

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590952

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変マウスの制御性B細胞の分布機能解析とB細胞標的療法最適化の検討

研究課題名(英文) Analysis of Regulatory B cell Distribution and Function in Primary Biliary Cirrhosis (Cholangitis) Model Mice and Optimization of B cell Targeted Therapy

研究代表者

守時 由起 (Moritoki, Yuki)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：90585522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：原発性胆汁性肝硬変(胆管炎)モデルマウスを用いた研究を進め、制御性B細胞を用いた有効性と安全性の高い治療戦略の提言を目指している。炎症抑制性のサイトカインInterleukin(IL)-10を産生する制御性B細胞の検出および機能解析を行う目的で、IL-10-GFP レポーターマウスとの交配によりIL-10産生に併せてGFPマーカーを発現するモデルマウスの作成に成功した。このモデルマウスでは、病理組織学的に肝臓炎症、血清中に抗ミトコンドリア抗体および総IgA、IgGの上昇を認め、元の疾患モデルマウスと同等であった。またIL-10産生制御性B細胞の体内分布には領域ごとに大きな差異を認めた。

研究成果の概要(英文)：We have conducted a model mice study of human Primary Biliary Cirrhosis (Cholangitis) to propose a highly effective and safe therapeutic strategy using regulatory B cells. In order to identify and analyze regulatory B cells that produce Interleukin (IL)-10, one of the immunosuppressive cytokines, IL-10-GFP reporter mice were crossed with the model mice of Primary Biliary Cirrhosis (Cholangitis) to develop IL-10-GFP expressing model mice. The developed model mice demonstrated liver inflammation histopathologically, serum positivity of anti-mitochondrial autoantibody, and elevated levels of total IgA and IgG, which were equivalent to those found in the original model mice. In addition, it was revealed that distribution of IL-10 producing regulatory B cells differ extremely among the physical areas.

研究分野：医歯薬学(消化器内科学)

キーワード：原発性胆汁性肝硬変(原発性胆汁性胆管炎) B細胞 IL-10

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性胆汁性肝硬変(胆管炎:2015年9月より国際的に本疾患の名称が Primary Biliary Cirrhosis から Primary Biliary Cholangitis へと変更された)は、難治性の自己免疫性慢性肝疾患であり、日本では厚生労働省の「難治性肝疾患」に指定されている。現在有効な治療法は確立されておらず、ウルソデオキシコール酸(UDCA)の内服治療にて病気の進行を遅らせるとのエビデンスが示されているが、肝硬変への進展を阻止できるものではなく、疾患末期には肝移植以外の有効な治療法は存在しない。また肝移植後には免疫抑制剤の長期服用が必要であり、移植後5年間に30%程度のケースで原発性胆汁性肝硬変(胆管炎)の再発が見られる。それ故、新たな治療法開発を最終目標として原発性胆汁性肝硬変(胆管炎)の病因、病態に関する活発な研究が世界的に進められている。原発性胆汁性肝硬変(胆管炎)では90-95%の症例にて自己抗体である抗ミトコンドリア抗体が血清学的に認められることから、B細胞の免疫異常が病態に大きく関与すると考えられている。

(2) 自然発症する原発性胆汁性肝硬変モデルマウス(dnTGF- RII マウス)では、抗ミトコンドリア抗体が血清中に認められ、肝臓門脈域にリンパ球を中心とした細胞浸潤および胆管傷害が見られる。そこで我々はB細胞の寄与を解明するため、遺伝的B細胞欠損dnTGF- RII マウスを作成したところ、原発性胆汁性肝硬変(胆管炎)様の肝臓炎症が増悪し、肝臓内の活性化CD4⁺、CD8⁺T細胞の割合も増加した。更に制御性CD4⁺Foxp3⁺T細胞の割合も肝臓内で減少し、Interleukin(IL)-6, Tumor Necrosis Factor (TNF)- などの炎症性サイトカインの上昇を伴っていたことから、B細胞が制御性T細胞を介して肝臓炎症抑制に寄与する一つの機序が明らかとなった。一方、B細胞には炎症抑制性サイトカインであるIL-10を産生する制御性B細胞と呼ばれる一群の存在が報告されているが、肝臓内B細胞においてはIL-10の産生亢進を認めなかったことから、肝臓外のB細胞が炎症抑制に関与する可能性が示唆された。CD8⁺T細胞移植肝臓炎症モデルにおいて腹腔内および脾臓のB細胞の炎症抑制機能を比較したところ、腹腔内のB細胞が肝臓炎症を抑制する一方、脾臓のB細胞にはそのような機能を認めず、肝臓内の単核球数、CD8⁺T細胞数ともに腹腔内B細胞の共移植で減少していた。これらの結果より、腹腔内のB細胞には制御性T細胞を介した肝臓炎症抑制とは異なった機序での炎症抑制機能を有することを我々は報告している

(*Gastroenterology* 2009)。B細胞による肝臓炎症抑制機能に関しては、この報告が世界初であり、肝臓におけるB細胞免疫研究の礎となっている。

一方、治療的B細胞除去療法の可能性を検討するため、若年および成体のdnTGF- RII マウスに抗マウスCD20抗体投与を行ったところ、若年マウスでは抗ミトコンドリア抗体の低下と肝臓炎症の低減を認めたと、成体マウスでは肝臓炎症に有意な変化を認めなかったことから、当モデルマウスにおいては抗マウスCD20抗体投与の早期施行の有効性が示唆されることを我々は報告している(*Hepatology* 2009)。

また、標準治療であるウルソデオキシコール酸(UDCA)投与に不応性のヒト原発性胆汁性肝硬変(胆管炎)患者に対してリツキシマブ(抗CD20抗体)を用いたオープンラベル臨床試験において我々は免疫機能解析を行っており、B細胞除去によりCD4⁺CD25⁺T細胞増加、messenger RNAにてFoxp3、TGF- 発現レベル増加、アルカリフォスファターゼ(ALP)低下を認め、B細胞除去療法の有効性が示唆されることを報告している(*Hepatology* 2012)。

2. 研究の目的

上記背景より、研究代表者らは、原発性胆汁性肝硬変(胆管炎)病期によりB細胞の免疫反応への寄与が炎症抑制、炎症促進へと変化することから、IL-10産生制御性B細胞の分布・局在・比率、自己抗体産生の有無を解明し、炎症促進的B細胞を除去すると共に、炎症抑制的IL-10産生制御性B細胞の喪失を最小限に抑えることで有効性・安全性を向上させ、原発性胆汁性肝硬変(胆管炎)患者におけるB細胞標的療法の確立を目指している。

3. 研究の方法

(1) dnTGF- RII モデルマウスとIL-10産生GFPレポーター(IL-10-GFP)マウスを交配して作成した。

(2) IL-10-GFP-dnTGF- RII マウスにおける肝臓炎症を病理組織学的に検討した。

(3) IL-10-GFP-dnTGF- RII マウスにおける血清中自己抗体である抗ミトコンドリア抗体(AMA)の抗体価をリコンビナントミトコンドリア抗原に対する血清免疫グロブリンを酵素免疫測定法(ELISA)にて検討した。

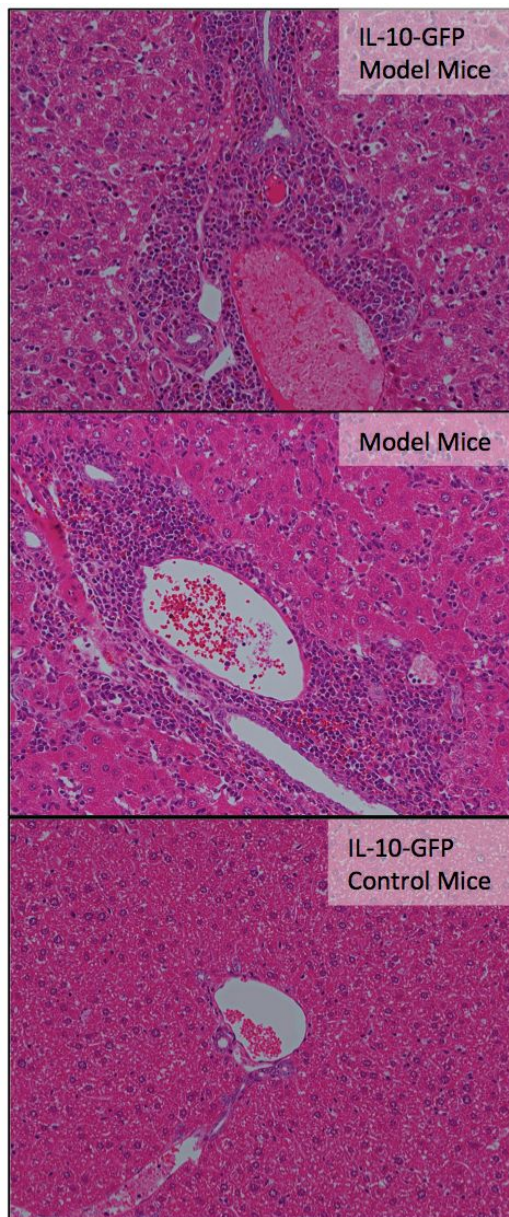
(4) IL-10-GFP-dnTGF- RII マウスにおける血清中免疫グロブリン値について、市販のELISAキットを用いて検討した。

(5) IL-10-GFP-dnTGF- RII マウスにおける IL-10 産生 B 細胞の体内分布・比率を検討するため単核球を採取し、細胞表面を B 細胞のマーカーである CD19 に対する蛍光抗体で染色し、IL-10-GFP の輝度をフローサイトメトリー法にて検討した。

4. 研究成果

(1) dnTGF- RII モデルマウスと IL-10 産生 GFP レポーター (IL-10-GFP) マウスを交配し、IL-10-GFP をホモ発現するマウスを作成した。これにより、IL-10 産生細胞を IL-10 細胞内染色を行わずに、GFP の発現の有無により検討できる実験系が完成した。

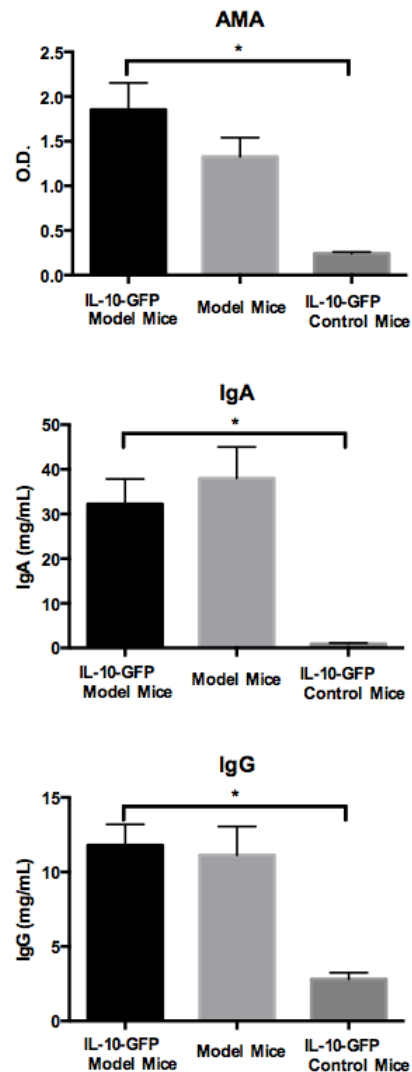
(図 1) 肝臓炎症の病理組織学的検討



(2) IL-10-GFP-dnTGF- RII マウスにおいて、dnTGF- RII マウスと同様の肝臓炎症が惹起されることを確認するため、病理組織学的検討を行ったところ、門脈域を含む肝臓内に浸潤する多数の炎症細胞を認められたが、IL-10-GFP マウスでは肝臓炎症を認めなかった (図 1)。

(3) IL-10-GFP-dnTGF- RII マウスにおいて、dnTGF- RII マウスと同様に血清中に自己抗体である抗ミトコンドリア抗体 (AMA) が存在することを確認するため、リコンビナントミトコンドリア抗原に特異性を有する血清免疫グロブリンを酵素免疫測定法 (ELISA) にて検討をおこなったところ、血清中 AMA 抗体価の上昇が見られ、IL-10-GFP マウスと比較して有意な上昇を認めた。(図 2)。

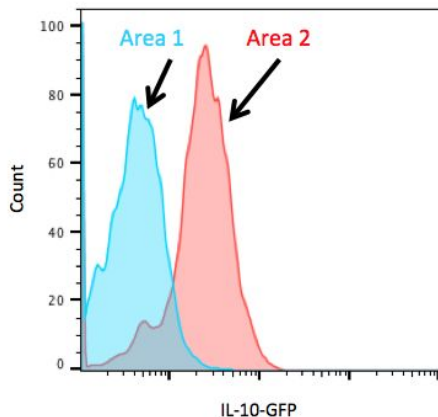
(図 2) ELISA (AMA, IgA, および IgG)



(4) IL-10-GFP-dnTGF- RII マウスにおいて、dnTGF- RII マウスと同様に血清免疫グロブリンの上昇がみられることを確認するため、ELISAにて血清中のIgM, IgA, IgG 免疫グロブリンレベルを測定したところ、同様のレベルにてIgM, IgA, IgG が確認され、IL-10-GFP マウスと比較してIgA, IgG が有意に上昇していた(図2)。

(5) IL-10-GFP-dnTGF- RII マウスにおいて、IL-10 産生 B 細胞の体内分布・比率を検討するため、マウス体内の複数領域から単核球を採取し、B 細胞表面マーカーである CD19 に対する蛍光抗体で染色後に CD19 陽性細胞における IL-10-GFP の輝度をフローサイトメトリーにて検討したところ、Area 1 に比較して Area 2 では IL-10-GFP 輝度が上昇している B 細胞が多数確認された(図3)。

(図3) フローサイトメトリーによる B 細胞における IL-10 産生の検討



これらの研究結果より、本モデルマウスにおいて IL-10 産生制御性 B 細胞の体内分布は領域により異なることが明らかとなり、制御性 B 細胞の機能解析を含めた検討を進めている。

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3件)

佐々塚涼弥, 馬場逸人, 菊池健太郎, 守時由起, 常山幸一. 原発性胆汁性肝硬変の免疫病理. 肝胆膵(査読無し), 71(5), 2015, 831-837.

Kikuchi, K., Tsuneyama, K., Yamada, H., Kajiyama, Y., Matsumoto, K., Tsunashima,

H., Yamashita, R., Takai, A., Negishi, M., Hara, M., Moritoki, Y., Miyakawa, H. Splenic lymph follicles generate immunoglobulin M-producing B cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology Res.* (査読あり), 44(10), 2014, E253-E6. doi: 10.1111/hepr.12231.

Jin, Q., Moritoki, Y., Lleo, A., Tsuneyama, K., Invernizzi, P., Moritoki, H., Kikuchi, K., Lian, Z.X., Hirschfield, G.M., Ansari, A.A., Coppel, R.L., Gershwin, M.E. and Niu, J. Comparative analysis of portal cell infiltrates in antimitochondrial autoantibody-positive versus antimitochondrial autoantibody-negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology* (査読あり), 55(5), 2012, 1495-506. doi: 10.1002/hep.25511.

[学会発表](計1件)

Moritoki, Y. B cell immunity in Primary Biliary Cirrhosis, First China-Japan Symposium on Autoimmune Liver Disease. May 4th, 2012, Hefei, China.

[図書](計3件)

守時由起, 菊池健太郎, 常山幸一 (2015) 自己免疫性胆管炎: 抗ミトコンドリア抗体陰性原発性胆汁性肝硬変 免疫症候群 第2版 -その他の免疫疾患を含めて-. 日本臨牀社, 大阪, 369-374.

吉田勝紀, 守時由起, 常山幸一 (2015) 原発性胆汁性肝硬変におけるバイオマーカーの探索. 最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応, (株)技術情報協会, 東京, 373-377.

Moritoki, Y. and Ueno, Y. (2014) Autoimmune Liver Diseases. Perspectives from Japan. Part II, Chapter 14. Animal Models for Primary Biliary Cirrhosis. 2014:171-199. Springer

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守時 由起 (MORITOKI, Yuki)
秋田大学・医学部・講師
研究者番号：90585522

(2) 研究分担者

茆原 順一 (CHIHARA, Junichi)
所属研究機関：なし (秋田大学・大学院
医学系研究科・教授の職を辞し、平成2
4年12月3日に退職したため、研究分担
者から削除)
研究者番号：80197615

(3) 連携研究者

なし
研究者番号：