

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860262

研究課題名(和文) Plasmablastsを介した多発性硬化症に対する新たな治療法の開発基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapeutic method for multiple sclerosis via plasmablasts

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：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、plasmablastsと呼ばれるB細胞集団からの抑制性サイトカインIL-10の産生が必須であるが、ヒトにおいてもplasmablastsがIL-10産生B細胞であるかは不明なままであった。そこで、申請者らは健常人から単離した末梢血B細胞をin vitroで刺激することにより、plasmablastsのみがIL-10を産生すること、および、このIL-10の産生にはIRF4とNFATの活性化が必要であることを明らかにした。以上の結果から、plasmablastsはIL-10産生B細胞として多発性硬化症を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：B cells can suppress experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis, by secreting an anti-inflammatory cytokine, IL-10. However, whether human plasmablasts can also serve as predominant IL-10 producers remains unknown. By culturing peripheral blood B cells derived from healthy donors in vitro, we found that plasmablasts predominantly produced IL-10 and that their IL-10 production was mediated by activation of IRF4 and NFAT. Thus, these results suggest that human plasmablasts can serve as IL-10 producers to suppress multiple sclerosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：多発性硬化症 IL-10 plasmablast

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。これまでに申請者らは、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、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、どのような転写因子の活性化を受けてIL-10を産生しているかは不明なままであった。

申請者らは、脳脊髄炎時のIL-10産生B細胞を同定するために、IL-10レポーターマウスに脳脊髄炎を誘発させたところ、所属リンパ節に局在するplasmablastsが特異的にIL-10を発現することを見出した。そこで、plasmablastsを欠損するマウスを

作製して脳脊髄炎を誘発させたところ、脳脊髄炎の症状の悪化が観察されたことから、plasmablastsがIL-10を産生して脳脊髄炎を抑制していることが明らかとなった(Matsumoto et al. Immunity, 2014)。また、これまでB細胞がIL-10を産生するためには、Toll様受容体2/4 (TLR2/4)、および、B細胞受容体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)刺激して分化誘導させたplasmablastsは、B細胞受容体刺激後に多量のIL-10を産生すること、および、このplasmablastsによるIL-10の産生には、IRF4とNFATの両転写因子の活性化が必須であることを明らかにした。

そこで、本研究においてマウスだけでなく、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明らかにし、さらにはplasmablastsを移入したマウスで脳脊髄炎が抑制され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。

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、ヒトのB細胞においても、plasmablastsが主要なIL-10産生B細胞であることを明らかにするとともに、plasmablastsによるIL-10産生メカニズムの解明を行う。また、plasmablastsを移入したマウスでは脳脊髄炎が抑制されるかを検討することにより、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) 健常人の末梢血から単離したB細胞をin vitroで分化誘導させた

plasmablasts は主要な IL-10 産生 B 細胞であるかを明らかにする。

(2) 多発性硬化症患者から単離した B 細胞から分化誘導させた plasmablasts は、健常人に比較して、IL-10 産生能が低下しているかを検討する。

(3) もし plasmablasts が主要な IL-10 産生 B 細胞であれば、IRF4 および NFAT の活性化が IL-10 の産生に必須であることを明らかにする。

(4) 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、plasmablasts を移入したマウスでは、脳脊髄炎の症状が抑制されるかを検討する。

3. 研究の方法

① ヒト plasmablasts における IL-10 産生能の解析

1) ヒト plasmablasts における IL-10 産生能の解析

本研究では、ヒトにおいても plasmablasts が主要な IL-10 産生 B 細胞であるかを明らかにするために、健常人の末梢血から単離した B 細胞を *in vitro* において CpG (TLR9 リガンド) およびサイトカイン (IL-2/IL-6/IFN- α) で刺激し、どの B 細胞集団が IL-10 を産生するかを ELISA で比較検討した。

2) 多発性硬化症患者の plasmablasts における IL-10 産生能の解析

多発性硬化症患者では、健常人に比較して、plasmablasts による IL-10 産生能が低下し、病因・病態の悪化を引き起こしている可能性が考えられる。そこで、多発性硬化症患者の末梢血 B 細胞から *in vitro* で分化誘導させた plasmablasts は、健常人に比較して、IL-10 産生能が低下しているかを ELISA で検討した。

② ヒト plasmablasts による IL-10 産生メカニズムの解明

申請者らは、マウスの plasmablasts が B 細胞受容体刺激後に多量の IL-10 を産生すること、又、この plasmablasts による IL-10 の産生には、IRF4 と NFAT の活性化が必須であることを明らかにしている。そこで、まず健常人から単離した B 細胞を *in vitro* で刺激して分化誘導させた plasmablasts が IRF4 を発現するかを明らかにするために、フローサイトメトリー解析を行った。続いて、plasmablasts を B 細胞受容体刺激した際の NFAT の活性化が IL-10 の産生に必須であることを解明するために、CsA と呼ばれるカルシニューリン阻害剤で NFAT の活性化を阻害することにより、IL-10 の産生が抑制されるかを ELISA で検討した。

③ Plasmablasts を介した多発性硬化症に対する治療法の開発基盤の確立

1) 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に IL-10 を産生する plasmablasts が多数局在していることを明らかにしている。そこで、plasmablasts の移入が脳脊髄炎を抑制しうるかを明らかにするために、脳脊髄炎を誘発させた野生型マウスから単離した plasmablasts を 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。

2) 申請者らは、*in vitro* において、マウスのナイーブ B 細胞から IL-10 産生 plasmablasts を分化誘導させる方法を確立している。そこで、野生型マウスの脾臓 B 細胞を *in vitro* で IL-10 産生 plasmablasts に分化誘導させた後に、B 細胞欠損マウスへ移入して、脳脊髄炎の症状が抑制されるかを検討した。

4. 研究成果

① ヒト plasmablasts における IL-10 産生能の解析

1) ヒト plasmablasts における IL-10 産生能の解析

健康人の末梢血から単離した B 細胞を in vitro において CpG およびサイトカインで刺激したところ、CpG 単独刺激ではわずかに IL-10 の産生が検出されただけであったが、CpG とサイトカインを共に加えると、多量の IL-10 の産生が観察された (図 1)。

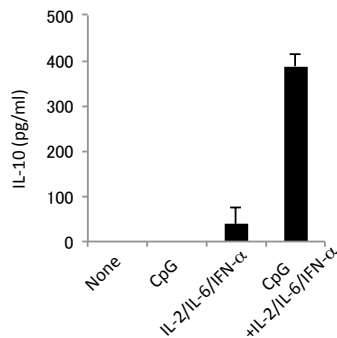


図1 健康人の末梢血B細胞によるIL-10産性能
健康人の末梢血から単離したB細胞をCpGおよびIL-2/IL-6/IFN-αで刺激した後に、IL-10産性能を測定した。

続いて、どの B 細胞集団が IL-10 を産生しているかを明らかにするために、各種 B 細胞集団を単離した後に IL-10 産生能を比較したところ、CD27^{int}CD38⁺の分画のみが特異的に IL-10 を産生した (図 2)。

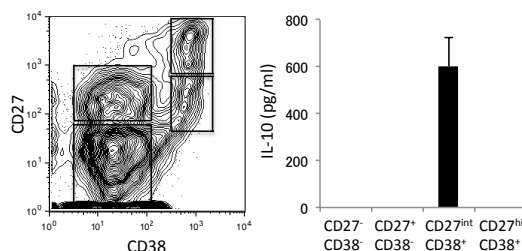


図2 各種B細胞集団によるIL-10産性能
CpGおよびIL-2/IL-6/IFN-αで末梢血B細胞を刺激した後に、各種B細胞集団を単離し、IL-10産性能を比較検討した。

この細胞が発現する遺伝子および形態学的特徴から、この IL-10 を産生する B 細胞集団は plasmablasts に分類されることが示唆された。

2) 多発性硬化症患者の plasmablasts における IL-10 産生能の解析

多発性硬化症患者の末梢血に CD27^{int}CD38⁺ plasmablasts が存在するかを健康人と比較検討するためにフローサイトメトリー解析を行ったが、多発性硬化症患者および健康人において、CD27^{int}CD38⁺ plasmablasts はほとんど検出されなかった。そこで、健康人の末梢血から単離した B 細胞を CpG およびサイトカインで刺激したところ、予想に反して、多発性硬化症患者由来の B 細胞は健康人と比較して、多量の IL-10 を産生した (図 3)。

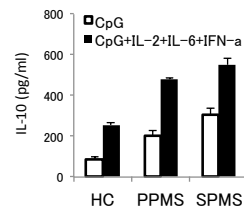


図3 多発性硬化症患者のB細胞によるIL-10産性能
健康人(HC)および多発性硬化症(MS)の患者(一次進行型(PPMS)/二次進行型(SPMS))の末梢血B細胞をCpGおよびIL-2/IL-6/IFN-αで刺激した後に、IL-10産性能を測定した。

これは多発性硬化症患者で強い炎症反応が生じているために、ネガティブフィードバック機構として、より多くの IL-10 が産生されている可能性が示唆された。

② ヒト plasmablasts による IL-10 産生メカニズムの解明

マウスと同様に、ヒトの plasmablasts が IL-10 を産生するために IRF4 と NFAT の活性化が必要であるかを検討した。まず in vitro で分化誘導させた CD27^{int}CD38⁺ plasmablasts の IRF4 の発現をフローサイトメトリーで解析したところ、ナイーブやメモリー B 細胞の分画に比較して IRF4 を高発現していた。また、CsA と呼ばれるカルシニューリン阻害剤を用いて、NFAT の活性化を阻害したところ、B 細胞受容体刺激後の plasmablasts による IL-10 の産生は阻害された (図 4)。

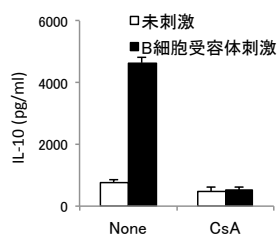


図4カルシニューリン阻害剤処理後のplasmablastsによるIL-10産性能
CpGおよびIL-2/IL-6/IFN- α 刺激で分化誘導させたCD27^{int}CD38⁺
Plasmablastsをカルシニューリン阻害剤(CsA)で処理した後に、
B細胞受容体刺激を行った。

以上の結果から、ヒト plasmablasts が IL-10 を産生するためには、IRF4 と NFAT の活性化が必要であることが示唆された。

③ Plasmablasts を介した多発性硬化症に対する治療法の開発基盤の確立

1)plasmablasts の移入が脳脊髄炎を抑制しうるかを明らかにするために、脳脊髄炎を誘発させた野生型マウスから単離した plasmablasts を 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。

2)申請者らは、脾臓 B 細胞を in vitro で IL-10 産生 plasmablasts に分化誘導させた後に、B 細胞欠損マウスへ移入したが、脳脊髄炎の症状は抑制されなかった。

これらは plasmablasts がリンパ節への浸潤に必要なホーミング受容体を発現していないために、リンパ節へ浸潤することができず、炎症反応を抑制することができなかったものと思われる。今後、plasmablasts の前駆細胞をマウスへ移入することにより、より効率的に in vivo において IL-10 産生 plasmablasts を誘導できるのではないかと考えて研究を行う予定である。

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 2 件)

Matsumoto M., Baba A., Yokota T., Nishikawa H., Ohkawa Y., Kayama H., Kallies A., Nutt S.L., Sakaguchi S., Takeda

K., Kurosaki T. and Baba Y.: Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*, 41:1040-1051, 2014.

Baba Y., Matsumoto M. and Kurosaki T.: Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells. *International Immunology*, 27:487-493, 2015.

[学会発表] (計 0 件)

[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：