

抗原特異的制御性 B 細胞が持つ自己免疫疾患に対する免疫制御機能に関する検討

吉崎 歩

東京大学大学院医学系研究科・医学部 皮膚科

【研究の背景】

B 細胞から抑制性のサイトカインである IL-10 が産生されるることは古くから知られており、2000 年には潰瘍性大腸炎において B 細胞から産生される IL-10 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。申込者の所属するグループでは IL-10 を産生する新しい B 細胞サブセットを同定し、制御性 B 細胞 (B10 cell) と名付けられたこの細胞が多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、接触性皮膚炎、糖尿病、関節リウマチなどのモデルに治療効果を示すことを報告してきた。しかし、その作用機序は不明確であり、制御性 B 細胞から産生される微量の IL-10 がどのように炎症反応を抑制するのかの解明が課題であった。また、生体から得られる制御性 B 細胞の数は極めて少なく、これを用いた臨床応用は現実的ではなかった。申込者らは生体外で制御性 B 細胞を増殖する方法を確立し、多発性硬化症のモデルにおいて B 細胞に発現する MHC class II (MHC II) と T 細胞上の T 細胞受容体 (TCR) が結合したときに、T 細胞から産生される IL-21 が制御性 B 細胞前駆細胞を制御性 B 細胞へと分化させ、制御性 B 細胞から産生される IL-10 が活性化した T 細胞を抑制することを見いだした。MHC II と TCR の結合はまさしく抗原を介した抗原特異的な反応であり、このことは制御性 B 細胞が抗原特異的な免疫反応抑制効果を有することを示している。以上のように制御性 B 細胞の持つ抗原特異性が疾患抑制効果に大きく影響を与えていることが示唆されるが、直接的な制御性 B 細胞の抗原特異性に関する研究は未だ行われていない。今回の研究目的は、制御性 B 細胞の持つ抗原特異性がどのように疾患に影響を与えるかを直接的に検討することにある。

【目的】

制御性 B 細胞は、過剰に活性化された免疫系を抑制性に調節する働きを持つことが知られており、自己免疫疾患やアレルギー疾患において、優れた疾患改善効果を示すことが報告されている。しかし、制御性 B 細胞は生体内にごく僅かしか存在せず、どのような機序で作用を発揮するかが不明であった。本研究の目的は、近年本申込者らによって開発された制御性 B 細胞増殖システムを用い、抗原特異的制御性 B 細胞の機能を解析し、自己免疫疾患の新たな新規治療法の開発と、病態解明を行うことにある。

【方 法】

1. ブレオマイシン(bleomycin; BLM)誘発 SSc モデルマウスの作成

BLM(日本化薬株式会社)を phosphate-buffer saline (PBS) に 1 mg/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛したそれぞれのマウスの背部皮膚へ 4 週間にわたり 27 ゲージの注射針で 300 μ g (300 μ l) を連日皮下投与した。コントロールとして PBS のみを BLM と同様の方法で投与した。

2. Ex vivo 誘導性制御性 B 細胞の作成

マウスの線維芽細胞株である 3T3 細胞に CD154 と B cell activation factor を遺伝子導入し、これを feeder 細胞として C57BL/6 マウスより抽出した脾臓 B 細胞を IL-4 及び IL-21 存在下にて 9 日間培養することで ex vivo 誘導性制御性 B 細胞を作成した。作成された細胞は、以下の SSc モデルマウスに対して 2×10^6 個、尾静脈より養子移入した。

3. 組織学的評価(皮膚肥厚の測定、肺線維化のスコア化、浸潤好中球・肥満細胞数)

各 SSc モデルマウスから背部皮膚と肺を採取し、ヘマトキシリン&エオジン染色とヴァンギーソン染色を行い、皮膚、真皮、皮下脂肪織の厚さを測定した。肺に関しては左中葉のランダムに選ばれた部分を 100 倍の拡大率で観察し、線維化の程度を Aschcroft らの提唱するスコア法で評価した。皮膚および肺へ浸潤する好中球の数を 1 検体中 10 箇所をランダムに選び測定した。トルイジンブルー染色によって肥満細胞を同定し、その数を好中球と同様に測定する。各解析についてそれぞれ最低 10 匹のマウスを用いた。

4. Real-time PCR および ELISA 法によるサイトカイン、細胞成長因子の mRNA 発現の定量的解析

各 SSc モデルマウスの血清と、皮膚および肺から mRNA を採取し、−80℃のフリーザーに凍結保存した。溶解した血清中、皮膚および肺においてインターフェロン γ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、basic fibroblast growth factor、platelet-derived growth factor、transforming growth factor- β などについて real time RT-PCR 法と ELISA 法(DuoSet ELISA Development kit、R&D systems)を用いて発現量と産生量を検討した。それぞれのサンプルは duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

【結果】

SSc マウスマodelを作成し、制御性 B 細胞の検討を行った。BLM 誘発 SSc モデルマウスにおける制御性 B 細胞の数は、コントロールマウスと比較して有意に減少を認めていた。BLM 投与前にコントロールマウスより得られた制御性 B 細胞を養子移入したところ、有意に皮膚硬化と肺線維化の抑制を認めた。さらに、BLM 誘発 SSc モデルマウスより得られた制御性 B 細胞は、コントロールマウスの制御性 B 細胞より有意な皮膚硬化と肺線維化の抑制作用を発揮した。制御性 B 細胞の養子移入は、皮膚および肺における IL-4、IL-6、IL-17 の mRNA 発現と、血清中における蛋白発現を有意に抑制したが、その抑制効果は BLM 誘発 SSc モデルマウスから得られた制御性 B 細胞で強く認められた。

SSc における制御性 B 細胞の疾患抑制効果に関して、自己抗原特異性がどのように影響しているかを検討する目的で、topo I 特異的 ex vivo 誘導性制御性 B 細胞を用いて更なる検討を行った。Topo I 特異的 ex vivo 誘導性制御性 B 細胞は、コントロールマウスより抽出した ex vivo 誘導性制御性 B 細胞よりも強く皮膚及び肺の線維化を抑制した。IL-4、IL-6、IL-17 のサイトカインについても同様に、topo I 特異的 ex vivo 誘導性制御性 B 細胞は topo I 非特異的な ex vivo 誘導性制御性 B 細胞よりも有意に皮膚および肺の mRNA 発現と血清中の蛋白発現を抑制した。

【考察】

今回の結果から、SSc においても制御性 B 細胞は SSc の主要な病態である皮膚硬化と肺線維化に対して疾患抑制効果を発揮し、しかもその効果は自己抗原特異的な機序で起こっていることが明らかとなった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今後、安全性などのさらなる検討を行い、SSc の新たな治療法として、制御性 B 細胞を用いた細胞療法が確立されることが期待される。

【参考・引用文献】

- Yoshizaki A. Sato S. Abnormal B lymphocyte activation and function in systemic sclerosis. *Ann Dermatol.* 2015;27: 1-9.
- Yoshizaki A. Blymphocytes in systemic sclerosis: Abnormalities and therapeutic targets. *J Dermatol.* 2016; 43(1): 39-45.
- Yoshizaki A, Taniguchi T, Saigusa R, Fukasawa T, Ebata S, Numajiri H, Nakamura K, Yamashita T, Takahashi T, Toyama T, Asano Y, Tedder TF, Sato S. Nucleosome in patients with systemic sclerosis: possible association with immunological abnormalities via abnormal activation of T and B cells. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74(10): 1833-1840.

Dis. 2016, in press.

4. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ, Tedder TF. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*. 2012; 491(7423): 264-8.