

平成 30 年 4 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18449

研究課題名(和文) 腫瘍免疫におけるRegulatory B細胞の役割についての解析

研究課題名(英文) A role of regulatory B cell in tumor immunity

研究代表者

小林 忠弘 (Kobayashi, Tadahiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20746383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、制御性B細胞が増加しているマウス(B細胞特異的PTEN欠損マウス)を用いて悪性黒色腫の増生および腫瘍浸潤細胞を解析した。B細胞特異的PTEN欠損マウスでは悪性黒色腫が有意に増大し、腫瘍に浸潤する制御性B細胞が増加していた。一般に制御性B細胞はMarginal zone B細胞とB1 B細胞の2つのサブセットから成るが、腫瘍に浸潤している制御性B細胞はB1 B細胞であった。そこでB1 B細胞を悪性黒色腫細胞と混合して野生型マウスに移入したところ、非混合群および非B1 B細胞混合群と比べ腫瘍増生が増大した。以上より制御性B細胞は悪性黒色腫に対する腫瘍免疫反応を抑制していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In tumor immunity, the participation of IL-10-producing regulatory B cell (Breg) which suppresses several immune responses is unclear. Here we demonstrated that B16F10 melanoma growth was increased in B cell-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice in which Breg subset is expanded. More than 50% of the tumor-infiltrating B cells consisted of Bregs in both B cell-specific PTEN-deficient mice and control mice. The number of tumor-infiltrating Bregs was significantly increased in B cell-specific PTEN-deficient mice. Although we have previously identified 2 Breg subsets derived from marginal zone Bregs and B1 Bregs, most of tumor-infiltrating Bregs consisted of B1 Bregs but not MZ Bregs. Adoptive transfer of B1 B cells increased melanoma growth while non-B1 B cells had no effect. Thus, B1 Bregs negatively regulate tumor immunity against melanoma.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：悪性黒色腫 制御性B細胞 免疫療法 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

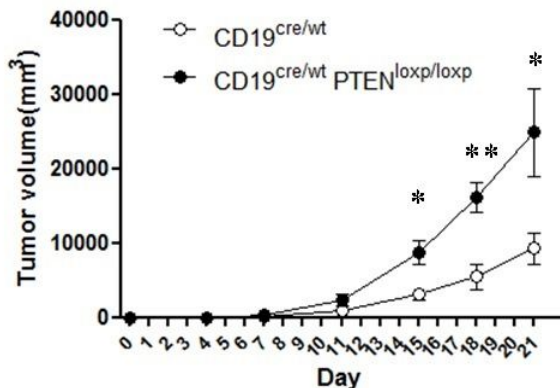
悪性黒色腫をはじめとする様々ながんでは腫瘍局所に B 細胞が浸潤しているが、腫瘍免疫における B 細胞の役割は明らかにされていない。申請者は悪性黒色腫に対する B 細胞の役割を検討し、“B 細胞全体としては”腫瘍局所への T 細胞の浸潤を促進するとともに、腫瘍局所に浸潤した T 細胞による Th1 サイトカインの産生を促進することで腫瘍免疫に貢献していることを解明したが、B 細胞のサブセット別の解析は施行しておらず、それぞれのサブセットが腫瘍免疫においてどのように（貢献的に/抑制的に）機能しているかについては分かっていない。

B 細胞のサブセットとして免疫反応を抑制する「制御性 B 細胞」が知られており、これは IL-10 を産生する B 細胞亜集団と定義される「免疫系のブレーキ」である。マウスのみならずヒトにおいても制御性 B 細胞の存在が確認されており、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、全身性強皮症といった自己免疫性疾患において病勢を抑制する役割を担っていることが知られている。

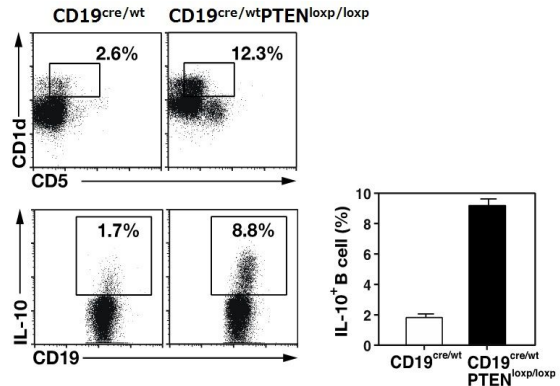
一方、B 細胞を欠損する  $\mu$ MT マウスを用いた実験では、B16F10 (悪性黒色腫の細胞株)、EL4 (胸腺腫の細胞株)、MC38 (大腸癌の細胞株) いずれにおいても腫瘍増生が野生型マウスに比べ抑制される。 $\mu$ MT マウスでは CD8<sup>+</sup>T 細胞における IFN- $\gamma$  の産生が亢進しており、野生型マウスの B 細胞を移入することで減弱することが示されている。

申請者は以上の背景を踏まえ、B 細胞には腫瘍免疫に対して促進的に機能する「エフェクター B 細胞」が存在する一方で、「制御性 B 細胞」は腫瘍免疫に対しても抑制的な機能を有しているのではないかと考え、悪性黒色腫における制御性 B 細胞の役割について解析を行うこととした。

申請者は Cre-loxP 部位特異的組換え技術により B 細胞特異的に PTEN 遺伝子を欠損したマウス (CD19<sup>cre/wt</sup>PTEN<sup>loxp/loxp</sup> マウス) を有しており、このマウスではリンパ組織における制御性 B 細胞がコントロールマウス (CD19<sup>cre/wt</sup> マウス) と比べて有意に増加していることをフローサイトメトリーで確認している (下図)。



さらに、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスにおいて悪性黒色腫の腫瘍サイズが野生型マウスに比べて有意に増大していることも確認している (下図)。



2. 研究の目的

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス (CD19<sup>cre/wt</sup>PTEN<sup>loxp/loxp</sup> マウス) を用いて、悪性黒色腫に対する腫瘍免疫反応における制御性 B 細胞の役割を解析する。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍に浸潤するリンパ球の解析

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス (CD19<sup>cre/wt</sup>PTEN<sup>loxp/loxp</sup> マウス) およびコントロールマウス (CD19<sup>cre/wt</sup> マウス) の腫瘍組織を Collagenase および Hyaluronidase で消化し、パーコール液を用いた比重遠心分離法を用いてリンパ球を分離し、フローサイトメータで解析した。B 細胞に関してはそのサブセット (CD5<sup>-</sup> Follicular B 細胞、CD1d<sup>hi</sup> Marginal zone B 細胞、CD5<sup>+</sup> B1 B 細胞) も解析し、それぞれのサブセットにおける IL-10 産生細胞 (= 制御性 B 細胞) も評価した。T 細胞のサブセットについては CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞を評価し、NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK 細胞についても評価した。

(2) 腫瘍に浸潤するリンパ球のサイトカイン産生能の解析

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス (CD19<sup>cre/wt</sup>PTEN<sup>loxp/loxp</sup> マウス) およびコントロールマウス (CD19<sup>cre/wt</sup> マウス) の双方において、T 細胞に関しては IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の産生能、NK 細胞に関しては Granzyme B の産生能について解析し、それぞれのマウス間でどのような差異があるのか検討した。

(3) B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス由来 B 細胞の移入による影響の解析

磁気細胞分離装置を用いて B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスの脾臓から B 細胞を抽出し、さらに CD5<sup>+</sup>B1B 細胞と非 CD5<sup>+</sup>B1B 細胞に分離した。それぞれの細胞分画を悪性黒色腫細胞 (B16F10 細胞) と混合したうえで野生型マウスに皮下注射し、腫瘍増生がどのように変化するのか検討した。

(4) 腫瘍組織におけるケモカイン (CXCL13) の解析

CXCL13はB細胞のケモカインとして知られている。癌細胞それ自体が、もしくは周囲組織と相互作用することにより CXCL13 を産生し、腫瘍局所に制御性 B 細胞を浸潤させている可能性を考え、腫瘍組織における CXCL13 の量を測定した。

具体的には、腫瘍組織を Collagenase、Hyaluronidase、DNase で消化し、その上清を検体として CXCL13 の濃度を ELISA 法で測定した。比較対象として、腫瘍と同面積の通常皮膚、および悪性黒色腫細胞の培養上清を用いた。

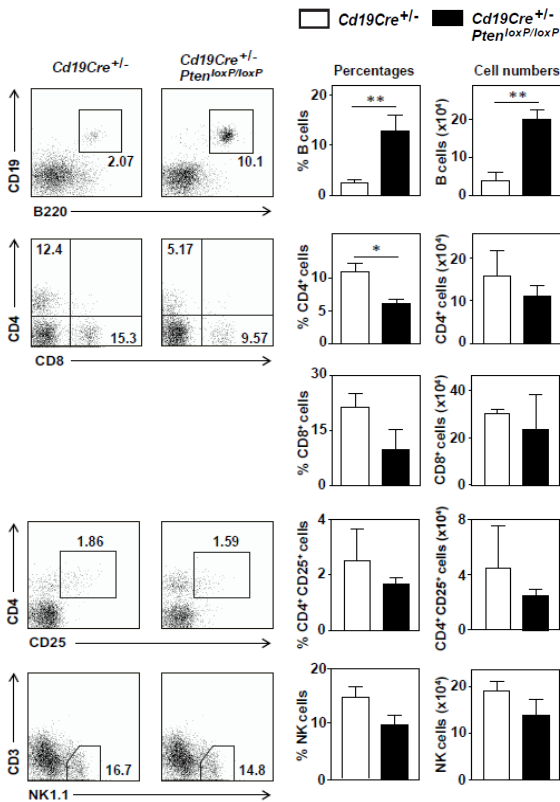
(5) 抗 CXCL13 抗体を用いた治療法の評価

(4) の実験によって腫瘍組織における CXCL13 が通常皮膚に比べて増加していることが確認できれば、CXCL13 を抑制することにより腫瘍組織への制御性 B 細胞の浸潤を阻害できる可能性がある。これを確認するため、悪性黒色腫細胞 (B16F10 細胞) を皮下注射した野生型マウスに抗 CXCL13 抗体 10ng/kg を 72 時間毎に腹腔内投与し、腫瘍増生に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍に浸潤するリンパ球の解析

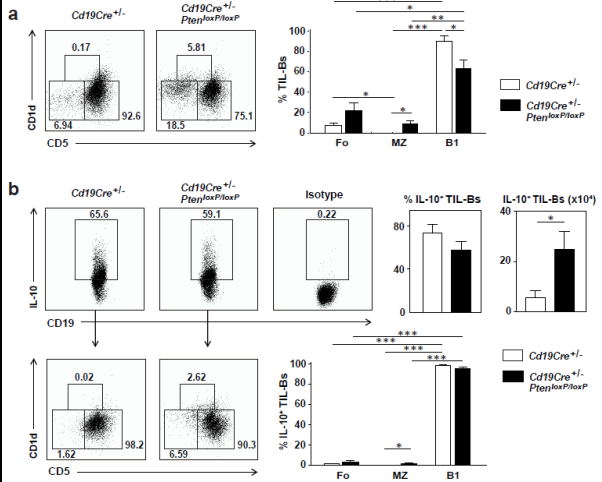
B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは、コントロールマウスに比べて腫瘍に浸潤する B 細胞が比率・絶対数ともに有意に増加していた。一方、CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞、NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>NK 細胞の絶対数に関しては、いずれも有意差がなかった (下図)。



(2) 腫瘍に浸潤する B 細胞のサブセット解析

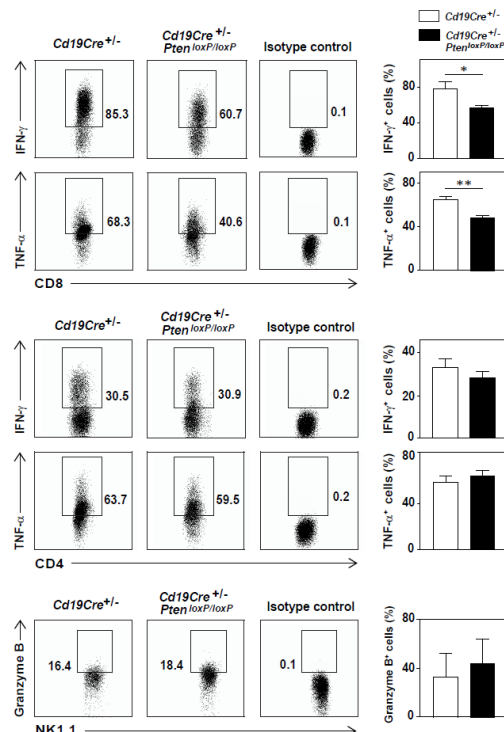
B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス、コントロールマウスいずれにおいても腫瘍に浸潤する B 細胞は大部分が CD5<sup>+</sup>B1 B 細胞で占められていた (下図 a)。

腫瘍に浸潤する制御性 B 細胞 (IL-10<sup>+</sup>TIL-Bs) について解析したところ、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは有意に増加していた。また、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス、コントロールマウスいずれにおいても腫瘍に浸潤する制御性 B 細胞の 90% 以上は CD5<sup>+</sup>B1 B 細胞で占められていた (下図 b)。



(3) 腫瘍に浸潤するリンパ球のサイトカイン産生能の解析

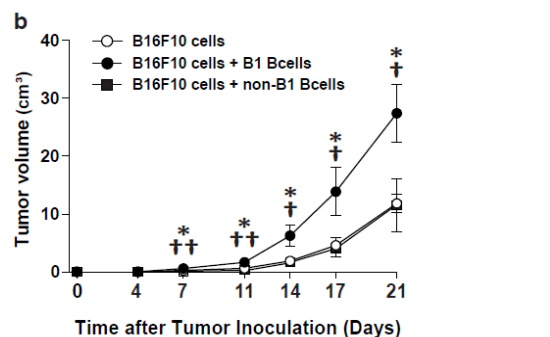
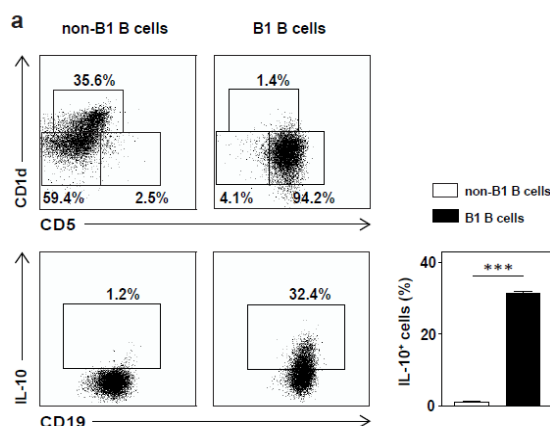
B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは、コントロールマウスに比べて腫瘍に浸潤する CD8<sup>+</sup>T 細胞における IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の産生能が有意に低下していた。一方、CD4<sup>+</sup>T 細胞における IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の産生能、NK 細胞における Granzyme B の産生能に有意差はなかった (下図)。



(4) B細胞特異的 PTEN 欠損マウス由来 B細胞の移入による影響の解析

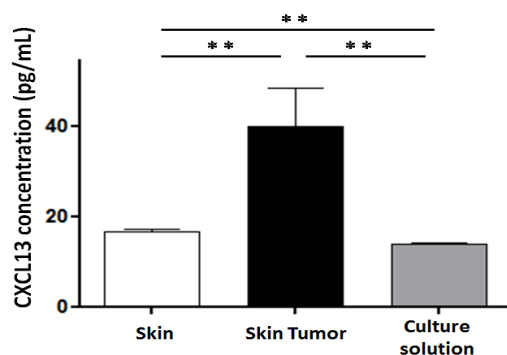
B細胞特異的 PTEN 欠損マウスの脾臓から B細胞を抽出し、さらに CD5<sup>+</sup>B1 B細胞と非 CD5<sup>+</sup>B1 B細胞に分離した。それぞれの分画における制御性 B細胞 (IL-10<sup>+</sup> cells) の比率を解析したところ、CD5<sup>+</sup>B1 B細胞は制御性 B細胞を 30%以上含んでいるのに対し、非 CD5<sup>+</sup>B1 B細胞では 1%前後であった (下図 a)。

それぞれの分画を悪性黒色腫細胞と混合して野生型マウスに移入したところ、CD5<sup>+</sup>B1 B細胞を混合した群 (B16F10 cells + B1 B cells) では、非 CD5<sup>+</sup>B1 B細胞を混合した群 (B16F10 cells + non-B1 B cells) および悪性黒色腫細胞のみを移入した群 (B16F10 cells) と比較して腫瘍増生が有意に増大した (下図 b)。

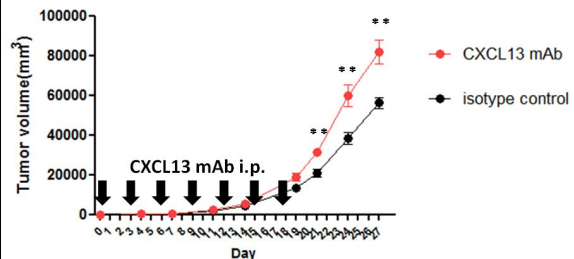


(5) 腫瘍組織におけるケモカイン (CXCL13) の解析

腫瘍組織では、同面積の正常皮膚および悪性黒色腫の培養上清と比較して有意に CXCL13 が高発現していた (下図)。



(6) 抗 CXCL13 抗体を用いた治療法の評価  
 予想では、抗 CXCL13 抗体を投与することにより腫瘍組織への制御性 B細胞の浸潤が抑制され、腫瘍免疫が増強することで腫瘍増生が減弱すると考えていたが、結果として抗 CXCL13 抗体投与群では腫瘍増生が有意に増悪していた (下図)。



## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kobayashi T, Matsushita T, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Takehara K: CD5<sup>+</sup> regulatory B cells inhibit melanoma tumor immunity. The 42<sup>nd</sup> annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology, 高知市文化プラザ かるぽーと (高知), 2017.12.17

2. Kobayashi T, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K: Dual aspects of B cells in tumor immunity; B cells are capable of positive and negative regulation for tumor immunity against B16F10 melanoma. The 41<sup>st</sup> annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology, 仙台国際センター (仙台), 2016.12.9

〔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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 忠弘 (KOBAYASHI TADAHIRO)  
 金沢大学・附属病院・助教  
 研究者番号: 20746383

(2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

松下 貴史 (MATSUSHITA TAKASHI )  
金沢大学・附属病院・講師  
研究者番号：60432126