

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2010

課題番号：22890073

研究課題名（和文） Sclerodermatous GVHD マウスにおける制御性B細胞の役割

研究課題名（英文） Research of regulatory B cell role in sclerodermatous GVHD mouse

研究代表者

松下 貴史 (MATSUSHITA TAKASHI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：60432126

研究成果の概要（和文）：

CD19欠損B10. D2マウスの骨髄および脾臓を放射線照射されたBALB/Cマウスに移入（ドナーが制御性B細胞を欠損）した結果は、コントロール群に比べより軽症のSclerodermatous GVHDを発症した。一方、B10. D2マウスの骨髄および脾臓を放射線照射されたCD19欠損BALB/Cマウスに移入（レシピエントが制御性B細胞を欠損）した結果は、コントロール群に比べより重症のSclerodermatous GVHDを発症した。これは、Sclerodermatous GVHDの過程において制御性B細胞が重要な役割を有し、ドナーとレシピエントで働きが違ふことが示唆される。特に、制御性B細胞はホストの抑制作用において重要な役割を有していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：CD19 knockout mouse lack regulatory B cell. Therefore, this mouse is good tool for investigating regulatory B cell. We transferred CD19 knockout B10. D2 bone marrow into Balb/c recipient mice. These mice developed mild sclerodermatous GVHD comparing wild type mice. While CD19 knockout Balb/c recipient mice which were transferred B10. D2 bone marrow were developed more severe sclerodermatous GVHD than that of wild type mice. These results indicate regulatory B cell is more critical for recipient immune response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
年度			
総計	1,230,000	369,000	1,599,000

研究分野：皮膚免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：強皮症、B細胞、IL-10

## 1. 研究開始当初の背景

B細胞はこれまで主に抗体産生細胞としての側面から研究が進められてきた。しかしながら、B細胞は抗体産生のみならず、抗原提示能やサイトカイン産生、T-B細胞相互作用を介して免疫反応において非常に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。また、さらにB細胞は均一な細胞集団ではなく、“悪玉”と“善玉”の2つに分けること

ができる。“悪玉”B細胞はeffector B細胞と呼ばれ、T細胞の活性化作用をもち、自己免疫や炎症を促進する働きがある。一方、“善玉”B細胞は自己免疫や炎症を抑制する働きがある(Nature Reviews Immunology. 236-247 2010)。申請者は、多発性硬化症のマウスモデルである Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) において effector B細胞と regulatory B細胞のバランスを世界に先駆けて解明した (J Clin Invest.

3420-3430, 2008)。EAE の発症前に抗 CD20 抗体を用い B 細胞を除去すると EAE がより重症化し、EAE 発症後に B 細胞を除去すると症状が改善する。発症前の B 細胞除去が重症化をもたらす機序は、炎症を抑制する regulatory B 細胞が除去されたからであり、EAE の早期では regulatory B 細胞が effector B 細胞よりも優位な状態であると考えられる。一方、EAE 後期では effector B 細胞が regulatory B 細胞よりも優位な状態であることが考えられる。このことより effector B 細胞と regulatory B 細胞のバランスが自己免疫の病態形成に非常に重要であり、また B 細胞除去療法が有益であるかの指標となる。Regulatory B 細胞は IL-10 を特異的に産生する亜集団であり、IL-10 の産生により過剰な免疫反応や炎症を抑制する。また、近年、申請者らのグループが IL-10 産生 regulatory B 細胞が CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> の表現型を有していることを明らかにしている (Immunity. 639-950, 2008)。さらに、申請者はヒトの IL-10 産生 regulatory B 細胞を同定しており、今後さまざまな炎症性疾患や自己免疫疾患の病態解明が進む可能性がある。

全身性強皮症は抗核抗体に代表される自己免疫現象を背景に、皮膚や肺などの内臓諸臓器の線維化、血管病変によって特徴づけられる膠原病である。これまでに全身性強皮症患者の病態には B 細胞の活性化や分化の異常が関与していることが示されている (Arthritis Rheum 50:1918-27, 2004)。しかしながら全身性強皮症に対する有効な治療法は未だ確立されておらず、その開発が望まれる。近年、ヒトの全身性強皮症のマウスモデルとしてマイナー組織適合抗原不一致-骨髄移植による Sclerodermatous GVHD マウスが使われるようになってきた (J Clin Invest. 101-108, 2003, J Invest Dermatol. 713-719, 2003)。このマウスモデルは、マイナー組織適合抗原が不一致である B10. D2 (H-2d) マウスの骨髄と脾臓細胞を、放射線照射された BALB/C (H-2d) マウスに移植することによって誘導できる。ドナー T 細胞がホストのマイナー組織適合抗原に反応することにより GVHD が起こり、組織への細胞浸潤、TGF- $\beta$  の過剰産生が認められ、移植後 3 週間より皮膚や肺の線維化がみられる。またこのモデルでは B 細胞や樹状細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞は T 細胞の活性化において非常に重要な役割を果たしている。以上より、マイナー組織適合抗原不一致-骨髄移植モデルは Sclerodermatous GVHD ならびに全身性強皮症の非常に良いモデルマウスと考えられている。これまで Sclerodermatous GVHD マウスにおける B 細胞、特に regulatory B 細胞の役割については、詳しく検討されていない。

## 2. 研究の目的

Sclerodermatous GVHD における regulatory B 細胞の役割を解明し、将来の治療法の開発を目的とする。

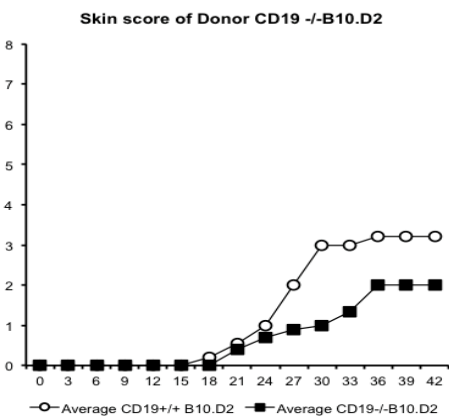
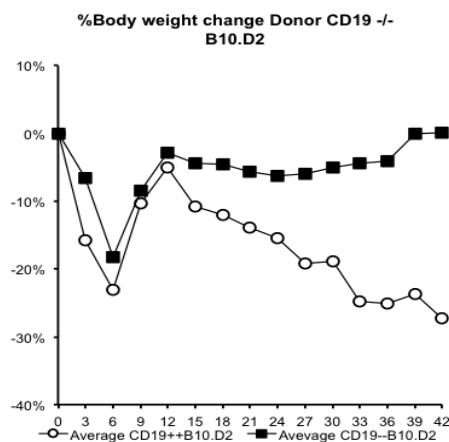
## 3. 研究の方法

A) Sclerodermatous GVHD マウスは、マイナー組織適合抗原が不一致である B10. D2 (H-2d) マウスの骨髄と脾臓細胞を、放射線照射された BALB/C (H-2d) マウスに移植することによって誘導した。まず、CD19 欠損 B10. D2 マウスおよび CD19 欠損 BALB/C マウスを作成し、Sclerodermatous GVHD マウスにおけるドナーおよびレシピエントの制御性 B 細胞の役割を解析した。

B) 次に regulatory B 細胞による治療法の開発のために、GVHD の誘導と一緒に regulatory B 細胞を投与し、改善の有無を検討した。

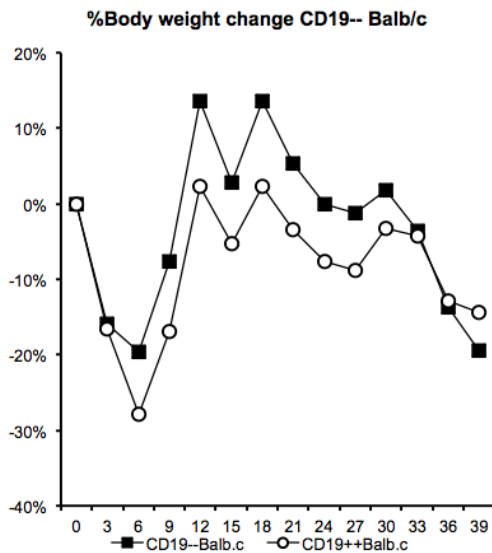
## 4. 研究成果

その結果、CD19 欠損 B10. D2 マウスの骨髄および脾臓を放射線照射された BALB/C マウスに移入 (ドナーが制御性 B 細胞を欠損) した結果は、コントロール群に較べより軽症の Sclerodermatous GVHD を発症した。

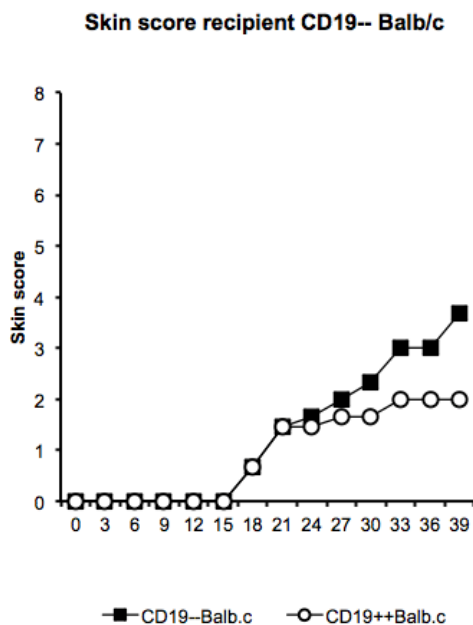


一方、B10. D2 マウスの骨髄および脾臓を放射線照射された CD19 欠損 BALB/C マウスに移入（レシピエントが制御性 B 細胞を欠損）した結果は、コントロール群に較べより重症の Sclerodermatous GVHD を発症した。

これは、Sclerodermatous GVHD の過程において制御性 B 細胞が重要な役割を有し、ドナーとレシピエントで働きが違うことが示唆



される。特に、制御性 B 細胞はホストの抑制



作用において重要な役割を有していることが示唆された。

さらに、regulatory B 細胞による治療法の開発のために、GVHD の誘導と同時に regulatory B 細胞を投与し、GVHD の改善の有無を検討し

たが、抑制効果は認めなかった。

#### 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 5 件)

1. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. J Immunol. 2010 Aug 15;185(4):2240-52. 査読有り。
2. Use of Serum Clara Cell 16-kDa (CC16) Levels as a Potential Indicator of Active Pulmonary Fibrosis in Systemic Sclerosis. Hasegawa M, Fujimoto M, Hamaguchi Y, Matsushita T, Inoue K, Sato S, Takehara K. J Rheumatol. 2011 May;38(5):877-84. 査読有り。
3. Serum chemokine and cytokine levels as indicators of disease activity in patients with systemic sclerosis. Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Clin Rheumatol. 2011 in press 査読有り。
4. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, Hall RP, St Clair EW, Tedder TF. Blood. 2011 Jan 13;117(2):530-41. 査読あり。
5. Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. Matsushita T, Tedder TF. Methods Mol Biol. 2011;677:99-111. 査読なし。

[学会発表] (計 1 件)

1. Takashi Matsushita, Manabu Fujimoto, Thomas F. Tedder and Kazuhiko Takehara (A double-edge sword in B cell depletion therapy for autoimmune disease) 第 35 回日本研究皮膚科学会、2010 年 12 月 4 日、和歌山県民文化会館 (和歌山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 貴史 (MATSUSHITA TAKASHI)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：60432126

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし