

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15H04813
研究課題名(和文) 制御性形質芽細胞Pregの炎症性腸疾患抑制効果の検討

研究課題名(英文) Role of regulatory plasmablasts pReg in colitis

研究代表者
溝口 充志 (MIZOGUCHI, Atsushi)
久留米大学・医学部・教授

研究者番号：50258472
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞は抗体産生を介して、主に免疫活性に関与していると考えられていた。調節性サイトカインであるインターロイキン10(IL-10)を分泌する事により、むしろ免疫抑制に働くB細胞群が2002年に同定され、現在では多くの疾患の抑制に寄与している事が明らかとなっている。本研究では、細胞表面マーカーよりB細胞と考えられていたこれらの細胞は、形質芽細胞であることを一連の遺伝子欠失マウスを用いて証明した。これらのIL-10産生形質芽細胞はIgAを選択的に産生し、健常では脾臓に存在するが大腸炎発症に伴い腸管膜リンパ節で増殖し、腸炎の抑制に寄与していることを同定した。

研究成果の概要(英文)：Due to the specific ability of B cells to produce immunoglobulins, B cells were generally believed to contribute always for immune activation. However, IL-10-producing B cells with immune suppressive activity were discovered in 2002, and it is becoming apparent increasingly that IL-10-producing B cells are associated with a wide variety of diseases. In this project, we unexpectedly found that IL-10-producing cells, which were believed as B cells due to the expression pattern of surface markers, rather represent plasmablasts. The IL-10-producing plasmablasts have an ability to produce IgA, exist in the spleen of mice, and expand in mesenteric lymph nodes under an intestinal inflammatory condition. The expanded IL-10-producing plasmablasts then contribute for the improvement of colitis. These findings unveil an unexpected function of plasmablasts in intestinal inflammation.

研究分野：腸管免疫

キーワード：制御性B細胞Breg 制御性形質芽細胞Preg 炎症性腸疾患 マウスモデル インターロイキン-10

1. 研究開始当初の背景

B 細胞は抗体産生を介して、主に免疫活性に関与していると考えられていた。しかし、申請者は調節性サイトカインであるインターロイキン 10 (IL-10) を分泌する事により、むしろ免疫抑制に働く B 細胞群を 2002 年にマウスの潰瘍性大腸炎モデルで同定し (Immunity 2002, p219)、これらの B 細胞を Regulatory B cells (Breg) と命名した (J Immunol 2006, p705)。現在では、炎症性腸疾患に加えて種々の自己免疫疾患やアレルギー疾患、移植臓器に対する免疫寛容、ガン免疫の抑制、肥満や動脈硬化といった代謝性疾患にも Breg 細胞の関与が報告されている (Annu Rev Immunol 2012, p221)。

大腸炎の発症に伴い惹起される Breg 細胞は、細胞表面マーカーの発現様式より抗原非特異的な未成熟 B 細胞由来と考えられていた。しかし、申請者は予備実験を介して、Breg 細胞は未成熟 B 細胞のマーカーである CD93 と B 細胞マーカーである CD19 を発現すると共に、形質細胞の特異的マーカーである CD138 も共発現する特殊な細胞群である可能性を見出した。

2. 研究の目的

これまでの予備実験の結果は、「Breg は B 細胞由来ではなく、形質芽細胞の分化段階で、自己反応性形質細胞への分化をのがれた形質芽細胞由来である」という仮説をもたらした。本研究では、一連の遺伝子改変マウスを用いてこの仮説を証明すると共に、IL-10 産生制御性形質芽細胞の発生機序を解明することを目的とする。

抗 CD20 抗体製剤等による B 細胞標的療法は臨床で種々の疾患に対して有効な治療法として使用されている。一方、抗 CD20 抗体製剤療法が潰瘍性大腸炎を悪化させた症例も多数報告されている。よって、自己反応性形質細胞 (悪玉) 対 制御性形質細胞 (善玉) を選択する分化のチェックポイント機構が解明できれば、現在広く臨床で使われている B 細胞除去療法の安全性・適応性の拡大につながると共に、形質芽細胞を用いた新たな細胞療法開発の基礎基盤を築く事が期待される。

3. 研究の方法

免疫抑制作用を仲介するサイトカインであるインターロイキン 10 (IL-10) を分泌する時に緑色蛍光を発するレポーターマウスを、形質細胞分化及び免疫グロブリンのクラススイッチが欠失するマウスと交配すると共に、これらの遺伝子改変マウスを更に潰瘍性大腸炎モデルマウスと交配して以下の実験を行った。

- 1a) IL-10 産生形質芽細胞の同定
- 1b) IL-10 産生形質芽細胞の自己反応性形質細胞との相違点の解析
- 1c) IL-10 産生形質芽細胞と Preg 細胞との同一性の検討
- 2a) IL-10 産生形質芽細胞分化への Blimp-1 の必要性の検討
- 2b) IL-10 産生形質芽細胞分化への AICD の関与の検討
- 2c) AICD 発現量と IL-10 産生形質芽細胞/自己反応性形質細胞への分化に対する相関性の検討
- 3a) B 細胞特異的 Blimp1 欠失の慢性腸炎に及ぼす影響の検討
- 3b) AICD 欠失の慢性腸炎に及ぼす影響の検討

4. 研究成果

1a) IL-10 産生形質芽細胞の同定：
IL-10 産生時に緑色蛍光を発するレポーターマウス (IL-10/GFP) を使用する事により、IL-10 産生形質芽細胞は健常時で脾臓に約 1% 存在する事を認めた。また、IL-10 産生形質芽細胞群をレポーターマウスの使用無くして検出できるように、これらの細胞群特異的な細胞表面マーカーの組み合わせも同定した。これらのマーカーにより検出された形質芽細胞のほぼ 100% が IL-10 を自然産生していることも確認した。

1b) IL-10 産生形質芽細胞の自己反応性形質細胞との相違点の解析：
IL-10 産生形質芽細胞は、細胞表面マーカー上、成熟 B 細胞と形質細胞の中間体であると共に、未成熟 B 細胞の特徴も幾つか兼ね備えている可能性を見出した。また、形質細胞同様に免疫グロブリン産生能を有するが、この産生は IgG 優位の形質細胞と異なり脾臓においても IgA 産生に拘束されている可能性も認めた。

1c) IL-10 産生形質芽細胞と Preg 細胞との同一性の検討：
近年同定された Preg 細胞 (Immunity 2014, p1040) と、腸炎特異的に増加する IL-10 産生形質芽細胞は、わずかな細胞表面マーカーの発現に違いを認めるが、lineage などについてはほぼ同一である事を認めた。また、制御性 B 細胞である B10 などマーカーである CD5 や CD11b の発現は認めなかった。

2a) IL-10 産生形質芽細胞分化への Blimp-1 の必要性の検討：
IL-10 産生細胞は、B 細胞マーカーである

CD19 を低発現し未成熟 B 細胞の表面マーカーである CD93 も発現した。よって、これまで Breg 細胞は未成熟 B 細胞由来と考えられていた。しかし、形質細胞のマーカーである CD138 も共発現することを発見した。よって、B 細胞由来または形質細胞由来であるかを検討するため、形質細胞への分化に必須の転写因子である Blimp-1 を B 細胞特異的に欠失させたマウスと IL-10/GFP レポーターマウスを交配した。興味深い事に、Blimp-1 の欠失下において未成熟 B 細胞マーカーを発現する IL-10 産生細胞は消失した。よって、未成熟 B 細胞マーカーを異所性に発現する形質芽細胞が IL-10 産生の主要細胞であると考えられた。

2b) IL-10 産生形質芽細胞分化への AICD の関与の検討：

脾臓に存在する IL-10 産生形質芽細胞 (Preg 細胞) は、IgA を選択的に発現していた。よって、IgM から IgA への免疫グロブリンクラススイッチが IL-10 産生 Preg 細胞への分化に必要な可能性を探求するため、免疫グロブリンクラススイッチに必要な Activation-induced cytidine deaminase (AICD) を欠失させたマウスと IL-10/GFP レポーターマウスを交配した。しかし、Blimp-1 の欠失とは異なり、IL-10 産生 Preg 細胞は減少も消失には至らなかった。よって、IgA へのクラススイッチは IL-10 産生 Preg 細胞分化において、必須因子としてではなく促進因子として作用している可能性が示唆された。

2c) AICD 発現量と IL-10 産生形質芽細胞/自己反応性形質細胞への分化に対する相関性の検討：

AICD は遺伝子に対する数少ない酵素の一つであり、エピジェネティックに及ぼす作用も近年同定されている。IL-10 産生 Preg 細胞における AICD の発現量とエピジェネティック変化を検討するため、AICD の発現後に赤色蛍光が緑色蛍光に変化する、fate-map double reporter マウスを用いた実験を試みた。しかし、何らかの環境因子に起因すると考えられる AID 非依存性の leaky な変色を認め、最終結果を得るには至らなかった。

3a) B 細胞特異的 Blimp1 欠失の慢性腸炎に及ぼす影響の検討：

Preg 細胞の欠失による腸炎への影響を検討するため、潰瘍性大腸炎モデルである T 細胞受容体 欠失マウスと IL-10 レポーターマウスを交配した。IL-10 産生 Preg 細胞は腸炎の発症に伴い腸管膜リンパ節で増加を認

めた。よって腸炎下では Preg 細胞は脾臓から所属リンパ節に移動する可能性が示唆された。

T 細胞受容体 欠失マウスには正常な T 細胞が存在しない。IL-10 産生 Preg 細胞がこのマウスに認められた事より、Preg 細胞の分化は T 細胞非依存性に生じる可能性が示唆された。

次に、この腸炎マウスに B 細胞特異的に Blimp1 を更に欠失させたマウスを作成した。この腸炎モデルにおいても、Blimp-1 の欠失により Preg 細胞は消失し、生後 6 か月で腸炎の著名な悪化を認めた。よって、Preg 細胞は腸炎に対して抑制的に働いている事が示唆された。

3b) AICD 欠失の慢性腸炎に及ぼす影響の検討：

腸炎の重症度に相関して、大腸および腸管膜リンパ節における IgA 産生の顕著な増加を認めた。よって、IgA へのクラススイッチが IL-10 産生 Preg 細胞に及ぼす影響を検討するため、潰瘍性大腸炎モデルである T 細胞受容体 欠失マウスに IL-10/GFP レポーターマウスと AID 欠失マウスを交配した。AID 欠失下では Preg 細胞は減少も消失には至らず、腸炎の軽度の悪化しか認めなかった。

総括) これらの結果より、T 細胞非依存性抗原に対して特異的に分化する IgA 産生形質芽細胞が IL-10 を産生して腸炎の改善に寄与していることが明らかとなった (現在論文の投稿準備中)。これらの結果をもとに、IL-10 産生 Preg 細胞の分化を導く特異的抗原の今後の同定は、炎症性腸疾患に対する新たな治療法開発に加えて、現在広く臨床で用いられている B 細胞除去療法の安全性・適応性の拡大に光明をもたらすことが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Mizoguchi A, Takeuchi T, Himuro H, Okada T, and Mizoguchi E. Genetically engineered mouse models of IBD. *J Pathol* 査読有 238, 2016, 205-219. DOI: 10.1002/path.4640.

DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Durrent understanding of dysbiosis in disease in humans and animal models. *Inflammatory Bowel Disease* 査読有 225, 2016, 1136-1150. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000750

Pyzik M, Rath T, Kuo TT, Win S, Mizoguchi A, Blumberg L, Lencer WI, Sandlie I, Kaplowitz N, Roopenian DC, Blumberg RS. Hepatic FcRn regulates albumin homeostasis and susceptibility to liver injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有 114, 2017 E2862-E2871.

DOI: 10.1073/pnas.1618291114

Mizoguchi A, Yano A, Himuro H, Ezaki Y, Sadanaga T, Mizoguchi E. Clinical importance of IL-22 cascade in IBD. J Gastroenterol. 査読有 53, 2018:465-474.

DOI: 10.1007/s00535-017-1401-7

〔学会発表〕(計4件)

Takeuchi T, Nishida A, Kinugasa T, Akagi Y, Noake T, Araki Y, Andoh A, Mitsuyama K, Mizoguchi A. Colonic IL-10-producing plasmablasts in UC patients. The 4th Annual Meeting of Asian Organization of Crohn's and Colitis (AOCC) 2016, China

Yano A, Nishida A, Takeuchi T, Mizoguchi E, Mizoguchi A. T-bet-dependent IL-12-producing regulatory B cells in the intestine. 日本免疫学会 2016, 沖縄

Yano A, Nishida A, Andoh A, Mizoguchi A. T-bet dependent IL-12-producing B cells for the termination of inflammatory response. GI Research Academy 2018, 東京

Yano A, Nishida A, Andoh A, Mizoguchi E, Mizoguchi A. Protective role of IL-10-producing plasmablasts (Preg) in colitis. Falk Symposium 2018, 京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/immun/mizoguchi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 充志 (MIZOGUCHI, Atsushi)
久留米大学・医学部免疫学講座・教授
研究者番号: 50258472

(2) 研究分担者

小松 誠和 (KOMATSU, Nobukazu)
久留米大学・医学部免疫学講座・講師
研究者番号: 50343687