

令和 3 年 4 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15269

研究課題名(和文) 腫瘍免疫における制御性B細胞の役割および作用機序についての解析

研究課題名(英文) Analysis of the role and mechanism of regulatory B cells 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、制御性B細胞の悪性黒色腫に対する役割を解析した。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悪性黒色腫が増大し、腫瘍に浸潤する制御性B細胞も増加していた。腫瘍に浸潤する制御性B細胞の大部分はB1a B細胞であった。野生型マウスまたはIL-10欠損マウス由来のB1a B細胞を野生型マウスに移入したところ、野生型マウス由来のB1a B細胞を移入した群では腫瘍増生が増大した。以上より、腫瘍に浸潤したB1a B細胞はIL-10を産生することで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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、B細胞のサブセットである制御性B細胞はIL-10を産生することで悪性黒色腫に対する腫瘍免疫反応を抑制していることが示された。このことから、制御性B細胞およびIL-10が悪性黒色腫の新規治療開発のための標的になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In tumor immunity, the participation of IL-10-producing regulatory B cells (Bregs), which play an important role in suppressing immune responses, is unclear. In this study, we demonstrated an increase in B16F10 melanoma growth in B cell-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice in which Bregs were expanded. The number of tumor-infiltrating Bregs significantly increased in B cell-specific PTEN-deficient mice. More than 50% of tumor-infiltrating B cells consisted of Bregs, predominantly CD19+CD5+CD43+ B1a Bregs, in both B cell-specific PTEN-deficient and control mice. Adoptive transfer of B1a B cells from WT mice, but not IL-10^{-/-} mice, exacerbated B16F10 melanoma growth. The current study indicates that B1a Bregs negatively regulate anti-melanoma immunity by producing IL-10. Therefore, B1a Bregs can be a potentially novel target for immunotherapy of melanomas.

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 腫瘍免疫 IL-10 B1a B細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。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 細胞の存在が知られており、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も病勢を抑制する役割を担っていることが示されている。申請者は以上の結果を踏まえ、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することとした。

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 ($CD19^{cre/wt}PTEN^{loxP/loxP}$ 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 ($CD19^{cre/wt}$ 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た (図 1)。さらに、B 細胞特異的 *PTEN* 欠損マウスでは悪性黒色腫の増生が野生型マウスに比べて有意に増大することも確認した (図 2)。これらの準備実験により、悪性黒色腫に対する腫瘍免疫反応において制御性 B 細胞は抑制的に機能していると推察できる。

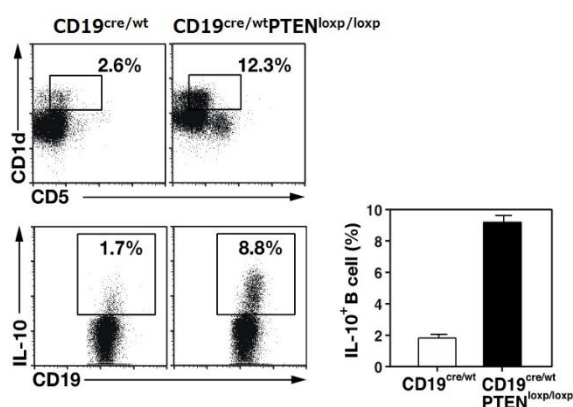


図 1: B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスおよびコントロールマウスにおける制御性 B 細胞

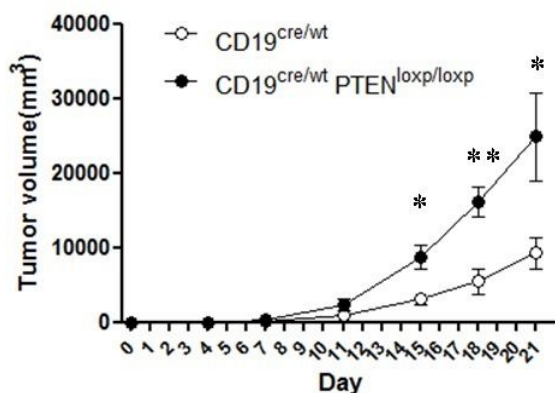


図 2: B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスおよびコントロールマウスの悪性黒色腫の増生

2. 研究の目的

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス ($CD19^{cre/wt}PTEN^{loxP/loxP}$ 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) B1a B 細胞および非 B1a B 細胞と T 細胞の共培養について

B16F10 メラノーマ細胞を皮下注射した B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスの脾臓を採取し、この組織から磁気細胞分離装置を用いて $CD5^+$ B1a B 細胞および $CD5^-$ 非 B1a B 細胞を抽出した。それぞれを *in vitro* で T 細胞と共培養 (36 時間) した。その際、放射線照射処理 (7000 rads) した B16F10 メラノーマ細胞を添加した場合と、添加しない場合の 2 通りの共培養条件を設定した。そのうえで T 細胞における IFN- γ および TNF- α の産生能をフローサイトメトリーで解析した。

(2) 腫瘍に浸潤するリンパ球解析について

B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス ($CD19^{cre/wt}PTEN^{loxP/loxP}$ マウス) およびコントロールマウス ($CD19^{cre/wt}$ 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、フローサイトメトリーで解析した。B 細胞に関しては IL-10 産生細胞 (= 制御性 B 細胞) およびサブセット (follicular B 細胞、marginal zone B 細胞、B1a B 細胞) も解析した。

(3) B1a B 細胞の移入実験について

磁気細胞分離装置を用いて野生型マウスおよび IL-10 欠損マウスの脾臓からそれぞれ B 細胞を抽出し、さらにそこから B1a B 細胞 ($CD1d^{int}CD5^+$ B 細胞) をセルソーターにて抽出した。これらを B16F10 メラノーマ細胞と混合し野生型マウスに移入してメラノーマの増生を観察した。

(4) 統計学的解析について

すべてのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で示した。2 群間の比較では t 検定を用い、3 群間以上の比較では多重比較検定を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) B1a B 細胞および非 B1a B 細胞と共培養した T 細胞のサイトカイン産生能の解析

放射線照射処理した B16F10 メラノーマ細胞を添加した場合、CD5⁻ 非 B1a B 細胞と共培養した CD8⁺ T 細胞における IFN- γ および TNF- α の産生は、CD5⁺ B1a B 細胞と共培養した場合および共培養しなかった場合と比べて有意に亢進していた (図 3A)。一方で、放射線照射処理した B16F10 メラノーマ細胞を添加した場合の CD4⁺ T 細胞では、CD5⁺ B1a B 細胞・CD5⁻ 非 B1a B 細胞いずれかと共培養した場合、もしくは共培養しなかった場合のいずれにおいても IFN- γ および TNF- α の産生に有意差はなかった (図 3B)。B16F10 メラノーマ細胞を添加しなかった場合には、CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞における IFN- γ および TNF- α の産生は、CD5⁺ B1a B 細胞・CD5⁻ 非 B1a B 細胞いずれかと共培養しても、共培養しなかった場合と比べて有意差はなかった (図 3C, D)。

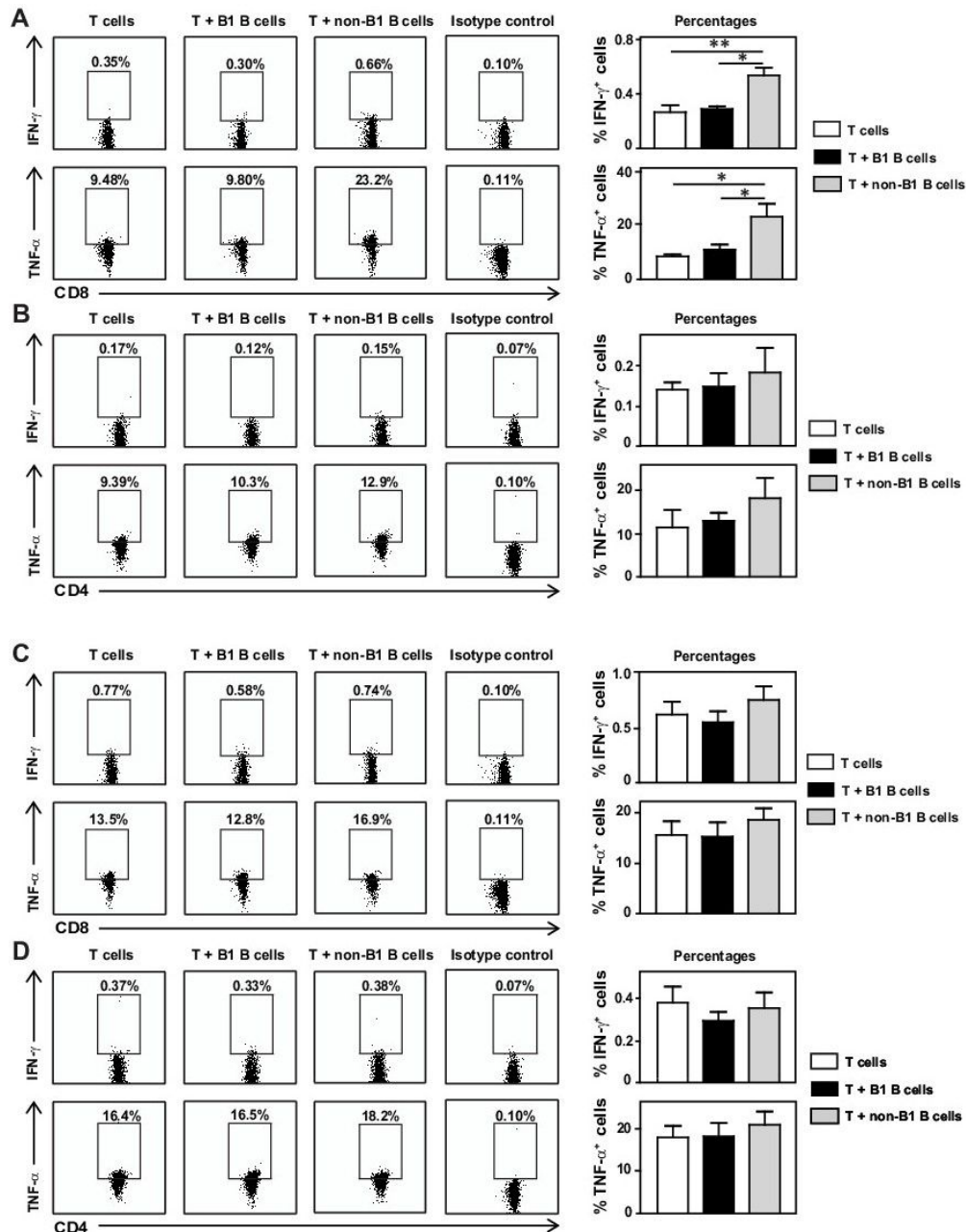


図 3: T 細胞のサイトカイン産生能の解析 (A, B: 放射線照射した B16F10 メラノーマ細胞の添加あり, C, D: B16F10 メラノーマ細胞の添加なし)

(2) 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 CD19⁺B220⁺ B細胞の絶対数がコントロールマウスに比べて増加していた。一方で CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、CD4⁺CD25⁺ 制御性 T細胞、NK1.1⁺CD3⁻ NK細胞の絶対数に関しては B細胞特異的 PTEN 欠損マウスとコントロールマウスの間に有意差はなかった。このことから B細胞特異的 PTEN 欠損マウスではコントロールマウスと比べて B16F10 メラノーマが増悪する要因として、腫瘍に浸潤する B細胞が重要ではないかと考えた。そこで、腫瘍に浸潤する B細胞についてフローサイトメトリーで詳しく解析した。その結果、B細胞特異的 PTEN 欠損マウスおよびコントロールマウスいずれにおいても末梢血における B細胞は主に follicular B細胞 (CD1d^{int}CD5⁻ B細胞) で構成されるのに対し、腫瘍に浸潤する B細胞は主に B1a B細胞 (CD1d^{int}CD5⁺ B細胞) で構成されていた (図 4a)。また、B細胞特異的 PTEN 欠損マウスではコントロールマウスと比べて IL-10⁺ B細胞 (制御性 B細胞) の絶対数が増加していた (図 4b 上段)。この制御性 B細胞の 90%以上は B細胞特異的 PTEN 欠損マウスおよびコントロールマウスいずれにおいても CD1d^{int}CD5⁺ の表現型を有する B1a B細胞であった (図 4b 下段)。

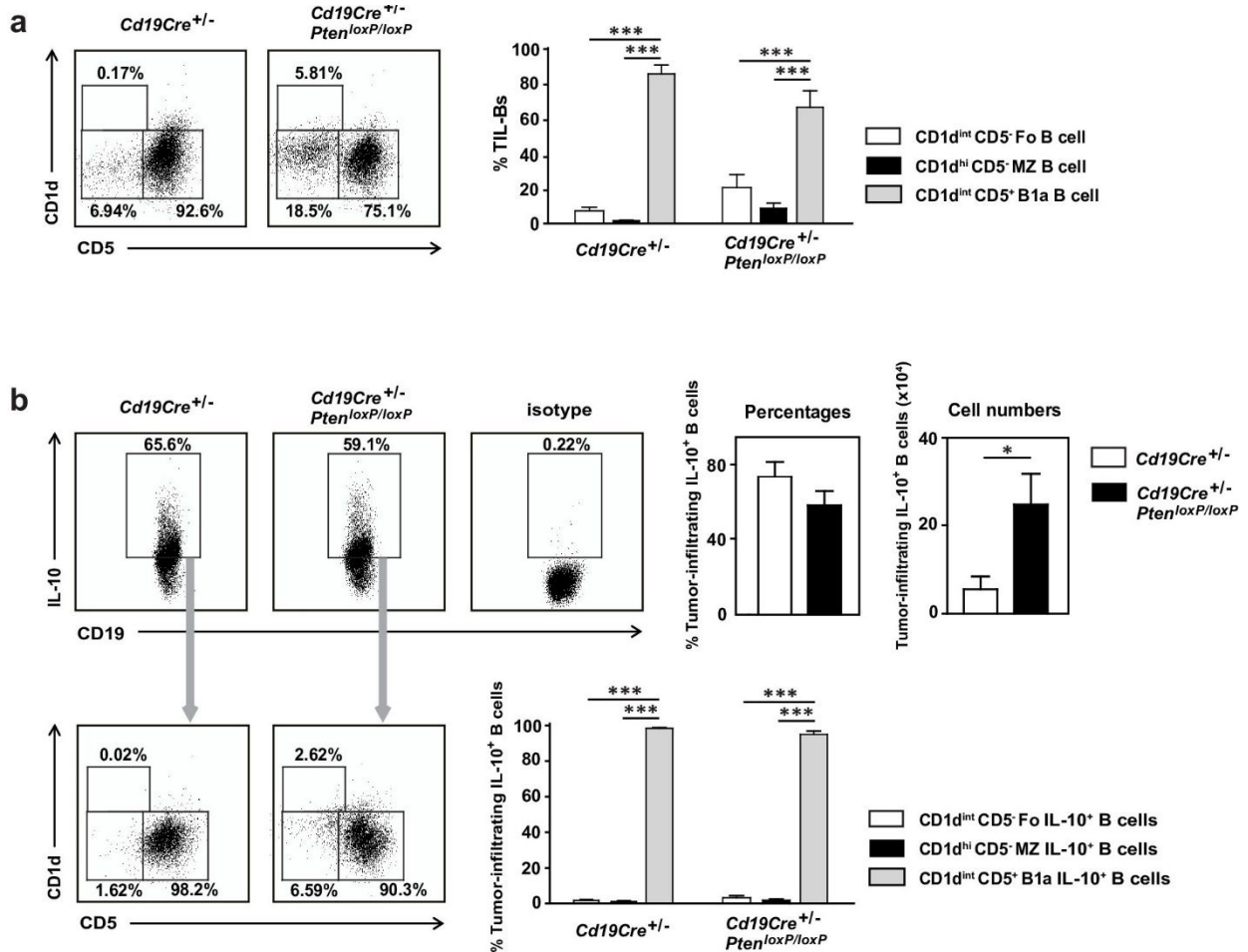


図 4 : 腫瘍に浸潤した B細胞のサブセット解析

(3) 腫瘍に浸潤する B細胞のサブセット同定方法についての確認実験

一般的に B細胞のサブセットは CD5、CD21、CD23、CD43 といった細胞表面マーカーを用いて CD21^{int}CD23^{hi} follicular B細胞、CD21^{hi}CD23^{lo} marginal zone B細胞、CD5⁺CD43⁺ B1a B細胞に分類される。一方、本研究では CD1d と CD5 を用いて follicular B細胞 (CD1d^{int}CD5⁻)、marginal zone B細胞 (CD1d^{hi}CD5⁻)、B1a B細胞 (CD1d^{int}CD5⁺) を同定した。このため上述した 2 つの同定方法の一致性についてフローサイトメトリーを用いて確認した。その結果、follicular B細胞の同定に関しては CD1d^{int}CD5⁻ B細胞集団と CD21^{int}CD23^{hi} B細胞集団の一致性が確認できた。marginal zone B細胞の同定に関しては、CD1d^{hi}CD5⁻ B細胞集団と CD21^{hi}CD23^{lo} B細胞集団の一致性が確認できた。B1a B細胞の同定に関しては、CD1d^{int}CD5⁺ B細胞集団と CD5⁺CD43⁺ B細胞集団の一致性が確認できた。これらの一致性は B細胞特異的 PTEN 欠損マウスおよびコントロールマウスいずれにおいても確認した (図 5)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tadahiro Kobayashi, Kyosuke Oishi, Ai Okamura, Shintaro Maeda, Akito Komuro, Yasuhito Hamaguchi, Manabu Fujimoto, Kazuhiko Takehara, and Takashi Matsushita	4. 巻 139
2. 論文標題 Regulatory B1a Cells Suppress Melanoma Tumor Immunity via IL-10 Production and Inhibiting T Helper Type 1 Cytokine Production in Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1535-1544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2019.02.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林忠弘、松下貴史、濱口儒人、藤本学、竹原和彦
2. 発表標題 悪性黒色腫における制御性B細胞の役割についての解析
3. 学会等名 第34回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadahiro Kobayashi, Takashi Matsushita, Yasuhito Hamaguchi, Manabu Fujimoto, and Kazuhiko Takehara
2. 発表標題 Tumor-infiltrating CD5+ regulatory B1 cells suppress melanoma tumor immunity via inhibiting cytokine production of tumor-infiltrating CD8+ T cells
3. 学会等名 International Investigative Dermatology 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadahiro Kobayashi
2. 発表標題 Regulatory B1a Cells Suppress Melanoma Tumor Immunity via IL-10 Production and Inhibiting Th1 Cytokine Production by CD8+ T Cells
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第45回年次学術大会・総会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔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
研究協力者	松下 貴史 (Matsushita Takashi) (60432126)	金沢大学・皮膚科・教授 (13301)	

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
---------	---------