

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月22日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791266

研究課題名（和文）ケラチン5を異所性発現する未熟B細胞様リンパ球系細胞を用いた免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of immunotherapy using lymphoid cells ectopically expressing keratin 5

研究代表者

小豆澤 宏明 (AZUKIZAWA HIROAKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10379240

研究成果の概要（和文）：ケラチン5は表皮や食道といった上皮細胞に発現する細胞骨格蛋白であるが、リンパ組織では胸腺上皮細胞で発現がみられるものの、リンパ球での発現するとの報告はない。我々はケラチン5を発現する新規リンパ球系細胞を発見し、それらを解析することでその特徴を明らかにした。この細胞は、骨髄でのB細胞の分化過程である **Common lymphoid precursor** の段階で、一過性にケラチン5を発現し、末梢のリンパ組織では発現していないことがわかった。またこの細胞を単離したものをを用いて、抗原提示能を検討したところ、形質細胞様樹状細胞に匹敵する高い抗原提示能力を持っていることがわかった。さらに、この細胞は、当初未熟 B 細胞様の細胞表面抗原の発現パターンをとると考えていたが、その後の解析で、 $\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD23}^-\text{CD43}^+\text{CD19}^+\text{CD93}^-$  であり、**Follicular B 細胞** や **Marginal zone B 細胞** ではなく、**B-1 細胞** に分化することがわかった。**B-1 細胞** は胸腔や腹腔に多く存在する細胞で、**IgM** を自然分泌することが知られる。一過性にケラチン5を発現するこの細胞は、通常の **B-1 細胞** よりも、より **IgM** を自然分泌することがわかった。以上より、一過性にケラチン5を発現する **B-1 細胞** は **IgM** 産生能、抗原提示能に優れた免疫細胞であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Keratin 5 (K5) is a cytoskeletal tissue-specific protein expressed in the epithelial cells of skin and esophagus. Although K5 is also expressed in lymphoid organs such as thymus, ectopic K5 expression in lymphocytes has never been reported. Since K5 expression in epidermal keratinocytes is transient during epidermal differentiation, not all keratinocytes express K5. Here we demonstrate an ectopic epidermal self-protein expression in a part of B-1 B cell by fate mapping of K5-expressing cells. K5-Cre  $\times$  CAG-CAT-loxP-EGFP double transgenic (K5 $\times$ GFP) mice that express enhanced green fluorescence protein (GFP) under the control of the K5 promoter were employed. Unexpectedly, B220<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells were found in lymph nodes (LNs), spleen, peripheral blood, and peritoneum. These cells were located in a non-follicular area of secondary lymph organs and were  $\text{IgM}^+\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD23}^-\text{CD43}^+\text{CD19}^+\text{CD93}^-$ , indicating that they were B-1 B cells, which are the major B cell subpopulation in the pleural and peritoneal cavities. Although GFP<sup>+</sup> B-1 cells did not express K5 in the periphery, Lin<sup>-</sup>CD93<sup>+</sup>B220<sup>low-neg</sup>CD19<sup>+</sup> B-1 B cell progenitors expressed GFP and B220<sup>+</sup>CD93<sup>+</sup> progenitor cells expressed K5 and MHC-class II in bone marrow (BM), indicating that GFP<sup>+</sup> B-1 cells transiently expressed K5 and the progenitor cells were potential antigen-presenting cells. Interestingly, GFP<sup>+</sup> B-1 cells in the periphery continued expressing MHC class II and had exogenous antigen-presenting capacity comparable to non-follicular B cells and plasmacytoid dendritic cells. GFP<sup>+</sup> B-1 cells proliferated more rapidly in vivo and spontaneously secreted more IgM than GFP<sup>-</sup> B-1 cells in vitro. These results indicate that a part of B-1 B cells transiently express K5 in BM and are potent for both natural antibody production and antigen presentation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚自己免疫疾患、樹状細胞、動物モデル、抗原提示細胞、B-1細胞

### 1. 研究開始当初の背景

(1) これまで組織特異的抗原を発現する細胞は特定の臓器と自己反応性T細胞の成熟を回避する胸腺での発現が知られていたが、最近の研究でリンパ節や脾臓といった二次リンパ組織で組織特異的抗原を発現する“第3の細胞”の存在が報告された。最近、我々は表皮自己抗原をリンパ組織で発現している細胞を見つけ、これまでの報告とは異なった細胞表面マーカーの発現がみられたことからこれまで報告のない新規のリンパ球系細胞分画であることがわかった。

(2) 我々はこれまでに皮膚自己抗原が骨髄由来の抗原提示細胞により CD8<sup>+</sup> T細胞に提示されることで、CD8<sup>+</sup> T細胞の活性化が起こり、皮膚ケラチノサイトのアポトーシスを起こす病態について動物モデルを樹立して明らかにした。この動物モデルは重症薬疹の病態を解明する貴重な情報を提供した。我々は、皮膚表皮のモデル自己抗原としてケラチン5プロモーター下に膜結合型ニワトリ卵白アルブミン(OVA)を発現するトランスジェニックマウス(K5-mOVA)を作製し、皮膚表皮からの抗原輸送、抗原提示を解析してきた。表皮に発現した自己抗原は骨髄由来の抗原提示細胞により、皮膚所属リンパ節で MHC class I 上に提示されており、これを CD8<sup>+</sup>T細胞が認識すると、それらは速やかに活性化、分裂し、皮膚へ浸潤、表皮ケラチノサイトのアポトーシスを誘導することを報告した。本研究ではケラチン5プロモーター下に Green Fluorescent Protein (GFP)を発現するトランスジェニックマウス K5xGFP とニワトリの卵白アルブミン(OVA)を発現するトランスジェニックマウス K5-mOVAを用いることで、表皮抗原の発現と抗原提示をとらえることができる。

(3) Montecino-Rodriguez らは B-1 細胞の前駆細胞を骨髄で特定し、Lin<sup>-</sup>B220<sup>low-neg</sup>CD93<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>であることを最近報告した。(E. Montecino-Rodriguez, H. Leathers, K. Dorshkind, Identification of a B-1 B cell-specified progenitor, Nat Immunol 7 (2006) 293-301.)

### 2. 研究の目的

(1) 表皮自己抗原を発現する新規リンパ球系細胞の細胞表面分子、遺伝子発現、サイトカイン産生などの特徴を解析する。

(2) 表皮自己抗原を発現する新規リンパ球系細胞の抗原提示能と自己免疫疾患への関与について明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) K5xGFP のリンパ節、脾臓、骨髄での表皮自己抗原を発現する新規リンパ球系細胞の特徴解析には、CD5,CD19,CD23,CD43,CD93, IgM, IgG, B220 といったマーカーを用いた。K5xGFP リンパ節での B 細胞の分布を B220 抗体を用いて、染色し、GFP 陽性細胞の分布と比較した。

(2) 表皮自己抗原を発現する新規リンパ球系細胞の IgM の自然分泌能の解析には Cell sorter による精製をおこなった。精製した細胞の IgM 産生は、IgM の ELISPOT assay を行った。

### 4. 研究成果

(1) ケラチン5を発現する新規リンパ球系細胞は、リンパ節では、リンパ濾胞ではなく Marginal zone に多く存在することがわかった。この細胞は、リンパ節や脾臓といった末梢リンパ組織では CD93 が陰性で、当初考えていた未熟 B 細胞ではなく、成熟 B 細胞であることがわかった。さらに、IgM<sup>+</sup>IgD<sup>low</sup>CD23<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>であることから、Follicular B 細胞や Marginal zone B 細胞ではなく、B-1 細胞であることがわかった。

(2) ケラチン5を発現する新規リンパ球系細胞は、セルソーターにより精製し、無刺激で、培養液で3時間培養するだけで、IgM を自然分泌能した。IgM の ELISPOT assay では、通常の無刺激の B-1 細胞と LPS で2日

刺激した Follicular B 細胞を比較に用いたが、ケラチン 5 を発現する新規リンパ球系細胞は、無刺激の通常の B-1 細胞よりも、より IgM を産生することがわかった。

(3) K5xGFP の骨髄における Lin<sup>-</sup>B220<sup>low-neg</sup>CD93<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>細胞には GFP 細胞が含まれていたことから、ケラチン 5 を発現する B-1 細胞は、最近報告された B-1 細胞の骨髄前駆細胞と同様の骨髄細胞から分化することがわかった。

#### 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 2 件)

- ① Yamaoka T, Azukizawa H, Tanemura A, Murota H, Hirose T, Hayakawa K, Shimazu T, Wada N, Morii E, Katayama I. Toxic epidermal necrolysis complicated by sepsis, haemophagocytic syndrome, and severe liver dysfunction associated with elevated interleukin-10 production. 22(6) 815-7 Eur J Dermatol. 2012 査読有り
- ② Hanafusa T, Azukizawa H, Matsumura S, Murakami Y, Tanaka A, Kurachi K, Katayama I. Non-pigmenting fixed drug eruption caused by an over-the-counter non-steroidal anti-inflammatory drug: drug-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes identified in peripheral blood. 22(5) 680-2 Eur J Dermatol 2012. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. 中山 育徳, 中野 真由子, 山岡 俊文, 小豆澤 宏明, 種村 篤, 玉井 克人, 片山 一郎, 古賀 浩嗣, 橋本 隆, 三浦 宏之, 崎元 和子 呼吸困難と急激な体重減少を伴い、腫瘍随伴性天疱瘡が疑われた、抗デスモコリン1、2、3IgG抗体陽性の粘膜型水疱症の1例 大阪地方会 5月19日大阪
2. 原 伸輔, 山本 智也, 門脇 裕子, 竹上 学, 大石 雅子, 三輪 芳弘, 小豆澤 宏明, 種村 篤, 片山 一郎, 黒川 信夫がんと化学療法に伴う手足症候群に関する実態調査 日本薬学会 3月28日 札幌。
3. 横見 明典, 種村 篤, 小豆澤 宏明, 片山 一郎TNF $\alpha$ 阻害薬により誘発されたと考えられる乾癬、掌蹠膿疱症の4例 日本皮膚科学会総会 6月1日 京都
4. Hiroaki Azukizawa, Takaaki Hanafusa, Noriko Arase, Ichiro Katayama Erythema multiforme induced by sorafenib Drug hypersensitivity meeting, 4月14日 ミュンヘン
5. 小豆澤 宏明、横見 明典、谷 守、室田 浩之、片山 一郎 パクリタキセル投与中にみられた顔面紅斑の2例 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 総会 7月14日 甲府
6. 小豆澤 宏明 薬疹におけるリンパ球刺激試験 日本皮膚学会総会 6月1日 京都

[その他]

ホームページ等

<http://derma.med.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小豆澤 宏明 (AZUKIZAWA HIROAKI)  
大阪大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：10379240