

80. 制御性 B 細胞をツールとした皮膚難病の治療戦略

藤本 学

筑波大学 医学医療系 皮膚科

Key words : 皮膚疾患, 免疫, サイトカイン, 制御性 B 細胞, シグナル伝達

緒 言

B リンパ球は抗体を産生する細胞として知られており、種々の感染症、蕁麻疹、自己免疫性水疱症、膠原病をはじめとする諸疾患において、重要な役割をもっている。さらに、B 細胞は、サイトカイン産生、抗原提示など抗体産生以外の機能を通じて、さらに幅広い疾患群に関与している可能性が示唆される。このことは、臨床的には、近年可能になった抗 CD20 抗体をはじめとする B 細胞標的療法が、従来予想された以上の数多くの疾患において有効性が示唆されていることから窺える。

一方で、近年、B 細胞の中に抑制性の機能をもつ「制御性 (regulatory) B 細胞」が存在することがわれわれや他のグループから報告され、その役割が注目を集めている¹⁻³⁾。制御性 T 細胞をはじめとする「抑制性細胞」のサブセットは、生体免疫機構において炎症を終息させ自己に対する寛容を維持するための装置として重要であり、その破綻は自己免疫疾患をはじめとする深刻な病態の発症を引き起こしうる。われわれは、B 細胞特異的な細胞表面蛋白で B 細胞のシグナル伝達をコントロールする中心的な分子である CD19 を欠損したマウスにおいて接触過敏反応が著明に亢進していることを見出し、制御性 B 細胞はマウス脾臓の marginal zone (MZ) B 細胞の分画中に存在し、CD5⁺CD1d^{high}CD23^{low}CD21^{high} の表現型をもち、IL-10 の産生が必要であること、CD19 欠損マウスでは制御性 B 細胞が欠損していること、Btk と Stat3 を介したシグナル伝達が不可欠であることを示し⁴⁻⁶⁾、B10 細胞とよんでいる¹。制御性 B 細胞は多発性硬化症モデルである実験性自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、SLE、強皮症の動物モデルにおいても重要な抑制性の役割をもつことが観察され⁷⁻⁹⁾、B 細胞除去療法は制御性 B 細胞を除去した場合には病態の悪化を招きうることを明らかにした。一方、制御性 B 細胞は、感染症における免疫抑制や悪性腫瘍の増殖・進展にも大きく関わっている。このように、制御性 B 細胞は様々な疾患において重要な役割をもっており、有効な治療標的となることが期待できる。そこで、制御性 B 細胞による免疫抑制の分子メカニズムを解析するために、制御性 B 細胞のシグナル伝達機構に関する本研究を行った。

方 法

マウスは、野生型 C57BL/6 マウスおよび C57BL/6 バックグラウンドの Cd19Cre^{+/+}-マウス、Pten^{loxP/loxP} マウス、および μ MT マウス (B 細胞欠損マウス) を Jackson 研究所より購入し使用した。Cd19Cre^{+/+} マウスと Pten^{loxP/loxP} マウスを交配して、B 細胞特異的な Pten 欠損マウスを作製した。このマウスの解析にあたっては Cd19Cre^{+/+}-マウスをコントロールとした。実験方法の詳細は発表論文¹⁰⁾ を参照されたい。

結 果

はじめに、制御性 B 細胞で重要なシグナル伝達経路を同定するために、野生型マウス IL-10 産生 B 細胞と非産生 B 細胞との間でマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行ったところ、いくつかの分子の高発現が認められた。特に PI3 キナーゼ経路の分子の発現異常が目立っていたため、PI3 キナーゼ経路について検討を行うこととした¹⁰⁾。

PI3 キナーゼおよび下流の Akt の活性をそれぞれ阻害する LY290042 と Triciribine を前処理に用いたところ、B 細胞の IL-10 産生条件において、IL-10 産生は完全に阻害された。したがって、PI3 キナーゼ経路の活性化が制御性 B 細胞の IL-10 産生に必須であることが示された。

そこで、PI3 キナーゼ経路を拮抗的に制御する PTEN を B 細胞特異的に欠損させたマウスを作製し、IL-10 産生制御性 B 細胞について解析を行った。B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは、脾臓の MZ B 細胞および B1 細胞の分画が著増しており (図 1)、また末梢血、リンパ節、脾臓、腹腔内の IL-10 産生 B 細胞もコントロール群マウスに比べて有意に増加していた。したがって、PI3 キナーゼ経路は制御性 B 細胞の分化に重要な役割を果たしていることが示された。

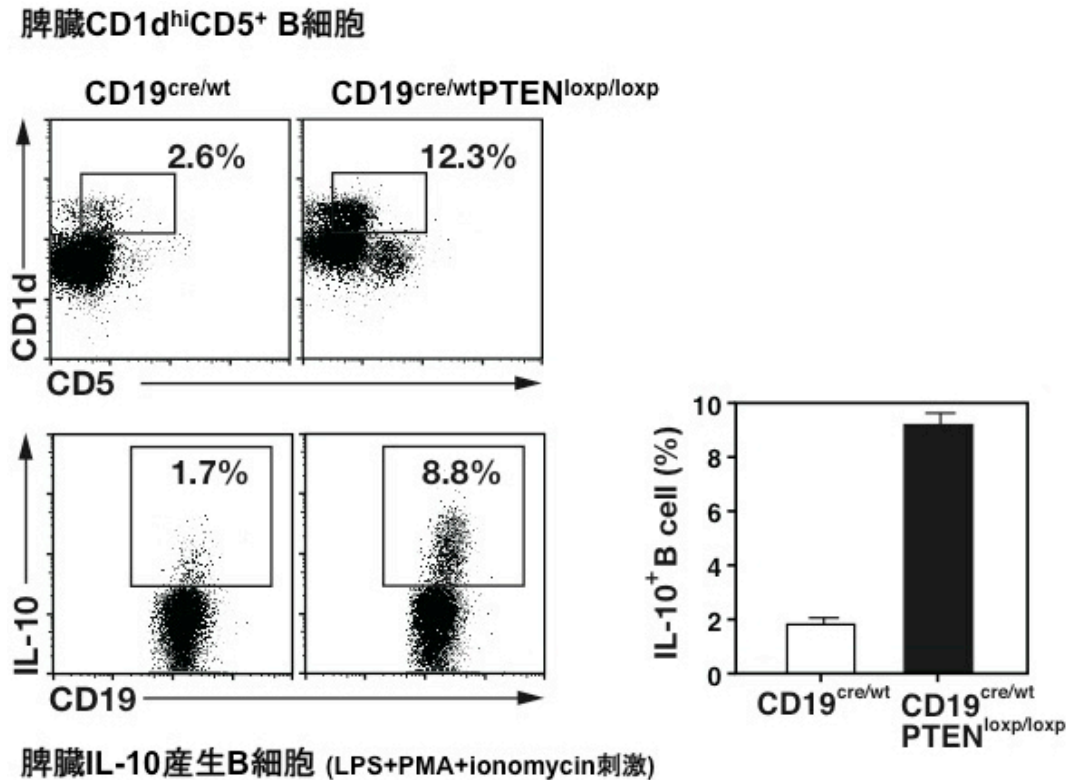


図 1. B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは制御性 B 細胞が増加している
コントロールマウス (左) および B 細胞特異的 PTEN 欠損マウス (右) における CD1d^{hi}CD5⁺B 細胞および IL-10⁺B 細胞。

次に、B 細胞における PI3 キナーゼ経路の活性化亢進の皮膚アレルギー疾患における影響を評価するために、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスを用いて接触過敏反応を検討した。通常のとおり、DNFB により感作した後に再塗布により惹起すると、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスではコントロール群マウスに比べて耳介の腫脹が約 50% に減少した。さらに、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは、皮膚病変部に浸潤する FoxP3 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞の割合が有意に増加していた。したがって、PTEN 欠損 B 細胞が、接触過敏反応の抑制に関与している可能性が示唆された。これを直接的に検証するために、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスおよびコントロールマウスから B 細胞を精製し、B 細胞欠損マウス (μ MT マウス) に移入して、同様に接触過敏反応を評価した。野生型マウスの B 細胞を移入された μ MT マウスは、PTEN 欠損 B 細胞を移入された μ MT マウスに比べて耳介の腫脹が有意に亢進していた。

さらに、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスにおける脾臓の IL-10 産生 B 細胞の分画を解析した。これまでの研究では、IL-10 産生制御性 B 細胞の多くは CD1d^{hi}CD5⁺ の分画 (MZ-B10 細胞) に含まれると考えられていたが、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスの IL-10 産生 B 細胞は主に CD1d^{int}CD5^{hi} の表現型をもつ B-1 細胞であり、B1-B10 細胞と呼ぶことにしたい (図 2)。そこで、この B1-B10 細胞を精製して、前述の実験と同様に μ MT マウスに移入して接触過敏反応を検討した。その結果、B1-B10 細胞も強力な抑制効果をもつことが明らかにされた。この B1-B10 細胞は、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスのみならず、野生型マウスにも認められた。さらに、B1-B10 細胞は脾臓、腹腔内のみならず、末梢血、リンパ節にも認められた。一方で、MZ-B10 細胞は腹腔内、末梢血、リンパ節には認められなかった。以上より、B1-B10 細胞は新しい制御性 B 細胞サブセットと考えられ、生体内における免疫抑制に重要な役割を担っていることが示唆された。

CD19^{cre/wt}PTEN^{loxp/loxp} マウス
(B細胞特異的PTEN欠損)

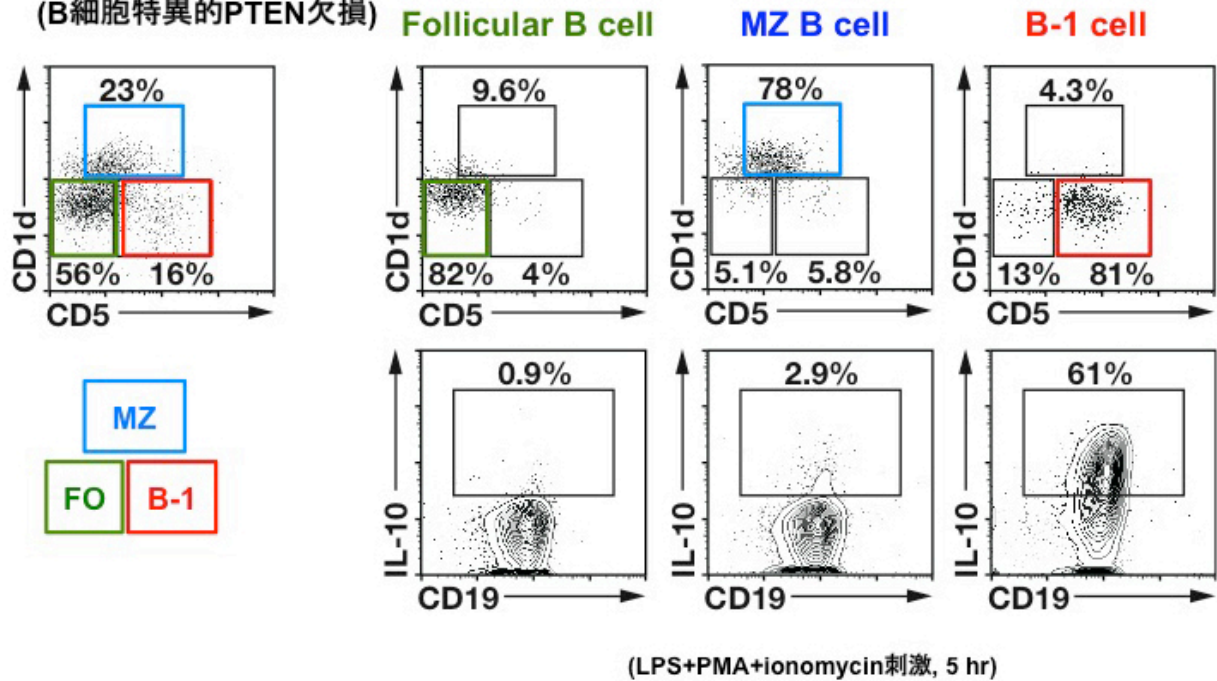


図2. B細胞特異的PTEN欠損マウスにおけるB1-B10細胞

B細胞特異的PTEN欠損マウスにおいてはB1細胞の分画が主要なIL-10産生細胞であった。

MZ-B10細胞とB1-B10細胞に共通したB10細胞全体の細胞表面マーカーを検討した。前述のマイクロアレイによる遺伝子発現解析により候補となったCD9およびCD80について検討したところ、CD9⁺CD80⁺のB細胞分画には両方のB10細胞分画が含まれ、CD9⁻CD80⁻のB細胞分画よりも30倍以上高頻度にB10細胞が存在することが明らかになった。したがって、CD9およびCD80のコンビネーションはB10細胞に特異性の高いマーカーと判断され、これらのマーカーにより特異性が高くB10細胞を標識することができることが示された。

考 察

本研究では、マウスにおける新しい制御性B細胞サブセットであるB1-B10細胞を同定した。また、従来から報告されているMZ-B10細胞とB1-B10細胞の共通の細胞表面マーカーを明らかにした。これらの制御性B細胞を標的とした新規B細胞療法についてさらに検討中であり、今後明らかにしていきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、金沢大学医薬保健研究域皮膚科学の松下貴史講師である。

文 献

- 1) Fujimoto M. Regulatory B cells in skin and connective tissue diseases. *J Dermatol Sci*. 2010 Oct;60(1):1-7. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.08.010. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20832998.
- 2) Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221-41. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22224776.
- 3) Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):391-7. doi: 10.1038/nri2315. PMID: 18437156.
- 4) Watanabe R, Fujimoto M, Ishiura N, Kuwano Y, Nakashima H, Yazawa N, Okochi H, Sato S, Tedder TF, Tamaki K. CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. *Am J Pathol*. 2007 Aug;171(2):560-70. Epub 2007 Jun 7. PMID: 17556590.

- 5) Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 2008 May; 28(5):639-50. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.017. PMID: 18482568.
- 6) Jin G, Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Le Huu D, Ishiura N, Naka K, Hirao A, Takehara K, Fujimoto M. B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Jun;131(6):1674-82. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.044. Epub 2013 Mar 25. PMID: 23534976.
- 7) Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Takehara K, Tedder TF, Sato S. Inhibitory role of CD19 in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating cytokine response. *Am J Pathol*. 2006 Mar;168(3):812-21. PMID: 16507897.
- 8) Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Kuwano Y, Okochi H, Tamaki K, Sato S, Tedder TF, Fujimoto M. Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J Immunol*. 2010 May 1;184(9):4801-9. doi: 10.4049/jimmunol.0902385. Epub 2010 Apr 5. PMID: 20368271.
- 9) Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF, Fujimoto M. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2013 Apr 18;121(16):3274-83. doi: 10.1182/blood-2012-11-465658. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23422748.
- 10) Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Naka K, Hirao A, Muramatsu M, Takehara K, Fujimoto M. A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses allergic disease through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activation. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct;138(4):1170-1182.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1319. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26948079.