

平成 31 年 5 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15217

研究課題名(和文)新規ヒト制御性B細胞の選択的誘導法の開発

研究課題名(英文)Development of efficient induction method of human regulatory B cells

研究代表者

馬場 義裕 (Baba, Yoshihiro)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：20415269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、免疫病や炎症疾患を抑制するIL-10産生B細胞(制御性B細胞)の存在が示され、その新規性と様々なヒト疾患病態への関与から非常に関心が高まっている。しかし、「ヒトの制御性B細胞の実体およびその分化過程」は未だ不明であり、本研究分野の進展が期待されている。本研究では、これまで全く不明であったヒト制御性B細胞の遺伝子発現を調べることにより、本サブセットに特徴的な遺伝子発現パターンを明らかにした。また、ヒト制御性B細胞の前駆細胞を同定した。また、ヒト制御性B細胞を増幅できる培養方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、B細胞は自己免疫や炎症を悪化させる要因としてのみ捉えられてきたが、必ずしもそうではなく、負の制御を行うことが認知されつつある。本研究は、制御性B細胞の特徴づけは本分野に新機軸を与える研究になることが期待される。さらに、ヒト制御性B細胞の実体解明により、新たな疾患診断法への発展が期待される。また、ヒト制御性B細胞の誘導技術は将来の輸注療法や疾患病態の相関を検証する手段を提供すると予想され、免疫や炎症疾患の理解や新しい治療戦略として大きな可能性をもちと思われる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the presence of IL-10 producing B cells (regulatory B cells) that suppress immune diseases and inflammation has been shown. However, "the nature of human regulatory B cells and their differentiation process" are still unknown. To understand these questions, in this study, we examined the gene expression of human regulatory B cells and clarified the gene expression pattern characteristic of this subset. In addition, we identified the precursor cells of human regulatory B cells. We also developed a culture method that can amplify human regulatory B cells efficiently.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性B細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B細胞は自己免疫病や炎症疾患の病態悪化因子として捉えられることが多いが、近年、逆に免疫反応を抑制するB細胞(制御性B細胞)の存在が明らかになり、非常に注目されている。特に抗炎症性サイトカインIL-10を産生するB細胞は、多発性硬化症や糖尿病などの自己免疫疾患や、移植における移植片対宿主病(GVHD)、さらにはがん免疫を抑制することが明らかになっている。このように、抑制機能を有するB細胞の研究は、その新規性に加えて基礎免疫学および臨床医学的な重要性から、国内外を問わず精力的に研究が行われており、臨床応用が期待されている。しかし、IL-10産生B細胞の実体は長らく不明であり、世界が鎬を削って同定を試みていた。我々は世界に先駆けて、「プラズマブラスト」と呼ばれるB細胞集団が、マウス生体内におけるIL-10産生制御性B細胞であることを発見した。さらに、B細胞がIL-10を産生するにはカルシウムシグナルが必須であることも明らかにしている。しかし、医学応用という観点から考えると、「ヒト」制御性B細胞の理解が必要不可欠であるが、現在、その実体や分化機構は不明であり、選択的誘導培養も実現していない。

2. 研究の目的

ヒト制御性B細胞の性状と分化メカニズムの全容解明を目指し、疾患を抑制しうるB細胞の分化誘導培養技術の確立を試みる。具体的には以下の研究を遂行する。

- ヒト制御性B細胞の性状を網羅的遺伝子解析から明らかにし、特異的マーカーを探索する。
- ヒト制御性B細胞に分化できる前駆細胞を同定し、その性状を明らかにする。
- ヒト制御性B細胞の分化機構を明らかにし、「ヒト制御性B細胞の選択的分化誘導」の培養技術を確立する。

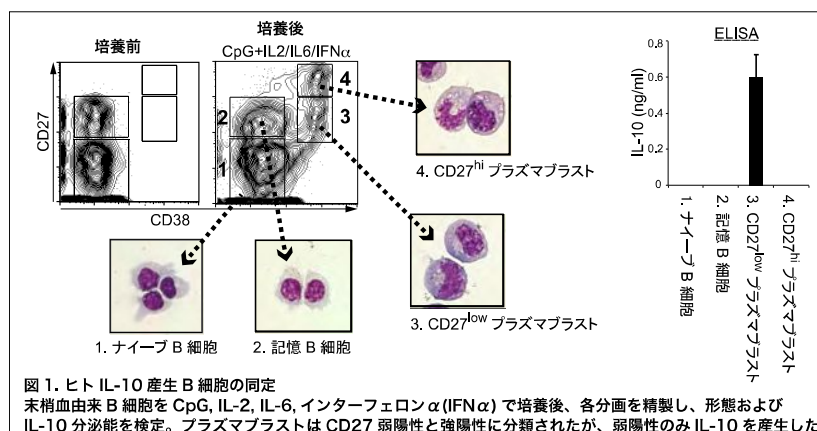
3. 研究の方法

- 1) 健康者由来末梢血から単核球をフィコールで分離した後、CD19 microbeadsを用いてB細胞を単離する(CD19陽性95%以上)。我々が見出した分化誘導方法(IL-2, IL-6, CpG, インターフェロンによる刺激)を用いて、CD27^{low}CD38^{hi}プラズマブラストを分化誘導する(図1)。IL-10の産生はELISA法とIL-10 secretion assayを用いて確認する。CD27^{low}CD38^{hi}プラズマブラストをsortingにより精製し、RNA-seqを行う。また、細胞表面マーカーや転写因子、抗体サブクラスをflow cytometryで検証し、CD27^{low}CD38^{hi}プラズマブラストの性状を調べる。
- 2) 様々な刺激によりCD27^{low}CD38^{hi}プラズマブラスト誘導効率を検討する。
- 3) 健康者由来末梢血から様々なB細胞サブセットをsortingした後、IL-2, IL-6, CpG, インターフェロンで培養し、前駆細胞を検討する。
- 4) ヒトB細胞生存を支持する因子を過剰発現するstroma cellsを樹立し、ヒトB細胞を様々な条件下で培養することにより、長期的に効率的にIL-10産生CD27^{int}CD38^{hi}プラズマブラストを増幅させる実験系を確立する。

4. 研究成果

CD27^{low}CD38^{hi}プラズマブラストの網羅的遺伝子発現解析から(図1,分画3)、ヒトIL-10産生プラズマブラストに特徴的な遺伝子発現が確認された。さらに、細胞表面マーカーや転写因子のflow cytometryの実験から、詳細に細分化することができた。また、IgMからクラススイッチも高頻度におきていることも判明した。IL-10 secretion assayにより、IL-10陽性のみを単離して、網羅的遺伝子解析を行う予定であったが、極めて数が少ないため通常の方法では難しかったため、少量でのRNA-seqが可能となる系に切り替える予定である。また、末梢血由来B細胞をCD24, CD180, CD19, CD20, IgD, CD27, CD38を用いて細分化を行い、IL-10産生CD27^{low}CD38^{hi}プラズマブラストへ分化しやすいサブセットを同定した。

ヒトB細胞生存を支持する3因子を過剰発現するstroma cellsの樹立を完了した。ヒトB細胞を培養することにより、2週間以上B細胞が増殖し、CD27^{low}CD38^{hi}プラズマブラストが約10倍まで増幅させることに成功した。また、stroma cellsの違いにより、B細胞の増殖や分化能差異があることも判明した。



5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Nakai A, Fujimoto J, Haruhiko M, Stumm R, Narazaki M, Schulz S, Baba Y, Kumanogoh A, Suzuki K. The COMMD3/8 complex is a determinant of GRK6 specificity for chemoattractant receptors. *J. Exp. Med.* 2019, in press
2. Kondo Y, Higa S, Iwasaki T, Matsumoto T, Maehara K, Harada A, Baba Y, Fujita M, Ohkawa Y. Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. *PLoS One.* e0191532 (2018).
3. Hosen N, Matsunaga Y, Hasegawa K, Matsuno H, Nakamura Y, Makita M, Watanabe K, Yoshida M, Satoh K, Morimoto S, Fujiki F, Nakajima H, Nakata J, Nishida S, Tsuboi A, Oka Y, Manabe M, Ichihara H, Aoyama Y, Mugitani A, Nakao T, Hino M, Uchibori R, Ozawa K, Baba Y, Terakura S, Wada N, Morii E, Nishimura J, Takeda K, Oji Y, Sugiyama H, Takagi J, Kumanogoh A. The activated conformation of integrin $\beta 7$ as a target for multiple myeloma-specific chimeric antigen receptor T cell therapy. *Nat. Med.* 12, 1436-1443. (2017).
4. Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Iino K, Adachi T, Baba Y, Kurosaki T, Ono K, Ito H. Stromal interaction molecule 1 haploinsufficiency causes maladaptive response to pressure overload. *PLoS One.* 12, e0187950 (2017).
5. Lim HM, Woon H, Han JW, Baba Y, Kurosaki T, Lee MG, Kim JY. UDP-Induced Phagocytosis and ATP-Stimulated Chemotactic Migration Are Impaired in STIM1-/- Microglia In Vitro and In Vivo. *Mediators Inflamm.* 8158514 (2017).
6. Morimoto K, *Baba Y, Shinohara H, Kang S, Nojima S, Kimura T, Ito D, Yoshida Y, Maeda Y, Sarashina-Kida H, Nishide M, Hosokawa T, Kato Y, Hayama Y, Kinehara Y, Okuno T, Takamatsu H, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Kurosaki T, *Toyofuku T, Kumanogoh A. LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF- κ B activation. *Sci. Rep.* 6, 25738 (2016).
7. Ohmi Y, Ise W, Harazono A, Takakura D, Fukuyama H, Baba Y, Narazaki M, Shoda H, Takahashi N, Ohkawa Y, Ji S, Sugiyama F, Fujio K, Kumanogoh A, Yamamoto K, Kawasaki N, Kurosaki T, Takahashi Y, *Furukawa K. Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. *Nat. Commun.* 7, 11205 (2016).
8. *Baba Y, Kurosaki T. Role of Calcium Signaling in B Cell Activation and Biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 393, 143-174 (2016)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 馬場義裕 「Humoral immunity and diseases」 第 47 回日本免疫学会 2018 年 12 月 10 日
2. 馬場義裕 第 50 回日本小児感染症学会 2018 年 11 月 12 日
3. 馬場義裕 「B 細胞による炎症制御機構」 第 9 回 中国免疫不全症研究会 2018 年 7 月 21 日
4. 馬場義裕 「胚中心 B 細胞におけるカルシウム流入の役割」 生体機能と創薬シンポジウム 2017 年 8 月 24 日
5. 馬場義裕 「B 細胞による炎症制御機構」 第 8 回 Q-PID 九州地区免疫不全症研究会 2017 年 7 月 29 日
6. 馬場義裕 「Regulatory function of B cells in autoimmune inflammation.」 第 709 回 生医研セミナー 2016 年 2 月 18 日
7. Yoshihiro Baba 「Regulatory function of B cells in autoimmune inflammation」 The 7th IFRc International Symposium "Immunology at the Forefront" 2016 年 1 月 22 日

〔図書〕(計 4 件)

1. 川上亮、馬場義裕「制御性 B 細胞と疾患」炎症と免疫(先端医薬社)vol.26 No. 5,86-91, 2018
2. 馬場義裕「B 細胞抗原受容体」「抗原-抗体反応と免疫複合体」「抗体のクラススイッチ」「抗体の多様性」実験医学増刊号 免疫ペディア(羊土社)vol.33 No. 12, .2017
3. 馬場義裕「B 細胞ストア作動性カルシウム流入による自己免疫性炎症反応の制御機構」YAKUGAKU ZASSHI 薬学雑誌 2016;136(3):473-478.
4. 馬場義裕「免疫反応を抑制する B 細胞：制御性 B 細胞」ライフサイエンス領域融合レビュー 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://immunegenomebio.localinfo.jp>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。