

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860563

研究課題名(和文) 肝硬変における記憶B細胞障害の機序

研究課題名(英文) The mechanism of memory B-cell disturbance in cirrhosis

研究代表者

土肥 弘義 (Hiroyoshi, Doi)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：70465102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：健常者と比べ肝硬変患者では末梢血中CD27陽性記憶B細胞に加え、CD4+およびCD8+エフェクターメモリーT細胞が低下していた。これらの記憶BおよびT細胞は肝障害の進行に伴って減少し、肝硬変患者の免疫不全状態の一因と考えられた。また、記憶B細胞に比べナイーブB細胞は外部からの刺激に対する活性化が弱く、アポトーシスしやすい傾向にあった。B細胞レセプターシグナルによって、より強い活性化と生存が可能となり、CD27発現も相対的に高値となった。興味深い事に、今回の条件下で最も強力な刺激下では、他と同程度の活性化マーカー上昇でもアポトーシスする細胞は多くなり、シグナルのバランスが重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Not only CD27+ memory B-cell but also CD4+ and CD8+ effector memory T-cell are reduced in cirrhotic patients compared to healthy donors. These loss of memory B and T-cell are larger as hepatic function becomes exacerbated and could be a cause of immunodeficiency observed in cirrhosis. Memory B-cell is apt to get activated and be resistant to apoptosis compared to Naive B-cell. B-cell receptor signaling is the most potent factor for, especially Naive, B-cell activation and survival. BCR signal also kept higher CD27 expression on B-cell. The weaker BCR signaling could be a cause of CD27+ memory B-cell loss in cirrhotic patients. Interestingly, though the strongest stimulation in this experimental setting induced great activation marker elevation, it also induced more apoptosis. We believe the optimal balance of stimulation is very important for the best B-cell activation and survival.

研究分野：消化器内科

キーワード：記憶B細胞 肝硬変 免疫不全 B細胞レセプター

1. 研究開始当初の背景

肝硬変患者は免疫不全状態と考えられており、臨床的にも特発性細菌性腹膜炎やバクテリアルトランスロケーションなどの感染症がしばしば問題となる。しかし免疫不全の病態については未だ解明されておらず、さらなる研究が必要と考えられる。申請者は、肝硬変患者では健常者と比較し、末梢血液中に存在する記憶 B 細胞が減少しており、さらにその機能低下が見られる事を以前に報告した。(Doi et. al. Hepatology 2012) また、肝硬変を中心とした慢性肝疾患では、B 細胞が産生する免疫グロブリンの増加が以前より報告されているが、その機序については統一した見解が得られていない。本研究では肝硬変で知られている免疫不全のうち液性免疫に焦点をあて、血清免疫グロブリン値異常と記憶 B 細胞障害を中心に解析する。

2. 研究の目的

肝硬変で観察される液性免疫異常と記憶 B 細胞障害の原因を解明する事を本研究の目的とする。記憶 B 細胞が障害されている原因としては幾つかの要因が考えられるが、本研究では特に以下の 3 つに焦点を当て解析を行った。

- (1) T 細胞や可溶性因子の与える影響
- (2) 種々のシグナルによる B 細胞の活性化およびアポトーシスの誘導
- (3) B 細胞シグナルと CD27 発現の関連

3. 研究の方法

当院に通院し、かつ同意が得られた方より末梢血を採取して以下の実験を行った。同時に測定した臨床血液データとの関連についても併せて解析した。各実験において患者を 4 グループ(健常者、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌)に分けて考察し、さらに Child-Pugh Score による肝障害の程度でも解析した。Flow cytometry (FCM)を用いた実験では、分離した末梢血単核球細胞(PBMC)あるいは B 細胞を染色し、BD LSR Fortessa にて計測し、FlowJo を用いて解析した。具体的な研究方法は、以下の通りである。

(1) 末梢記憶 B 細胞と、T 細胞および可溶性因子との関連

- ① 臨床データや肝障害
PBMC を解析し、CD27 陽性記憶 B 細胞の割合を FCM で測定した。
- ② 記憶 T 細胞
セントラルメモリー T 細胞 (TCM : CCR7+CD45RA-)、エフェクターメモリー T 細胞 (TEM : CCR7-CD45RA-) の割合を測定した。

③ B 細胞活性化因子

採血と同日に回収した血清を用いて、血清中 B 細胞活性化因子 (BAFF/APRIL) 濃度を ELISA にて測定した。

④ B 細胞における TLR 発現

PBMC を用い、B 細胞の TLR4 および TLR9 発現を、CD27 発現と併せて FCM で解析した。

(2, 3) 各シグナルによる B 細胞の動態種々の刺激によって B 細胞で誘導されると予想される以下の①-③を解析した。

健常者の新鮮血より磁気分離法 (MACS) で分離した CD19 陽性 B 細胞を 96 穴のプレートに分配し、以下を用いて単独あるいはその組み合わせにより刺激を行い、それによる①-③の変化を FCM にて測定した。B 細胞に与える刺激としては、B 細胞レセプター (BCR)、TLR4、TLR9 の刺激としてそれぞれ抗 IgG/A/M 抗体、LPS、CpG-ODN を用いた。

① 活性化

マーカーとして、CD80/CD86/CD69/HLA-DR を用いて評価した。

② アポトーシス

上記刺激に伴う細胞死について Annexin V と 7AAD を用いて FCM で評価した。

③ CD27 発現

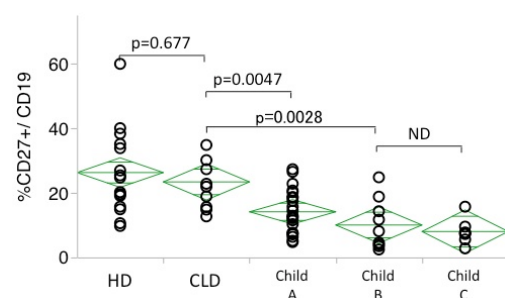
CD19 細胞に占める CD27 陽性細胞の割合を測定し、シグナルによる違いを比較した。

4. 研究成果

(1) 記憶 B 細胞と記憶 T 細胞

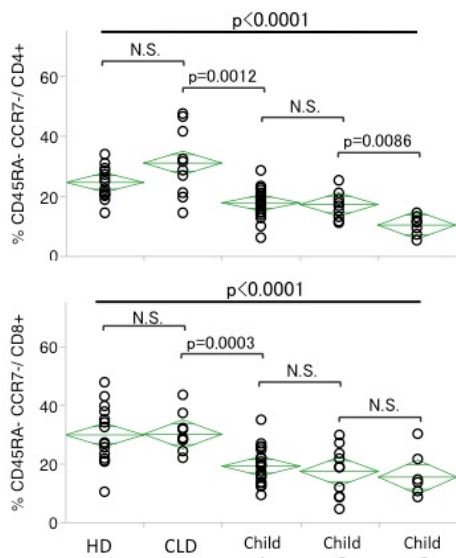
①我々の以前の報告同様、肝硬変において末梢血記憶 B 細胞の減少が見られた。

また、Child-Pugh スコアで評価すると肝障害の進行に伴って末梢記憶 B 細胞が減少する傾向が見られた。

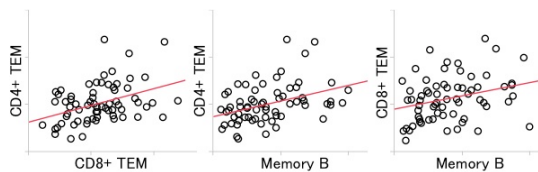


免疫グロブリンについては IgG と負の相関をする傾向が見られたが、IgA や IgM については一定の傾向がみられなかった。

②肝硬変症例では、記憶 B 細胞と同様に CD4+および CD8+ TEM の低下が見られ、どちらも肝障害が進行するに従い減少する傾向であった。TCM には差が見られず、相対的にナイーブ T 細胞が肝硬変で増加する傾向にあった。



同一症例においては、CD4+および CD8+ TEM は、正の相関がみられる傾向があった。(p=0.001, R² =0.16) また、CD4+、CD8+TEM 細胞ともに CD27+記憶 B 細胞と一定の関連が示唆された (CD4+; p=0.003, R² =0.18、CD8+; p=0.008, R² =0.10)。これらは直接的な因果関係とは考えづらいが、ともに肝硬変の進行に伴って減少する事を反映していると考えられる。



③ELISAにてB細胞活性化因子を測定した。健常者あるいは慢性肝障害患者と比較して肝硬変の患者では、血清 BAFF 値は有意に上昇していた (HD vs LC: p=0.0009, CLD vs LC: p=0.0013)。さらにその値は Child Pugh Score に伴い上昇する傾向であった。血清 APRIL 値は差が見られなかった。

④記憶B細胞上のTLR4発現は差が見られなかったが、TLR9発現は肝硬変患者で増加しており (CLD vs LC, p=0.045)、CD27陽性記憶B細胞と負の相関関係にあった (p=0.0276, R²=0.23)。

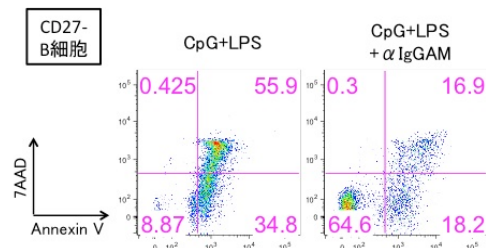
(2) シグナルによる B 細胞変化の違い。

① 活性化

B 細胞に刺激物質を加え培養すると、今回観察した全ての細胞表面の活性化マーカー発現の増強がみられた。BCR シグナルを欠くと相対的な活性化の低下がみられ、最適な B 細胞の活性化には BCR シグナルが重要であると考えられる。

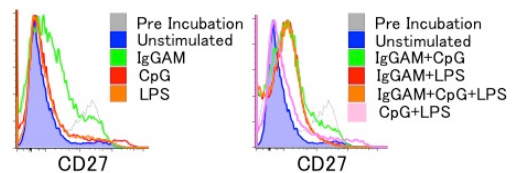
② アポトーシス

培養後、細胞刺激を行わなかった B 細胞の約 70%が(早期+後期)アポトーシスに至った。これらの細胞に刺激を加える事により、どの刺激であっても生細胞の比率が有意に増加するが、BCR シグナルが存在しない場合には、相対的に生細胞の割合は少なかった。これは CD27-B 細胞において特に顕著であった。また CD27-B 細胞であっても BCR シグナルが存在する場合には、CD27+細胞と同等の細胞生存が期待できる事が分かった。



③ CD27 発現

刺激培養後の B 細胞全体に占める CD27 陽性細胞の比率は BCR 刺激が存在する場合に高い傾向が見られた。一方で、CD27 陽性と陰性の細胞を比較すると、活性化マーカーの発現自体は大差がないものの、陰性細胞ではアポトーシスに至っている細胞が多かった。



これらのことから、肝硬変患者では肝障害の進行に伴い、記憶 B 細胞および記憶 T 細胞の障害がみられる事が分かり、肝硬変における免疫不全の一因と考えられた。

B 細胞へのシグナルの中では BCR シグナルが活性化と細胞生存には重要であり、さらに CD27 発現にも関連していた。この所見から肝硬変における CD27 陽性細胞の減少には BCR シグナルの減少が関与している可能性が考えられた。

肝硬変で観察される、活性化しづらくアポトーシスに至りやすい CD27 陰性 B 細胞の相対的な増加をはじめとした免疫細胞バランスの異常を改善させる事は、免疫不全状態自体を改善することも期待でき、今後さらに研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

① 土肥 弘義, 吉田仁 他、肝硬変では肝障害の進展に伴いエフェクターメモリーT細胞が障害される。第51回日本肝臓学会総会 2015年5月22日(熊本)

② 土肥 弘義, 森川 賢一, 吉田 仁 肝硬変における液性免疫異常 第40回日本肝臓学会東部会、ワークショップ2 2014年11月28日(東京)

③ 土肥 弘義, 吉田 仁 バクテリアルトランスロケーションにより増強した Toll-like Receptor 4/9 シグナルが B 細胞を活性化する 第50回日本肝臓学会総会 2014年5月30日(東京)

〔その他〕

昭和大学病院 消化器内科ホームページ

<http://www.showa-u.ac.jp/SUH/department/list/digestive/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土肥 弘義 (DOI Hiroyoshi)

昭和大学 消化器内科 助教

研究者番号：70465102