

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659544

研究課題名（和文）制御性 B 細胞の特異的マーカー遺伝子の探索

研究課題名（英文）Identification of marker molecules specific for regulatory B cells

研究代表者

藤本 学 (FUJIMOTO MANABU)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90272591

研究成果の概要（和文）：

近年、新しい B 細胞サブセットである「制御性 B 細胞」の免疫反応の調節における重要性が認識されてきた。制御性 B 細胞の分子メカニズムの解明には特異的マーカーの同定が必須である。本研究は、マウスにおける制御性 B 細胞の特異的マーカー遺伝子を、網羅的な発現遺伝子解析にて同定することを目的とした。マウスの全遺伝子型 DNA チップを用いて、制御性 B 細胞の発現遺伝子解析を行い、コントロールとの比較により、約 180 個の候補遺伝子を得ることができた。その中で、約 10 個の転写制御分子の候補遺伝子の機能を解析中である。

研究成果の概要（英文）：

Recently, the important roles of “regulatory B cells” in the regulation of immune responses have been widely appreciated. To further clarify the molecular mechanisms of regulatory B cell functions, identification of marker molecules specific for regulatory B cells is necessary. In this study, we have attempted to identify such genes using comprehensive gene expression analysis. We have identified approximately 180 candidate genes. We are currently studying the in vivo and in vitro functions of 10 candidate transcriptional genes among them.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚免疫，B細胞，転写因子

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関与している。その中で B リンパ球は、種々の感染症や炎症・免疫疾患において、抗体を産生する液性免疫担当細胞として中心

的な役割を果たしている。近年になって、抗体産生以外にサイトカイン産生や抗原提示をはじめとする様々な機能によって種々の疾患に深く関わっている可能性が示唆されている。このことは、臨床的には、近年可能になった抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法

が、従来予想された以上の多くの疾患に有効性を示すことから窺える。

生体免疫機構には、「ブレーキ」の役割をもつ抑制性細胞の存在が重要であり、T細胞における制御性T細胞については研究が進んでいる。最近、B細胞にも抑制性の機能をもつサブセット、すなわち「制御性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、注目を集めている (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だし、これは CD19 欠損マウスでは制御性B細胞が欠損しているためであることを示した (Watanabe et al, Am J Pathol, 2007, Yanaba et al. Immunity, 2008)。同様のメカニズムは多発性硬化症の動物モデルである実験性自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) や SLE の動物モデルにおいても観察され、(Matsushita et al, Am J Pathol, 2006, Watanabe et al, J Immunol, 2010)、制御性B細胞がB細胞除去療法により失われ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)。免疫系における「ブレーキ」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ため、その機能を明らかにすることはきわめて重要である。

制御性B細胞は脾臓辺縁帯B細胞類似の表現型をもち、IL-10 産生が必要であることは明らかになっているが、その細胞表面マーカーの発現パターンについてはグループ間で完全には意見の一致をみておらず、また、制御性B細胞がいかなる分子機序で免疫反応を抑制するのかについてもまだほとんどわかっていない。これは、制御性B細胞の転写因子等の特異的マーカー遺伝子 (例えば制御性T細胞の foxP3 に相当するもの) が同定されていないことが根幹的な問題であり、「制御性B細胞を分子レベルで定義する」ことが必

要である。

マウス制御性B細胞の特異的マーカーを明らかにすることができれば、制御性B細胞を明確に定義することができ、制御性B細胞研究における大きなブレイクスルーとなり、当該領域の研究が次のステージへの発展を遂げることができると考えられる。また、ヒトにおいても同様の結果が得られれば、皮膚免疫疾患や膠原病などの種々の難病に対する治療法や創薬に結びつけられる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子網羅的解析により、IL-10 産生とこれまでに報告されている細胞表面マーカーとの組み合わせから、マウス制御性B細胞の特異的マーカー遺伝子を同定することを目指す。近年、制御性T細胞はその解析が進み、免疫反応の調節における重要性が広く認識されてきている。一方、制御性B細胞の研究は、近年注目されてきているものの、まだ認知度は低く、その研究は世界的に見ても端緒についたばかりである。実際に、申請者らを除き本邦からの研究報告はなく、独自性が高いと考えられる。皮膚免疫疾患を抑制する重要なサブセットであると推測される制御性B細胞の分子メカニズムの解明は大きなブレイクスルーになることが期待される。さらに、接触皮膚炎における制御性B細胞の関与を証明したのは、われわれがはじめてであり、接触過敏反応という皮膚科領域に特徴的でシンプルな系を用いて新たな免疫制御システムへアプローチすることは独自性が高いと考えられる。さらに、近年の研究成果は、制御性B細胞が幅広い病態において重要な役割を担っていることを示唆しており、特に全身性エリテマトーデスなどの自己免疫性疾患の抑制に大きな役割をもつであろうことは想像に難くない。実際に、最近のヒト患者における抗 CD20 抗体を用いた B細胞除去療法によって、乾癬や自己免疫疾患

の発症をきたす例があることが報告されていることは、まさにこのような機序を示唆しているといえるであろう。したがって、制御性 B 細胞の同定とその機能の解明は、基礎免疫学的に重要であるのみならず、ヒト自己免疫疾患の病態の解明にも役立つと考えられる。

制御性 B 細胞の特異的マーカーの同定は、制御性 B 細胞の研究を今後進める上で必須のものである。制御性 B 細胞を扱う研究者の中で、現在マーカーの探索が精力的に行なわれていると考えられるが、これまでに成功した報告はない。これは、各研究グループの提唱する細胞表面マーカーの組み合わせや *in vitro* での増殖方法が少しずつ異なる点、このような細胞表面マーカーの組み合わせによっても、その分画中の制御性 B 細胞の純度はおよそ 10%程度であり、他の細胞の混入の影響が大きすぎるためと考えられる。本研究では、(1) われわれが見出した制御性 B 細胞が増加しているマウス系統を使用すること (2) われわれのグループによる制御性 B 細胞の分離誘導法による結果に、他のグループのプロトコルを用いて分離誘導した結果とを照合して候補を絞りこんでいくことにより、特異的マーカー遺伝子の同定に到達したいと考えた。

さらに、遺伝子解析が困難である可能性があるため、本研究では、遺伝子解析に加えてプロテオミクス解析を並行して進める。これまで報告されている制御性 B 細胞の細胞表面マーカーによっても、制御性 B 細胞はその分画中のわずかに 10%程度であり、他の 90%近くにはその他の B 細胞が含まれている。したがって、制御性 B 細胞に特異的なマーカー遺伝子が同定できれば、基礎研究において制御性 B 細胞の研究が今後進展するのみならず、臨床的にも制御性 B 細胞を増殖させるなどの創薬や治療における利点は図り知れない。実際に制御性 T 細胞の研究は、特異的マーカー遺伝子である *foxp3* 遺伝子の同定以来、飛躍的な発展を遂げている。実地臨床においては、近年の B 細胞標的療法は、従来想定さ

れた以上に幅広い疾患において、予想された以上の効果がみられており、B 細胞標的治療の有望性を示していると考えられるが、重篤な感染症の合併や予想外の合併症など問題は少なくない。また、皮膚免疫疾患や自己免疫疾患を増悪されるエフェクター B 細胞のサブセットと抑制する制御性 B 細胞のバランスを考慮していくことが必須である。今後は、B 細胞のサブセットを標的とする本研究は、将来的に、免疫疾患において B 細胞のサブセットを選別し個別に標的とする新しい治療戦略を構築していく上で不可欠であると思われる。

3. 研究の方法

野生型マウス (C57BL/6 マウス) より、制御性 B 細胞の分離するために、IL-10 を含む多重免疫染色を用いてフローサイトメーターによる細胞のソーティングを行った。脾臓より B 細胞を分離し、LPS+PMA+イオノマイシンを添加して 5 時間培養した後、RNA を抽出した。

DNA チップは、マウスの全遺伝子型 DNA チップである東レ社の 3D-Gene ("3D-Gene" Mouse Oligo chip 24k) を用いて、コントロール群との比較により網羅的な発現遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

脾臓における IL-10 産生制御性 B 細胞の分画でコントロール群と比較してその RNA の発現量が 2 倍以上に上昇した遺伝子をピックアップしたところ、約 180 個の候補遺伝子を得ることができた。その中で、蛋白の構造や推定される機能から、約 10 個の転写制御分子を候補遺伝子とした。現在、これらの遺伝子の機能を *in vitro* および *in vivo* で解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

- ①藤本 学、松下貴史 制御性 B 細胞と自己免疫疾患 臨床免疫・アレルギー科 56:338-345, 2011. 査読無
- ②藤本 学 制御性 B 細胞と接触過敏反応 日本皮膚アレルギー学会・接触皮膚炎学会雑誌 6:55-59, 2012. 査読有

〔図書〕（計1件）

- ①藤本 学 メディカルレビュー社, 制御性 B 細胞とは, What's New in 皮膚科学 2012-2013, 2012年, 38頁～39頁.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 学 (FUJIMOTO MANABU)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：90272591