

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07528

研究課題名(和文) Toll様受容体を標的とした制御性B細胞誘導による多発性硬化症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy for multiple sclerosis via induction of regulatory B cells targeting Toll-like receptor

研究代表者

越智 博文(Ochi, Hirofumi)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20325442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、リポ多糖(LPS)によるToll様受容体4(TLR4)刺激によってIL10産生制御性B細胞が誘導されること、再発期MSでは寛解期MSに比較して、脳脊髄液中のLPS濃度とLPS-binding protein(LBP)濃度が低下していること、MS脳脊髄液中ではLPS濃度とLBP濃度は正の相関関係にあることを見出した。さらに、内在性TLR4リガンドのうち、high mobility group box-1 protein(HMGB1)がLPSと同様にIL10産生制御性B細胞を誘導すること、対照変性疾患に比較してMS脳脊髄液中ではHMGB1濃度が高いことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、LPSがLBPと結合してTLR4を刺激することでIL10産生制御性B細胞が誘導され、再発期MSでは消費性に脳脊髄液中のLPSやLBPの濃度が低下している可能性が示唆された。一方で、HMGB1もIL10産生制御性B細胞を誘導することはできるものの、HMGB1を中和することでMS動物モデルの軽症化が生じることから、TLR2や終末糖化産物受容体(RAGE)を介して炎症を増幅することで疾患促進的に作用する可能性が考えられる。したがって、効率よくIL10産生制御性B細胞を誘導するためには、B細胞上のTLR4をより選択的に刺激することが重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The new findings of this study are: (1) toll-like receptor 4(TLR4) stimulation with lipopolysaccharide(LPS) induced IL-10-producing regulatory B cells, (2) the level of LPS in the cerebrospinal fluid(CSF) of multiple sclerosis(MS) at relapse was lower than that in remission, (3) the level of LPS-binding protein in the CSF of MS at relapse was also lower than that in remission, and (4) there was a positive correlation between the levels of LPS and LPS-binding protein in the CSF of MS. Furthermore, we found that (5) TLR4 stimulation with high mobility group box-1 protein(HMGB1) induced IL-10-producing regulatory B cells and (6) the level of HMGB1 in the CSF of MS was higher than that of other neurodegenerative central nervous system diseases.

研究分野：神経内科学

キーワード：多発性硬化症 Toll様受容体4 制御性B細胞 IL10 リポ多糖 リポ多糖結合蛋白質 HMGB1

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は再発と寛解を繰り返す中枢神経の慢性炎症性脱髄疾患である。中枢神経髄鞘抗原に対する T 細胞が介在する自己免疫疾患と考えられてきたが、B 細胞除去療法が再発予防に有効であることから、B 細胞が病態悪化に寄与していることが事実となった(1-4)。一方、B 細胞には IL10 を産生し免疫反応を制御する制御性 B 細胞の存在が指摘されている(5, 6)。さらに、B 細胞の分化や生存に重要な BAFF (B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family) /APRIL (a proliferation-inducing ligand) を阻害するアタキセプトは、MS の病態を悪化させることが報告されている(7)。このことは、B 細胞は MS 病巣形成に促進的に作用するほか、病態改善にも寄与していることを示唆している。したがって、B 細胞を標的としたより効果的な MS 治療法を開発するためには、病態の悪化に關与する B 細胞のみを選択的に除去する新たなアプローチとともに、制御性 B 細胞の誘導を目指した新たな免疫細胞療法の開発が必要と考えられる。

2. 研究の目的

我々は、再発期 MS では Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 4 と CD40 を介した共刺激によって IL10 産生 B 細胞が増加することを明らかにし、CD40 と TLR4 を介する B 細胞シグナルが再発期 MS の寛解誘導とその維持に關与する可能性を指摘した(8)。そして、CD40 と TLR4 を介する刺激によって誘導される IL10 産生制御性 B 細胞を標的とした新たな MS 治療法の開発が可能であると考えた。そこで本研究では、(1) IL10 産生制御性 B 細胞を効率よく誘導する TLR4 の内因性リガンドを見出すこと、(2) 疾患の悪化に關与する B 細胞を効率よく除去し、制御性 B 細胞のみを選択的に分離するために、CD40 と TLR4 を介した刺激によって誘導される IL10 産生制御性 B 細胞の表面タンパク質の表現型を決定すること、そして最終的に、(3) IL10 産生制御性 B 細胞の機能制御を介した MS の新規免疫細胞療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 末梢血単核球からの B 細胞分離: FicoII を用いた密度勾配遠心分離によって全血サンプルから末梢血単核球を分離した。その後、磁性ビーズを用いて CD19 陽性細胞を末梢血単核球からポジティブ分離することで B 細胞を分離した。

(2) CD40 と TLR4 を介する刺激によって誘導される IL10 産生 B 細胞の表面マーカーの同定: 分離した B 細胞を CD40 ligand とリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) によって共刺激を行ない、誘導された IL10 産生 B 細胞の表面抗原をフローサイトメトリー法によって解析した。

(3) IL10 産生制御性 B 細胞を誘導する内在性 TLR4 リガンドの同定: TLR4 は微生物由来の LPS 以外にも、自己の細胞が傷害された時に放出される様々な内在性分子を認識する。これまでに、種々の heat-shock protein や high mobility group box-1 protein (HMGB1) などの細胞質タンパク質、fibronectin などの細胞外マトリックス、fibrinogen、fatty acid、LDL、tenascin-C などが内在性リガンドとして報告されている。MS 再発期には、組織傷害に伴いこれらの分子が放出され、B 細胞にシグナルを伝達する可能性が考えられる。そこで、CD40 ligand と既知の内在性リガンドで B 細胞を刺激し、IL10 産生 B 細胞が誘導できるかフローサイトメトリー法で検討した。

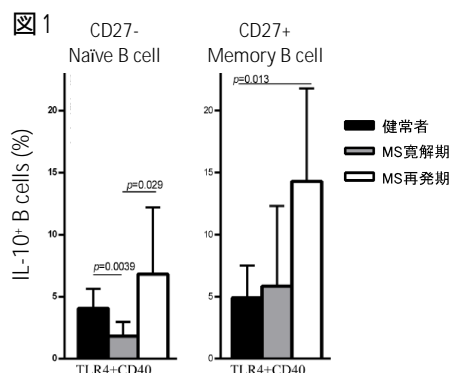
(4) LPS・LPS-binding protein (LBP)・HMGB1 濃度の測定: 脳脊髄液中の LPS、LBP、HMGB1 の各濃度を ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

本研究により以下のことが明らかとなった。

(1) CD40 と TLR4 を介する刺激によって誘導される IL10 産生 B 細胞の表面マーカー: CD40 と TLR4 の共刺激によって誘導され、再発期 MS で増加する IL10 産生 B 細胞は、memory 分画のみならず naïve 分画にも存在する過去に報告のないユニークな細胞集団であることが明らかとなった(図 1)。しかし、現時点では、この細胞集団を特徴付ける特異な表面抗原は明らかになっていない。

(2) IL10 産生制御性 B 細胞を誘導する内在性 TLR4 リガンド: 微生物由来の LPS 以外にも、HMGB1 による TLR4 刺激によって IL10 産生制御性 B 細胞が誘導されることを見出した。また、対照変性疾患に比較して MS の脳脊髄液中では HMGB1 濃度が高かった。このことは、再発寛解型 MS の末梢血単核球では HMGB1 mRNA の発現が高い(9)、MS 脳脊髄液中では健常者に比較して HMGB1 や IL6、IL17 の濃度が高い(10)、血清や脳脊髄液中の HMGB1 濃度は MS リスクと相関する(11)、などの既報告と一致するものであ



った。しかし、HMGB1 は血液脳関門の破綻と炎症関連分子の誘導に働き、樹状細胞の活性化や T 細胞の増殖、また Th1 偏倚を促進することで脳内の炎症を加速することが報告されている(12)。さらに、HMGB1 を中和することで MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎の軽症化が生じるとの既報告がある(12)。これらのことから、炎症や組織傷害に伴い細胞外に放出された HMGB1 は、TLR4 を介して制御性 B 細胞を誘導するよりむしろ、TLR2 や終末糖化産物受容体 (receptor for advanced glycated end-product : RAGE) を介して炎症を増幅することで疾患促進的に作用しているのではないかと考えられる。

(3) 脳脊髄液中の LPS と LBP 濃度 : 再発期 MS では寛解期に比較して、脳脊髄液中の LPS 濃度が低く(図 2) LPS に結合する LBP 濃度が低下(図 3) していることを見出した。さらに、MS 脳脊髄液中では LPS 濃度と LBP 濃度が正の相関関係にあることも見出した(図 4)。再発期 MS では LPS による TLR4 刺激によって IL10 産生制御性 B 細胞が誘導されること、LPS はまず LBP と結合、その後さらに可溶性 CD14 と結合することで TLR4 を刺激することから、再発期 MS では消費的に脳脊髄液中の LPS や LBP の濃度が低下している可能性が考えられた。以上のことから、効率よく IL10 産生制御性 B 細胞を誘導するためには、B 細胞上の TLR4 をより選択的に刺激することが重要であると考えられた。そこで我々は現在、歯周病原細菌に由来する TLR4 に着目して、IL10 産生制御性 B 細胞を効率よく誘導する研究を進めている。

歯周病原細菌は数百種類に及ぶが、*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* の 3 菌種は歯周病原性が強い red complex 細菌と呼ばれ、歯周病の病態形成に強い影響を及ぼしている。このうち、*T. forsythia* と *T. denticola* に由来する LPS は TLR4 を活性化するが、*P. gingivalis* 由来の LPS は TLR2 を活性化する一方で、TLR4 のアンタゴニストとして作用する(13)。このことから、口腔内細菌叢を形成する菌種によって誘導される免疫応答が異なり、*P. gingivalis* に由来する LPS は他の細菌の認識を抑制することで、これらの細菌に対する免疫応答を抑制している可能性が考えられる。そこで本研究を進展させる形で今後は、歯周病原細菌による TLR4 を介した MS 病態の修飾機構を明らかにすることを目的に、MS 患者を対象に歯周病原細菌検査を実施し、口腔内バイオフィーム特性と各種臨床指標、サイトカインバランスや IL10 産生制御性 B 細胞の免疫動態との関連を検討することで、本研究の目的である IL10 産生制御性 B 細胞の機能制御を介した MS の新規治療法の開発に繋げていきたい。

肥満形成における腸内細菌叢の役割が科学的に示されて以降(14, 15)、腸内細菌叢の構成異常 (dysbiosis) が我々の健康に大きな影響を及ぼしていること、また、糖尿病や動脈硬化性疾患、非アルコール性脂肪肝疾患、関節リウマチ、炎症性腸疾患、うつなど、様々な疾病の発症や進展に大きく関連していることが次々に明らかとなってきた。一方、口腔内にも口腔フローラと呼ばれる細菌叢が存在することから、口腔内細菌叢と全身性疾患との関連が注目されるようになり、口腔内細菌叢の dysbiosis が歯や歯周病を引き起こすのみならず、糖尿病(16)や動脈硬化性疾患(17)、脳卒中(18)の発症や進展に悪影響を及ぼしていることが報告されている。さらに最近では、歯周病原細菌の一つである *P. gingivalis* が peptidyl arginine deiminase (PAD) の産生を介して関節リウマチの発症に(19)、また、血液脳関門を通過して脳内でタンパク質分解酵素 gingipain を産生・分泌することでアルツハイマー病の発症に関わっていることも報告されている(20)。しかし、口腔内細菌叢の dysbiosis や歯周病原細菌と MS 病態との関連を指摘した報告はない。腸内細菌叢と比較して、口腔内細菌叢は抗菌療法を含む歯科治療や口腔ケアによって比較的容易に変化しうると考えられる。このことから、歯周病原細菌が TLR4 を介して MS 病態を修飾する免疫機序を明らかにすることで、口腔内バイオフィームの制御を介した新たな MS の治療戦略、ひいては IL10 産生制御性 B 細胞の機能制御を介した MS の新規治療法の開発につながる事が期待できる

< 引用文献 >

1. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion

図 2

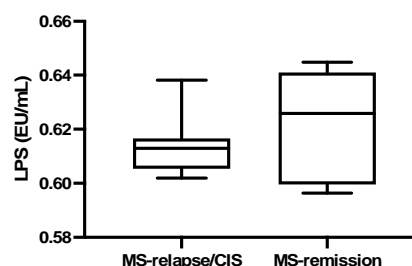


図 3

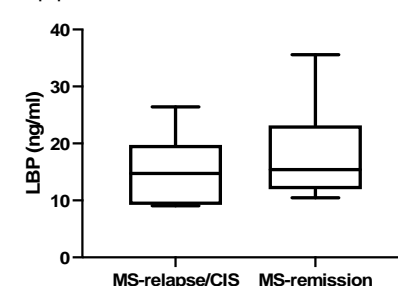
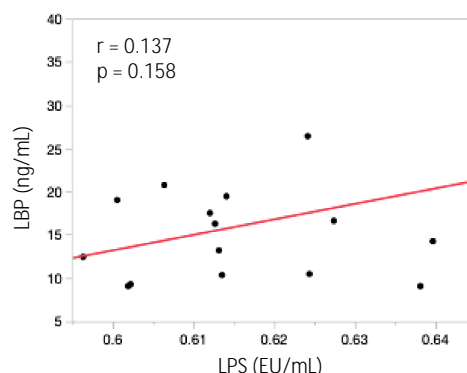


図 4



- with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2008;358(7):676-88.
2. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376(3):209-20.
 3. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376(3):221-34.
 4. Hauser SL, Bar-Or A, Cohen JA, Comi G, Correale J, Coyle PK, et al. Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2020;383(6):546-57.
 5. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 2010;32(1):129-40.
 6. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol.* 2010;67(4):452-61.
 7. Kappos L, Hartung HP, Freedman MS, Boyko A, Radu EW, Mikol DD, et al. Atacicept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2014;13(4):353-63.
 8. Okada Y, Ochi H, Fujii C, Hashi Y, Hamatani M, Ashida S, et al. Signaling via toll-like receptor 4 and CD40 in B cells plays a regulatory role in the pathogenesis of multiple sclerosis through interleukin-10 production. *J Autoimmun.* 2018;88:103-13.
 9. Malhotra S, Fissolo N, Tintore M, Wing AC, Castillo J, Vidal-Jordana A, et al. Role of high mobility group box protein 1 (HMGB1) in peripheral blood from patients with multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2015;12:48.
 10. Wang H, Wang K, Wang C, Xu F, Zhong X, Qiu W, et al. Cerebrospinal fluid high-mobility group box protein 1 in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation.* 2013;20(2):113-8.
 11. Zhen C, Wang Y, Li D, Zhang W, Zhang H, Yu X, et al. Relationship of High-mobility group box 1 levels and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;31:87-92.
 12. Paudel YN, Angelopoulou E, C BK, Piperi C, Othman I. High mobility group box 1 (HMGB1) protein in Multiple Sclerosis (MS): Mechanisms and therapeutic potential. *Life Sci.* 2019;238:116924.
 13. Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Campylobacter jejuni* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infect Immun.* 2002;70(1):218-25.
 14. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-31.
 15. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444(7122):1022-3.

16. Teeuw WJ, Gerdes VE, Loos BG. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2010;33(2):421-7.
17. Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med*. 2008;23(12):2079-86.
18. Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Dorn JP, Falkner KL, Sempos CT. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. *Arch Intern Med*. 2000;160(18):2749-55.
19. Sandhya P, Danda D, Sharma D, Scaria V. Does the buck stop with the bugs?: an overview of microbial dysbiosis in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2016;19(1):8-20.
20. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv*. 2019;5(1):eaau3333.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤井 ちひろ (Fujii Chihiro) (00516065)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (24303)	
研究分担者	岡田 洋一郎 (Okada Yoichiro) (10808356)	関西医科大学・医学部・研究医員 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関