

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591339

研究課題名（和文） 免疫性皮膚疾患における制御性 B 細胞の役割とその分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of regulatory B cells in immuno-dermatological diseases

研究代表者

藤本 学 (FUJIMOTO MANABU)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90272591

研究成果の概要（和文）：

腹腔内 B-1 細胞が接触過敏反応の後期に抑制性の働きをもつことを示した。また、脾臓の抑制性 B 細胞としてはたらく marginal zone B 細胞の表現型を明らかにし、全身性エリテマトーデスの動物モデルにおける抑制性 B 細胞の役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Peritoneal B-1a cells have been shown to suppress the later phase of contact hypersensitivity reaction. The cell-surface expression phenotype of splenic marginal zone regulatory B cells has been clarified. Moreover, the role of regulatory B cells in murine model of systemic lupus erythematosus has been demonstrated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：B 細胞、免疫、皮膚疾患

1. 研究開始当初の背景

生体免疫機構は、様々な皮膚疾患の惹起や収束に関与している。そのなかで B リンパ球は、種々の感染症、蕁麻疹、自己免疫性水疱症、膠原病をはじめとする諸疾患において、液性免疫担当細胞として抗体産生によって中心的な役割を果たしているが、近年、B 細胞には、抗体産生以外にもサイトカイン産生、抗原提示、T 細胞や樹状細胞の分化や機能の制御など様々なはたらきをもつことが明らかにされてきており、これまで「抗体」によって考えられてきたよ

りも幅広い疾患群において B 細胞が関わっている可能性が示唆される。このことは、臨床的には、近年可能になった抗 CD20 抗体による B 細胞除去療法が、従来予想された以上の数多くの疾患に有効性を示すことから窺える。

生体免疫機構には、免疫反応を増強する「アクセル」の働きをする因子と、抑制性にはたらく「ブレーキ」の役割をもつ因子が存在し、その両者のバランスによって精緻に調節されている。例えば T 細胞には、Th1、Th2 などの effector T 細胞に加えて、抑制性にはたらく regulatory T 細胞の存在

が知られており、regulatory T 細胞の減少や機能異常は自己免疫疾患などの発症と密接な関連があることが想定されている。一方、これまで B 細胞のなかに抑制性の機能をもつサブセットが存在するかどうかは明らかではなかった。ところが最近になって、自己免疫疾患の動物モデルにおいて、B 細胞（の一部）が抑制的に作用している可能性が示されてきており、「制御性 (regulatory) B 細胞」の存在が示唆されている。われわれも、B 細胞特異的な細胞表面蛋白で B 細胞のシグナル伝達をコントロールする中心的な分子である CD19 を欠損したマウスにおいて接触過敏反応が著明に亢進していることを見だし、これは CD19 欠損マウスでは制御性 B 細胞が欠損しているためであることを示した。また、多発性硬化症の動物モデルである実験性自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) においても、ほぼ同様の結果を明らかにした。

これらのことは、

- a) 接触皮膚炎において、制御性 B 細胞が抑制に重要な役割をもっていること
- b) CD19 などによる B 細胞のシグナル伝達が、制御性 B 細胞の分化や機能に重要な役割をもっていること
- c) 制御性 B 細胞は、接触皮膚炎以外にも様々な皮膚免疫疾患や膠原病などで重要な役割をもっているかもしれないことを示している。われわれは、接触過敏反応の系において、制御性 B 細胞が脾臓の marginal zone B 細胞 (CD23^{low}CD21^{high}) の分画中に存在することを示しており、また、われわれや他のグループの結果から IL-10 を産生することが特徴のひとつであると考えられる。しかしながら、制御性 B 細胞の分化、特異的なマーカー、免疫抑制の分子メカニズム、そしてヒトにも存在するのかどうか、さらに（存在するとすれば）ヒトの免疫疾患においてどのような役割をもっているのか、など多くの点において全く明らかになっていない。

申請者はこれまで CD19 や CD22 をはじめとした”B cell response regulator”による B 細胞のシグナル伝達の制御メカニズムと膠原病をはじめとする自己免疫疾患の関わりについて研究を進めてきた。B 細胞におけるこれらのシグナル伝達系の制御メカニズムを、制御性 B 細胞を対象にさらに解析を進めることにより、これまでに明らかになっていない制御性 B 細胞の分子基盤が明らかにできると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、B 細胞のシグナル分子欠損

マウスを用いて、接触過敏反応モデルや全身性エリテマトーデス (SLE) モデルを検討し、制御性 B 細胞の機能発現をどのようなシグナル伝達系が制御しているのかを解析することを目指した。

3. 研究の方法

野生型マウス、CD19 欠損マウス、CD22 欠損マウスを用いた。接触過敏反応モデルでは C57BL/6、SLE モデルでは NZB/NZWF1 のバックグラウンドを用いた。

接触過敏反応モデルは、マウスを DNFB にて感作し、5 日後に耳介に再度塗布することにより惹起し、耳介の腫脹をゲージを用いて経時的に測定した。

SLE モデルは、NZB/NZWF1 マウスにおいて、血中の自己抗体および尿中の蛋白尿を経時的に観察し、また腎臓を採取して、免疫染色をおこなった。さらに生存率を検討した。

細胞移入実験は、蛍光標識された抗体による多重染色後、フローサイトメトリーによるセルソーターを用いて、必要とする細胞を取得し、尾静脈より移入した。

4. 研究成果

CD19 は B 細胞に特異的に発現する約 100 kDa の膜表面蛋白であり、細胞質に 9 つの保存されたチロシン基をもち、これらのチロシン基のリン酸化通じて、細胞表面アダプター分子として B 細胞の様々なシグナル伝達を制御している。CD19 のリン酸化チロシン基には SH2 ドメインを介して、Src-family チロシンキナーゼである Lyn や PI-3 キナーゼ、Vav などの重要なシグナル分子が結合できる。CD19 欠損マウスには、抗原受容体、リポ多糖、CD40 刺激などによる活性化反応や増殖反応の障害をはじめとして様々な B 細胞の異常が認められる。

CD19 欠損マウスは、脾臓 marginal zone (辺縁帯) の B 細胞 (CD21 強陽性 CD23 陰性) が欠損しているために、DNFB などによる接触過敏反応が増強しており、この脾臓 marginal zone B 細胞の分画に制御性 B 細胞が存在すると考えられていたが、CD5 陽性 CD1d 強陽性の表現型をもつことが明らかになった。このような細胞は CD19 欠損マウスではほぼ欠損しており、一方 CD19 を B 細胞特異的に過剰に発現させたトランスジェニックマウスでは反対に増加していた。しかしながら、このような表現型をもつ B 細胞のうち、制御性 B 細胞と考えられる IL-10 産生細胞は数%であり、さらに、特異的なマーカー、特に特異的に制御する転写因子の同定が今後必要と考えられる。

脾臓 marginal zone B 細胞は、接触過敏反応の初期の反応を抑制したが、CD22 欠損マウスでは接触過敏反応の後期の反応の抑制が障害されていたため、そのメカニズムを検討した。CD22 も B 細胞に特異的に発現する約 140 kDa の細胞表面分子であり、immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を細胞質に有し、SHP-1 や SHIP などの分子のリクルートを通じて、B 細胞シグナルを抑制するはたらきをもっている。CD22 欠損マウスにおける DNFB を用いた接触過敏反応の検討の結果、腹腔内の B-1a 細胞 (B220 陽性 CD5 陽性) が接触過敏反応の後期の抑制に重要であることが明らかになった。興味深いことに、CD22 欠損マウスでは、腹腔内 B-1a 細胞はむしろ増加しているものの、B-1a 細胞のリンパ節での保持に障害があることが示された。

SLE モデルマウスである NZB/NZW F1 マウスは、NZB マウスと NZW マウスの F1 交配により得られる自然発症ループスモデルであり、約 20 週頃より抗 2 本鎖 DNA 抗体をはじめとする自己抗体が出現して、その後糸球体腎炎を発症する。NZB/NZW F1 の系では、CD19 欠損マウスでは抗 2 本鎖 DNA 抗体を含む抗核抗体の出現および力価は野生型マウスに比べて、ともに減弱していたが、それに反して、腎炎の発症は有意に早く出現した。さらに、CD19 欠損マウスでは野生型マウスに比べて、生存期間も有意に短縮していた。このように、CD19 は自己抗体の出現は促進する働きがあるものの、制御性 B 細胞の分化に必要であるため、CD19 欠損マウスにおいては、腎炎の発症とそれに代表される SLE 症状が増悪するものと考えられた。実際に、野生型マウス由来の制御性 B 細胞を含む細胞分画を 20 週の時点で CD19 欠損マウスに一回移入すると、腎炎の発症は 35 週まで有意に抑制され、生存期間も有意に延長した。さらに、興味深いことに、制御性 B 細胞を移入することにより、CD19 欠損マウスではみられなかった制御性 T 細胞の有意な増加が観察された。このことから、制御性 B 細胞と制御性 T 細胞は互いに相互作用を有していると考えられた。

以上のように、制御性 B 細胞は皮膚の IV 型アレルギーのシンプルなプロトタイプである接触過敏反応から複雑な全身性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスのような膠原病まで幅広い病態において重要な役割を果たしていることが明らかになってきたといえ、これは臨床領域での B 細胞除去両方などでみられる種々の報告とも合致しているといえる。このため、今後さらに制御性 B 細胞の詳細な分子メカニズムを明らかにしていくことが、皮膚やその他の免疫難病を克服する治療のストラテジーを構築してい

く上で必要と考えられた。

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 15 件)

1. Nakashima H, Hamaguchi Y, Watanabe R, Ishiura N, Kuwano Y, Okochi H, Takahashi Y, Tamaki K, Sato S, Tedder TF, Fujimoto M. CD22 expression mediates the regulatory functions of peritoneal B-1a cells during the remission phase of contact hypersensitivity reactions. *J Immunol*, 2010;184:4637-45. 査読有
2. Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Kuwano Y, Okochi H, Tamaki K, Sato S, Tedder TF, Fujimoto M. Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J Immunol*, 2010;184:4801-9. 査読有
3. Haas KM, Watanabe R, Matsushita T, Nakashima H, Ishiura N, Okochi H, Fujimoto M, Tedder TF. Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Immunol*. 2010;184:4789-800. 査読有
4. Ishiura N, Nakashima H, Watanabe R, Kuwano Y, Adachi T, Takahashi Y, Tsubata T, Okochi H, Tamaki K, Tedder TF, Fujimoto M. Differential phosphorylation of functional tyrosines in CD19 modulates B lymphocyte activation. *Eur J Immunol*, 2010;40:1192-1204. 査読有
5. Odaka M, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Ishiura N, Kumada S, Matsushita T, Komura K, Sato S, Takehara K, Fujimoto M. Autoantibody-mediated regulation of B cell responses by functional anti-CD22 autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2010;159:176-84. 査読有
6. Tanaka C, Fujimoto M, Hamaguchi Y, Sato S, Takehara K, Hasegawa M. Inducible costimulator ligand (ICOSL) regulates bleomycin-induced lung and skin fibrosis independent of ICOS-ICOSL pathway. *Arthritis Rheum*, 2010;62:1723-32. 査読有
7. Oda H, Fujimoto M, Patrick MS, Chida D, Sato Y, Azuma Y, Aoki H, Abe T, Suzuki H, Shirai M. RhoH plays critical roles in FcεRI-dependent signal transduction in mast cells. *J Immunol*. 2009;182:957-62. 査読有

8. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol*, 2008;172:1650-63. 査読有
9. Iwata Y, Yoshizaki A, Komura K, Shimizu K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Bae S, Takenaka M, Yukami T, Hasegawa M, Fujimoto M, Tomita Y, Tedder TF, Sato S. CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling. *Am J Pathol*. 2009;175:649-60. 査読有
10. Ishii T, Fujita T, Matsushita T, Yanaba K, Hasegawa M, Nakashima H, Ogawa F, Shimizu K, Takehara K, Tedder TF, Sato S, Fujimoto M. Establishment of experimental eosinophilic vasculitis by IgE-mediated cutaneous reverse passive Arthus reaction. *Am J Pathol*. 2009;174:2225-33. 査読有
11. Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M, Higashi K, Tomigahara Y, Kaneko H, Shirasaki F, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. A novel inhibitor of Smad-dependent transcriptional activation suppresses tissue fibrosis in mice models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 2009;60:3465-75. 査読有
12. Tomita H, Iwata Y, Ogawa F, Komura K, Shimizu K, Yoshizaki A, Hara T, Muroi E, Yanaba K, Bae S, Takenaka M, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S. P-selectin glycoprotein ligand-1 contributes to wound healing predominantly as a P-selectin ligand and partly as an E-selectin ligand. *J Invest Dermatol*, 2009;129:2059-67. 査読有
13. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz J-D, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*, 2008;118:3420-30. 査読有
14. Yanaba K, Bouaziz J-D, Hass KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{high}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 2008;28:639-650. 査読有
15. Komura K, Fujimoto M, Yanaba K, Matsushita T, Matsushita Y, Horikawa M, Ogawa F, Shimizu K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Blockade of CD40-CD40 ligand interactions attenuates skin fibrosis and autoimmunity in the

tight-skin mouse. *Ann Rheum Dis*, 2008;67:867-72. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 学 (FUJIMOTO MANABU)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90272591