

制御性B細胞の機能と自己免疫疾患における役割の解明

金沢大学 医薬保健研究域医学系 皮膚科学
藤本 学

1. はじめに

緒言

生体免疫機構は、感染症、アレルギー性疾患、自己免疫疾患などの様々な病態の惹起や収束に関与している。生体免疫機構には、「ブレーキ」の役割をもつ抑制性細胞の存在が不可欠であり、T細胞における制御性T細胞については研究が進んでいる。近年、免疫反応を抑制するB細胞サブセットである「制御性B細胞」が存在することが明らかになり、様々な免疫疾患の抑制に重要な役割をもつことがわかってきた。しかしながら、その抑制の分子メカニズムは多くの点が未解明のままである。制御性B細胞の分子メカニズムを解明することは、難病である自己免疫疾患の病態解明やそれに立脚する治療法の開発においてブレイクスルーになることが期待される。

目的

本研究は、制御性B細胞の機能の詳細、特にシグナル伝達経路を明らかにするとともに、自己免疫疾患における役割を解明することを目的とする。

背景

抑制性の機能をもつB細胞サブセット、すなわち「制御性B細胞」が存在することが報告され、注目を集めている¹⁻⁵。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実験性自己免疫性脳脊髄炎や接触過敏反応が著明に亢進していることを見だし、これはCD19欠損マウスでは制御性B細胞が欠損しているためであることを示した^{6,8}。同様のメカニズムはSLEの動物モデルにおいても観察され⁹、制御性B細胞がB細胞除去療法により失われた場合には病態の悪化を招きうることを明らかにした^{8,10}。これまでのところ、マウスにおける制御性B細胞は、脾臓のmarginal zone B細胞ないしtransitional 2 marginal zone 前駆B細胞に含まれるCD1d^{hi}CD5⁺B細胞であり、IL-10産生がその機能に必須であると考えられており、「B10細胞」ともよばれる。このような知見は、制御性B細胞が幅広い病態において重要な役割を担っていることを示唆しており、ヒトにおいてもSLEをはじめとする自己免疫性疾患の抑制に大きな役割をもつであろうことが推測される。近年、ヒトの種々の自己免疫疾患においてB細胞標的療法が試みられており、欧米では関節リウマチに対して承認されている。このようなB細胞標的治療を考える上でも、自己免疫疾患を増悪されるであろうエフェクターB細胞のサブセットと抑制するであろう制御性B細胞のバランスを考慮していくことが必須である。

序論

B細胞の反応は、膜表面や細胞内に発現する様々なシグナル伝達分子により巧緻に調節されている。BLNKは、B細胞とマクロファージに発現する細胞内アダプター分子で、Btk, Vav, Grb2, PLC γ 2など様々なシグナル伝達分子と結合し、B細胞抗原受容体シグナルによるカルシウム動員やMAPキナーゼ活性化などに重要な役割を果たす。BLNK欠損マウスでは、B細胞分化に障害があり、プレB細胞の蓄積が起り、follicular B細胞が著明に減少している。一方で、marginal zone B細胞は野生型マウスに比べてBLNK欠損マウスで数は減少しているものの、follicular B細胞よりも障害が少なく、%はむしろ増加している。上述のように、CD19欠損マウスはmarginal zone B細胞の分化が障害されているため、制御性B細胞がほぼ欠損しており、いわば制御性B細胞の分化が障害されているといえる。そのため、marginal zone B細胞の比率がむしろ増加しているBLNK欠損マウスは、制御性B細胞のシグナル伝達を検討する上で有用なツールと考えられる。

2. 方法

C57BL/6系統の野生型マウス、BLNK欠損マウス、およびIL-10欠損マウスを用いた。これらのマウスより脾臓B細胞を採取し、LPS単独またはLPS, PMA, およびイオノマイシンにて刺激し、IL-10の産生を検討した。また、これらのマウスにおいて実験性自己免疫性脳脊髄炎および接触過敏反応を誘導した。実験性自己免疫性脳脊髄炎はMOGペプチドを免疫することにより、接触過敏反応はDNFBによって感作することにより誘導した。また、これらのマウスの種々のB細胞分画をセルソーターを用いて分離してから、個体内に移入することにより、これらの細胞分画の生体内における機能を解析した。

3. 結果

BLNK欠損マウスは、脾臓におけるmarginal zone B細胞分画の%およびCD1d^{hi}CD5⁺B細胞の%は野生型マウスに比べて増加していたにもかかわらず、LPS+PMA+イオノマイシン刺激により誘導されるIL-10産生B細胞はほぼ欠損しており、BLNK欠損マウスにおいては、制御性B細胞 (CD1d^{hi}CD5⁺B細胞) の分画は存在するものの、IL-10産生が傷害されている可能性が示唆された。

BLNK欠損由来CD1d^{hi}CD5⁺B細胞の生体内における機能を検討するために、BLNK欠損マウスにおいて実験性自己免疫性脳脊髄炎および接触過敏反応を誘導し、野生型マウスと比較した。BLNK欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、両反応は有意に増悪増悪がみられ、これは野生型マウスからCD1d^{hi}CD5⁺B細胞を移入することによって正常化したが、IL-10欠損マウスからのCD1d^{hi}CD5⁺B細胞移入によっては改善がみられなかった。したがって、BLNK欠損マウスにおける制御性B細胞は機能に異常があることが示された。

制御性B細胞におけるシグナル伝達経路を検討するために、キナーゼ阻害薬によるB細胞のIL-10産生に対する影響を調べた。Syk阻害薬およびBtk阻害薬は濃度依存的にB細胞からのIL-10産生を抑制した。一方、Src-familyキナーゼ阻害薬はIL-10産生を抑制しなかった。

次に、BLNK欠損B細胞におけるシグナル伝達経路を検討したところ、野生型B細胞ではCD1d^{hi}CD5⁺B細胞においてLPS刺激によりStat3のリン酸化が誘導されたが、BLNK欠損B細胞では誘導されなかった。野生型B細胞におけるStat3リン酸化は、Syk阻害薬あるいはBtk阻害薬により抑制されたことから、このStat3リン酸化はSyk, Btk, BLNKの発現にを必要とすることが示された。一方、JAK阻害薬によっては抑制されなかった。さらに、刺激条件にIL-10を加えると、IL-10産生B細胞はさらに増加し、この増加はJAK依存性であった。

4. 考察・まとめ

本研究によって、BLNKの発現が制御性B細胞の機能、すなわちIL-10産生に必要であることが示された。制御性B細胞を含む分画であるCD1^{hi}CD5⁺B細胞では、follicular B細胞ではみられないLPS誘導性のStat3のリン酸化が認められたが、BLNKはBtkを介してStat3のリン酸化を制御していることがin vitroの系で示された。また、in vivoの系においてもBLNKの発現は実験性自己免疫性脳脊髄炎や接触過敏反応の抑制に必要であった。また、制御性B細胞からのIL-10産生は、autocrine機序によって制御性B細胞をさらに増殖させる働きがあることが示された。制御性B細胞におけるこのようなシグナル伝達系の解明は、制御性B細胞の機能改変によって自己面積疾患に対する治療的アプローチにもつながることが期待できる。

5. 発表論文、参考文献

発表論文

Jin G, Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Huu DL, Ishiura N, Naka K, Hirao A, Takehara K, Fujimoto M. BLNK expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. Submitted.

参考文献

1. Mauri C, Blair PA: Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies, *Nat Rev Rheumatol* 2010, 6:636-643
2. DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF: B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer, *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1183:38-57
3. Fillatreau S, Gray D, Anderton SM: Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology, *Nat Rev Immunol* 2008, 8:391-397
4. Fujimoto M: Regulatory B cells in skin and connective tissue diseases, *J Dermatol Sci* 2010, 60:1-7
5. Mizoguchi A, Bhan AK: A case for regulatory B cells, *J Immunol* 2006, 176:705-710
6. 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, 168:812-821
7. 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, 171:560-570
8. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF: Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression, *J Clin Invest* 2008, 118:3420-3430
9. 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, 184:4801-4809
10. Haas KM, Watanabe R, Matsushita T, Nakashima H, Ishiura N, Okochi H, Fujimoto M, Tedder TF: Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice, *J Immunol* 2010, 184:4789-4800