

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390281

研究課題名(和文) 制御性B細胞による皮膚免疫疾患の抑制機構の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of regulatory B cell inhibition on skin immunological diseases

研究代表者

藤本 学 (Fujimoto, Manabu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90272591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：制御性B細胞におけるIL-10産生のシグナル伝達メカニズムを解析した。BLNKは、B細胞におけるシグナル伝達経路の重要なアダプター分子であるが、BLNKを欠損したマウスでは、Cd1dhiCD5+B細胞からのIL-10産生が欠如しており、接触過敏反応も亢進していた。BLNKを欠損したB細胞では、Stat3の活性化が障害されており、これはBtkの活性に依存していた。さらに、刺激培養条件にIL-10を添加することにより、IL-10産生B細胞の数は著明に増加し、IL-10によるpositive feedback loopの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Signal transduction mechanisms responsible for IL-10 production in regulatory B cells were analyzed. BLNK is an important adaptor protein in B cell signal transduction. B cells from BLNK-deficient mice showed diminished IL-10 production in CD1dhiCD5+ B cells. Accordingly, BLNK-deficient mice exhibited augmented contact hypersensitivity response. CD1dhiCD5+ B cells from BLNK-deficient mice showed impaired Stat3 activation, which was dependent on Btk activity. Moreover, exogenous addition of IL-10 in culture markedly increased the number of IL-10-producing B cells, suggesting the presence of positive feedback loop provided by IL-10 stimulation.

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：免疫 B細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。

(2) 生体免疫機構には、炎症を終息させ、自己に対する寛容を維持するための装置として「抑制性細胞」のサブセットが重要である。すなわち、免疫反応を増強する「アクセル」の働きをする因子と、抑制性の「ブレーキ」の役割をもつ因子のバランスによって調節されており、「ブレーキ」の破綻は自己免疫疾患をはじめとする深刻な病態の発症を引き起こしうる。最近、B 細胞のなかに抑制性の機能をもつサブセット、すなわち「制御性 (regulatory) B 細胞」が存在することがわれわれや他のグループから報告され、注目を集めている (Fillatreau et al, Nat Immunol, 2002; Mizoguchi et al, Immunity, 2002 など)。われわれは、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 (Watanabe et al, Am J Pathol, 2007, Yanaba et al. Immunity, 2008)。同様のメカニズムは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) や SLE の動物モデルにおいても観察され、(Matsushita et al, Am J Pathol, 2006, Watanabe et al, J Immunol, 2010)。B 細胞除去療法は制御性 B 細胞を除去した場合には病態の悪化を招きうることを明らかにした (Matsushita et al, J Clin Invest, 2008, Haas & Watanabe et al, J Immunol, 2010)。

(3) マウスにおいて制御性 B 細胞は脾臓の marginal zone B 細胞の分画中に存在し、 $CD5^+CD1d^{high}CD23^{low}CD21^{high}$  の表現型をもち、IL-10 の産生が必要であることは明らかになったが、このような制御性 B 細胞が、いかなる分子機序で免疫反応を抑制するのかはまだ不明である。これを解明するには、接触過敏反応がもっともシンプルで評価しやすい系であると考えられた。また、ヒトの皮膚免疫疾患において制御性 B 細胞がどのように関与しているのかも明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

マウスにおける接触皮膚炎モデルを中心に、制御性 B 細胞の分化・機能を特異的に制御しているシグナル伝達分子やシグナル伝達経路の同定、接触過敏反応を制御性 B 細胞が抑制する分子メカニズムの同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

B 細胞における重要なアダプター分子である BLNK 欠損マウスを用いて、接触過敏反応を検討した。接触過敏反応は、マウス腹部に DNFB を塗布して感作させた後、耳介に再度 DNFB を塗布して、接触過敏反応を惹起した。耳介の腫脹を測定し、また組織学的検討を加えた。BLNK 欠損マウスは C57BL/6 系統であり、

同系統の野生型マウスをコントロールとして用いた。

In vitro における制御性 B 細胞の機能を解析するために、磁気分離法またはフローサイトメトリーにより細胞を分離し、LPS で刺激を加えた後に、各種抗体を用いて、シグナル伝達経路の活性化を検討した。また、Stat3 阻害薬をはじめとする各種阻害薬を用いて、細胞の処理を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 制御性 B 細胞における IL-10 産生のシグナル伝達メカニズムを解析した。BLNK は、B 細胞におけるシグナル伝達経路の重要なアダプター分子であるが、BLNK を欠損したマウスでは、Cd1dhiCD5+B 細胞は B 細胞の中の比率としては、野生型よりもむしろ多いにもかかわらず、刺激後の IL-10 産生は欠如していた (図 1)。

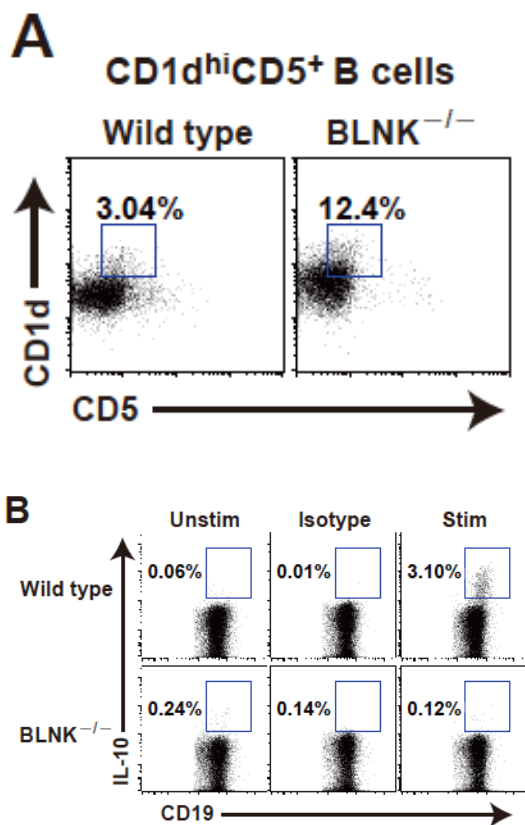


図 1 BLNK 欠損マウスにおける制御性 B 細胞分画と IL-10 産生細胞

(2) BLNK 欠損マウスでは、B 細胞からの IL-10 産生障害にともない、接触過敏反応は、野生型マウスに比べて有意に増強していた (図 2)。これは、野生型マウス由来の B 細胞を移入すると、増強した反応が正常に復することからも示された。

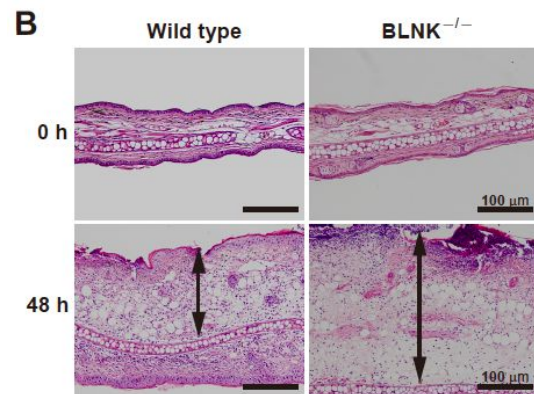
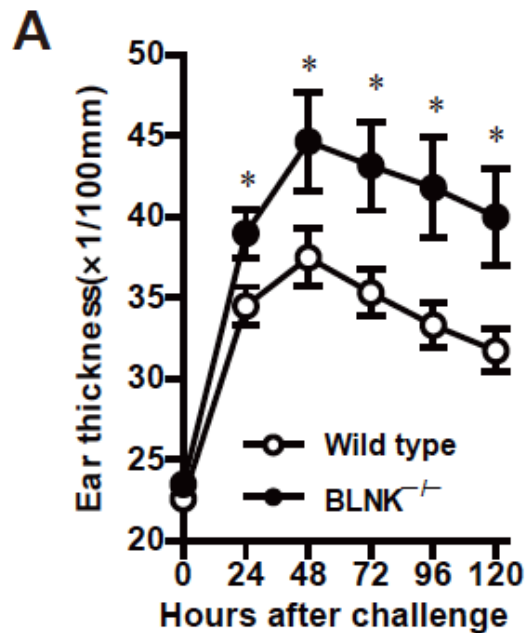


図 2 BLNK 欠損マウスにおける接触過敏反応 (A : 耳介の厚さ、B : 病理組織所見、HE 染色)

(3) 野生型マウス由来 B 細胞において、Stat3 の活性を阻害すると、IL-10 の産生はほぼ完全に抑制された (図 3)。LPS 刺激による Stat3 の活性化は、制御性 B 細胞を含む CD1dhiCD5+B 細胞では観察されたが、通常の B 細胞分画

(CD1d<sup>lo</sup>CD5<sup>-</sup>)では認められなかった(図4)。Stst3の活性化はJAKには依存しておらず、Btk活性に依存していた。

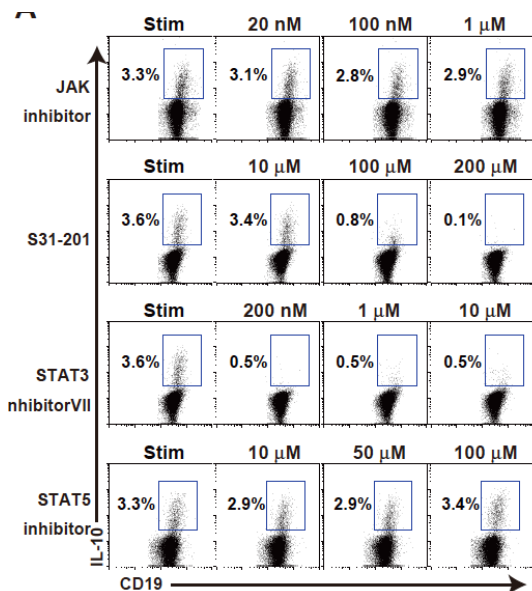


図3 Stat阻害薬のIL-10産生への効果

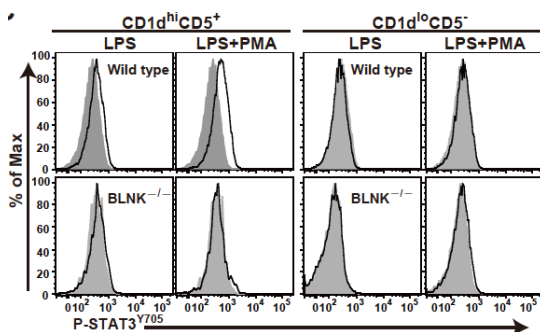


図4 B細胞分画の違いによるStat3リン酸化の相違

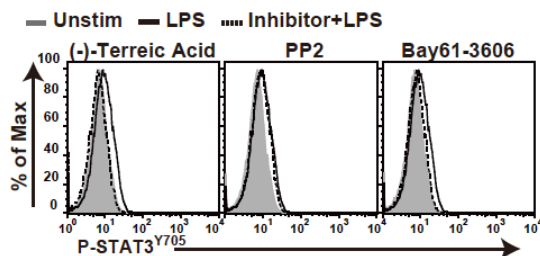


図5 チロシンキナーゼ阻害薬によるStat3リン酸化の抑制

(4) さらに、刺激培養条件にIL-10を添加することにより、IL-10産生B細胞の数は著明に増加し、IL-10によるpositive feedback loopの存在が示唆された。

## 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5件)

Jin G, Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Huu DL, Ishiura N, Naka K, Hirao A, Takehara K, Fujimoto M. BLNK expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:1674-1682. doi:

10.1016/j.jaci.2013.01.044. (査読あり)

Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF, Fujimoto M. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 2013;121:3274-83. doi:

10.1182/blood-2012-11-465658. (査読あり)

Jin G, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Ishii T, Hasegawa M, Obata K, Karasuyama H, Takehara K, Fujimoto M. Basophils and mast cells play critical roles for leukocyte recruitment in IgE-mediated cutaneous reverse passive Arthus reaction. *J Dermatol Sci*. 2012;67:181-9. doi:

10.1016/j.jderm.2012.06.005. (査読あり)

Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, Fujimoto M, Takehara K. Potential roles of interleukin 17A in the development of skin

fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:3726-35.

doi: 10.1002/art.34643. ( 査読あり )

Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M.

IL-6 blockade attenuates the development of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *J Invest Dermatol.* 2012;132:2752-61. doi:

10.1038/jid.2012.226. ( 査読あり )

[学会発表](計 1 件)

Fujimoto M. Regulatory B cells in skin disease. International Meeting of Investigative Dermatology. Edinburgh, UK.

2013年5月10日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://dermatology-tsukuba.org>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤本 学 (FUJIMOTO, Manabu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：9 0 2 7 2 5 9 1