

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591450

研究課題名(和文) ヒト制御性B細胞の同定と自己免疫疾患におけるその役割

研究課題名(英文) Identification of human regulatory B cells and their role in autoimmune diseases

研究代表者

新納 宏昭 (NIIRO, HIROAKI)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：20380636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究にて、我々はIL-10産生性のヒトBregが末梢血IgM-memory B細胞サブセットにおいて特に誘導され、その分子機構として形質細胞分化関連の転写因子Blimp-1が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、代表的な自己免疫疾患であるSLEにおいては、Blimp-1発現誘導の低下を介してBreg誘導能が高度に低下していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we showed that IL-10-producing regulatory B cells (Bregs) are predominantly induced in human IgM-memory B cell subsets in the peripheral blood, and also showed that Blimp-1, a master regulator of plasma cell differentiation, plays a critical role in Breg induction. Patients with SLE, a prototypic autoimmune disease, exhibited defective Breg function mainly via impaired induction of Blimp-1.

研究分野：医歯薬学

キーワード：自己免疫疾患 B細胞 免疫学

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患における B 細胞の重要性は近年の B 細胞標的療法の有効性により再認識された。ここで判明した重要な点として、B 細胞は単なる自己抗体産生細胞ではなく、抗原提示、共刺激分子発現、サイトカイン産生などの多彩な機能を営むエフェクター細胞であり、他の免疫・炎症担当細胞との相互作用を通して自己免疫疾患の病態へ深く関与している。ただ興味深いことに、無差別な B 細胞除去療法により疾患の増悪をきたす場合も判明し、病原性エフェクター B 細胞とは異なった免疫抑制的に機能する制御性 B 細胞 (Breg) の存在がマウスの系を中心に着目されるようになった (Mauri and Blair. *Nat Rev Rheumatol* 2010)。T 細胞ではエフェクター T 細胞とは異なる制御性 T 細胞 (Treg) の概念はすでに確立され、ヒト Treg を使用した免疫細胞療法の実用化も現在模索されている (Wang and Jiang. *Sci Transl Med* 2011)。以上から、個々の自己免疫疾患の病態はエフェクター細胞と制御性細胞とのバランスによって異なることが予想される。

マウス Breg の表面マーカーについては transitional, follicular, marginal-zone, B1 B 細胞といった異なる B 細胞群の特性を共有しており、これらの結果は Breg が複数の異なった B 細胞群により構成されている可能性を強く示唆する。ただ重要な点は、これらの Breg に共通の機能的特徴として高い interleukin-10 (IL-10) 産生能があげられる (Mauri and Blair. *Nat Rev Rheumatol* 2010)。IL-10 は元来マウス 2 型ヘルパー (Th2) 細胞から産生されるサイトカインとして発見されたが、その後 Treg を含む他の T 細胞サブセット、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球などの種々の炎症・免疫細胞からも産生されることが判明した (Saraiva and O'Garra. *Nat Rev Immunol* 2010)。IL-10 は生体内における過剰な免疫・炎症反応の抑制に重要であり、その作用標的の中心は樹状細胞・マクロファージ・好中球などの骨髄系細胞や T 細胞であることは、我々を含めこれまでに報告されている (Niiri et al. *Blood* 1995; Niiri et al.

Blood 1997; Moore et al. *Annu Rev Immunol* 2001)。興味深いことに、マウスのリンパ組織における主な IL-10 産生細胞は B 細胞であることから、リンパ系組織における免疫制御に Breg が重要な役割を果たしていると思われる (Madan et al. *J Immunol* 2009)。

ヒト Breg の存在については不明だったが、最近興味深い報告がなされた (Blair et al. *Immunity* 2010; Iwata et al. *Blood* 2011)。ただマウス同様、ヒト Breg も IL-10 産生能では共通しているものの、表面マーカーにおいては相矛盾する点が見られた。また、ヒト Breg の自己免疫疾患における量的・質的異常も指摘されたが、再び相矛盾する結果であり明確な解答はでない。

以上から、現時点ではヒト Breg の研究については国内・国外を併せてまだ初期段階であり、ヒト Breg が特定の B 細胞集団として本当に存在するのか、自己免疫疾患において Breg の量的・質的異常はあるとした場合の分子機構は何か、などを含めて未解決の問題が山積みの状態と言える。

2. 研究の目的

本研究では、Breg 共通の機能的特徴である高い IL-10 産生に着目して研究を行う。

- (1) Breg に富むサブセットにおいて新規マーカーを使用したヒト Breg を同定、(2) IL-10 産生の分子機構、(3) Breg によるエフェクター T 細胞への機能制御機構、(4) Breg のヒト自己免疫疾患における量的・質的变化について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Breg による IL-10 産生

① B 細胞サブセットの IL-10 産生 (新納、赤司)

これまでの研究から判明したことは、B 細胞の IL-10 産生は定常状態では少なく、Breg 誘導には至適な刺激が必要である。B 細胞の刺激因子には数多くあるが、我々はヒト B 細胞での受容体発現などを考慮し、様々な刺激条件にて B 細胞サブセット別での IL-10 産生を評価する。B 細胞サブセットとしては、セルソーターを用いた高純度 naive、IgM-memory, switched memory (Jabbarzadeh-Tabrizi, et al. *J Immunol* 2009)で行う。

IL-10 産生の評価については、real-time PCR を使用した mRNA レベル、ELISA ならびにフローサイトメトリー細胞内染色を使用した蛋白レベルにて行う。

② Breg の IL-10 産生の分子メカニズム(新納)

刺激により誘導される B 細胞内シグナル伝達経路として、PKC, calcium, PI3K, Jak-STAT, MAPK (ERK, JNK, p38 MAPK), NFκB などがある。骨髄系細胞や T 細胞における IL-10 産生に重要なシグナルとして、ERK, p38 MAPK, Jak-STAT などがこれまで報告されている(Saraiva and O'Garra. Nat Rev Immunol 2010)が、B 細胞の場合は不明である。まずは、上記シグナル伝達経路の阻害薬を使用し、IL-10 産生に重要な経路を大まかにスクリーニングする。次に阻害薬の非特異的効果の可能性を除外するため、変化の見られたシグナル分子を個別に過剰発現・ノックダウンを行うことで機能的な検証を行う。さらに、これらのシグナル伝達経路の最下流にて IL-10 産生に重要な転写因子についても、上記と同様に検討を行う。

(2) ヒト Breg の同定 (新納、赤司)

(1)の(a)において Breg 誘導能の高いサブセットにおいて、さらに Breg に富んだ亜集団を分離するための新規表面マーカーの同定を試みる。ごく最近、CD マーカーとは異なった細胞表面分子 Tim-1 を発現しているマウス B 細胞が Breg 機能をもつことが報告された(Ding, et al. J Clin Invest 2011)。ヒト Breg においても Tim-1 陽性分画に Breg 誘導能が高いことが判明した場合、Tim-1 陽性 vs 陰性分画 B 細胞を純化し、我々のマイクロアレイ解析(Ishikawa, Niino, et al. Blood 2007)にて Breg を純化するための新規マーカーの同定を行う。

(3) Breg による T 細胞機能の制御 (新納)

我々は IL-10 のマクロファージや好中球などの骨髄系細胞への抑制機構については詳細に検討してきたが、ここでは免疫異常における T-B 相互作用の重要性に着目し Breg によるエフェクター T 細胞機能の直接制御機構について明らかにする。Breg との共培養にて、T 細胞の増殖(CFSE アッセイ)、生存

(Annexin 染色)、サイトカイン産生(IFN γ; 細胞内染色)、共刺激分子発現レベルなどの変化を評価する。また、変化の見られた機能については、それが IL-10 を介したものか否かを IL-10 中和抗体などを使用して評価する。IL-10 を介さない場合、Breg-T 細胞間接触の必要性が予想されるが、この場合、この制御に必要な Breg の細胞表面分子を同定する。

(4) ヒト自己免疫疾患における Breg の量的・質的变化 (新納、赤司)

我々の予備実験の結果では、健常人に比し全身性エリテマトーデス(SLE)患者の CD19⁺B 細胞において Breg 誘導(IL-10 産生能)に障害を認めたため、本疾患を中心に検討する。Breg 誘導の障害の原因としては、量的・質的異常の両方が考えられる。量的変化としては(2)によって同定した新規マーカーを使用した Breg に富んだ細胞群の数を詳細に比較する。質的变化としては、(1)の②や(2)で同定した IL-10 産生に重要なシグナル伝達系路のどの段階に障害が生じているかについて検討する。さらに、患者 Breg の T 細胞機能への作用についても(3)の結果をもとに検討する。この場合、T 細胞として健常人ならびに患者由来のものを使用して比較検討も行う。

4. 研究成果

(1) Breg による IL-10 産生

① B 細胞サブセットの IL-10 産生

ヒト末梢血 B(CD19⁺)細胞上の受容体発現などを考慮した上で、抗 IgM 抗体、抗 CD40 抗体、CpG(TLR9 リガンド)、BAFF、April、IFN, TNFα, IL-2, -4, -6, -10, -21, -27 などで刺激を行った。その結果、IL-10 mRNA ならびに蛋白発現ともに CpG 刺激が最も強力に誘導したことから、ヒト Breg 誘導には TLR9 刺激が重要と示唆された。また、抗 IgM 抗体による B 細胞抗原受容体(BCR)の刺激は、単独での Breg 誘導は弱かったが、CpG による Breg 誘導に対しては相乗的に作用し、その理由として BCR シグナルによる TLR9 発現上昇が示唆された。

次に、CD19⁺細胞よりセルソーターを使用し高純度 naïve, memory B 細胞に分離し CpG

刺激による Breg 誘導能を比較したところ、memory B 細胞に高い傾向が見られた。さらに、memory B 細胞分画を IgM-memory, switched memory B 細胞に分離し比較したところ、IgM-memory B 細胞にて最も強い Breg 誘導能を認めた。

② Breg の IL-10 産生の分子メカニズム

Breg 誘導に重要な TLR9 下流のシグナル経路の同定を目的に、MAP キナーゼ、PI3 キナーゼ、NFκB などの阻害薬による検討を行った結果、全ての阻害薬は濃度依存的に Breg 誘導を抑制した。この結果より、TLR9 下流の複数のシグナル経路が共同し Breg を誘導していることが強く示唆された。

(2) ヒト Breg の同定

ヒト末梢血 B 細胞サブセットの中で最も IgM-memory B 細胞に TLR9 刺激下で IL-10 を高発現する Breg が誘導できることが判明したため、TLR9 刺激下の細胞表面マーカーの変化と Breg 誘導能について詳細に解析した。既報ではマウスの系にて細胞表面分子 Tim-1 を発現している B 細胞が Breg 機能をもつことが報告されたが、ヒトの系においては Tim-1 にて Breg の純化は困難であった。ただ、TLR9 刺激により CD20 や HLA-DR の発現低下、CD27 や CD38 の発現増加といった形質細胞分化過程での表面マーカーの変化が見られ、この中間段階にて高い Breg 能を獲得することが判明した。

そこで、この形質細胞分化が Breg 誘導に重要なことに着目し検討した結果、TLR9 刺激下流の複数のシグナル経路の中で STAT3 活性化が最も重要であることが判明した。さらに、STAT3 活性化の下流で制御される転写因子を数個に絞り、それらの各転写因子をヒト末梢血 B 細胞にてノックダウンを行い詳細に検討した結果、Breg 誘導能には転写因子 Blimp-1 が最も重要であることが明らかになった。

(3) Breg による T 細胞機能の制御

自己免疫疾患の病態における T-B 相互作用の重要性に着目し、Breg がエフェクター T 細胞の機能に及ぼす影響について検討した。そこで、TLR9 刺激で誘導した Breg と CD3/CD28 刺激によるエフェクター T 細胞 (制

御性 T 細胞は除いた条件下) との共培養を行った。T 細胞増殖を CFSE アッセイにて評価を行った結果、Breg は T 細胞増殖を著明に抑制した。また、T 細胞機能として IFN γ 産生について細胞内染色にて評価を行った結果、Breg は T 細胞の IFN γ 産生を著明に抑制した。さらに、上記の Breg を介した T 細胞機能抑制の大部分が抗 IL-10 中和抗体の存在下にて解除されたことから、Breg 産生の IL-10 が主な T 細胞機能制御メカニズムと示唆された。興味深いことに、無刺激 B 細胞とエフェクター T 細胞との共培養でも弱い抑制が見られることより、T 細胞の表面分子を介した相互作用による弱い Breg 誘導も示唆された。

(4) 自己免疫疾患における Breg 機能異常の分子メカニズム

上記の結果に基づき、ヒトにおいて IgM-memory B 細胞は IL-10 産生を介して Breg として機能していることが予想されるが、代表的な自己免疫疾患である SLE において IgM-memory B 細胞数は減少しており、Breg の量的な低下が示唆された。加えて、本疾患では IgM-memory B 細胞において TLR9 刺激による Breg 誘導能が質的に低下していることも判明した。エフェクター T 細胞との共培養にて SLE 患者 Breg 能について機能的評価を行った結果、患者では Breg 能を高度に失っていることが明らかになった。さらに、その分子メカニズムとして (2) で同定した形質細胞分化関連の転写因子 Blimp-1 の発現について検討したところ、SLE 患者 Breg においては TLR9 刺激に伴う Blimp-1 発現誘導が高度に低下していることが明らかになった。

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 10 件)

- ① Iwata S, Yamaoka K, Niirō H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Wang SP, Kondo M, Yoshikawa M, Akashi K, Tanaka Y: Increased Syk phosphorylation leads to overexpression of TRAF6 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* (査読有) 24(7):695-704, 2015 Jun
DOI: [10.1177/0961203314560424](https://doi.org/10.1177/0961203314560424)

- ② Ono N, Nihiro H, Ueda A, Sawabe T, Nishizaka H, Furugo I, Yoshizawa S, Yoshizawa S, Tsukamoto H, Kiyohara C, Tada Y, Horiuchi T: Characteristics of MPO-ANCA-positive granulomatosis with polyangiitis: a retrospective multi-center study in Japan. *Rheumatol Int* (査読有) 2015 35(3):555-559, 2015 Mar DOI: [10.1007/s00296-014-3106-z](https://doi.org/10.1007/s00296-014-3106-z)
 - ③ Ishikawa K, Yoshida S, Nakao S, Nakama T, Kita T, Asato R, Sassa Y, Arita R, Miyazaki M, Enaida H, Oshima Y, Murakami N, Nihiro H, Ono J, Matsuda A, Goto Y, Akashi K, Izuhara K, Kudo A, Kono T, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T: Periostin promotes the generation of fibrous membranes in proliferative vitreoretinopathy. *FASEB J* (査読有) 28(1):131-142, 2014 Jan DOI: [10.1096/fj.13-229740](https://doi.org/10.1096/fj.13-229740)
 - ④ Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, Ayano M, Tanaka A, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Nihiro H, Akashi K, Horiuchi T: The cytotoxic effects of certolizumab pegol and golimumab mediated by transmembrane tumor necrosis factor α . *Inflamm Bowel Dis* (査読有) 19(6):1224-1231, 2013 May DOI: [10.1097/MIB.0b013e318280b169](https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318280b169)
 - ⑤ Oryoji K, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Nihiro H, Shimoda T, Akashi K, Yanase T: Reduced carotid intima-media thickness in systemic lupus erythematosus patients treated with cyclosporine A. *Mod Rheumatol* (査読有) 24(1): 86-92, 2014 Jan DOI: [10.3109/14397595.2013.852838](https://doi.org/10.3109/14397595.2013.852838)
 - ⑥ Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Nihiro H, Iino T, Endo S, Kawano Y, Komohara Y, Takeya M, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y: PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood* (査読有) 121(6):962-970, 2013 Feb 7 DOI: [10.1182/blood-2012-05-431429](https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431429)
 - ⑦ Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, Kiyohara C, Ueda N, Ayano M, Ohta SI, Inoue Y, Arinobu Y, Nihiro H, Horiuchi T, and Akashi K: Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity. *Arthritis Res Ther* (査読有) 14(6):R244, 2012 Nov DOI: [10.1186/ar4087](https://doi.org/10.1186/ar4087)
 - ⑧ Shimoda S, Tsuneyama K, Kikuchi K, Harada K, Nakanuma Y, Nakamura M, Ishibashi H, Hisamoto S, Nihiro H, Leung PS, Ansari AA, Gershwin ME, and Akashi K: The role of natural killer (NK) and NK T cells in the loss of tolerance in murine primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* (査読有) 168(3): 279-284, 2012 Jun DOI: [10.1111/j.1365-2249.2012.04581.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04581.x)
 - ⑨ Iwata S, Yamaoka K, Nihiro H, Nakano K, Wang SP, Akashi K, and Tanaka Y: Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B activation. *J Allergy Clin Immunol* (査読有) 129(6): 1594-1601, 2012 Jun DOI: [10.1016/j.jaci.2012.03.014](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.014)
 - ⑩ Nihiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota SI, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, and Akashi K: CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. *Blood* 119(10): 2263-2273, 2012 March 8 DOI: [10.1182/blood-2011-04-351965](https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-351965)
- 〔学会発表〕 (計 11 件)
- ① ACR annual meeting 2014 November 18, 2014 (Boston, MA, USA) Elucidation of molecular mechanism of Breg induction in autoimmune diseases. Shun-ichiro Ota, Hiroaki Nihiro, Naoko Ueki, Yuri Hirosaki, Hirofumi Tsuzuki, Kumiko Noda, Siamak Jabbarzadeh-Tabrizi, Atsushi Tanaka, Hiroki Mitoma, Yojiro Arinobu, Mitsuteru Akahoshi, Hiroshi Tsukamoto, and Koichi Akashi.
 - ② 第 42 回日本臨床免疫学会総会 (招待講演) 2014.9.25 東京 演題名: エフェクターB細胞 新納宏昭
 - ③ 第 58 回日本リウマチ学会総会 2014.4.24 東京 演題名: 健常人なら

びに SLE 患者における制御性 B 細胞の誘導メカニズムの検討 大田俊一郎、新納宏昭、植木尚子、廣崎友里、野田久美子、田中淳、綾野雅宏、上田彰、久本仁美、押領司大助、中川仁、中野翔太、上田尚靖、木本泰孝、赤星光輝、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一

- ④ 第 58 回日本リウマチ学会総会
2014.4.24 東京 演題名：全身性エリテマトーデス患者における Granzyme B 産生 B 細胞の役割 植木尚子、新納宏昭、大田俊一郎、廣崎友里、野田久美子、上田尚靖、田中淳、綾野雅宏、上田彰、久本仁美、押領司大助、中川仁、中野翔太、木本泰孝、赤星光輝、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一
- ⑤ 第 58 回日本リウマチ学会総会
2014.4.24 東京 演題名：関節リウマチ患者におけるトシリズマブの有効性および酸化ストレスマーカー変化量の検討 -中間解析から得られた知見- 新納宏昭、塚本浩、有信洋二郎、赤星光輝、木本泰孝、藤健太郎、押領司健介、井上靖、澤部琢哉、永野修司、西坂浩明、吉澤誠司、多田芳史、吉澤滋、大塚毅、上田章、中島衡、堀内孝彦、赤司浩一
- ⑥ 第 41 回日本臨床免疫学会総会
2013.11.27 下関 演題名：関節リウマチ患者と健常人における B 細胞の RANKL 発現の比較検討 廣崎友里、新納宏昭、大田俊一郎、植木尚子、綾野雅宏、赤星光輝、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一
- ⑦ 第 57 回日本リウマチ学会総会
2013.4.19 京都 演題名：健常人ならびに SLE における granzyme B 産生制御性 B 細胞の比較検討 植木尚子、新納宏昭、大田俊一郎、廣崎友里、ジャバルザデータブリッジ シアマック、野田久美子、上田尚靖、田中淳、綾野雅宏、上田彰、久本仁美、押領司大助、赤星光輝、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、

赤司浩一

- ⑧ 第 57 回日本リウマチ学会総会
2013.4.19 京都 演題名：健常人ならびに SLE 患者 B 細胞における IRAK-M 発現とその機能 新納宏昭、ジャバルザデータブリッジ シアマック、大田俊一郎、植木尚子、廣崎友里、野田久美子、上田尚靖、田中淳、上田彰、久本仁美、綾野雅宏、押領司大助、赤星光輝、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一
- ⑨ 第 57 回日本リウマチ学会総会
2012.4.27 東京 演題名：健常人ならびに SLE 患者における制御性 B 細胞の比較検討 大田俊一郎、新納宏昭、植木尚子、Siamak Jabbarzadeh-Tabrizi、野田久美子、上田尚靖、田中淳、上田彰、久本仁美、綾野雅宏、古川牧緒、井上靖、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一
- ⑩ 第 57 回日本リウマチ学会総会（招待講演）2012.4.27 東京 演題名：抗BAFF抗体、TACI-Ig 新納宏昭
- ⑪ 第 57 回日本リウマチ学会総会
2012.4.27 東京 演題名：CblAアダプター分子CIN85によるB細胞機能制御とSLE患者B細胞における役割 新納宏昭、Siamak Jabbarzadeh-Tabrizi、大田俊一郎、植木尚子、野田久美子、上田尚靖、田中淳、上田彰、綾野雅宏、久本仁美、古川牧緒、井上靖、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed1/immune/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新納 宏昭 (NIIRO HIROAKI)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：20380636

(2)研究分担者

赤司 浩一 (AKASHI KOICHI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：80380385