

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08943

研究課題名(和文)細胞膜外酵素BST-1、CD38による新しい自然免疫シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文)A novel regulatory mechanism for innate immune signals by ectoenzymes BST-1 and CD38

研究代表者

井関 将典 (Iseki, Masanori)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30532353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はBST-1という細胞膜外酵素がさまざまな免疫細胞上に発現していることを明らかにしている。BST-1がどのような機能を持っているかを調べるためBST-1を欠損するマウスを製し、抗原に対する反応や大腸菌成分LPSに対する反応を解析した。清浄な環境かつ厳密な飼育条件を設定して比較したところ、胸腺非依存性抗原に対する抗体産生反応、LPSに対する敗血症反応のいずれも通常マウスとBST-1欠損マウス間で反応に有意な差は見られず、それらの反応にはBST-1は必須でないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は予備実験においてBST-1遺伝子欠損マウスはB細胞を直接活性化できる外来抗原に対する反応が亢進しているという結果を得ていた。しかしながら動物の飼育条件や比較対照動物の選定を厳密にしてもう一度実験を行ったところ、通常のマウスと変異マウス間で有意な反応の差は見られなかった。免疫反応は個体が生育、居住する環境から多くの影響を受ける。動物を用いて免疫反応を調べる際はそれらの条件を厳密に揃えることが正しい結果を得るために重要である。

研究成果の概要(英文)：We have been clarifying that an ectoenzyme BST-1 is expressed on various immune cells. To uncover its function in vivo, we generated BST-1 gene deficient mice and analyzed their responses against antigen immunization or challenge of microbial component, LPS. Experiments were done in specific pathogen-free condition with strict experimental conditions for keeping out environmental and other effects. As a result, there was no significant differences in antibody production against thymus-independent antigens and endotoxin shock induced by LPS injection. These results indicate that BST-1 is not required for these innate-like immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：辺縁帯B細胞 マクロファージ IL-6 抗体産生 自然免疫 細胞膜外酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ由来骨髄間質細胞に高発現する GPI アンカー型の細胞膜外酵素 BST-1 (CD157) は、GPI アンカー型の細胞膜外酵素であり、NAD からサイクリック ADP リボース (cADPR) を合成する ADP リボシルシクラーゼ活性と cADPR 加水分解酵素活性を持つ。cADPR は小胞体のリアノジン受容体に結合して貯蔵  $Ca^{2+}$  の遊離を誘導するセカンドメッセンジャーである。CD38 は BST-1 と共に ADP リボシルシクラーゼファミリーをつくる分子であり、B 細胞をはじめ多くの細胞で発現している。近年 BST-1 が絶食時に腸のパネート細胞で発現し、酵素活性を介して腸管幹細胞の分化を抑制して増殖を促進することが報告された。またヒト *BST1* 遺伝子の SNP がパーキンソン病 (PD) の新規危険因子であるとの多数の報告がなされ、東田らは共同研究として *Bst1* KO を用いた行動解析から BST-1 が PD の初期病態である非運動神経系障害を抑制的に制御している可能性を提唱した。これらの知見より BST-1 は腸管-神経-免疫制御分子として、その重要性が認識されてきている。しかしながら、生体内での詳細な分子機構は不明な点が多い。

我々は生体における BST-1 の機能を解析するため BST-1 遺伝子欠損マウス (*Bst1* KO) の作製と解析を続けている。初期の 129 と C57BL/6 の混雑背景における *Bst1* KO の解析では II 型胸腺非依存性抗原である TNP-Ficoll に対する IgG3 抗体産生反応が低下し、コレラ毒素を経口投与した際の糞便中 IgA 産生が減少していた。より詳細な解析のために *Bst1* KO を C57BL/6 背景へ戻し交配したところ、*Bst1* KO における新しい異常として LPS に対する反応亢進を *in vivo*、*in vitro* の両方の実験で見出した。更にこの反応亢進には CD38 が必要であるという予備実験結果も得ている。またマクロファージにおいても BST-1 が Toll 様受容体 (TLR) シグナルを制御することを発見した。これらは BST-1/CD38 による新しい TLR シグナル制御機構の存在を示している。

## 2. 研究の目的

BST-1 および CD38 による新規 TLR シグナル制御機構を解明し、BST-1/CD38 の感染・炎症疾患における役割を明らかにすることが目的である。BST-1 および CD38 は ADP リボシルシクラーゼ活性をもつ細胞膜外酵素であるが、このような分子と自然免疫シグナルを関連づけた研究はこれまで報告がなく、学術的にも新たな視点から切り込んだものであると言える。

自然免疫系の制御は感染症時の対応、治療に重要であると共に、近年では自然免疫が様々な慢性炎症疾患に関連することが明らかになってきている。従って、自然免疫シグナル伝達経路の解明は感染症対策だけではなく慢性炎症に起因する様々な疾患の制御法、治療法開発の第一歩として重要である。

## 3. 研究の方法

### (1) BST-1/CD38 は B 細胞において抗体産生反応を制御しているか？

野生型マウス (WT) および、BST-1、CD38 遺伝子改変マウスの脾臓から磁気ビーズ法により全 B 細胞、または FACS Aria III によるソーティングにより濾胞 B 細胞、辺縁帯 B 細胞を精製し、LPS や抗 IgM 抗体などの刺激と共に培養した。16 時間培養後に細胞を回収し、細胞表面の活性化マーカーに対する抗体および 7-アミノアクチノマイシン D (7-AAD) で染色後フローサイトメトリ解析を行い、活性化マーカーの発現強度や細胞の生存率 (7-AAD 陰性細胞の割合) を評価した。また 2 日または 3 日間培養後に WST-1 アッセイによって細胞増殖反応を評価した。

SPF 環境で飼育した C57BL/6 背景の *Bst1* 遺伝子ヘテロ接合体の雌雄を交配し、得られた WT と *Bst1* KO を用いて実験を行った。WT と *Bst1* KO マウスに抗原を腹腔内投与し、7 日後、14 日後に採血を行い、血清中の抗原特異的抗体を ELISA にて測定した。

### (2) マクロファージにおける BST-1 の役割の解析

WT および *Bst1* KO から骨髄細胞を採取し、L929 細胞株の培養上清 (M-CSF を含む) と共に 1 週間培養して骨髄由来マクロファージを作製する。またはそれぞれのマウスの腹腔内浸潤細胞から FACS Aria III を用いたソーティングにより腹腔マクロファージを精製した。マウスマクロファージを LPS などで刺激し、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの発現を定量的 PCR や ELISA によって調べ、WT と *Bst1* KO の間で比較を行った。

抗体産生実験と同様に、SPF 環境にて *Bst1* 遺伝子ヘテロ接合体の雌雄交配で得られた WT と *Bst1* KO の腹腔内に LPS を投与することで敗血症性ショックを誘導し、マウスの生存率を WT と *Bst1* KO の間で比較した。

## 4. 研究成果

### (1) BST-1/CD38 は B 細胞において抗体産生反応を制御しているか？

本研究開始前の予備実験において、C57BL/6 背景の *Bst1* KO マウスは WT と比較して I 型の胸

腺非依存性抗原である TNP-LPS に対する抗体産生反応が亢進しているという結果が得られていた。この結果から *Bst1*KO では LPS に対する反応が亢進していることが考えられた。しかしながら WT と *Bst1*KO から脾臓 B 細胞を磁気ビーズ法により精製し、LPS 刺激後の細胞増殖反応を調べたところ、*Bst1*KO で増殖反応が亢進する傾向は見られたものの、有意な差は見られなかった。脾臓 B 細胞の BST-1 の発現を調べたところ、B 細胞の大部分を占める濾胞 (FO) B 細胞にはほとんど発現しておらず、脾臓 B 細胞の亜集団である辺縁帯 (MZ) B 細胞に発現していることが分かった (図 1)。MZ B 細胞は LPS 刺激により反応しやすい B 細胞であることから BST-1 が MZ B 細胞で LPS に対する反応性を制御している可能性が考えられた。そこで FACS Aria III を用いて SPF 環境で飼育した WT、*Bst1*KO マウスの脾臓から MZ B 細胞を精製し、*in vitro* での LPS に対する反応を調べた。その結果、WT と *Bst1*KO の MZ B 細胞の LPS に対する反応性には有意な差がないことが明らかとなった。

この結果は予想外であり、予備実験の結果と矛盾するものであった。予備実験はマウスの飼育環境が SPF ではなかったことから、飼育ケージごとの環境が一定でなかった可能性が考えられた。そこで SPF 環境かつ *Bst1* 遺伝子ヘテロ接合体の雌雄交配で得られた WT と *Bst1*KO を用いて TNP-LPS に対する反応性をもう一度調べたところ、TNP-LPS 投与後の抗原特異的抗体価は WT と *Bst1*KO の間で有意差は見られなかった (図 2)。

### (2) マクロファージにおける BST-1 の役割の解析

WT および *Bst1*KO 骨髄細胞より骨髄由来マクロファージを作製し、LPS 刺激後に細胞から RNA を精製し、リアルタイム PCR によって様々な遺伝子発現について検討したところ、*Bst1*KO のマクロファージでは WT と比較して *Il6* 遺伝子の発現誘導が低下していた。しかしながらその他の炎症性サイトカイン遺伝子である *Tnf* や *Il1b* については有意な差は見られなかった。また M1 マクロファージ関連遺伝子の発現も WT と *Bst1*KO の間で変化はなく、マクロファージを IL-4 で刺激した際の M2 マクロファージ関連遺伝子の発現誘導も *Bst1*KO マクロファージにおいて WT と同様に観察された。

生体内で BST-1 が LPS 投与後の IL-6 を含む炎症性サイトカインの産生誘導にどのような役割をしているかを明らかにするために、SPF 環境で飼育した *Bst1* 遺伝子ヘテロ接合体の雌雄交配で得られた WT と *Bst1*KO の腹腔内に LPS を投与して敗血症性ショックを誘導した。各群 10 匹以上のマウスを準備し LPS 投与後のマウスの生存について観察したところ、WT と *Bst1*KO の間に生存率の有意な差は無かった (図 3)。

### (3) BST-1 を発現する新しい細胞群の探索

ここまで報告してきたとおり、当初の予想に反して WT と *Bst1*KO マウス間の明確な LPS に対する反応の差が観察できず、結果として BST-1 の生体における役割が解析できていなかった。そこで今後の研究に繋げる目的で、BST-1 を細胞表面に持つ新たな免疫細胞を探索した。WT と *Bst1*KO の免疫組織をフローサイトメトリー解析によって比較したところ、小腸パイエル板内の胚中心 (GC) B 細胞の一部に BST-1 の発現を確認した (図 4)。GC B 細胞は外来抗原を免疫後に脾臓などの二次リンパ組織内に誘導される活性化 B 細胞であり、小腸パイエル板では抗原を投与されていない動物でも観察できることが知られている。BST-1 を発現する GC B 細胞が抗原投

図1 B細胞亜集団表面のBST-1発現

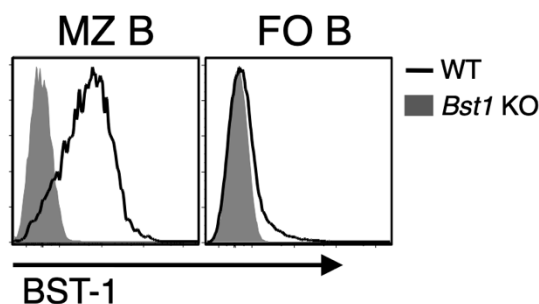


図2 血清中の抗TNP-IgM抗体価

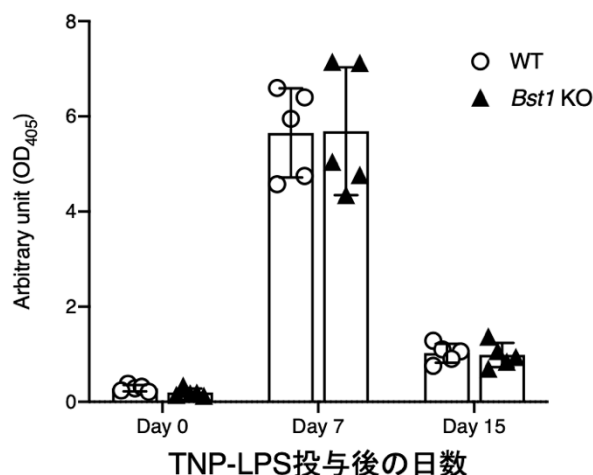
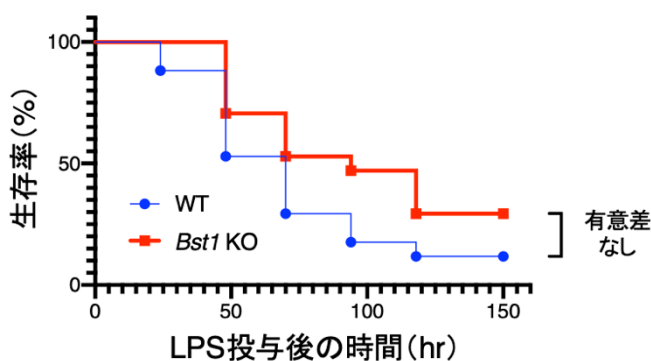


図3 LPS投与後の生存率(各群17匹)

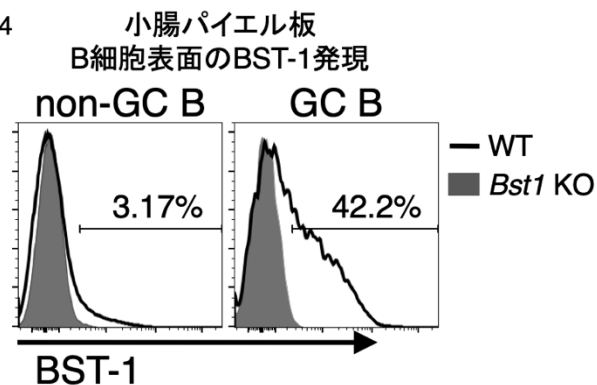


与後の脾臓でも見られるかどうかを調べたところ、卵白アルブミン投与後の脾臓 GC B 細胞では BST-1 陽性細胞は検出されなかった。したがって BST-1 を持つ GC B 細胞は小腸パイエル板特異的に存在することが明らかになった。

小腸パイエル板内の GC B 細胞において、BST-1 陽性細胞と陰性細胞の間でどのような違いがあるかについてフローサイトメトリー解析を行った。BST-1 陽性 GC B 細胞は BST-1 陰性細胞と比較して活性化の指標となる細胞の大きさや表面の MHC クラス II、CD86 の発現が増加していた。この結果から、既に活性化している胚中心 B 細胞において BST-1 が更なる活性化状態を示す新たな指標となる可能性が示唆された。

本研究で BST-1 が脾臓辺縁帯 B 細胞や小腸パイエル板内の胚中心 B 細胞など自然免疫に近いと考えられる B 細胞に発現していることを明らかにしたが、それらの細胞上の BST-1 が生体内で自然免疫、獲得免疫をどのように制御しているかを明らかにすることは未だできていない。マウスの飼育環境や腸内細菌叢の違いによっても反応が異なることも考えられるので、今後はそれらの点にも注意して解析を進める必要があると考えられる。

図4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mukai Tomoyuki, Akagi Takahiko, Hiramatsu Asano Sumie, Tosa Ikue, Ono Mitsuaki, Kittaka Mizuho, Ueki Yasuyoshi, Yahagi Ayano, Iseki Masanori, Oohashi Toshitaka, Ishihara Katsuhiko, Morita Yoshitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Imatinib has minimal effects on inflammatory and osteopenic phenotypes in a murine cherubism model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.14073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawahara Kyoko, Mukai Tomoyuki, Iseki Masanori, Nagasu Akiko, Nagasu Hajime, Akagi Takahiko, Tsuji Shoko, Hiramatsu-Asano Sumie, Ueki Yasuyoshi, Ishihara Katsuhiko, Kashihara Naoki, Morita Yoshitaka	4. 巻 22
2. 論文標題 SH3BP2 Deficiency Ameliorates Murine Systemic Lupus Erythematosus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4169 ~ 4169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22084169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuji S., Matsuzaki H., Iseki M., Nagasu A., Hirano H., Ishihara K., Ueda N., Honda Y., Horiuchi T., Nishikomori R., Morita Y., Mukai T.	4. 巻 198
2. 論文標題 Functional analysis of a novel G87V TNFRSF1A mutation in patients with TNF receptor associated periodic syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 416 ~ 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yahagi Ayano, Saika Taro, Hirano Hiroyasu, Takai-Imamura Miwa, Tsuji Fumio, Aono Hiroyuki, Iseki Masanori, Morita Yoshitaka, Igarashi Hideya, Saeki Yukihiko, Ishihara Katsuhiko	4. 巻 5
2. 論文標題 IL-6-PAD4 axis in the earliest phase of arthritis in knock-in gp130F759 mice, a model for rheumatoid arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RMD Open	6. 最初と最後の頁 e000853 ~ e000853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/rmdopen-2018-000853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagasu Akiko, Mukai Tomoyuki, Iseki Masanori, Kawahara Kyoko, Tsuji Shoko, Nagasu Hajime, Ueki Yasuyoshi, Ishihara Katsuhiko, Kashihara Naoki, Morita Yoshitaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Sh3bp2 Gain-Of-Function Mutation Ameliorates Lupus Phenotypes in B6.MRL-Faslpr Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 402 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8050402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 赤木貴彦, 向井知之, 浅野澄恵, 井関将典, 矢作綾野, 平野紘康, 中野和久, 石原克彦, 守田吉孝
2. 発表標題 The investigation of the pathogenesis of TNF Receptor-Associated Periodic Syndrome (TRAPS) using murine TRAPS models
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (JSI2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katsuhiko Ishihara, Ayano Yahagi, Ryo Katsumata, Akiko Shiotani, Masanori Iseki
2. 発表標題 Lack of bone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1)/CD157 ameliorated colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS)
3. 学会等名 VIRTUAL IMMUNOLOGY2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢作 綾野、井関 将典、石原 克彦
2. 発表標題 関節リウマチモデルgp130F759の最初期滑膜細胞のシングルセルRNA-seq解析
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石原 克彦, 矢作 綾野, 井関 將典
2. 発表標題 BST-1/CD157の欠損による滑膜線維芽細胞のIL-6産生低下により、GP130F759の関節炎における線維化が軽減した。
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢作 綾野、井関 將典、石原 克彦
2. 発表標題 BST-1/CD157はDSS誘発性大腸炎における腸上皮の傷害を促進させる
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢作 綾野、井関 將典、石原 克彦
2. 発表標題 関節リウマチモデルgp130F759の最初期病変におけるIL-6-PAD4関連
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanori Iseki, Ayano Yahagi, Katsuhiko Ishihara
2. 発表標題 Toll-like receptor-induced Ab production from marginal zone B cells is negatively regulated by ADP-ribosyl cyclase BST-1/CD157
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石原 克彦  (Ishihara Katsuhiko)  (10263245)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	
研究 分担者	矢作 綾野  (Yahagi Ayano)  (10584873)	川崎医科大学・医学部・助教   (35303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------