

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790384

研究課題名(和文)多発性硬化症を抑制するIL-10産生B細胞の同定とその抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of IL-10-producing B cells to suppress multiple sclerosis and elucidation of its suppression mechanism

研究代表者

松本 真典(Matsumoto, Masanori)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：50542106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：これまで多発性硬化症のマウス実験モデルである脳脊髄炎の抑制には、B細胞からの抑制性サイトカインIL-10の産生が必須であることが報告されているが、脳脊髄炎を抑制するIL-10産生B細胞がどのB細胞集団であるかは不明なままであった。そこで、申請者らは、脳脊髄炎を誘発させたIL-10レポーターマウスを用いて、所属リンパ節に局在するplasmablastsが主要なIL-10産生B細胞であること、および、plasmablastsを欠損するマウスでは脳脊髄炎の増悪化が観察されることを明らかにした。以上の結果から、plasmablastsがIL-10の産生を介して脳脊髄炎を抑制していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：B cells can suppress experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a mouse model of multiple sclerosis, by secreting the anti-inflammatory cytokine IL-10. However, which B cell subsets can serve as IL-10-producing B cells to suppress EAE remains unknown. By using IL-10 reporter mice, we found that plasmablasts in the draining lymph nodes (dLNs) predominantly expressed IL-10 during EAE. In addition, mice lacking plasmablasts developed an exacerbated EAE. Thus, these results suggest that plasmablasts in the dLNs can serve as IL-10 producers to limit EAE inflammation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：免疫

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症は自己免疫疾患の一つであり、脳、脊髄、視神経などに炎症が起こることにより、運動麻痺や感覚障害などの神経症状の悪化を繰り返す疾患である。我が国での患者数は人口10万人あたり8~9人程度と推定され、神経繊維を覆っている髄鞘成分が自己抗原になり、この組織を免疫細胞が破壊することにより引き起こされると考えられている。近年、申請者らは、多発性硬化症に類似する脳脊髄炎のマウス実験モデルを用いて、B細胞のカルシウムシグナルが脳脊髄炎の抑制に重要であること、又、この脳脊髄炎の抑制には、B細胞からの抑制性サイトカインIL-10の産生が必須であることを明らかにしてきた(Matsumoto et al. Immunity, 2011)。脳脊髄炎において、この抑制性B細胞の存在が提唱されたのは、1996年にCharles A. Janeway Jr. らが、B細胞を欠損するマウスに脳脊髄炎を誘発させたところ、症状の悪化が観察されることを報告したことが始まりである。2002年にSimon Fillatreau らが、この脳脊髄炎を抑制するB細胞はIL-10を産生するB細胞であることを発見したことがきっかけとなり、その後、脳脊髄炎におけるIL-10産生B細胞の同定は、国内外を問わず精力的に研究が行われてきた。しかしながら、脳脊髄炎を抑制するIL-10産生B細胞がどのB細胞集団であり、どのようなメカニズムを介して脳脊髄炎を抑制しているかは未だ明らかにされていない。

これまで脳脊髄炎を誘発させたマウスのB細胞がIL-10を産生するためには、Toll様受容体2/4 (TLR2/4)、CD40およびB細胞受容体(BCR)からのシグナルが必須であることが報告されていた。そこで、申請者らは、in vitroにおいて、ナイーブB細胞をLPS (TLR4リガンド)で活性化させた後に、BCRを抗体で刺激すると多量のIL-10を産生することを初めて明らかにした(Matsumoto et al.

Immunity 2011)。このLPSで活性化させたナイーブB細胞は、Blimp1を発現するplasmablastsへの分化が誘導されることが知られている。申請者らの予備的な実験では、Blimp1レポーターマウスから単離したナイーブB細胞をLPSで活性化させた後に、Blimp1陽性および陰性のB細胞を単離してIL-10産生能を比較したところ、Blimp1陽性のplasmablastsのみがBCR刺激後に多量のIL-10を産生することを見い出している。また、申請者らは、脳脊髄炎を誘発させたマウスの所属リンパ節でもBlimp1陽性のplasmablastsが局在することを明らかにしている。

そこで、本研究において、Blimp1陽性のplasmablastsがIL-10を産生して脳脊髄炎を抑制するかを明らかにし、それらIL-10産生B細胞が脳脊髄炎を抑制するメカニズムを解明することは、多発性硬化症に対する新たな治療法の開発に繋がり、その意義は大きいものと考えられる。

2. 研究の目的

上記背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では多発性硬化症に類似する脳脊髄炎のマウス実験モデルを用いて、IL-10産生B細胞がplasmablastsであるかを明らかにし、さらにはIL-10産生B細胞による脳脊髄炎の抑制メカニズムの解明を行い、IL-10産生B細胞を介した多発性硬化症に対する新たな治療法を開発するための基盤となる研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかにする。

- (1) 脳脊髄炎を誘発させたIL-10レポーターマウスを用いて、IL-10産生B細胞がplasmablastsであるかを明らかにする。
- (2) Plasmablastsを移入したマウスに脳脊髄炎を誘発させて、症状が抑制される

- かを検討する。
- (3) Blimp1 の発現は plasmablasts への分化に必須であることが報告されている。そこで、B 細胞特異的に Blimp1 を欠損するマウスを作製し、この plasmablasts を欠損したマウスに脳脊髄炎を誘発させて、症状が悪化されるかを解析する。
 - (4) Blimp1 が plasmablasts による IL-10 の産生に必須の転写因子として機能するかを明らかにする。
 - (5) 樹状細胞は脳脊髄炎の悪化を引き起こすエフェクターT 細胞(Th17 細胞)への分化を誘導する。そこで、plasmablasts が産生する IL-10 が、主要な抗原提示細胞である樹状細胞の機能を抑制するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 脳脊髄炎を抑制する IL-10 産生 B 細胞の同定

本研究では、どの B 細胞集団が IL-10 を産生して脳脊髄炎を抑制するかを解析する。

① IL-10 レポーターマウスを用いた IL-10 産生 B 細胞の同定

本研究では IL-10 産生 B 細胞を生理的な条件下で探索するために、中枢神経系の自己抗原の一つである MOG を IL-10 レポーターマウスへ免疫して脳脊髄炎を誘発させた後に各組織から細胞を単離して、IL-10 産生 B 細胞がどのような細胞表面マーカーを発現しているかについてフローサイトメトリーで解析を行った。

② Plasmablasts 移入マウスにおける脳脊髄炎の解析

Plasmablasts は Blimp1 と呼ばれる遺伝子の特異的に発現する。Plasmablasts が脳脊髄炎に対する抑制

能を有しているかを解析するために、脳脊髄炎を誘発させた Blimp1 レポーターマウスのリンパ節から単離した Blimp1 陽性の plasmablasts を、脳脊髄炎の悪化が観察される B 細胞欠損マウスへ移入して、症状が抑制されるかを調べた。

③ B 細胞特異的 Blimp1 欠損マウスにおける脳脊髄炎の解析

Blimp1 の発現は plasmablasts への分化に必須であることから、plasmablasts が脳脊髄炎を抑制するかを解明するために、申請者らは、B 細胞特異的に Blimp1 を欠損するマウス(plasmablasts を欠損したマウス)を作製した後に脳脊髄炎を誘発させて、症状が増悪化するかを検討した。

(2) B 細胞による IL-10 産生メカニズムの解明

申請者らは、LPS で分化誘導させた plasmablasts を BCR 刺激すると多量の IL-10 を産生することを見いだしている。そこで、Plasmablasts への分化に必要な遺伝子である Blimp1 が、IL-10 を産生するために必須の転写因子として機能するかを解析するために、Blimp1 欠損マウスの脾臓から単離した B 細胞を LPS および抗 BCR 抗体で刺激した後に IL-10 産生量を ELISA で検討した。

(3) IL-10 産生 B 細胞による脳脊髄炎の抑制メカニズムの解明

脳脊髄炎は Th17 細胞のようなエフェクターT 細胞が中枢神経系に浸潤することにより引き起こされる。樹状細胞はナイーブ T 細胞からエフェクターT 細胞への分化を誘導することから、plasmablasts が産生する IL-10 が樹状細胞の機能を抑制するかを

明らかにするために、plasmablasts の培養上清存在下でリンパ節由来の樹状細胞と TCR MOG Tg マウス (T 細胞が MOG 特異的 TCR を発現するマウス) から単離したナイーブ T 細胞を共培養すると、エフェクター T 細胞への分化が抑制されるかをフローサイトメトリーで解析を行った。

4. 研究成果

(1) 脳脊髄炎を抑制する IL-10 産生 B 細胞の同定

① IL-10 レポーターマウスを用いた IL-10 産生 B 細胞の同定

脳脊髄炎を誘発させた IL-10 レポーターマウスを解析したところ、所属リンパ節に局在する CD138 陽性の細胞が主要な IL-10 発現 B 細胞であることが明らかとなった (図 1)。また、脳脊髄炎を誘発させた Blimp1 レポーターマウスを解析した結果、この細胞は Blimp1 を中程度に発現する plasmablasts であることを明らかにした。

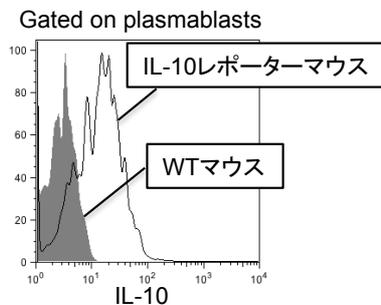


図1 脳脊髄炎を誘発させたIL-10レポーターマウス
脳脊髄炎を誘発させたIL-10レポーターマウスの所属リンパ節に局在するplasmablastsはIL-10を特異的に発現した。

② Plasmablasts 移入マウスにおける脳脊髄炎の解析

脳脊髄炎を誘発させた Blimp1 レポーターマウスのリンパ節から単離した Blimp1 陽性の plasmablasts を、脳脊髄炎の悪化が観察される B 細胞欠損マウスへ移入したが、症状の抑制は観察

されなかった。これは plasmablasts がリンパ節への浸潤に必要な接着分子 (L-selectin や CCR7) をほとんど発現していないことが原因と考えられた。

③ B 細胞特異的 Blimp1 欠損マウスにおける脳脊髄炎の解析

B 細胞特異的に Blimp1 を欠損するマウス (plasmablasts を欠損したマウス) に脳脊髄炎を誘発させたところ、症状の悪化が観察されたことから、plasmablasts が脳脊髄炎の抑制に必須であることが示唆された (図 2)。

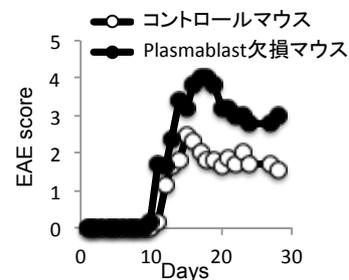


図2 脳脊髄炎を誘発させたplasmablast欠損マウス
Plasmablast欠損マウスに脳脊髄炎を誘発させるとコントロールマウスに比較して症状の悪化が観察された。

(2) B 細胞による IL-10 産生メカニズムの解明

Blimp1 欠損マウスの脾臓から単離した B 細胞を LPS および抗 BCR 抗体で刺激したが、IL-10 の産生量はコントロール細胞と同程度であった。Blimp1 欠損 B 細胞を LPS 刺激した際にも、抗体産生がわずかに観察されることから、Blimp1 を欠損していても plasmablasts への分化が若干誘導されていることが示唆された。そこで、plasmablasts への初期分化に関わる IRF4 を欠損する B 細胞を用いて同様の実験を行ったところ、BCR 刺激後の IL-10 産生能の

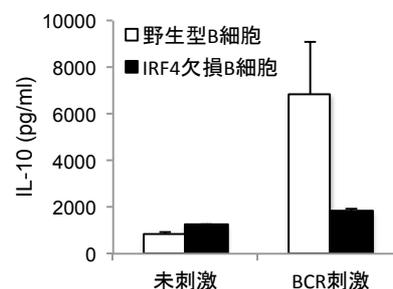


図3 IRF4欠損B細胞によるIL-10産生能
LPSで活性化させたIRF4欠損B細胞をBCR刺激したが、IL-10産生量の亢進が観察されなかった。

亢進が全く観察されなかった (図 3)。以上の結果から、IRF4 は IL-10 の産生に必須の遺伝子であることが示唆された。

(3) IL-10 産生 B 細胞による脳脊髄炎の抑制メカニズムの解明

上述した刺激法を用いて分化誘導させた野生型 plasmablasts の培養上清存在下でリンパ節由来の樹状細胞と MOG 特異的 TCR を発現するナイーブ T 細胞を共培養すると、エフェクター T 細胞への分化が抑制された (図 4)。IL-10 欠損 plasmablasts ではエフェクター T 細胞への分化は抑制されなかったことから、plasmablasts により産生される IL-10 が樹状細胞機能を抑制することにより、エフェクター T 細胞への分化誘導が阻害されることが示唆された。

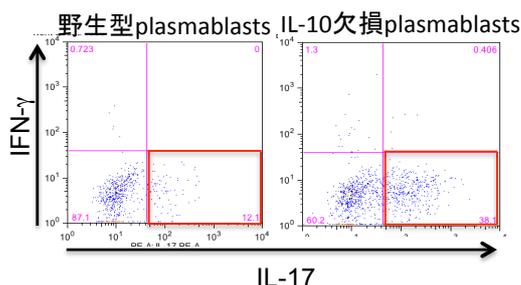


図4 PlasmablastsによるエフェクターT細胞分化の抑制
野生型plasmablastsの培養上清存在下でナイーブT細胞を樹状細胞と共培養させると、IL-17を産生するエフェクターT細胞への分化が抑制された。

以上の結果から、plasmablasts により産生される IL-10 が、樹状細胞を介したエフェクター T 細胞への分化を阻害することにより、脳脊髄炎の悪化を抑制していることが強く示唆された。今後、マウスだけでなく、ヒト多発性硬化症の発症や悪化においても plasmablasts が産生する IL-10 が抑制的に機能しうるかを解明することは、多発性硬化症に対する新たな治療法の開発に繋がり、その意義は大きいものと考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

松本真典、plasmablasts control T cell autoimmunity through IL-10 production、第 42 回日本免疫学会学術集会、12 月 10 日、幕張メッセ

[図書] (計 0 件)

[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

http://lymph.ifrec.osaka-u.ac.jp/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 真典 (MATSUMOTO MASANORI)
大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任助教
研究者番号：50542106

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：