

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05970

研究課題名(和文) 自然免疫型制御性B細胞の分化機序と炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on differentiation and immunosuppressive function of innate-type regulatory B cells

研究代表者

藤間 真紀 (Touma, Maki)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：40542246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自然免疫受容体を介した刺激によって活性化&誘導される自然免疫型の制御性B細胞(Breg)の機能と作用機序の解明を試みた。その結果、核内転写調節因子I¹BNSがTLR刺激を介した自然免疫型Bregの分化とIL-10産生を正に制御すること、およびB細胞におけるI¹BNS依存的な炎症抑制機能が確認された。また、自然免疫型Bregの炎症制御機序として、IL-10産生以外の抑制因子の存在が示唆された。その詳細は今後の課題であるが、本研究によってI¹BNS依存的自然免疫型Bregによる炎症制御機構の一端が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、これまでに情報の少なかつた自然免疫型の制御性B細胞(Breg)の機能と炎症抑制機序の一端を明らかにすることができ、B細胞による免疫制御機構の包括的理解に重要な情報が得られた。自然免疫型Bregは、素早く容易に、しかも大量に誘導できることから、免疫系の第一次抑制機構として重要であると推察される。本研究の発展として、B細胞の抗炎症機能を利用した新しい免疫制御法の確立といった展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to elucidate the regulatory function and the mechanisms of innate-type regulatory B cells (Breg) that are activated and induced via innate immune receptors. As the results, we confirmed that a transcriptional regulator I¹BNS positively regulates the differentiation and IL-10 production of innate-type Bregs via TLR stimulation, and that the suppressive function of B cells was observed in an I¹BNS-dependent manner. In addition, the undefined factors other than IL-10 production was suggested as an immunosuppressive mechanism by innate-type Bregs. Although the details remain to be elucidated, the present study partially elucidated the immunoregulatory mechanisms by I¹BNS-dependent innate-type Bregs.

研究分野：免疫学、動物生理学

キーワード：B細胞 制御性B細胞 炎症制御 Toll様受容体(TLR) IL-10

1. 研究開始当初の背景

B 細胞は主に抗体を産生して生体防御に働く一方、自己免疫疾患や炎症性疾患においては病態の増悪因子のひとつと考えられてきた。しかし近年では、炎症反応を抑制する B 細胞亜集団 (制御性 B 細胞, regulatory B cell, Breg) の存在が明らかになり、炎症制御における役割が注目されている。Breg の免疫抑制機能は主に抗炎症性サイトカインである IL-10 の分泌によるもので、種々の疾患モデルにおいて IL-10 産生 B 細胞が自己免疫の病態を軽減させることが示されている。

制御性 B 細胞はその誘導経路によって 2 つに大別される。ひとつは B 細胞受容体 (BCR) と CD40 を介した刺激で抗原特異的に誘導される獲得免疫型 (獲得型 Breg) で、もうひとつは Toll 様受容体 (TLR) などの自然免疫シグナルを介して迅速に誘導される自然免疫型 (自然型 Breg) である。前者は B2 細胞から分化し、後者には B-1 細胞や辺縁帯 B 細胞のような自然免疫様 B 細胞が含まれる。自然型 Breg は迅速にしかも大量に誘導できることから、抗原特異性は低くとも様々な炎症反応で広く機能し得る抑制細胞として免疫制御の一翼を担うと考えられる。これまでに、獲得型 Breg に関する研究は大きく進んでいる一方、自然型 Breg については生体での分化機序や炎症制御における役割がほとんど知られていない。そのため、自然型 Breg を新たな免疫制御因子として利用するためには、その実態と分化機序を解明し、炎症制御における役割を明らかにする必要がある。

我々は、自然型 Breg の分化と機能制御の鍵となる因子として、I κ BNS を見出している。I κ BNS は、活性化刺激を受けた免疫細胞において一過性に発現し、主に核内で転写因子である NF- κ B と結合してその転写活性を調節する因子である。また、我々は I κ BNS が B 細胞において Toll 様受容体を介した IL-10 産生に関与することを報告している (Immunol. 2016, 図 1)。そこで次なる課題として、I κ BNS による自然型 Breg の分化および機能調節機序の解明を挙げることにした。自然型 Breg の実態と作用機序を明らかにすることで、獲得型 Breg と合わせた B 細胞による効果的な免疫制御法を確立できると期待した。

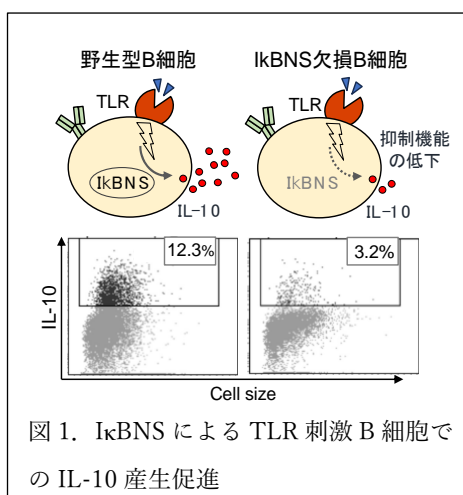


図 1. I κ BNS による TLR 刺激 B 細胞での IL-10 産生促進

2. 研究の目的

本研究では、自然免疫型制御性 B 細胞 (自然型 Breg) の発生と機能発現の鍵となる因子として I κ BNS という転写調節因子に着目し、自然型 Breg の分化機序と生体での作用機序の解明を目指すことにした。また、自然免疫型と獲得免疫型の両制御性 B 細胞の特徴と作用機序を比較解析することで、B 細胞による炎症制御機構の全体像を明らかにし、制御性 B 細胞による免疫疾患の制御法を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 自然型 Breg の分化機序

B 細胞での IL-10 産生が大きく障害される I κ BNS 欠損マウスと野生型 B 細胞の Breg 分化頻度を比較することで、I κ BNS が Breg 分化のキープクターであるかを検証する。また、野生型マウスの自然免疫様 B 細胞（腹腔 B-1a 細胞, 脾臓辺縁帯 B 細胞）を TLR 刺激することで自然型 Breg の分化を誘導し、この時に発現誘導される転写因子の解析を行う。

2) 生体内における自然型 Breg の機能

複数の疾患モデルをマウスに誘導し、生体内で分化する自然型 Breg の局在や性状を明らかにする。また、疾患モデルマウスの体内で誘導された自然型 Breg の炎症制御機能を生体内外で解析・評価する。

3) 自然型 Breg による炎症制御機序

自然型 Breg がどのように炎症を制御するのかを明らかにするために、生体内外で誘導した自然型 Breg の産生サイトカインや表面抗原の解析を行う。また、T 細胞やマクロファージを標的細胞として自然型 Breg と共培養し、標的細胞の炎症応答への作用を明らかにする。

4. 研究成果

1) 自然型 Breg の分化機序

野生型(WT)および I κ BNS 欠損(KO) マウスの B 細胞を *in vitro* および *in vivo* で種々の TLR アゴニストによって刺激したところ、*in vitro*, *in vivo* の両方で WT と比較して I κ BNS KO で IL-10 産生細胞頻度および IL-10 産生量が有意に低く、IL-10 産生 B 細胞の分化および IL-10 の産生における I κ BNS の必要性が確認された。

自然型 Breg の誘導に関わるマスター転写因子の探索については、RNA アレイのサンプル調整に難航したため中断したが、WT-B 細胞と I κ BNS KO-B 細胞の発現遺伝子の比較から、B 細胞での IL-10 産生を正に制御することが報告されている *Prdm1*(Blimp-1 をコード)の発現に I κ BNS が必要であることが示唆された。

2) 生体内における自然型 Breg の機能

生体内で分化する自然免疫型制御性 B 細胞 (自然型 Breg)の局在や性状を明らかにするために、骨髄キメラ法によって B 細胞特異的 I κ BNS 欠損マウスを作製した。これに、炎症性物質のひとつであるリポ多糖(LPS)を腹腔投与することで腹膜炎を誘導した。その結果、低容量の LPS を頻回投与することで、腹腔と脾臓で抗炎症性サイトカインである IL-10 を産生する B 細胞が顕著に増加すること、およびこの現象が I κ BNS 依存的に起こることが示された。

また、自己免疫疾患における I κ BNS 依存的 Breg の機能と役割を調べるため、B 細胞特異的 I κ BNS KO マウスを作製し、これに実験的自己免疫性脳髄炎 (EAE) を誘導した。EAE は、これまでの研究で獲得免疫型 Breg の関与が示されている疾患モデルである。実験の結果、KO-B 細胞マウスでは WT-B 細胞マウスよりも脾臓の Breg 亜集団頻度は低かったものの、両者の EAE 発症率と重篤度は同程度であり、EAE では I κ BNS 依存的 Breg の役割が大きくないと推察された。

3) 自然型 Breg による炎症制御機序

LPS 刺激によって発揮される B 細胞の炎症抑制機序を明らかにするため、様々な条件で標的細胞と培養した。具体的には、標的細胞としてマウス T 細胞とマクロファージ様細胞株を用い、直接接触培養、非接触共培養、放射線照射 B 細胞との共培養、IL-10 阻害剤添加条件下での共培養などを行った。その結果、LPS 刺激 B 細胞は細胞間の直接接触と可溶性因子の両方の抑制経路を通じて標的細胞の炎症応答を制御していることが示唆された (図 2, 3)。また、その炎症制御機序として、標的細胞による炎症性サイトカインの抑制と抗炎症性サイトカインの産生誘導の両者が確認された。さらに、LPS 刺激によって誘導される Breg では、一般的に Breg の主な抑制機序として知られる IL-10 の分泌以外にも、炎症性サイトカインである IL-6 を含む様々なサイトカイン類が分泌されることがわかった。自然免疫型 Breg が発現する IL-10 以外の抑制因子の同定と細胞表面の抑制因子の同定は今後の課題であるが、本研究によって I κ BNS 依存的自然免疫型 Breg の機能とその作用機序の一端が解明され、自然免疫型 Breg を活用した炎症制御や疾患治療への応用が期待される。

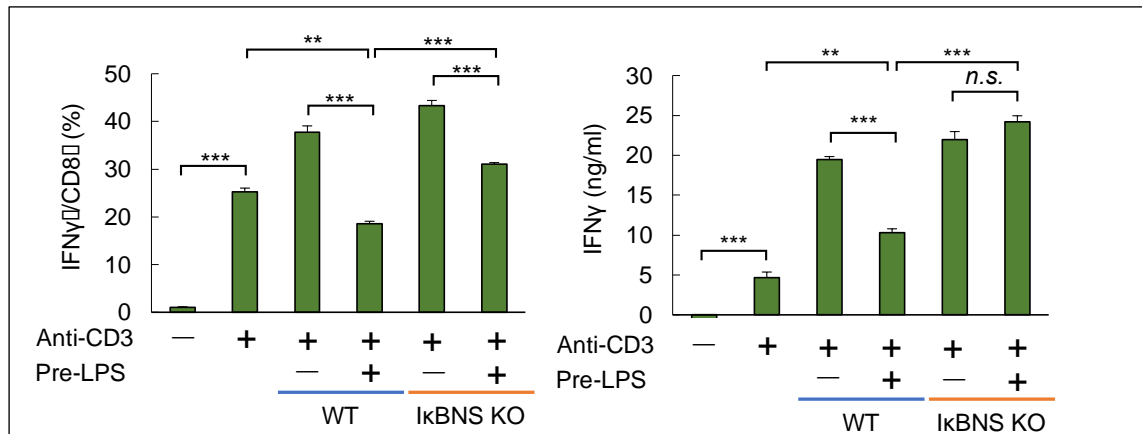


図 2. リポ多糖存在下で 2 日間刺激培養 (Pre-LPS) した野生型 (WT) あるいは I κ BNS 欠損 (KO) B 細胞を T 細胞と共培養した。2 日間の共培養後の IFN γ 産生 T 細胞頻度 (左) と IFN γ 産生量 (右) を示した。活性化 T 細胞の IFN γ 産生は I κ BNS 依存的に LPS 刺激 B 細胞によって抑制された。

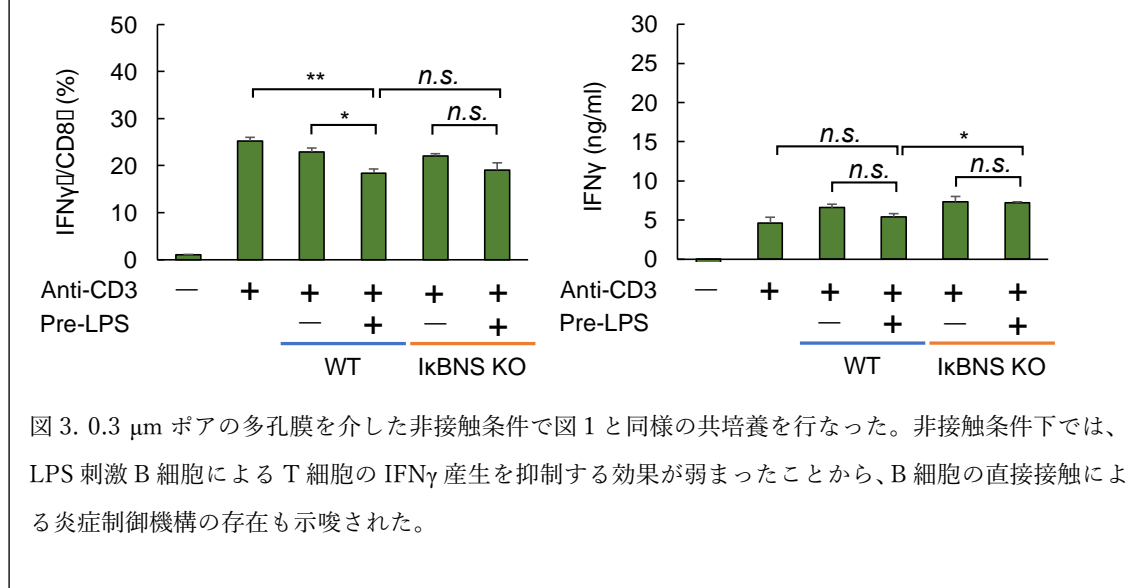


図 3. 0.3 μ m ポアの多孔膜を介した非接触条件で図 1 と同様の共培養を行なった。非接触条件下では、LPS 刺激 B 細胞による T 細胞の IFN γ 産生を抑制する効果が弱まったことから、B 細胞の直接接触による炎症制御機構の存在も示唆された。

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 和田 綾音、西山 将平、藤間 真紀
2. 発表標題 Analysis of pathological factors associated with mouse autoimmune hypertrophic gastritis.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋智也、尻引彩乃、藤間真紀
2. 発表標題 Biological properties of IL-10-producing B cells induced by innate immune signals
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉原 万彩、石部 万葉、藤間 真紀
2. 発表標題 Regulation of function and differentiation of marginal zone B cell by IkappaBNS
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	片貝 智哉 (Katakai Tomoya) (00324682)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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