

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03645

研究課題名(和文)ターミネーターB細胞を活用した炎症性腸疾患に対する終息戦略の検討

研究課題名(英文)Terminator B cells for IBD therapy

研究代表者

溝口 充志(Mizoguchi, Atsushi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：50258472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫はバランス、そしてバランス、さらにバランスと言っても過言でなく、バランスが崩れると自己免疫疾患やアレルギー疾患を起こしてしまう。これまでの多くの研究は、病気の悪玉となる細胞に焦点があてられ、悪玉を倒す事により病気を治すという概念が主流であった。本研究では、悪玉細胞でなく、バランスを保つ細胞に着目し、免疫のバランスを維持する事により悪玉細胞を生まれさせなくする方法を模索する。これにより、本邦で右肩上がりに増え続け、一生涯付き合わないといけない炎症性腸疾患対し、一生涯付き合わなくともすむような「完治」を導く治療戦略開発の糸口につながる基盤の形成を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫バランスの維持に寄与しながらも、研究の歴史が浅い「Preg」と「NKB」と呼ばれる細胞に着目し、マウスを用いた実験系で、これらの細胞が「どのようにして生まれ」そして「何によって抑制」されるかを解明した。これまで発見されている細胞群とは異なり、これらの細胞は環境因子に依存して多様性を持って生まれる事を見出し、学術的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Immune responses are preserved by delicate balance of various cell types and cytokines to prevent the development of autoimmune diseases and allergy. Majority of previous studies for developing therapeutic approaches against these diseases have focused on targeting the pathogenic cell populations. In contrast, we herein focus on immune regulatory B cells and plasma blasts to preserve immune balance, which can prevent the development of pathogenic cells and also induce the termination of inflammatory responses in inflammatory bowel disease that is increasing continuously in Japan. We hope this project, if fully completed, would provide a novel insight into the development of an innovative therapeutic strategy that aims to complete cure rather than induction and maintenance of remission for inflammatory bowel disease.

研究分野：腸管免疫

キーワード：炎症性腸疾患 ターミネーションB細胞 Breg細胞 Preg細胞 NKB細胞 インターロイキン10 インターロイキン12 双方向性分化

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

病原体などの排除のために活性化された免疫反応は、自己への攻撃のリスクを回避するため自然に終息するようにプログラムされている(1)。一方、これまでの炎症性腸疾患(IBD)に関する多くの研究は免疫活性、免疫抑制、粘膜治癒などの機序解明に重点がおかれ、免疫反応の自然終息すなわち「ターミネーション」については不明瞭な現状である。

免疫抑制細胞として制御性 T 細胞(Treg)が有名である。しかし、B 細胞は抗体産生に加えて、種々のサイトカインを産生して Treg のように免疫抑制に寄与するサブセットが存在する事が明らかとなっている(2)。免疫抑制に寄与する B 細胞としては IL-10 を産生する制御性 B 細胞(Breg)を我々は 2002 年に同定し(3) その後、多くの疾患で報告されている。また、抗原特異的に成熟した形質芽細胞の中にも IL-10 を産生し免疫抑制に寄与する制御性形質芽細胞(Preg)が存在することも報告されている(4)。また、IL-12 を産生する B 細胞が腸炎の抑制に寄与する事を我々は 2007 年に報告し(5) その後ナチュラルキラー様 B (NKB) 細胞と命名されている(6)。

2. 研究の目的

IBD は潰瘍性大腸炎(UC)とクローン病(CD)に分類される。IL-10 の欠失が腸炎発症を惹起する事は IL-10 関連遺伝子異常の early onset of IBD 患者からも明らかである。本研究では、抗原特異的に IL-10 を産生する制御性形質芽細胞(Preg)が炎症の終息促進に貢献する可能性、および Preg の分化機序の解明を目的とする。IL-12 は IFN- γ 産生 Th1 細胞の分化を誘導して免疫活性に働くことは周知であるが、逆に Th1 反応を終息させる機能もあることが報告されている(7)。生理の消退出血を導く黄体形成ホルモンのサージのように、過剰な IL-12 への暴露は Th1 細胞のクロマチンリモデルを誘導し IFN- γ に加えて IL-10 も産生できるようになる。この IL-12 の過剰産生に誘導される IL-10 が炎症のターミネーションに寄与する事が報告されている(7)。よって、本研究では NKB 細胞が IL-12 の産生を補足することにより IL-12 サージを起こし、IL-10 産生を誘導する事により炎症を終息するという仮説のもとに、NKB 細胞の分化機序の解明を第二の目的とする。「ターミネーション」の機序という新たな概念に着目する事により、現在の IBD 治療の目標である「寛解導入・寛解維持」から「完治」を目指した新たな治療戦略開発のための基盤形成を最終目的とする。

3. 研究の方法

腸炎モデルとして T 細胞受容体 欠失(TCR)マウスと DSS 腸炎モデルを用いた。TCR 欠失マウスを L-10 産生時に緑色蛍光(GFP)を発するレポーターマウスまたは IL-12p40 産生時に黄色蛍光(YFP)を発するレポーターマウスと交配し、種々の B 細胞マーカーと共染色により Preg 細胞と NKB 細胞を FACS 解析で同定した。これらのマウスに、以下の表に示すように、Preg 細胞または NKB 細胞の分化・機能に寄与すると推測される分子を欠失したマウスを交配した。また、B 細胞以外にも発現を認める分子に関しては、CD19cre マウスと更に交配する事により B 細胞に特異的な欠失を誘導した。

マウス	特徴	使用目的
GFP/IL10 x TCR	IL-10産生時に緑色蛍光	Breg/Preg検出
YFP/p40 x TCR	IL-12p40産生時に黄色蛍光	NKB検出
CD19cre x Blimp1 x GFP/IL10 x TCR	形質細胞の分化が阻害	Pregの分化が阻害
CD19cre x STAT3 x GFP/IL10 x TCR	B細胞のSTAT3が欠失	Pregの機能？
AID x GFP/IL10 x TCR	クラススイッチが欠失	Pregの活性化阻害
IL4R x YFP/p40 x TCR	IL-4依存のSTAT6が欠失	NKBの抑制阻害？

これらのマウスの各臓器における Breg 細胞、Preg 細胞、NKB 細胞を解析し、分化・機能に関与する分子の同定を行った。腸炎発症を検討し、各細胞群の腸炎における役割を検討した。また、single cell RNA sequence 法を用いて各細胞の特徴と関連性を検討するとともに、腸炎を発症したマウスに対して細胞移入実験を行い、腸炎下における各細胞群の役割と関連性を検討した。

4. 研究成果

(1)問題点と克服

マウスコロニー：令和 2 年に始まった COVID-19 のパンデミックにより、動物センター職員の人件確保が難しくなる可能性があったため、マウスコロニーの削減が依頼され、約 25% の削減を夏季に行った。細胞移入実験では、ドナーとレシピエントが必要なうえ、移入のための細胞精製にも多くのドナーを必要とする。よって、同時期に多くの匹数を必要とする細胞移入を基本とする実験系は先送りし、一度に多くの匹数を必要としない実験系から開始した。また、令和 3 年度に計画されたマウス匹数を必要とする実験系の代わりに、匹数を抑えられる single cell RNA sequence を用いた実験系を行った。第 1 波の非常事態宣言解除後から早急にマウスコロニーの

回復に努めたが、レシピエントとして用いる CD19cre x Blimp1 x GFP/IL-10 x TCR マウスの繁殖が不良であった。解析の結果、CD19cre x Blimp1 x GFP/IL-10 x TCR マウスは、加齢に伴い B 細胞リンパ腫を発症する事を認めた。よって、ブリーディングペアをヘテロザイガスに変更し、ペア数も大幅に増やして対処し、令和 4 年度の後半に細胞移入実験が実現可能となった。

問題点から得られた新たな知見：リンパ腫を発症した CD19cre x Blimp1 x GFP/IL-10 x TCR マウスでは著名な肝脾腫を認め、幼若 B 細胞の IL-10 (GFP) 産生が認められた。一方、腸炎を発症しない CD19cre x Blimp1 x GFP/IL-10 マウスではリンパ腫の発症を認めなかった。よって、炎症下において、Breg 細胞の Preg 細胞への成熟・分化が阻害されると B 細胞リンパ腫の発症につながる可能性が示唆された。

(2) Preg 細胞の分化機序と腸炎における役割

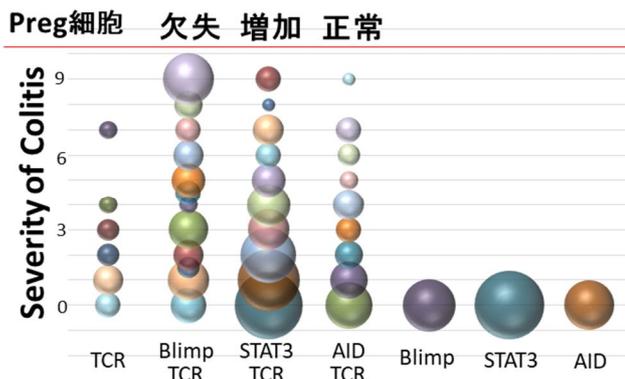


図 1 :

GFP/IL10 x TCR (TCR) マウスに比べて、CD19cre x Blimp1 x GFP/IL10 x TCR (Blimp1 TCR) の腸炎は悪化、CD19cre x STAT3 x GFP/IL10 x TCR (STAT3 TCR) の腸炎は改善、AID x GFP/IL10 x TCR (AID TCR) の腸炎に変化は認めなかった。TCRと交配していない、CD19cre x Blimp1欠失 (Blimp)、CD19cre x STAT3 欠失 (STAT3)、AID欠失 (AID) マウスには腸炎の発症を認めなかった。円の大きさは、各重症度のマウス数を反映する。

Blimp1: Blimp1 は B 細胞の形質細胞への分化を担う転写因子であるが、T 細胞も発現する事が報告されている。よって、B 細胞特異的な Blimp1 欠失マウスを用いた。CD19cre x Blimp1 x GFP/IL-10 x TCR マウスにおいて Preg 細胞の欠失を認め、Preg 細胞は未成熟 B 細胞マーカーである CD93 を発現しているにも関わらず、形質芽細胞由来と考えられた。また、生後 6 ヶ月において、GFP/IL-10 x TCR マウス (n=22) に比べ、CD19cre x Blimp1 x GFP/IL-10 x TCR マウス (n=61) では顕著な腸炎の悪化を認めた (図 1)。これらの結果は、Blimp1 に依存して分化する Preg 細胞が腸炎に対して抑制的に働くことを明らかにした。

AID: B 細胞は activation-induced cytidine deaminase (AID) により IgM から IgG や IgA へのクラススイッチが誘導され活性化する。また、Preg 細胞はクラススイッチ後の IgA を発現している可能性が報告されている (8)。よって、AID x GFP/IL-10 x TCR マウスを作成して、クラススイッチの Preg 細胞分化への必要性を検討した。AID 欠失下においても、Preg 細胞の明らかな変化は認めなかった。腸炎発症も、GFP/IL-10 x TCR マウス (n=22) に比べて、AID x GFP/IL-10 x TCR マウス (n=48) では優位な差を認めなかった (図 1)。また、Preg 細胞は IgM や IgG3 を発現する事も single RNA sequence で確認した。これらの結果は、クラススイッチは Preg 細胞の分化と機能には必須でなく、腸炎に誘導される Preg 細胞は IgA でなく IgG3 を発現している可能性を示唆した。

STAT3: STAT3 は Preg 細胞の分化と機能に必要な可能性が報告されている (9)。よって、B 細胞特異的に STAT3 を欠失した CD19cre x STAT3 x GFP/IL-10 x TCR マウスを作成し解析した。驚くことに、STAT3 の欠失下で Preg 細胞は減少すると推測していたが、CD19cre x STAT3 x GFP/IL-10 x TCR マウスにおいて Preg 細胞は、むしろ増加した。Preg 細胞は腸炎発症により誘導される Inducible phenotype のため、CD19cre x STAT3 x GFP/IL-10 x TCR マウスの匹数を 138 匹に増やし、腸炎の重症度による影響を考慮しながら、詳細に検討を加えた。結果として、STAT3 の欠失下で Preg 細胞は増加する事を確認すると共に、Preg 細胞の増加により腸炎が抑制される事も明らかにした (図 1)。これらの結果は、これまでの報告とは異なり、腸炎において STAT3 は Preg 細胞の抑制因子として寄与している可能性を示唆した。

(3) NKB 細胞の分化機序

IL-12 産生 NKB 細胞が、DSS 誘導の急性腸炎からの回復期に増加し、この細胞の欠失は腸炎の回復を遅らせた。よって、慢性腸炎である UC 様腸炎における NKB 細胞の役割を検討するため、IL-12p40 産生時に YFP を発現する YFP/p40 x TCR マウスを作成して解析した。しかし、NKB 細胞は DSS 腸炎の回復期に比べて、わずかしこ検出できなかった。TCR マウスの腸炎は IL-4 に依存し、IL-4 は IL-12/Th1 カスケードの抑制因子と働くため、IL-4 受容体を欠失した YFP/p40 x TCR マウスを次に作成した。興味深い事に、IL-4R x YFP/p40 x TCR マウスでは NKB 細胞の増加を認めた。これらの結果は、IL-4 依存の STAT6 が NKB 細胞の抑制因子として働くことを示す。また、IL-4R x YFP/p40 x TCR マウスでは腸炎の改善も認めた。

(4) Single cell RNA sequence 解析

単細胞レベルで様々な解析が可能な single cell RNA sequence 解析は新たな発見を様々な分野でもたらしている。よって、Breg 細胞、Preg 細胞、NKB 細胞の委細な解析のため、腸炎を発症した TCR マウスの腸管膜リンパ節と脾臓で single cell RNA sequence 解析を行った。

Breg 細胞、Preg 細胞、NKB 細胞の特徴と関連性 (図 2): 興味深い事に、IL-10 産生 B 細胞と IL-12p35 産生 B 細胞は、通常の B 細胞から構成される cluster #2 と特殊な cluster #1 に存在した。Cluster #2 に存在する IL-10 産生 B 細胞と IL-12p35 産生 B 細胞のどちらも未成熟 B 細胞マーカーである CD38 を発現しており、Breg 細胞と NKB 細胞と考えられた。また、超未熟マーカーである IgD は、NKB 細胞には発現するが、Breg 細胞には発現しなかった。よって、NKB 細胞は Breg 細胞よりも未熟な段階である事を示唆した。また、NKB 細胞の IgD の発現は cluster #1 では消失し、cluster #1 の NKB 細胞は成熟型を反映していると考えられた。Cluster #1 の IL-10 産生 B 細胞では、cluster #2 に比べて B 細胞のマーカーである CD19 の発現が低下しており、Preg 細胞を反映した。また、Cluster #1 の Preg 細胞に IgG3 の発現が認められたが、IgA の発現は認めなかった。これらの結果は、Breg 細胞と未成熟な NKB 細胞は正常 B 細胞と同様の cluster #2 に存在するが、Breg 細胞から分化した Preg 細胞と、成熟した NKB 細胞は、正常の B 細胞とは異なる cluster #1 を形成する事を示した。つまり、Breg 細胞、Preg 細胞、NKB 細胞は lineage-specific な細胞群でなく、通常の B 細胞から環境因子により分化が誘導され、成熟にともない正常 B 細胞とは異なった機能を獲得すると考えられた。興味深い事に、成熟 NKB 細胞には Preg 細胞のマーカーである CD93 が発現しており、炎症の環境因子により NKB 細胞が Preg 細胞へと分化する興味深い可能性が考えられた。

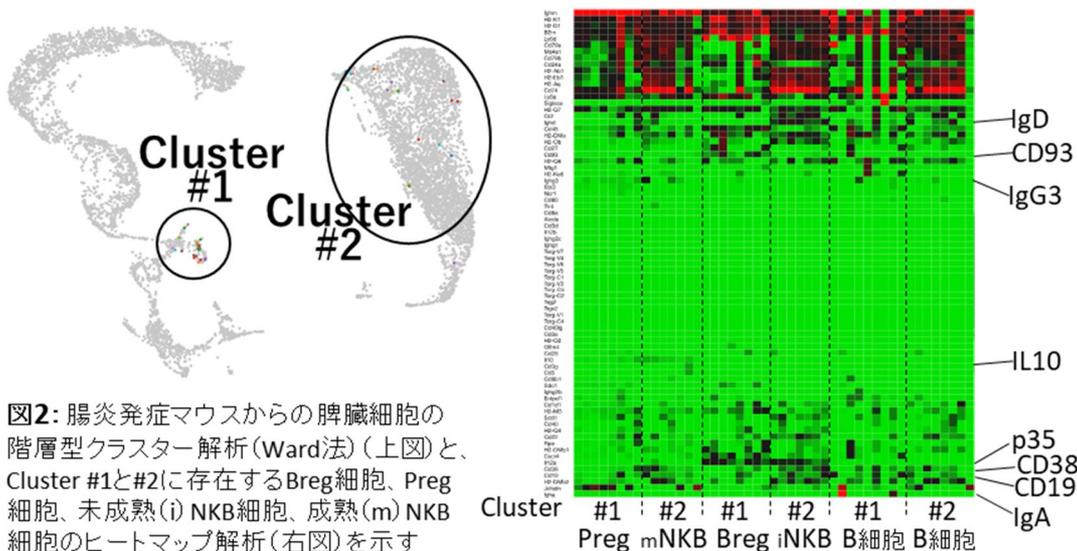


図2: 腸炎発症マウスからの脾臓細胞の階層型クラスター解析(Ward法)(上図)と、Cluster #1と#2に存在するBreg細胞、Preg細胞、未成熟(i)NKB細胞、成熟(m)NKB細胞のヒートマップ解析(右図)を示す

IL-35 (図 3): Cluster #1 には IL-12p35 と EBi3 の発現を認めるが、p40 の発現は認めなかった。よって、cluster #1 の NKB 細胞は IL-12 (p35 と p40 の 2 量体) でなく、IL-35 (p35 と EBi3 の 2 量体) を産生している可能性が考えられた。「(3) NKB 細胞の分化機序」に示すように IL-4 が過剰産生される TCR マウスでは IL-12 を産生する NKB 細胞は認めない。よって、IL-4 の存在下では NKB 細胞は IL-12 でなく IL-35 を産生する可能性も否定はできなかった。また、Preg 細胞が IL-35 を産生する事が報告されており(10)、上記に示した CD93 の発現様式も、Preg 細胞と NKB 細胞は同一の細胞から炎症の環境因子に依存して双方向性の分化をしているという仮説をサポートするのかもしれない。

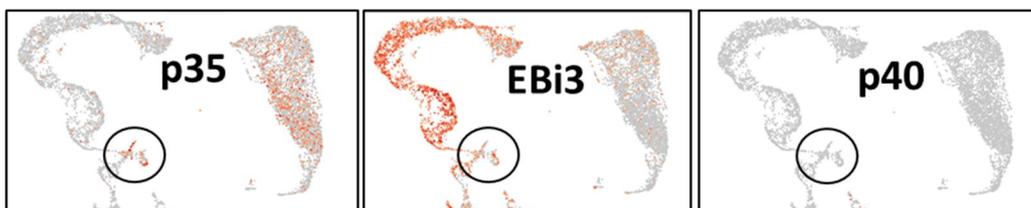


図3: 細胞クラスター別のp35, EBi3, p40発現。発現細胞は赤色。円で囲まれた部位はCluster#1

(5) Breg 細胞、Preg 細胞、NKB 細胞の起源

令和 3 年度までの結果は、Breg 細胞、Preg 細胞、NKB 細胞が同一の起源から、炎症の環境因子に依存して、Breg 細胞から NKB 細胞や NKB 細胞から Preg 細胞など双方向性の分化の可能性を示唆した。令和 4 年度にはドナーとレシピエントマウスが確保できたため、細胞移入実験により、この可能性を検討した。腸炎で誘導される「inducible」型分化の検討のため、ドナーは腸炎を発症前の 8 週令マウスを用い、腸炎の発症を下痢により確認したドナーマウスへ移入した。ドナ

マウスとして Preg 細胞の分化検討のため GFP/IL-10 x TCR マウスを、NKB 細胞分化の検討には YFP/p40 x TCR マウスを用いた。レシピエントには Preg 細胞を欠失する CD19cre x Blimp1 x TCR マウスを使用した。細胞の由来臓器を検討のため、ドナーB細胞は、骨髄、腹腔、脾臓、腸管膜リンパ節よりそれぞれ negative selection により精製した。細胞移入後2週目に、レシピエントマウスの Preg 細胞および NKB 細胞の再構築を検討した。

興味深い事に、骨髄細胞移入群において、レシピエントの脾臓に Preg 細胞のマーカである CD39 (+) CD93 (+) の形質芽細胞の再構築を認めた(図4)。また、この再構築した CD39 (+) CD93 (+) Preg 細胞の全てが IL-10(GFP) を発現している事を確認した。一方、腹腔内 B1 細胞、脾臓 B 細胞、腸管膜リンパ節 B 細胞の移入ではレシピエントの脾臓に Preg 細胞の再構築を認めなかった。また、全てのマウス群において、レシピエント腸管膜リンパ節での Preg 細胞の再構築は認めなかった。YFP/p40 x TCR マウス由来の B 細胞移入実験においては、骨髄、腹腔、脾臓、腸管膜リンパ節からの B 細胞は、レシピエントでの NKB 細胞への分化は認めなかった。これらの結果は、Preg 細胞は抗原記憶を有さない骨髄由来の未成熟 B 細胞から分化する可能性を示唆した。

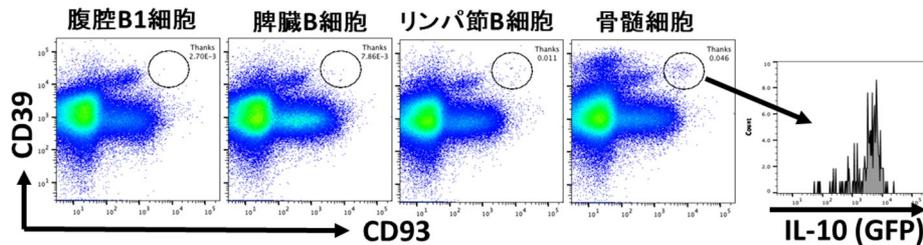


図4: ドナー腹腔内B1細胞、脾臓B細胞、腸管膜リンパ節B細胞、骨髄細胞を移入後のレシピエント脾臓における、CD39 (+) CD93 (+)、CD138 (+) Preg細胞の発生。骨髄細胞移入により発生したPreg細胞は全てIL-10を産生。

興味深い事に、骨髄細胞の移入を受けたレシピエントの脾臓に再構築した CD19 陽性 B 細胞は、IL-10 (GFP) と CD49b を共発現していた (図5)。このような細胞は腹腔 B1 細胞、脾臓 B 細胞、腸管膜リンパ節 B 細胞を移入した群では認めなかった。CD49b は NKB 細胞のマーカであるため、これらの結果は、NKB 細胞、Breg 細胞、Preg 細胞の双方向性分化仮説を更にサポートする。

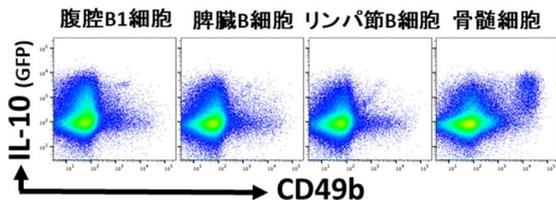


図5: ドナー腹腔内B1細胞、脾臓B細胞、腸管膜リンパ節B細胞、骨髄細胞を移入後のレシピエント脾臓におけるCD19陽性B細胞にgateした解析。骨髄細胞は、IL-10産生、CD49b(+)、CD19(+) B細胞に分化

<引用文献>

1. O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nat Immunol* 2009, 929-932.
2. Mizoguchi A, Bhan AK: A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006, 705-710.
3. Mizoguchi A et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10 producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002, 219-230.
4. Matsumoto M et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 2014, 1040-1051.
5. Sugimoto K et al. Inducible IL-12-producing B cells regulate Th2-mediated intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2007, 124-136.
6. Wang S et al. Natural killer-like B cells prime innate lymphocytes against microbial infection. *Immunity* 2016, 131-144.
7. Anderson CF et al. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007, 285-297.
8. Rojas OL et al. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell* 2019 p610-624.
9. Menon M et al. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* 2016, 683-697.
10. Shen P et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 2014, 366-370.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅原有紗、野明俊裕、溝口恵美子、荒木靖三、光山慶一、溝口充志
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎の炎症部位に認められる獲得免疫および上皮依存喘息関連機構
3. 学会等名 第58回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野有紗、西田淳史、小松誠和、溝口恵美子、安藤朗、溝口充志
2. 発表標題 腸炎における制御性形質芽細胞Preg
3. 学会等名 第57回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野有紗、西田淳史、小松誠和、溝口恵美子、安藤朗、溝口充志
2. 発表標題 腸炎における制御性形質芽細胞Preg
3. 学会等名 第57回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

久留米大学医学部免疫学講座ホームページ
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/immun/>
久留米大学医学部免疫学講座HP
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/immun/>
おなかの健康免疫
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/immun/>

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

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