

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460970

研究課題名(和文) 制御性B細胞の誘導・活性化機構の分子メカニズムの解明と腸管炎症制御への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of induction/activation of regulatory B cells and its application to regulation of intestinal inflammation

研究代表者

石原 俊治 (Ishihara, Shunji)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80263531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの私共の研究で、制御性B細胞(Breg)の存在・機能によって腸管炎症が抑制されることが明らかになってきた。今回の申請課題において得られた知見として、アポトーシス細胞をマウス腸炎モデルに経静脈的投与することによってBregが誘導され、結果的に腸炎が抑制されること、さらに、その過程にはTLR9シグナルとMFG-E8を介したアポトーシス細胞の貪食が関わることを明らかにした。本研究成果は、生体内でBregを誘導する方法として新規の知見であり、炎症性腸疾患の病勢をコントロールする新たな治療法開発へつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Although we recently reported anti-inflammatory roles of regulatory B cell (Breg), methodologies regarding the effective induction of Bregs remain unknown. Apoptosis is a programmed death of unwanted cells, and handling of apoptotic cells (ACs) is thought to have profound effects on immune-mediated disorders. In the present study, we injected ACs into a chronic colitis model in the presence and absence of co-transferred Bregs. We also injected syngeneic ACs into control mice as a control and into milk fat globule-epidermal growth factor 8 knockout (MFG-E8 KO) mice deficient of phagocytic function. Colitis severity of mice was reduced in the AC as opposed to control group. The AC-mediated effect was lost in the absence of Bregs. ACs induced splenic B cells to secrete significantly increased levels of IL-10 in wild mice but not MFG-E8 KO mice. Our results show that ACs are protective only in the presence of B cells and phagocytosis of ACs induced IL-10 producing Bregs.

研究分野：消化器病学

キーワード：炎症性腸疾患 腸管免疫 制御性B細胞 IL-10 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

私共は、これまでに炎症性腸疾患 (IBD) モデルマウス (クローン病自然発症モデル SAMP1/Yit マウス、SCID マウスへのナイーブ T 細胞移入腸炎モデル) を用いて、IBD の病態における制御性 B 細胞 (Breg) の機能を検討してきた (*Immunology* 2010, *Inflamm Bowel Dis* 2014)。この研究結果によって、Breg が存在しない個体では、過剰な免疫応答をとらなう腸炎が増悪することが明らかになっていった。

しかし、腸管免疫の恒常性維持において、どのように Breg が誘導・活性化されるかについては全く不明であった。また一方で、私共のグループは、Breg の研究とは別に、生体内でアポトーシス細胞が処理される過程を研究しており、実際、このシステムが破綻すると炎症性疾患が誘発されることを明らかにしていた (*J Immunol* 2009)。この研究過程で、アポトーシス細胞によって免疫寛容が誘導されることが想定されたため、アポトーシス細胞が制御性の免疫サブセットを誘導する可能性を想定していた。特にアポトーシス細胞による Breg の誘導や治療への応用についての研究や報告は皆無であった。

2. 研究の目的

生体内での Breg の誘導・活性化機構の解明、特にアポトーシス細胞の処理機構との関連を解明し、Breg の免疫調整作用を応用した新規の IBD 治療法を開発することを目的とした。

3. 4. 研究の方法

① アポトーシス細胞の移入による腸炎抑制

アポトーシス細胞の生体内への移入により腸管炎症の抑制が可能になるか否かを検討した。体外においてデキサメサゾンで誘導・調整したアポトーシス細胞 (胸腺細胞) を CD19 陽性 B 細胞とともに、腸炎モデル (T 細胞移入 SCID マウス) に経静脈的に移入した。移入後に体重減少の抑制、腸管の組織学的炎症、腸管における炎症性サイトカイン産生を評価した。

② アポトーシス細胞による腸炎抑制における Breg の関与

上記腸炎モデルにおいて、Breg 存在の有無が腸炎抑制に与える影響を検討した。FACS によって Breg (CD1d^{high}CD19^{high}) を除去した B 細胞群、除去しない全 B 細胞群を調整し、アポトーシス細胞とともに、腸炎モデル (T 細胞移入 SCID マウス) に経静脈的に移入した。同様に、移入後に体重減少の抑制、腸管の組織学的炎症、腸管における炎症性サイトカイン産生を評価した。

③ アポトーシス細胞による Breg の誘導メカニズムの解析

ここまでの検討で、移入アポトーシス細胞が Breg を介して炎症を抑制することが明らかになったので、次に、生体内でアポト

シス細胞がどのように Breg を誘導するかを検討した。他の研究グループの先行研究によって、移入したアポトーシス細胞は脾臓に蓄積することが報告されていた。そこで、野生型 C57/BL マウスにアポトーシス細胞を移入後に、マウスから脾細胞を分離して、FACS で Breg 分画 (CD1d^{high}CD19^{high}) の誘導率を解析した。また、誘導された Breg が PMA や非メチル化 CpG DNA に対して IL-10 を産生するか否かを *in vitro* で検討した。

アポトーシス細胞による Breg 誘導過程における TLR9 の必要性について、TLR9 KO マウスの B 細胞共移入する腸炎モデルを作成し、腸炎の抑制効果を検討した。

③ 本実験系における Breg 誘導には、食細胞によるアポトーシス細胞の貪食が必須であると仮定し、Milk fat globule-EGF factor-8 (MFG-E8) KO マウス (アポトーシス細胞の貪食機能が欠失したマウス) を用いて検討した。具体的には、MFG-E8 KO マウス、および野生型マウスにアポトーシス細胞を移入し、Breg 分画 (CD1d^{high}CD19^{high}) の誘導率を解析した。

4. 研究の成果

① アポトーシス細胞の移入による腸炎抑制

対外で調整したアポトーシス細胞の移入によって、体重減少の抑制、腸管の組織学的炎症や炎症性サイトカイン産生の抑制が顕著に認められた。以上のことから、アポトーシス細胞の移入によって腸炎の抑性が可能になることが明らかとなった。

② アポトーシス細胞による腸炎抑制における Breg の関与

本検討によって、Breg 非存在下では、体重減少の抑制、腸管の組織学的炎症や炎症性サイトカイン産生の抑制が十分に認められず、アポトーシス細胞による腸炎抑制効果が減弱することが明らかとなった。

③ アポトーシス細胞による Breg の誘導メカニズムの解析

アポトーシス細胞移入後に野生型マウスの脾細胞を分離して、Breg の誘導率を解析したところ、コントロール (非移入群) に比べて、アポトーシス細胞移入群で有意に Breg が誘導された。また、誘導された Breg は PMA や非メチル化 CpG DNA に対して IL-10 を有意に産生するサブセットであった。

TLR9 KO マウスの B 細胞を共移入したモデルでは、Breg の誘導率が低いことから、アポトーシス細胞を介した Breg の誘導には B 細胞に発現する TLR9 の存在が必須であることが明らかとなった。

③ MFG-E8 KO マウス、および野生型マウスにアポトーシス細胞を移入後に、マウスの脾細胞を用いて Breg の誘導率を解析したところ、MFG-E8 KO マウスでの Breg 誘導率が野生型に比べて有意に低いことが明らかとなった。

【まとめ】

申請課題の研究成果によって以下の点を明らかとした。

Breg の存在・機能によって腸管炎症が抑制される。

アポトーシス細胞を経静脈的投与することによって腸炎が抑制される。

移入アポトーシス細胞によって Breg が誘導され、その過程には TLR9 シグナルと MFG-E8 を介したアポトーシス細胞の貪食が関わる。

上記の研究成果を基に、今後は IBD への治療応用を目指した研究へつなげていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Kawashima K, Ishihara S (14 名 , 2 番目), et al. Fecal calprotectin level correlated with both endoscopic severity and disease extent in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterology* 16: 47; 2016. (doi:10.1186/s12876-016-0462-z)査読有
2. Mishima Y, Ishihara S (13 名, 2 番目), et al. Decreased Frequency of Intestinal Regulatory CD5+ B Cells in Colonic Inflammation. *PLoS One* 11: e0146191, 2016. (doi:10.1371/journal.pone.0146191) 査読有
3. Tada Y, Ishihara S (16 名, 2 番目), et al. Down-regulation of serotonin reuptake transporter gene expression in healing colonic mucosa in presence of remaining low grade inflammation in ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 31:1443-1452; 2016. (doi:10.1111/jgh.13268)査読有
4. Ishihara S, Kinoshita Y, Schoepfer A. Eosinophilic esophagitis, eosinophilic gastroenteritis, and Eosinophilic colitis: Common mechanisms and differences between east and west. *Inflamm Intest Dis* 1: 63-69, 2016. (doi:10.1159/000445131)査読有
5. Kinoshita Y, Ishihara S (7 名, 7 番目) , et al. Recent progress in the research of eosinophilic esophagitis and gastroenteritis: review *Digestion*, 93:7-12; 2016. (doi:10.1159/000441668) 査読有
6. Kusunoki R, Ishihara S (15 名 2 番目), et al. Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in colonic inflammation and carcinogenesis. *J Gastroenterol.* 50:862-75, 2015. (doi:10.1007/s00535-014-1036-x) 査読有
7. Yoshimura N, Ishihara S (27 名 ,17 番目), et al. An open-label prospective randomized multicenter study of intensive versus weekly granulocyte and monocyte apheresis

in active crohn's disease. *BMC*

Gastroenterology 15:163; 2015.

(doi:10.1186/s12876-015-0390-3)査読有

8. Oka A, Ishihara S (10 名 , 2 番目), et al. Role of regulatory B cells in chronic intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 20:315-28; 2014. (doi:10.1097/01.MIB.0000437983.14544.d5) 査読有
 9. Ansary MM, Ishihara S (10 名 2 番目), et al. Apoptotic Cells Ameliorate Chronic Intestinal Inflammation by Enhancing Regulatory B-cell Function. *Inflamm Bowel Dis* 20:2308-2320; 2014. (doi:10.1097/MIB.0000000000000240) 査読有
 10. Fukuba N, Ishihara S (10 名 , 2 番目), et al. Prevalence of irritable bowel syndrome-like symptoms in ulcerative colitis patients with clinical and endoscopic evidence of remission: prospective multicenter study. *Scand J Gastroenterol* 49:674-680; 2014. (doi: 10.3109/00365521.2014.898084) 査読有
 11. Kawashima K, Ishihara S (18 名 2 番目), et al. Therapeutic Efficacy of pH-Dependent Release Formulation of Mesalazine on Active Ulcerative Colitis Resistant to Time-Dependent Release Formulation: Analysis of Fecal Calprotectin Concentration. *Biomed Res Int* 2014:342751;2014. (doi:10.1155/2014/342751) 査読有
- ### 〔学会発表〕(計 13 件)
1. Oshima N, Ishihara S (6 名, 2 番目) , et al. Epidermaldifferentiation complex protein involucrin is down-regulated in eosinophilic esophagitis. Asian pacific Digestive Week, Kobe Convention Center, Hyogo, Kobe, Japan, 2016 November 2-5.
 2. Mishima Y, Ishihara S (13 名, 2 番目) , et al. Persistent decrease in colonic regulatory CD5+ B cell possibly associated with pathogenesis of inflammatory bowel disease. The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis, Kyoto International Conference center, Kyoto, Kyoto, Japan, 2016 July 7-9.
 3. 三島義之、石原俊治 (9 名, 2 番目) , 他. プレナリーセッション: IBD 基礎: 腸内細菌による腸管 IL-10 産生細胞誘導メカニズムの解明と腸管免疫制御への応用. 第 102 回日本消化器病学会総会, 京王プラザホテル, 東京都新宿区, 2016 年 4 月 21-23 日.
 4. Kawashima K, Ishihara S (13 名, 2 番

- 目), et al. Psychological state of subjects with irritable bowel syndrome and headache: annual health check-up survey results. Digestive Disease Week 2015, Washington, USA, 2015 May 17-19.
5. Kawashima K, Ishihara S (11 名, 2 番目), et al. Fecal calprotectin concentration correlated with both endoscopic severity and disease extent in ulcerative colitis: Analysis of sum of Mayo endoscopic subscore for five colon segments. Digestive Disease Week 2015, Washington, USA, 2015 May 17-19.
 6. Ishihara S (13 名, 1 番目), et al. Apoptotic neutrophils ameliorate intestinal inflammation - possible mechanism of granulocyte/monocyte apheresis 10th Congress of European European Crohn's Colitis Organisation(ECCO). Barcelona, Spain, 2015 February 18-21.
 7. Kawashima K, Ishihara S (11 名, 2 番目), et al. Matrix metalloproteinase-3 concentration correlates with clinical and endoscopic evidence of ulcerative colitis. 10th Congress of European European Crohn's Colitis Organisation(ECCO). Barcelona, Spain, 2015 February 18-21.
 8. Tada Y, Ishihara S (11 名, 2 番目), et al. Serum amyloid A level correlated with endoscopic findings in patients with Crohn's disease-possible biomarker for evaluating mucosal healing 10th Congress of European European Crohn's Colitis Organisation(ECCO), Barcelona, Spain, 2015 February 18-21.
 9. 園山浩紀、石原俊治 (11 名, 2 番目), 他. 腸管炎症における IL-33 の役割. 第 11 回日本消化管学会総会学術集会, 京王プラザホテル, 東京都新宿区, 2015 年 2 月 13-14 日.
 10. Mishiro T, Ishihara S (4 名, 3 番目), et al. Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis models via milk fat globule-EGF factor 8. The 5th asian-pacific topic conference, Kobe Convention Center, Hyogo, Kobe, Japan, 2014 October 21.
 11. 川島耕作、石原俊治 (11 名, 2 番目), 他. Research Forum: 炎症性腸疾患の病態と診断: 便中カルプロテクチンを指標とした活動期潰瘍性大腸炎に対するアサコールの有効性の評価と意義. 第 100 回日本消化器病学会総会, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区, 2014 年 4 月 23-26 日.
 12. 岡明彦, 石原俊治 (3 名, 2 番目), 他. ワークショップ: 腸疾患病態研究の進歩 - 免疫と腸内環境 - 制御性 B 細胞による腸管免疫の機能維持とその破綻による腸炎発症機序の検討. 第 100 回日本消化器病学会総会, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区, 2014 年 4 月 23-26 日.
 13. Mishiro T, Ishihara S (4 名, 3 番目). Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis models via milk fat globule-EGF factor 8. The 7th International Gastrointestinal Consensus Symposium, CORASSE Fukushima, Fukushima, Fukushima, Japan, 2014 February 15.

【図書】(計 2 件)

1. Mishima Y, Ishihara S (4 名, 2 番目). TGF- β detection and measurement in murine B cells: pros and cons of the different techniques. In: Methods Mol Biol. Vitale G, Mion F(ed) pp71-80. Human Press, New York, 2014.
2. Ishihara S, Kusunoki R, Kinoshita Y (3 名, 1 番目). Anti-Inflammatory Role of MFG-E8 in the Intestinal Tract. In: MFG-E8 and Inflammation. Wang P(ed) pp137-148. Springer Science+Business Media, Dordrecht, 2014.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

石原 俊治 (Shunji Ishihara)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号 : 80263531