

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09559

研究課題名(和文) 肺局所制御性B細胞の新規同定と慢性気道炎症抑制機構解明の基盤研究

研究課題名(英文) A preliminary study of identification and inhibitive mechanisms of airway regulatory B cells in chronic airway inflammatory diseases

研究代表者

川山 智隆 (KAWAYAMA, TOMOTAKA)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：80289389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：フローサイトメトリー法を用いたヒト気道局所(誘発喀痰)および全身性(末梢血)からIL-10産生制御性B細胞の検出を試みた。健常人の誘発喀痰および末梢血B細胞(CD19陽性)分画は全リンパ球のうちそれぞれ約1.0%および11%で、ぜん息患者と有意差は無かった。さらに末梢血制御性B細胞分画はリンパ球の約0.6%で、ぜん息患者との差は無かった。

研究成果の概要(英文)：We attempted detection of human IL-10 produced regulated B cells from airway local (induced sputum) and systemic (peripheral blood) using flow cytometry. The frequency of B cell (CD 19 positive) differentiations of the total lymphocytes in induced sputum and peripheral blood in healthy individuals were about 1.0% and 10%, respectively, and there was no significant difference in frequency of B cell differentiations between healthy individuals and asthmatic patients. Furthermore, the IL-10 produced regulatory B cell differentiations peripheral blood were about 0.6% of B lymphocytes, and there was no difference in frequency of regulatory B cell differentiations between healthy individuals and asthmatic patients.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：制御性B細胞 気管支ぜん息

## 1. 研究開始当初の背景

慢性気道炎における制御性T細胞の動態を、ぜん息患者の臨床検体を用いて健常人と比較して制御性T細胞が少なく (Kawayama T, et al. Allergol Int 2013)、ぜん息発作誘発でさらに減少することを証明した (Kinoshita T, Kawayama T, et al. JACI 2014)。一方、IgE産生B細胞あるいはプラズマ細胞は寄生虫感染症に欠かせない免疫担当細胞であるが、アトピーやアナフィラキシー反応に関与し、ぜん息においては肺局所におけるB細胞を介した局所IgE産生増幅や肥満細胞活性に関与している (Balzar S, et al. JACI 2007)。しかし、ヒトにおける肺局所での制御性B細胞を基盤研究の報告はない。

近年、炎症性腸疾患 (Mizoguchi A [研究協力者, 久留米大学免疫学講座], et al. J Exp Med 1997)、自己免疫疾患 (Lund FE, et al. Nature 2010) や膠原病 (Kalmpokis I, et al. Arthritis Research & Therapy 2013) の分野で自然にIL-10産生をする制御性B細胞あるいはある刺激下でインターロキン (IL) -10産生が増強されるB細胞 (B10細胞) の存在が明らかになってきた (図1)。

制御性B細胞やB10細胞は、特異的にIL-10を産生することで、過剰な抗体産生やT細胞活性を制御するとされる。マウスでは制御性B細胞はCD1d、CD5およびIL-21受容体 (CD360) を有し、MHC-IIおよびCD40Lの共結合によるCD4陽性T細胞からのIL-21シグナルを受容することで自らを活性化させると言われている (図1)。一方、ヒトではCD24およびCD27を有するB細胞がIL-10産生に関与していると考えられているが、その特異性は低く、制御性T細胞で認められるFoxp3のような決定的な分子あるいはマーカーは見つかっていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

ヒトの末梢血あるいは肺局所 (誘発喀痰) 中のIL-10産生B細胞 (制御性B細胞) の同定を行う。また慢性気道炎症を有する気管支ぜん息 (以下、ぜん息) 患者における気道局

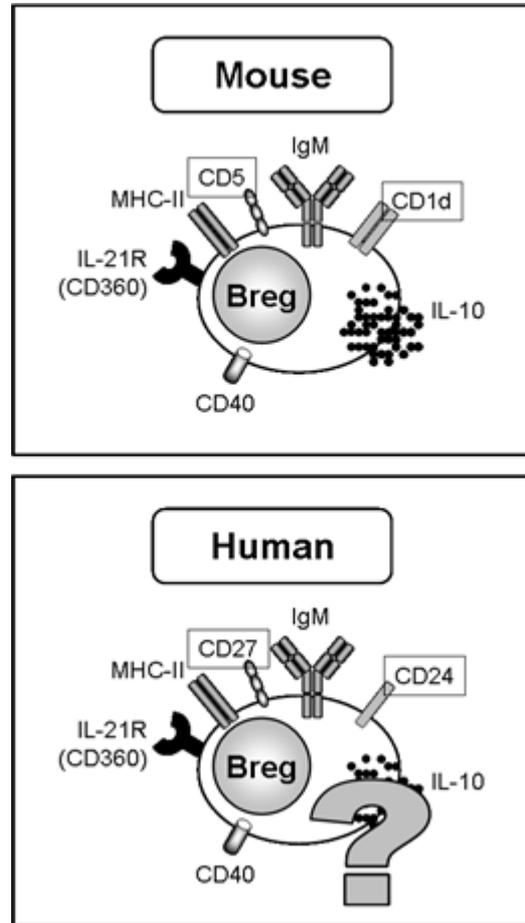


図1 マウスとヒトのIL-10産生細胞 (制御性B細胞=Breg) の特徴

所 (誘発喀痰) 中の制御性B細胞の同定およびその役割 (特に気道内のIgEとの関連) について検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) 末梢血を用いた制御性B細胞の同定

文書同意 (久留米大学倫理委員会で承認) を得た健常人6名から末梢血を採取した。採取された血液は遠心分離法 (Lymphoprep™) を用いて、末梢血単核球細胞 (PBMC) を得た。PBMCを $0.5 \times 10^6$  cells/mLに調整し、ホルボールミスチン酸アセテート (PMA)、

Ionomycin および非メチル化 CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CPG-ODN2006) で刺激し、細胞内サイトカイン染色法を用いて、フローサイトメトリーによって、B 細胞 (CD19 陽性細胞) 中の IL-10 産生細胞分画 (%) を算出した。

PMA と Ionomycin はそれぞれ 25ng/mL と 1μg/mL に固定し、添加 4 時間後に PBMC を回収することとした。ただし細胞内にサイトカインを留める目的に GolgiStop®を用いた。

さらに PBMC は、CPG-ODN2006 を 0.1、0.3、1.0 および 3.0μM の濃度下 (GolgiStop®含有) で、それぞれ 24、48 および 72 時間培養し、細胞回収 4 時間前に PMA および Ionomycin を添加し、細胞を回収した。

フローサイトメトリー (セルアナライザ EC800, Sony, Tokyo) は、表面マーカーとして、FITC-anti-human mouse CD19 抗体を用いて、細胞内は PE-anti-human rat IL-10 抗体を用いた。ただし PE-rat isotype control で 3% 未満を cut-off とした。

## 2) 誘発喀痰を用いた制御性 B 細胞の同定

文書同意 (久留米大学倫理員会で承認) を得た健康人 6 名およびぜん息患者 6 名 (全例が軽症間欠型で定期治療を受けていない) から誘発喀痰を採取した。誘発喀痰は、短時間作用性β刺激薬吸入後に、3%、4%および 5% 高張食塩水を、超音波ネブライザーを介して、それぞれ 7 分間吸入後に、喀痰を喀出および採取を行った。採取された喀痰は唾液成分を取り除かれ、0.1% Sputolysin® (CalbioChem®/Merk, ON, Canada) で処理後、52μm メッシュでろ過され、喀痰細胞浮遊液として回収した。細胞浮遊液は総細胞数を算出したのち、 $1.0 \times 10^6$  cell/mL に調整され、サイトスピンで細胞分画 (メイギムザ染色) およびフローサイトメトリーで B 細胞分画と IL-10 産生細胞を同定した。また喀痰上清は使用されるまで -80°C で保管した。フローサイ

トメトリーは PBMC に準じた。ただしリンパ球領域を判定する目的で PerCP-Cy5.5-CD45 による染色を追加し、刺激は PMA と Ionomycin のみで、培養 4 時間後に回収および染色を行った。

## 3) 気道局所 (誘発喀痰中) の IgE の存在

喀痰上清を用いて、総 IgE の測定を行った。測定方法は、血清に準じて、蛍光酵素免疫測定法 (FEIA, Fluorescence enzyme immunoassay) (SRL, Tokyo) を用いた。

## 4) 統計学的手法

2 群間の比較は unpaired T 検定、多重比較には、Analysis of variance (ANOVA) 検定を用いて、それぞれの比較には、Tukey-honestly significant difference (HSD) 検定を用いた。危険度 (p) <0.05 を有意差ありと判定した。解析には、統計解析ソフト JMP pro 13® (SAS Institute Inc., Tokyo, Japan) を用いた。

## 4. 研究成果

### 1) 末梢血を用いた制御性 B 細胞の同定

末梢血リンパ球のうち、B 細胞 (CD19 陽性細胞分画 (平均±標準誤差)) は、 $5.61 \pm 0.73\%$ であった (図 2 A)。

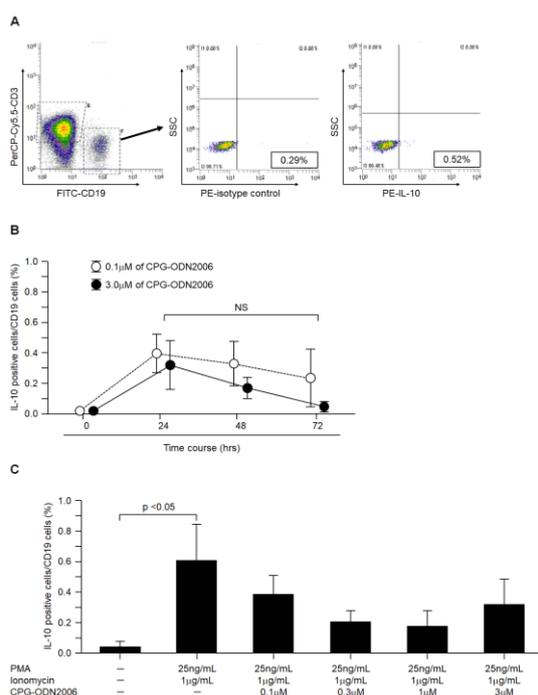
細胞内染色法によるフローサイトメトリーを用いて、IL-10 産生 B 細胞 (制御性 B 細胞) の存在を確認した (図 2 A)。

より多くの制御性 B 細胞の回収を目的として、CPG-ODN2006 による共培養を行ったが、制御性 B 細胞の検出率に、CPG-ODN2006 の濃度あるいは暴露時間依存性は無かった (p>0.05) (図 2 B)。CPG-ODN2006 存在下では、時間依存的に制御性 B 細胞の検出率は低下することが分かった (図 2 B)。

さらに PMA および Ionomycin の処理前に CPG-ODN2006 を添加しても、制御性 B 細胞の検出率に影響を及ぼさなかった (図 2 B)。

ただし PMA、Ionomycin および CPG-ODN2006 の添加無しでは、制御性 B 細胞はほぼ検出が出来ないことも判明した (図 2 B)。

PMA および Ionomycin 刺激 4 時間後の制御性 B 細胞の検出率が最も高く、末梢血中 B 細胞 (CD19 陽性細胞) に対して、制御性 B 細胞の分画 (平均±標準誤差) は、 $0.62 \pm 0.23\%$  (n=6) であった (図 2 B)。



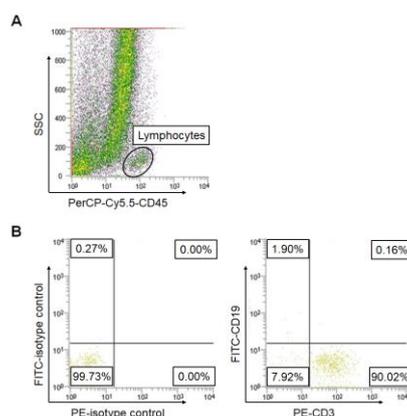
## 図 2 末梢血からの制御性 B 細胞の検出の試み

- A) 細胞内染色フローサイトメトリー
- B) CPG-ODN2006 の濃度および時間依存
- C) CD19 陽性細胞に対する制御性 B 細胞分画

### 2) 誘発喀痰を用いた制御性 B 細胞の同定

Side scatter (SSC) と PerCP-Cy5.5-CD45 でリンパ球領域を同定した (図 3 A)。

次にリンパ球のうち、CD3 陽性細胞 (T 細胞) および CD19 陽性細胞 (B 細胞) 分画に分けた (図 3 B)。ただしコントロールとして mouse isotype control を用いた。



## 図 3 誘発喀痰からの制御性 B 細胞の試み

- A) リンパ球領域
- B) 左は isotype control で、右は CD19 および CD3 陽性細胞

リンパ球に対して CD19 細胞分画 (平均±標準誤差) は、ぜん息 (n=6) および健常人 (n=6) で、それぞれ  $1.11 \pm 0.22$  および  $1.45 \pm 0.46\%$  であった。一方、CD3 陽性細胞分画は、ぜん息と健常人では、それぞれ  $87.99 \pm 0.07$  および  $88.7 \pm 30.63\%$  であった。いずれも両群間に有意差は無かった。

CD19 陽性細胞に対して、IL-10 産生細胞の同定を試みたが、いずれも検出は出来なかった。

### 3) 気道局所 (誘発喀痰中) の IgE の存在

健常人およびぜん息患者から得た誘発喀痰上清中の総 IgE はいずれも検出されなかった。

### 考察

末梢血には約 1%未満の制御性 B 細胞が存在している可能性が示唆された。これは既報に比較して極めて少ないことが確認された。しかも肺局所を反映するであろう誘発喀痰中には B 細胞そのものが少ないことが確認され、IL-10 産生細胞の同定には至らなかった。

今後は、肺局所のリンパ節内での制御性 B 細胞分画の検討あるいはその存在意義につ

いて検討する必要がある。ヒトでは臨床的に肺の所属リンパ節を得ることは困難であると推察される。

したがって動物モデルを用いた検討を進めている。

#### 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 13 件)

- ① Kawayama T (1 番目/7 名中), et al. Role of Regulatory T cells in Airway Inflammation in Asthma. Kurume Med J. 査読無し, 2018;64(3):45-55.
- ② Kawayama T (9 番目/12 名中), et al. Successful Treatment of Rapidly Progressive Unclassifiable Idiopathic Interstitial Pneumonia with Anti-melanoma Differentiation-associated Gene-5 Antibody by Intensive Immunosuppressive Therapy. Intern Med. 査読有り, 2018;57(7):1039-1043.
- ③ Kawayama T, Sasaki J. How do we critically use long-acting muscarinic receptor antagonists and beta-adrenergic receptor agonists monotherapy, or these combination therapies depending on the situation in Japanese patients with COPD? Respir Investig. 査読有り, 2017;55(6):323-325.
- ④ Kawayama T (10 番目/14 名中), et al. Association of anti- aminoacyl- transfer RNA synthetase antibody and anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody with the therapeutic response of polymyositis / dermatomyositis-associated interstitial lung disease. Respir Investig. 査読有り, 2017; 55(1): 24-32.
- ⑤ Kawayama T (3 番目/10 名中), et al. Overexpression of IL-38 protein in anticancer drug-induced lung injury and acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Investig. 査読有り, 2017;55(5):293-299.
- ⑥ Kawayama T (10 番目 10 名中), et al. High Detection Rates of Urine Mycobacterium tuberculosis in Patients with Suspected Miliary Tuberculosis. Intern Med. 査読有り, 2017;56(8):895-902.
- ⑦ Kawayama T (2 番目 11 名中), et al. Poor pharmacological adherence to inhaled medicines compared with oral medicines in Japanese patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Allergol Int. 査読有り, 2017; 66(3): 482-484.
- ⑧ Kawayama T (1 番目/7 名中), et al. Responsiveness of blood and sputum inflammatory cells in Japanese COPD patients, non-COPD smoking controls, and non-COPD nonsmoking controls. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 査読有り, 2016; 11: 295-303.
- ⑨ Kawayama T (2 番目/9 名中), et al. "Frequent exacerbator" is a phenotype of poor prognosis in Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 査読有り, 2016;11:207-16
- ⑩ Kawayama T (2 番目/8 名中), et al. Evaluation of the Modified Medical Research Council Dyspnea Scale for Predicting Hospitalization and Exacerbation in Japanese Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

Intern Med. 査読有り, 2016;55(1):15-24.

- ⑪ Kawayama T (9 番目/12 名中), et al. A retrospective cohort study of outcome in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Respir Investig.* 査読有り, 2016; 54(6): 445-453.
- ⑫ Kawayama T (2 番目/11 名中), et al. Paired maximum inspiratory and expiratory plain chest radiographs for assessment of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Radiol.* 査読有り, 2015;84(4):726-31
- ⑬ Kawayama T (2 番目/8 名中), et al. Chronic Rhinosinusitis is Associated with Airflow Obstruction in Japanese Never-Smokers without Asthma. *Int J Respir Pulm Med.* 査読有り, 2015;2:023

[学会発表] (計 2 件)

- ① 川山智隆. 病態からみた COPD の治療戦略. 第 75 回 日本呼吸器学会・日本結核学会・日本アレルギー学会/肉芽腫性疾患学会九州支部秋季学術講演会教育セミナー. 2015. 10. 3.佐賀市
- ② 川山智隆. COPD 管理目標の達成に向けた治療戦略. 第 214 回日本呼吸器学会関東地方会ランチョンセミナー. 2015. 5. 23. 東京

[図書] (計 4 件)

- ① 川山智隆、木下隆、松岡昌信. 気管支喘息の危険因子と病態生理. 気管支喘息の気道炎症のメカニズム. サイトカイン、ケモカイン. 三嶋理晃、井上博雅著 気管支喘息. 中山書店. 2017:71-80

- ② 川山智隆. C. 安定期の管理. 5. 全身併存症および肺合併症への対応. 日本呼吸器学会著. COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と治療のためのガイドライン 2018 第 5 版. p111-113, 2018
- ③ 川山智隆. 喀痰採取法と細胞診. 新呼吸器専門医テキスト. (編集: 日本呼吸器学会) 南江堂 p72-74. 2015 年発刊.
- ④ 川山智隆. 吸入療法. 新呼吸器専門医テキスト. (編集: 日本呼吸器学会) 南江堂 p164-166. 2015 年発刊.

[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.kurume-ichinaika.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川山智隆 (KAWAYAMA, Tomotaka)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 80289389

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

木下隆 (KINOSHITA, Takashi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 90454917

坂崎優樹 (SAKAZAKI, Yuki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 80597386

徳永佳尚 (TOKUNAGA, Yoshinao)

久留米大学・医学部・大学院生

研究者番号: 60832722

合原みち (GOUHARA, Michi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 00597429