⁺ cells（以下、非貪食 B 細胞と省略）を分取した。また FITC-*St.pneumoniae* は細胞の内外を問わず同様に FITC による蛍光発色を生じるため、FITC-*St.pneumoniae*⁺IgM⁺ cells は、少なくとも肺炎球菌と結合している B 細胞と考えられる。

(2) 分取した貪食 B 細胞は、培養に用いるか、他の正常マウスに経静脈的に移入した。その後、培養上清やマウスの血清を回収し、ELISA（サンドウィッチ法）にて anti-PPS IgM、anti-PspA IgM、anti-PspA IgG、anti-*St.pneumoniae* specific IgM、total IgM、total IgG の濃度を決定した。貪食 B 細胞を移入した正常マウスと B 細胞（IgH^{-/-}）欠損マウスに対して、致死量の肺炎球菌を投与し、予後に及ぼす効果を検証した。貪食 B 細胞の代わりに FITC-*St.pneumoniae*⁺IgM⁺ cells も投与した。

4. 研究成果

(1) 単核球マウス肝臓 B 細胞は血清を添加した上で約 100 ~ 500 倍の pHrodo-*St.pneumoniae* と培養すると、約 5 ~ 10% が貪食していることが蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーにて確認された。図 1 に電子顕微鏡にて捉えた B 細胞の貪食像を示す。これらの所見は、大腸菌を用いた以前の報告 (Nakashima, JLB, 2012) と同様に、肝臓 B 細胞が貪食能することを

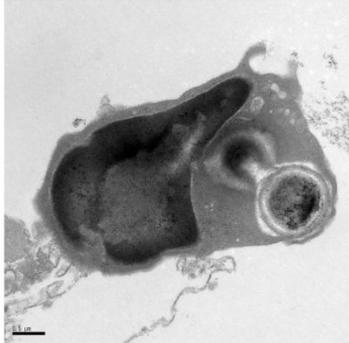
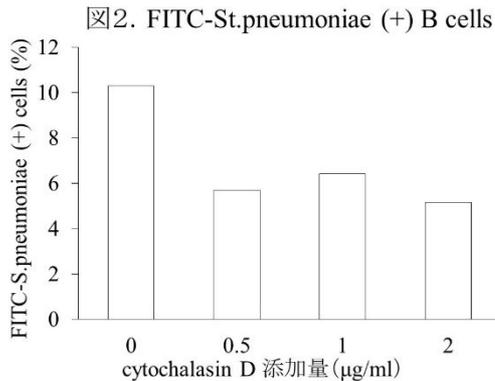


図1. 肺炎球菌を貪食したB細胞

裏付けるものである。

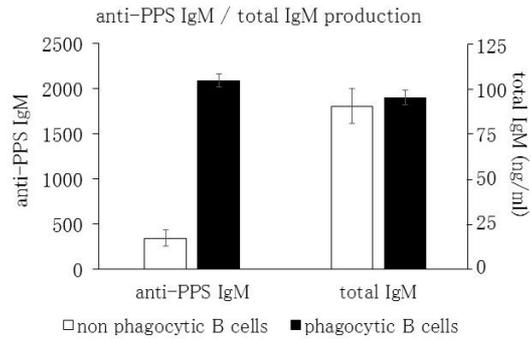
pHrodo-*St.pneumoniae* を用いた解析では、脾臓 B 細胞には貪食細胞が殆どみられなかったが、脾臓単核球に対して FITC-*St.pneumoniae* を約 100 ~ 500 倍添加すると、FITC-*St.pneumoniae*⁺IgM⁺ cells は約 10% に認められた。この FITC-*St.pneumoniae*⁺IgM⁺ cells は貪食阻害剤 cytochalasin D を添加するにしたがい半減した (図 2)、つまり脾臓 B 細胞も約 5% が肺炎球菌を細胞内に取り込んでいるもののその後は殆ど processing を行っていないものと考えられる。



なお本研究に先立ち、食細胞の lysosome を GFP 発色させたマウスにおいて肝臓の好中球や脾臓の B 細胞における lysosome 発現を定量したが、好中球では 76% が陽性であるのに対し、肝臓 B 細胞では約 3%、脾臓 B 細胞では 1% 未満であった。

(2) セルソーターにて肝臓の貪食 B 細胞を分取し、5 日間培養すると anti-PPS IgM の産生を認めた (図 3)、anti-PspA IgM については、ごく低濃度の産生を疑っているが、現在確認中である。一般的には anti-PspA IgM は、肺炎

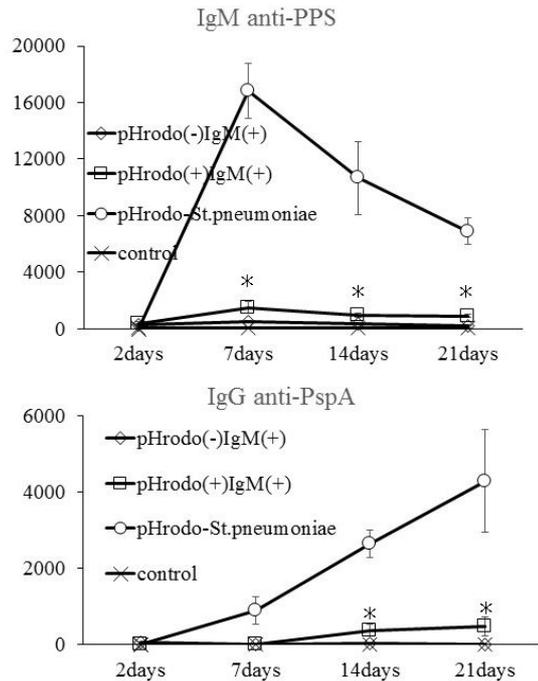
図3. 貪食B細胞を培養した際のanti-PPS IgM



球菌に感染した生体内においてすら産生されないものとみなされている。今回の検証からは、おそらく貪食 B 細胞は自身で抗原特異的な IgM を産生するものの、それは莢膜抗原のような TI-2 antigen を対象としたものであり、蛋白抗原に対しては産生できないと考えられる。なお非貪食 B 細胞はいずれの IgM も産生しなかったが、非特異的な IgM は貪食 B 細胞と同様に産生した。

この細胞を 50 万個だけ正常マウスに移入すると、anti-PPS IgM だけでなく anti-PspA IgG が産生されるのが確認された (図 4)、anti-PspA

図4. 貪食B細胞をマウスに投与した際の抗体価の変動



IgM に関しては有意な産生を認めることができなかった。同様に 50 万個の貪食 B 細胞を正

常マウスやB細胞欠損マウスに移入し、致死量の肺炎球菌が経静脈投与された際に、予後に与える影響を調べたが、コントロール群と比較しても改善はみられなかった。

(3) 磁気的に採取した脾臓のFITC-*St.pneumoniae*⁺IgM⁺ cellsを正常マウスやB細胞欠損マウスに500万個移入すると、致死量の肺炎球菌投与に対して予後の改善を認めた(図5)。これは、上述の(2)において50万個の貪食B細胞を移入した場合の結果と矛盾するように思われるが、(2)では移入細胞数が少なかった可能性がある。生存率を向上させるために十分な免疫を獲得させるには、移入細胞数がある程度必要であると考えている。

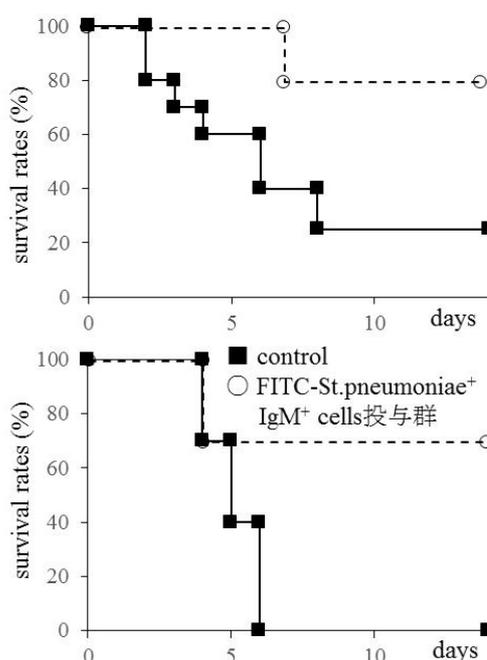


図5. C57BL/6(上図)およびIgH^{-/-}(下図)mouseに致死量に肺炎球菌を投与した際の予後

5. 主な発表論文等(研究代表者には下線) [雑誌論文](計1件)

1. Nishiyama K, Nakashima H, Ikarashi M, Kinoshita M, Nakashima M, Aosasa S, Seki S, Yamamoto J. Mouse CD11b⁺Kupffer Cells Recruited from Bone Marrow Accelerate Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. PLoS One. 2015 Sep 2;10(9):e0136774. doi: 10.1371/journal.pone.0136774. eCollection 2015.

[学会発表](計4件)

1. 中島正裕、木下学、中島弘幸、宮崎裕美、関修司、加齢に伴う自然免疫機構の低下とピオグリタゾン投与による増強、第89

回日本細菌学会総会、2016年3月24日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

2. Hiroyuki Nakashima, Kiyoshi Nishiyama, Masahiro Nakashima, Masami Ikarashi, Manabu Kinoshita, Shuhji Seki, Mouse CD11b⁺Kupffer cells recruited from bone marrow accelerate liver regeneration after partial hepatectomy, AALSD The Liver Meeting, San Francisco, USA, 2015 November
3. 中島正裕、木下学、中島弘幸、宮崎裕美、関修司、Decreased innate immunity in aged mice and its improvement by pioglitazone pretreatment、第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月20日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
4. Hiroyuki Nakashima, Atsushi Sato, Masahiro Nakashima, Masami Ikarashi, Kiyoshi Nishiyama, Manabu Kinoshita, Shuhji Seki, Involvement of the TNF and FasL produced by CD11b Kupffer cells/macrophages in CCl4-induced acute hepatic injury, AALSD The Liver Meeting, Boston, USA, 2014 November

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 正裕 (Nakashima Masahiro)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・助教
研究者番号: 70738103

(2) 研究協力者

関 修司 (Seki Shuhji)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授
研究者番号: 80531392

中西 邦昭 (Nakanishi Kuniaki)
防衛医科大学校・病院・教授
研究者番号: 60523115

四ノ宮 成祥 (Shinomiya Nariyoshi)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授
研究者番号: 40505260