

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成22年度～平成23年度

課題番号：22790657

研究課題名（和文）

TLR9によるB細胞の機能調節と炎症性腸疾患治療への応用

研究課題名（英文）

B cell modulation by TLR9 and discovery of novel treatment in inflammatory bowel disease

研究代表者

片倉 響子（KATAKURA KYOKO）

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70423788

研究成果の概要（和文）： CpG DNA 投与による腸炎抑制のメカニズムを解明するために、マウス腸炎モデルを用いて、CpG DNA 投与による形質細胞様樹状細胞（pDC）の活性およびB細胞の分化について検討した。CpG 投与にてマウス DSS 腸炎は抑制され、腹腔リンパ節では制御性サイトカインの産生が確認できたが、制御性 B 細胞の誘導は認められず、pDC と B 細胞の共培養でも分化誘導は認められなかった。この腸炎抑制のメカニズムにおいて B 細胞、特に制御性 B 細胞は関与していないものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether TLR9 agonist CpG DNA protects mice from colonic inflammation through activated plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and B cell proliferation. Administration of CpG DNA significantly suppressed colonic inflammation of DSS-induced colitis, and we could detect production of regulatory cytokines in mesenteric lymph nodes. Although we could not detect regulatory B cells as well as its induction by co-cultured with CpG DNA stimulated pDC. These results suggest that B cells, especially regulatory B cells didn't concerned to protective effect of CpG DNA to mouse DSS colitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患、Toll-like receptor、制御性 B 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

B細胞は抗体産生やT細胞活性化を通じて免疫反応に関与していることは知られていたが、近年になり、B細胞自身がIL-10を産生することにより自己免疫や炎症反応の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた (*Immunol Rev* 223:284, 2008)。さらに、炎症抑制性のサイトカインであるTGF- $\beta$ を産生することにより炎症を制御するB細胞の存在も示唆されており (*J Immunol* 167:1081, 2001)、現在ではこれらのB細胞を総称してregulatory(制御性)B細胞と呼んでいる (*J Immunol* 176:705, 2006)。B細胞の反応の制御には、増強性の制御分子としてCD19が、そして抑制性の制御分子としてCD22が重要な役割を果たしている。その他、TLRは自然免疫系の細胞だけではなくB細胞などのリンパ球の制御にも重要であり、TLR9のリガンドで刺激された形質細胞様樹状細胞(pDC)から産生されたI型interferon(IFN)によりCD5<sup>+</sup>B細胞からIL-10が産生され炎症の抑制に働くことが報告されている (*J Exp Med* 204:1107, 2007)。

潰瘍性大腸炎(UC)やクローン病(CD)などの炎症性腸疾患(IBD)は原因不明の難治性疾患であるが、腸管免疫応答における自然免疫系の異常が疾患発症に関与することが想定されている (*Nature* 411:599, 2001, *Nature* 411:603, 2001, *Nat Immunol* 5:800, 2004)。これまでに我々はTLR9シグナル伝達経路に腸炎抑制効果があることを報告し (*Gastroenterology* 122:1428, 2002, *Gastroenterology* 126:520, 2004)、その抗炎症作用はTLR9を介して産生されるI型IFNによることを明らかにした (*J Clin Invest* 115:695, 2005)が、炎症抑制のメカニズムやB細胞との関係については明らかにされていない。

現在B細胞標的の抗体療法は、まずB細胞由来悪性腫瘍をターゲットに開発され、次に関節リウマチやSLEなどの自己免疫疾患に適応が拡大されている。一方で抗CD20抗体でB細胞を除去したことによりUCが増悪した例や(*Inflamm Bowel Dis* 13:1365, 2007)、乾癬が発症した例(*Arthritis Rheum* 56:2715, 2007)が報告されており、今後はより選択的なB細胞除去療法が必要になると思われる。

以上より、TLR9を介してB細胞機能を制御しIBDの治療に結びつけることを想定した。

## 2. 研究の目的

炎症性腸疾患における制御性B細胞の役割を解明し、TLRを介するB細胞の制御により腸炎を抑制することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウスDSS腸炎モデルを作製し、CpGDNA投与による腸炎抑制とB細胞サブセットを検討した。

①C57BL/6を用いてDSS腸炎を誘導し、DSS投与開始前にpDCを誘導するCpGDNA(D19)を100 $\mu$ gずつ皮下注射で投与する。CpG非投与群と腸炎の程度を比較する。

②腸炎マウスの末梢血を採取し、両群間で産生された血清サイトカインを比較する。

③腸炎を発症したマウスの脾細胞におけるpDCおよびB細胞の分画をフローサイトメトリーにて検討し、CpGDNA投与群と非投与群で比較する。

④腸炎を起こした大腸におけるB細胞の分布について免疫染色で検討する。

⑤全大腸のRT-PCRを施行し、腸炎増悪に関係すると思われるサイトカインやケモカインのRNA発現の検討を行う。

(2) TLR9活性により誘導された制御性B細胞による腸炎抑制を試みる。

⑦マウスの骨髄細胞を Flt3 リガンドで刺激し、pDC を誘導・作製する。

⑧マウスの脾細胞から MACS<sup>®</sup> ビーズにて CD20 陽性細胞を分離し、前述の pDC と共培養し、CpG DNA を加える。

⑨分化した B 細胞の表現型および分布をフローサイトメトリーで確認する。

#### 4. 研究成果

(1)C57BL/6 マウスへ DSS 腸炎を誘導し 100 $\mu$ g の CpG DNA(D19)を皮下注射で投与したところ、CpG 非投与群と比較し腸炎抑制効果が認められ、また大腸における遺伝子発現では TNF- $\alpha$ の発現が低下し、IFN- $\beta$ 、TGF- $\beta$ の発現が増加していた。

(2)CpG 投与群の末梢血中のサイトカイン産生を検討したところ、非投与群に比し、IL-10 の産生増加が認められた。

(3)CpG 投与マウスの脾臓、および腹腔リンパ節における遺伝子発現とサイトカイン産生を検討した。脾臓では非投与群と比し有意差を認めず、腹腔リンパ節では CpG 投与群において TLR9、IFN- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、IL-10 の発現が増加していた。

(4)腹腔リンパ節および腸管を抗 CD20 抗体で免疫染色したが、CpG 投与群と非投与群において B 細胞の分布に有意差は認められなかった。

(5)マウスの骨髄細胞を Flt3 リガンドで刺激し pDC を作製し、脾臓から分離した CD20 陽性細胞と共培養し CpG-DNA を加えた。分化した B 細胞の表現型をフローサイトメトリーで確認するも、CD5 陽性細胞は検出できなかった。

(6)CpG DNA で刺激した pDC と CD20 陽性 B 細胞を共培養し、上清中のサイトカイン産生を検討したが、TGF- $\beta$ 、IL-10 等の制御性サイトカイン産生増加は認められなかった。

以上より、CpG 投与にてマウス DSS 腸炎は抑制され、腹腔リンパ節では制御性サイトカインの産生が確認できたが、この腸炎抑制のメカニズムにおいて B 細胞、特に制御性 B 細胞は関与していないものと考えられた。

5. 主な発表論文等；なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

片倉 響子 (KATAKURA KYOKO)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70423788

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし