

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24689023

研究課題名(和文) 制御性B細胞の実体と免疫抑制機序の解明

研究課題名(英文) Identification of regulatory B cells in vivo and elucidation of its suppressive mechanism

研究代表者

馬場 義裕 (Yoshihiro, Baba)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：20415269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫反応を抑制するIL-10産生B細胞(制御性B細胞)の性状および抑制機序は未解明である。そこで、我々は実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いて、それら疑問にアドレスした。IL-10レポーターマウスにEAEを誘発させたところ、所属リンパ節に局在するプラズマプラストが主にIL-10を発現することが判明した。また、B細胞特異的Blimp1欠損マウスを樹立し、EAEを誘導するとコントロールに比べて、より重篤な脳脊髄炎を発症したことから、Blimp1がEAE抑制に重要である事が明らかとなった。さらに、ヒト末梢血由来B細胞から分化誘導させたプラズマプラストも主なIL-10産生細胞である事が判明した。

研究成果の概要(英文)：B cells can suppress autoimmunity by secreting interleukin-10 (IL-10). Although subpopulations of splenic B lineage cells are reported to express IL-10 in vitro, the identity of IL-10-producing B cells with regulatory function in vivo remains unknown. By using IL-10 reporter mice, we found that plasmablasts in the draining lymph nodes (dLNs), but not splenic B lineage cells, predominantly expressed IL-10 during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). These plasmablasts were generated only during EAE inflammation. Mice lacking plasmablasts by genetic ablation of the transcription factor Blimp1 in B lineage cells developed an exacerbated EAE. Hence, plasmablasts in the dLNs serve as IL-10 producers to limit autoimmune inflammation. As with mice, we established that human plasmablasts derived from naive B cells selectively secreted IL-10, reinforcing the importance of plasmablasts as IL-10-producing regulatory cells.

研究分野：免疫

キーワード：制御性B細胞 炎症 自己免疫疾患 IL-10

1. 研究開始当初の背景

抗体産生や抗原提示によるT細胞の活性化がB細胞の中心的役割だと考えられているが、それだけでなく、自己免疫性炎症反応を抑制するB細胞(制御性B細胞)の存在が明らかになり、非常に注目されている。特に、抗炎症性サイトカインIL-10を産生するB細胞は多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性大腸炎、I型糖尿病といった自己免疫疾患モデルマウスを用いた研究から、これら炎症反応を抑制することが明らかになっている。このように、抑制機能を有するB細胞の研究は、その新規性に加え、基礎免疫学および臨床医学的な重要性は明らかであり、国内外を問わず積極的に研究が行われている。しかし、IL-10産生制御性B細胞の性状および抑制メカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

多発性硬化症のマウスモデル系である実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いて、生体内におけるIL-10産生B細胞の同定とその作用機序を明らかにする。また、IL-10以外の制御性B細胞の同定も試みる。

3. 研究の方法

- (1) IL-10レポーターマウスにEAEを誘導し、いつ、どこに、IL-10産生B細胞が局在するかを同定し、細胞表面マーカーから、その集団の正体を明らかにする。
- (2) IL-10陽性細胞を同定するためにBlimp1-GFPレポーターマウスにEAEを誘導する。
- (3) IL-10産生B細胞がプラズマブラストであることから、B細胞特異的Blimp1欠損(プラズマブラスト欠損)細胞を樹立し、EAE病態を検証
- (4) *in vitro*でB細胞をLPS刺激してプラズマブラストに分化させ、そのIL-10産生を検証
- (5) ヒト末梢血のB細胞をCpG, IL-2/6, インターフェロンalphaの刺激でプラズマブラストへ分化させ、そのIL-10産生を検証

4. 研究成果

野生型およびIL-10-Venusレポーターマウスに、EAEを誘発させ、14日後の脾臓や所属リンパ節、脊髄から細胞を単離して各種B細胞集団のIL-10(Venus)の発現レベルを測定したところ、所属リンパ節に局在するCD138⁺CD44^{hi}細胞が主にIL-10を発現することが判明した(図1)。

CD138はプラズマブラストまたはプラズマ細胞のマーカーとして知られていることから、IL-10⁺CD138⁺CD44^{hi}B細胞集団を同定するために、Blimp1(プラズマ細胞分化に必須の分子)のGFPレポーターマウスにEAEを

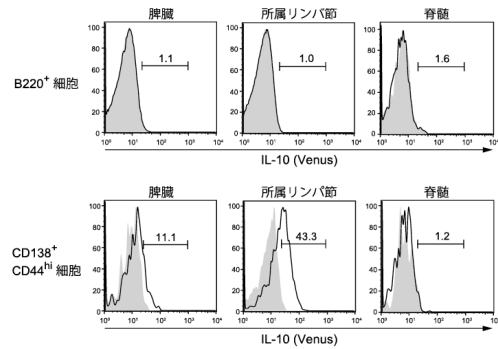


図1 脳脊髄炎を誘発させたマウスの各組織におけるIL-10産生B細胞

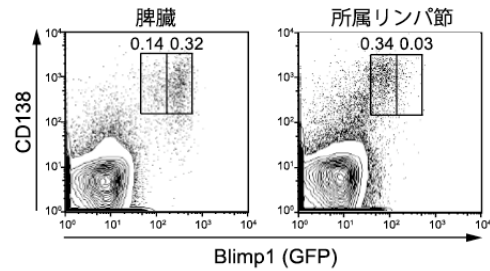


図2 脳脊髄炎を誘発させたマウスのCD138陽性細胞のBlimp1発現レベル

誘発させた。その結果、所属リンパ節のCD138陽性細胞はBlimp1を低レベルに発現するプラズマブラストであることが明らかとなった(図2)。

次に、プラズマブラストが抑制機能を有するかどうかを検証するために、B細胞特異的Blimp1欠損マウスを樹立し、EAEの重症度を観察した。B細胞特異的Blimp1欠損マウスはコントロールマウスにくらべて、より重篤な脳脊髄炎を発症したことから、Blimp1がEAE抑制に重要である事が明らかとなった(図3)。

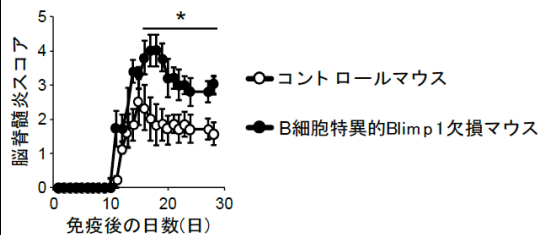


図3 B細胞特異的Blimp1欠損マウスにおける脳脊髄炎の増悪化

*In vitro*においてプラズマブラストがIL-10産生B細胞であることを確認するために、Blimp1-GFPレポーターマウスを用いた。B細胞をLPSで刺激して、プラズマブラストへ分化させ、BCR刺激後のIL-10分泌を検証したところ、Blimp1-GFP陽性細胞のみが特異的にIL-10を産生することが明らかとなった(図4)。

以上の事から、プラズマブラストがIL-10産生B細胞として機能することが考えられた。では、これらマウスの知見はヒトにも適応できるのか?次にこの疑問にアドレスした。健康人由来の末梢血からB細胞を単離し、

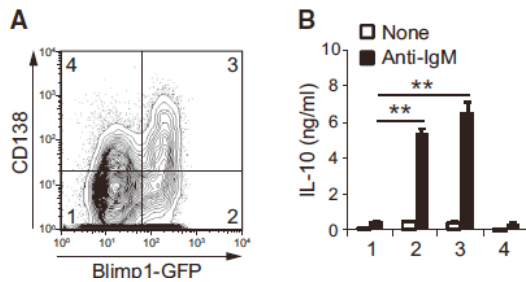


図4 Blimp1陽性細胞のIL-10産生
(A) Blimp1-GFP由来のB細胞をLPSで刺激した後のFACSプロット
(B) 各フラクションを単離し、BCR刺激で誘導されるIL-10産生

CpG, IL-2/6, インターフェロン alpha で培養すると、効率よくプラズマブラストが誘導された。興味深い事に、このプラズマブラストの集団のなかでも CD27^{low} のサブセットがメジャーな IL-10 産生細胞であることを突き止めた。

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 13 件)

1. Morimoto K, Baba Y, Shinohara H, Kang S, Nojima S, Kimura T, Ito D, Yoshida Y, Maeda Y, Sarashina-Kida H, Nishide M, Hosokawa T, Kato Y, Hayama Y, Kinehara Y, Okuno T, Takamatsu H, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Kurosaki T, Toyofuku T & Kumanogoh A. LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF- κ B activation. *Sci. Rep.* 6, 25738; doi: 10.1038/srep25738 (2016).
2. Ohmi Y, Ise W, Harazono A, Takakura D, Fukuyama H, Baba Y, Narazaki M, Shoda H, Takahashi N, Ohkawa Y, Ji S, Sugiyama F, Fujio K, Kumanogoh A, Yamamoto K, Kawasaki N, Kurosaki T, Takahashi Y & Furukawa K. Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. *Nat. Commun.* 7:11205 doi: 10.1038/ncomms11205 (2016).
3. Baba Y & Kurosaki T. Role of Calcium Signaling in B Cell Activation and Biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 393, 143-174 (2016).
4. Baba Y, Matsumoto M & Kurosaki T. Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells. *Int. Immunol.* 10, 487-493 (2015).
5. Shanmughapriya S, Rajan S, Hoffman N, Zhang X, Guo S, Kolesar J, Hines K, Ragheb J, Kaufman B, Baba Y, Zhou Y, Cheung J, Kurosaki T, Gill DL, & Madesh M. Ca²⁺ signals control function and CREB-mediated expression of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Sci. Signal* 8:ra23 (2015).
6. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T & Baba Y. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41, 1040-1051 (2014).
7. Hendron E, Wang X, Zhou Y, Cai X, Goto JI, Mikoshiba K & Baba Y, Kurosaki T, Wang Y, Gill DL. Potent functional uncoupling between STIM1 and Orai1 by dimeric 2-aminodiphenyl borinate analogs. *Cell Calcium* 56, 482-492 (2014).
8. Hartmann J, Karl RM, Alexander RP, Adelsberger H, Brill MS, Rühlmann C, Ansel A, Sakimura K, Baba Y, Kurosaki T, Misgeld T & Konnerth A. STIM1 controls neuronal Ca²⁺ signaling, mGluR1-dependent synaptic transmission, and cerebellar motor behavior. *Neuron* 82, 635-644 (2014).
9. Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani M, Nakamura S, Kurakawa T, Kikuta J, Gotoh K, Motooka D, Sato S, Higuchi T, Baba Y, Kurosaki T, Kinoshita M, Shimada Y, Kimura T, Okumura R, Takeda A, Tajima M, Yoshie O, Fukuzawa M, Kiyono H, Fagarasan S, Iida T, Ishii M & Takeda K. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. *Nat. Commun.* 5:3704 doi: 10.1038/ncomms4704 (2014).
10. Furukawa Y, Teraguchi S, Ikegami T, Dagliyan O, Jin L, Hall D, Dokholyan N, Namba K, Akira S, Kurosaki T, Baba Y & Standley D. Intrinsic disorder mediates cooperative signal transduction in STIM1. *J. Mol. Biol.* 426:2082-2097 (2014).
11. Zhang H, Clemens RA, Liu F, Hu Y, Baba Y, Theodore P, Kurosaki T & Lowell CA. The STIM1 calcium sensor is required for activation of the phagocyte oxidase during inflammation and host defense. *Blood* 123, 2238-2249 (2014).
12. Baba Y, Matsumoto M & Kurosaki T. Calcium signaling in B cells: Regulation of cytosolic Ca²⁺ increase and its sensor

molecules, STIM1 and STIM2. *Mol. Immunol.* 62, 339-343 (2014).

13. Fujii Y, Shiota M, Ohkawa Y, Baba A, Wanibuchi H, Kinashi T, Kurosaki T & Baba Y. Surf4 modulates STIM1-dependent calcium entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 615-620 (2012).

[学会発表] (計 7 件)

1. 馬場義裕 (招待口頭発表) 「Regulatory function of B cells in autoimmune inflammation.」第 709 回 生医研セミナー (九州大学, 博多) 2016 年 2 月 18 日
2. Yoshihiro Baba (招待口頭発表) 「Regulatory function of B cells in autoimmune inflammation」The 7th IFRcC International Symposium "Immunology at the Forefront" (KNOWLEDGE THEATER, Grand Front Osaka) 2016 年 1 月 22 日
3. 馬場義裕 (招待口頭発表) 「炎症を制御する IL-10 産生 B 細胞の誘導機序」第 43 回日本臨床免疫学総会 (神戸国際会議場, 神戸) 2015 年 10 月 22 日
4. 馬場義裕 (招待口頭発表) 「B 細胞ストア作動性カルシウム流入による自己免疫性炎症反応の制御機構」日本薬学会第 135 回年会 (神戸学院大学, 神戸) 2015 年 3 月 27 日
5. 馬場義裕, 黒崎知博 「B 細胞における SOCE の生理的役割」(招待口頭発表) 第 90 回日本生理学会大会 (タワーホール船堀, 東京) 2013 年 3 月 28 日
6. 馬場義裕 「The mechanism of calcium influx induced by ER calcium sensor STIM and its physiological function」(招待口頭発表) 第 85 回日本生化学学会大会 (福岡国際会議場, 福岡) 2012 年 12 月 14 日
7. 馬場義裕 「Physiological significance for Calcium Influx in B cell」(招待口頭発表) 第 40 回日本臨床免疫学会 (京王プラザホテル, 東京) 2012 年 9 月 27 日

[図書] (計 7 件)

1. 馬場義裕 「B 細胞ストア作動性カルシウム流入による自己免疫性炎症反応の制御機構」YAKUGAKU ZASSHI 薬学雑誌 2016;136(3):473-8.
2. 馬場義裕 「免疫反応を抑制する B 細胞:

制御性 B 細胞」ライフサイエンス領域融合レビュー 2016

3. 馬場義裕: 「B 細胞による腫瘍制御」The Frontiers in Life Sciences がん免疫 (南山堂) 84-94, 2015
4. 馬場義裕, 黒崎知博: 「IL-10 産生 B 細胞による自己免疫疾患の制御」実験医学増刊号 自己免疫疾患 (羊土社) vol.33 No. 12, 173-178, 2015
5. 松本真典, 黒崎知博, 馬場義裕: 「インターロイキン 10 を産生するプラズマブラストは自己免疫疾患における炎症反応を抑制する」ライフサイエンス 新着論文レビュー 2014
6. 馬場義裕: 「B 細胞からの IL-10 産生機序」臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) vol. 60 (3) 346-350, 2013
7. 松本真典, 馬場義裕: 「制御性 B 細胞における STIM 依存的カルシウム流入の役割」薬学雑誌 133(4): 419 -425, 2013

[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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
馬場 義裕 (BABA YOSHIHIRO)
大阪大学免疫学フロンティア研究センター・分化制御研究室・特任准教授

研究者番号: 20415269

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：