

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791260

研究課題名（和文） 制御性B細胞におけるPI3Kシグナルによる制御機構の解析

研究課題名（英文）

Analysis of PI3K signaling role in regulatory B cells

研究代表者

松下 貴史（MATSUSHITA TAKASHI）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：60432126

研究成果の概要（和文）：

近年、免疫反応を抑制する作用を持つ IL-10 産生制御性 B 細胞が発見され、免疫疾患において非常に重要であることが明らかとなった。制御性 B 細胞の分化・増殖には B 細胞の表面マーカーである CD19 およびそのシグナル伝達 (PI3K シグナル) が重要であることが示唆されている。本研究では、PI3K シグナルによる制御性 B 細胞の制御機構を解析した。本研究にて PI3K の阻害剤が、用量依存性に IL-10 産生を阻害しりことを明らかとした。さらに PI3K/AKT の inhibitor である PTEN の B 細胞特異的欠損マウスを作成し、同マウスにて IL-10 産生制御性 B 細胞が著増していることを確認した。B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは Contact hypersensitivity 反応の著明な低下が認められた。以上より、IL-10 産生制御性 B 細胞の制御機構において、PI3K/AKT 経路が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

IL-10 producing regulatory B (Breg) cells negatively regulates autoimmune disease and inflammation, such as contact hypersensitivity (CHS). CD19 expression is critical for Breg cells development, since CD19 loss results in decreased number of Breg cell and increased reactivity of CHS. However, molecular mechanism of Breg cell development remains poorly understood. CD19 downstream signal is depend on the activation of phosphoinositide 3-kinases (PI3K)-AKT pathways, while phosphatase and tensin homologue (PTEN) attenuates PI3K-AKT pathways. In this study, we investigated the role of PI3K-AKT pathway in the development of Breg cells. The effect of PI3K-AKT pathway inhibitors on Breg cell development was examined in vitro. B cell-specific PTEN deficient mice, which exhibit aberrant activation of PI3K-AKT pathway in B cell, were generated using Cre-loxp system. CHS severity in B cell-specific PTEN deficient mice was investigated. The current studies demonstrate that PI3K-AKT pathway inhibitors reduced Breg cells in vitro in dose-dependent manner. However, PTEN inhibitor had no effect on Breg cells. Breg cell number and frequency were significantly increased in various organs of B cell-specific PTEN deficient mice when compared with wild-type mice. Furthermore, CHS response was significantly diminished in B cell-specific PTEN deficient mice when compared with wild-type mice. Thus, PI3K-AKT pathway positively regulates Breg cell development, while PTEN negatively regulates it. PI3K-AKT pathway in B cell is critical for Breg cell development and could be a potent therapeutical target.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：皮膚免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：制御性B細胞 IL-10 自己免疫疾患

## 1. 研究開始当初の背景

B細胞はこれまで主に抗体産生細胞としての側面から研究が進められてきたが、B細胞は抗体産生のみならず、抗原提示能やサイトカイン産生、T-B細胞相互作用を介して免疫反応において非常に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。さらに関節リウマチ患者においてリツキサン®（抗CD20抗体）によるB細胞除去療法が予想以上の治療効果を挙げたことから、B細胞の自己免疫反応を促進的に制御する役割に世界中の注目が注がれた。しかしながら、近年B細胞のなかに免疫反応を抑制するサブセットが存在することが我々のグループを含め多数報告され、制御性B細胞として知られるようになった。我々は、この制御性B細胞を制御する分子としてCD19が重要であることを、世界に先駆けて発見している(Matsushita et al, *Am J Pathol*, 2006)。CD19を遺伝的に欠損したマウスでは、多発性硬化症のモデルマウスである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)が著明に重症となる。また、CD19欠損マウスでは接触過敏反応(contact hypersensitivity: CHS)も著明に亢進することが報告されている(Watanabe et al, *Am J Pathol*, 2007; Yanaba et al. *Immunity*, 2008)。さらにEAE、CHSいずれにおいてもCD19欠損マウスでの抑制機能の破綻は、制御性B細胞が欠損しているためであることが示されている。以上より、制御性B細胞が炎症反応・自己免疫反応の抑制に重要であり、制御性B細胞とCD19には強い関連性が存在する。

制御性B細胞はIL-10を特異的に産生するB細胞亜集団と定義され、CD1d<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup>の表現型を有し(Yanaba et al. *Immunity*, 2008)、IL-10産生により過剰な炎症反応および自己免疫反応を抑制する(Matsushita et al. *J Clin Invest*, 2008; Matsushita et al. *J Immunol*, 2010)。CD19欠損マウスではIL-10産生制御性B細胞が著明に減少し、反対にCD19トランスジェニックマウスでは制御性B細胞が著明に増加していることが明らかにされており(Yanaba et al. *Immunity*, 2008, Matsushita et al. *J Immunol*, 2010)、CD19からのシグナルが制御性B細胞の分化・増殖を制御している。CD19はB細胞の細胞表面マーカーで、BCRの刺激を調節する重要な分子である。CD19からのシグナルはB細胞内にお

いて主にPhosphoinositide 3-kinase (PI3K)を介して伝えられる。PI3Kは植物、酵母からヒトまで種を超えて普遍的に存在する非常に保存されたlipid signaling kinaseである。PI3Kにはclass I、IIおよびIIIが存在し、class IAがB細胞のシグナル伝達において重要である。活性化されたPI3KはPIP3を産生し、PI3Kのすぐ下流にあるAKT(別名protein kinase B: PKB)を活性化することにより、細胞の活性化や分化・増殖を制御する。一方、Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN)はPI3Kシグナルを阻害する。近年、樹状細胞において、PI3K↑/AKT↑/mTOR↑/IL-10↑といった一連のシグナル伝達が確認され、少なくとも樹状細胞においてPI3KシグナルがIL-10産生を正に制御することが明らかとなっている(Ohtani and Koyasu et al, *Blood*, 2008)。以上より、B細胞においてもPI3KシグナルがIL-10産生を正に制御していることが推測される。

## 2. 研究の目的

近年、免疫応答におけるIL-10を産生する制御性B細胞の重要性が明らかにされてきた。特に接触過敏反応や実験的自己免疫性脳脊髄炎などのモデルマウスを使用した研究で、制御性B細胞は過剰な免疫反応や炎症を抑制することが示されている。また、制御性B細胞の分化・増殖にはB細胞の表面マーカーであるCD19およびそのシグナル伝達(PI3Kシグナル)が重要であることが示唆されている。本研究は、PI3Kシグナルによる制御性B細胞の制御機構の解明を目的としたものである。

## 3. 研究の方法

まず、PI3Kシグナルによる制御性B細胞の制御機構を解析する。我々の予想ではPI3Kシグナルを抑制すると制御性B細胞が減少し、PI3Kシグナルを増強させると制御性B細胞が増加する。PI3Kシグナルを抑制する方法としてはPI3Kの阻害薬(LY294002)を使用しin vitroで解析する。またPI3Kシグナルの抑制因子であるPTENをB細胞特異的に欠損したマウス(制御性B細胞が著明に増加することが予想される)を作成し、接触過敏反応や実験的自己免疫性脳脊髄炎などのマウスモデルにおける制御性B細胞の機能を解析する予定である。

## 4. 研究成果

PI3KおよびAKTの阻害剤を脾臓細胞の培養に加え、B細胞のIL-10産生能をFACSで解析し

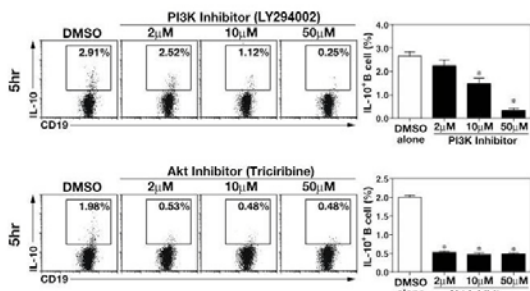


Figure 1: Splenic IL-10<sup>+</sup> B cell cultured with inhibitors (5hr stimulation with LPS+PMA+ionomycin)

た。Figure 1 に示すとおり PI3K 阻害剤は、用量依存性に IL-10 産生を阻害した。また、AKT でも強力な阻害作用が認められた。次に、*vivo* での PI3K/AKT シグナルを解析するために PTEN 欠損マウスを作成した。PTEN

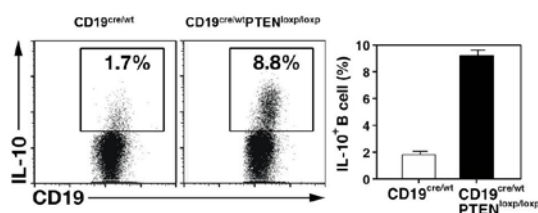


Figure 2: Splenic IL-10<sup>+</sup> B cell in CD19<sup>cre/wt</sup> and CD19<sup>cre/wt</sup>PTEN<sup>lox/lox</sup> (5hr stimulation with LPS+PMA+ionomycin)

欠損マウスは胎生致死なので、CD19<sup>cre</sup> と PTEN<sup>lox</sup> マウスを掛け合わせ、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスを作成した。PTEN は PI3K/AKT の inhibitor なので、PTEN を欠損させることにより PI3K/AKT シグナルが増強される。マウスを解析したところ B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスでは IL-10 産生制御性 B 細胞の著明な増加が認められた (Figure 2)。

#### Contact hypersensitivity: CHS

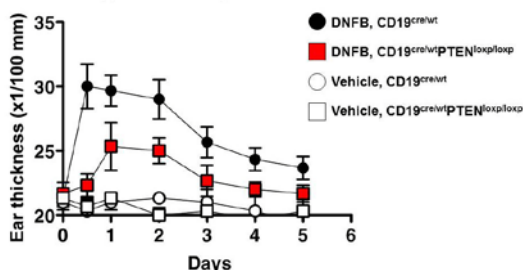


Figure 3: Contact hypersensitivity in CD19<sup>cre/wt</sup> and CD19<sup>cre/wt</sup>PTEN<sup>lox/lox</sup>

以上より、PI3K/AKT シグナルが制御性 B 細胞の制御機構において非常に重要であることが明らかとなった。

さらに Contact hypersensitivity 反応を B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスとコントロールマウスで比較したところ、B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスで著明な反応低下が認められた (Figure 3)。

#### 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 6 件)

1. Le Huu D, Matsushita T, Jin G., Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Tedder T. F, Fujimoto M: Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 121:3274-83. 2013 Feb 19. [Epub ahead of print] doi: 10.1182/blood-2012-11-465658.

2. 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*. 131:1674-82. 2013 [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.044.

3. Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Kaji K, Asano Y, Ogawa F, Yamaoka T, Fujikawa K, Tsukada T, Sato K, Echigo T, Hasegawa M, Takehara K. Autoantibodies to small ubiquitin-like modifier activating enzymes in Japanese patients with dermatomyositis: comparison with a UK Caucasian cohort. *Ann Rheum Dis*. 72:151-3. 2013. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201736.

4. Ichimura Y, Matsushita T, et al: Anti-NXP2 autoantibodies in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies: possible association with malignancy. *Ann Rheum Dis*. 71:710-713 2012 doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200697.

5. Iwata Y\*, Matsushita T\*, Horikawa, DiLillo, Yanaba, Venturi, Szabolcs, Bernstein, Magro, Williams, Hall, St. Clair, and Tedder TF: Characterization of a Rare IL-10-Competent B Cell Subset in Man That Parallels Mouse Regulatory B10 Cells. *Blood* 117:530-41. 2011 (\*equal contribution) doi: 10.1182/blood-2010-07-294249.

6. Horikawa M, Minard-Colin V, Matsushita T, Tedder TF: Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest*. 121:4268-4280 2011 doi: 10.1172/JCI59266.

[学会発表] (計 1 件)

Matsushita T, Le Huu D, Fujimoto M, Takehara K: PI3K-Akt pathway modulates IL-10 producing regulatory B cell. The 37th Annual Meeting of the Japanese

Society for Investigative Dermatology,  
Okinawa, LOISIR HOTEL & SPA TOWER NAHA  
December 7, 2012 (oral)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 貴史 (MATSUSHITA TAKASHI)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号 : 60432126

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし