

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21107

研究課題名(和文)新規B-1細胞サブセットによる抗炎症機構の解明

研究課題名(英文)Role of a novel B-1 cell subset in anti-inflammatory processes

研究代表者

渡邊 幸子(Watanabe, Sachiko)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80770619

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)：SPA-1 KO マウスには、B-1細胞とは発現する細胞表面分子が一部異なる特定の細胞集団が存在しなかったことから、申請者はこの細胞集団を新規B-1細胞サブセットと考え、解析を進めた。新規B-1細胞サブセットの特徴として、IL-10産生能が非常に高いほか、インテグリンやPD-L2の発現がやや高く、B細胞の分化に関わる転写因子の発現が他の細胞と比較して低い傾向にあった。また、SPA-1 KOマウスのみならず野生型マウスにおいても、若齢マウスでは新規B-1細胞サブセットが存在せず、成長に伴って出現することが明らかとなり、SPA-1はその分化を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：SPA-1 is a specific negative regulator of Rap1 that mediates broad cellular activities. Because our preliminary results suggest that SPA-1 knockout mice show a lack of a novel B-1 cell subset that acts as anti-inflammatory properties, we investigated the role of the cell subset in anti-inflammatory processes. The new B-1 cell subset isolated from WT cells produced a large amount of an anti-inflammatory cytokine IL-10. In this cell subset, the expression levels of integrin and PD-L2 were higher whereas B cell differentiation-related transcription factors tended to be lower than other cell subsets. Furthermore, this cell subset was not present in young WT mice. These findings suggest that SPA-1 regulates the differentiation of novel B-1 cell subset which has anti-inflammatory function.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫 B細胞 B-1細胞 IL-10

1. 研究開始当初の背景

低分子量 G タンパク質は、不活性型である GDP 結合型と活性型である GTP 結合型の間を行き来するサイクルを繰り返すことにより、細胞内分子スイッチとして機能している。このサイクルは、positive regulator である GDP-GTP 交換因子 (GEF) と、negative regulator である GTPase 活性化因子 (GAP) により制御されている。低分子量 G タンパク質の一つである Rap1 (RAS-related protein) シグナルの特徴は、細胞に対する様々な刺激に対し容易に活性化されることに加え、そのシグナルが非常に長い間遷延することにある。一方、細胞における Rap1 シグナルの異常は、様々な病態を引き起こすことが明らかとなっている。例えば、Rap1 の GAP である SPA-1 (signal-induced proliferation associated gene-1) 遺伝子を欠損するマウス (SPA-1 KO マウス) では、加齢に伴って様々なタイプの白血病が発症することが観察されるとともに、T 細胞機能不全や B 細胞の分化異常による自己免疫疾患の発症なども認められる。さらに、申請者らの予備的検討より、この SPA-1 KO マウスに微量の LPS (細菌の構成成分) を腹腔内投与し続けると、白血病の発症が早まる傾向が認められた。すなわち、細菌感染による過剰な炎症反応が、白血病の早期発症の一つの原因となっていることが示唆される。しかし、炎症反応の制御に SPA-1 がどのように関与しているのかは、ほとんど明らかとなっていない。

そこで申請者は、SPA-1 KO マウスでは炎症反応の抑制機能に何らかの欠陥が生じていると考え、脾臓や胸腺、骨髄細胞、腹腔細胞を用いた解析を行った。その結果、野生型マウスと比較し、SPA-1 KO マウスの腹腔内には特定の細胞集団が存在しないことが明らかになった。さらに、野生型と SPA-1 KO マウスから腹腔細胞を回収し、LPS 刺激後のサイトカインやケモカインの産生量を測定したところ、SPA-1 KO マウスの細胞では IL-10 (炎症反応を抑える液性因子) の産生量が低下していた。以上の予備的解析の結果は、SPA-1 KO マウスで欠損するこの細胞集団が IL-10 を産生し、炎症反応の抑制に関与することを強く示唆している。

腹腔内で IL-10 を産生する細胞として、B 細胞のサブセットである B-1 細胞が知られている。B-1 細胞は主に哺乳類の腹腔内に存在し、感染防御や体内の不要物処理に働いている。しかし、その定義は統一されておらず、広義な細胞集団として捉えられている。実際に、SPA-1 KO マウスで欠損する細胞集団は B-1 細胞と類似しているものの、発現する細胞表面分子が一部一致していなかった。

以上のような研究背景から、申請者は、この同定された細胞集団が新規 B-1 細胞サブセットではないかと考え、この細胞集団が炎症の制御にどのように関与しているのかを明

らかにするという本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

申請者は新規 B-1 細胞サブセットが炎症の抑制に大きく関与していると予想した。本研究の目的は、その細胞の特徴を明らかにするとともに、SPA-1 に焦点を当てた炎症抑制機構の分子メカニズムを解明することである。さらに、マウスへの細胞移入実験や抗体投与等を行い、白血病や自己免疫疾患の改善を試み、この新規細胞サブセットを利用した新規治療法の開発の手がかりを得ることを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、新規 B-1 細胞サブセットによる抗炎症機構の分子メカニズムを明らかにするため、以下の検討を行った。

種々の刺激により新規 B-1 細胞サブセットが産生する液性因子の定量

野生型マウスから新規 B-1 細胞サブセットをセルソーターにより回収し、LPS 等の刺激による液性因子の産生量を ELISA により定量した。

新規 B-1 細胞サブセットの分化能、増殖能、遊走能の検討 (in vitro)

新規 B-1 細胞サブセットをセルソーターにより回収し、選択培地で培養することにより分化能の異常について解析した。

新規 B-1 細胞サブセットの分化能、増殖能、遊走能の検討 (in vivo)

新規 B-1 細胞サブセットが存在しない Rag2 KO マウスに、セルソーターにより回収した新規 B-1 細胞サブセットを移入した。14 日後、Rag2 KO マウスの腹腔細胞をフローサイトメトリー解析した。

新規 B-1 細胞サブセットの発現する転写因子の検討

～ の結果から、新規 B-1 細胞サブセットで特に産生の高かった液性因子の産生や細胞の分化、増殖、遊走に関わる転写因子の発現をリアルタイム PCR により解析した。

4. 研究成果

SPA-1 KO マウスの腹腔内には特定の細胞集団 (新規 B-1 細胞サブセット) が存在せず、腹腔内全体での IL-10 の産生量が低下していることが予備的検討により明らかになった。また、腹腔内にはマクロファージ等 F4/80 を発現する細胞の割合が高いが、F4/80⁺ の細胞集団を磁器ビーズにより回収し、そのサイトカイン産生能を解析した結果、野生型マウスと SPA-1 KO マウスにおいて有意な差は認められなかった。

そこで、野生型マウスの腹腔細胞を回収し、フローサイトメトリー解析により新規 B-1 細胞サブセットが実際に IL-10 を産生している

ことを確認した。その後、野生型マウスから新規 B-1 細胞サブセットをセルソーターにより回収し、LPS および PMA/Ionomycin 刺激による IL-10 の産生量を ELISA により定量した。その結果、新規 B-1 細胞サブセットは腹腔内の他の細胞と比較して IL-10 産生能が高いことが明らかとなった。一方、IL-6 や IL-12p40, TNF- α , TGF- β , IFN- γ といった他のサイトカインの産生には有意な差が認められなかった。IL-10 は炎症反応に関与するマクロファージの活性化を抑えることが知られている。従って、これらの解析から、新規 B-1 細胞サブセットが抗炎症効果を持つことが示唆された。

続いて、SPA-1 KO マウスではなぜ新規 B-1 細胞サブセットが存在しないのかを明らかにするため、新規 B-1 細胞サブセットの分化能や増殖能、遊走能の検討を行った。腹腔の B-1 細胞は、成長の過程で自己増殖をすることによりその数を保つことが報告されていることから、様々な週齢のマウスの腹腔細胞を用いてフローサイトメトリー解析を行った。その結果、若齢マウスでは SPA-1 KO マウスのみならず、野生型マウスにおいても新規 B-1 細胞サブセットが存在しないことが明らかとなった。また、野生型マウスの腹腔細胞の IL-10 の産生能は、週齢を追うごとに上昇していた。すなわち、新規 B-1 細胞サブセットは成長の過程で出現し、SPA-1 KO マウスではその分化能に異常が生じていることが示唆された。

そこで、野生型マウスの腹腔細胞を表面マーカーの違いにより細かく分離し、セルソーターにより回収、5 日間培養した後、その表面分子の発現についてフローサイトメトリーで解析した。その結果、他の細胞集団と異なり、新規 B-1 細胞サブセットは回収時とは異なる発現パターンを示すことが明らかになった。さらに、新規 B-1 細胞サブセットを含む B 細胞が存在しない Rag2 KO マウスへの細胞移入実験を試みたところ、新規 B-1 細胞サブセットは腹腔内に定着し、やがてその表面マーカーが変化することも観察された。以上の結果から、新規 B-1 細胞サブセットは成長の過程で他の細胞から分化してくるのではなく、成長に伴って分化能を失った細胞が新規 B-1 細胞サブセットである可能性が示された。そして、SPA-1 は分化を抑える何らかの働きをしているため、SPA-1 KO マウスでは分化が止まらず、どの週齢においても新規 B-1 細胞サブセットが存在しなかったと考えられる。今後、SPA-1 の発現が加齢に伴ってどのように変化しているのかをより詳細に解析する必要がある。

最後に、PCR やフローサイトメトリー解析により新規 B-1 細胞サブセットをより詳細に解析した結果、インテグリンや PD-L2 の発現がやや高く、B 細胞の分化に関わる転写因子の発現が低い傾向にあることがわかった。今後、マイクロアレイ等による解析を行い、

SPA-1 との関連を明らかにすることが必要である。

私たちの体に備わる免疫システムは、複雑かつ厳密にバランスが保たれている。その仕組みを理解し、応用することにより様々な治療法が開発されている。また、炎症反応は、過剰になると生体にとって有害であるが、本来は必須の防御反応である。通常は生体への傷害を抑えるためのフィードバック機構が上手く機能しており、炎症反応を抑える働きをもつ細胞もいくつか報告されている。新規 B-1 細胞サブセットがこのような抗炎症作用を有する細胞である可能性は充分にある。そして SPA-1 はその細胞の分化を制御している可能性が考えられる。本研究で新規 B-1 細胞サブセットによる治療効果を明らかにすることはできなかったが、今後、様々な病態における新規 B-1 細胞サブセットの役割が明らかになることで、この細胞を利用した新たな治療法が開発されることが期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 幸子 (WATANABE, Sachiko)
自治医科大学 医学部 助教

研究者番号：80770619

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()