

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790469

研究課題名（和文） B細胞におけるストア作動性カルシウム流入の生理的役割と
その分子基盤の解明研究課題名（英文） Elucidation of physiological function of store-operated calcium
influx in B cells and its molecular mechanism.

研究代表者

馬場 義裕 (BABA YOSHIHIRO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：20415269

研究成果の概要（和文）：STIM2 の欠損 DT40B 細胞を樹立・解析から STIM1 との機能的差異を明らかにした。また、STIM2 欠損マウスを作製したところ、4～5週に致死となることが判明した。さらに、STIM1/2 の B 細胞特異的欠損マウスの解析から STIM が B 細胞レセプターからの NFAT の活性化および IL-10 産生に必須であることを明らかにした。これらは抑制性 B 細胞の活性化メカニズムの一端を明らかにした重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：We established Stim2-deficient DT40 B cells and analyzed the functional difference between STIM1 and STIM2. We generated Stim2-deficient mice, but these are lethal about 4~5 weeks after birth. Furthermore, we found that B cells lacking STIM1 and STIM2 were defective in BCR-evoked NFAT activation and IL-10 production, suggesting that STIM proteins are essential for suppressive function through NFAT-dependent IL-10.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：B細胞、ストア作動性カルシウム流入、STIM1、STIM2

1. 研究開始当初の背景

細胞の分化・活性化において、細胞内カルシウムが極めて重要なセカンドメッセンジャーとして働くことは広く知られており、B細胞においても例外ではない。抗原刺激による細胞内カルシウムの上昇は主に二つの経路から供給され、一つは細胞内カルシウム貯蔵庫である小胞体からのカルシウム放出であり、もう一つは細胞膜上のチャネルを介した細胞外からのカルシウム流入である。免疫

細胞では、細胞外からのカルシウム流入は小胞体のカルシウム放出（小胞体枯渇）が引き金となって初めて引き起こされるカルシウム流入、つまり、ストア作動性カルシウム（SOC）流入が主要なメカニズムとなり長時間の持続的カルシウムシグナルを維持する上で重要であると考えられている。B細胞における小胞体カルシウム放出阻害は骨髄でのB細胞分化停止を惹起し、免疫不全発症の原因となるが、SOC流入および持続的カルシウムシグナルの生理的意義の詳細は不明である。

さらに、細胞内カルシウムストアの枯渇がどのようにして SOC 流入を作動させるのかという分子機序も全く明らかでなかった。しかし、2005 年に SOC 活性化に必須の分子として小胞体カルシウムセンサー-STIM1 (STIM2 ホモログ) が報告され、それ以来、様々な分野の研究者が大きな関心を示し国際的競争の激しい分野となったが、依然、SOC 活性化メカニズムおよびその生理的役割には不明な点が多い。

これまでに、我々は SOC 流入活性化メカニズム解明を目的として、STIM1 ノックアウト DT40B 細胞株を樹立し、STIM1 が B 細胞抗原レセプター (BCR) 刺激で誘導される SOC 流入に必須であることを明らかにした。さらに、我々は世界に先駆けて STIM1 ノックアウトマウスを作製・解析することにより、分子レベルの解析だけでなく、個体レベルでの STIM1 の生理的意義の一端を証明した。まず注目すべきは、STIM1 ノックアウトマウスが分娩前後で致死となることで、STIM1 を介するカルシウム流入が個体発生において極めて重要な役割があることを示している。さらに、STIM1 ノックアウトマスト細胞の解析により、STIM1 がマスト細胞の脱顆粒およびアレルギー反応に必須の分子であることを明らかにした。これは、カルシウム流入機構の破綻が免疫病の発症に関与するという重要な知見である。

2. 研究の目的

免疫応答において、B 細胞は抗体産生細胞へと成熟分化し、異物に対する抗体を作ることにより生体防御の役割を担っている。逆に自己を攻撃するような異常な抗体を作ることにより、自己免疫疾患発症にも関与することが知られる。よって、B 細胞の分化・活性化、自己反応性 B 細胞除去の制御機構を明らかにすることは、免疫不全、自己免疫疾患といった免疫病の理解、さらには免疫系を制御するための新規薬剤の創薬につながる重要な研究課題であると考えられる。そこで、本研究課題では如何にして持続的カルシウム流入が B 細胞分化・成熟・活性化を制御しているのかという重要かつ未解決の疑問にアプローチする。STIM1 の解析は大きく進展しているが、STIM1 ホモログである STIM2 は未だ不明な点が多い。そこで、STIM2 の B 細胞における生理的役割とその分子メカニズムの解析を行ない、STIM2 の機能解明の糸口にする。

3. 研究の方法

(1) STIM2 ノックアウト DT40 細胞株および

STIM1/2 ダブルノックアウト株を樹立し、SOC 流入への影響を調べた。STIM 分子がタンパク質の安定性に差があることを見出したので、様々な STIM1 と STIM2 のキメラ体を作製し、安定性に関与する領域の同定を試みた。

(2) Stim2 のコンベンショナルノックアウトマウスを作製し、個体発生における STIM2 の関与を明らかにする。

(3) mb1-Cre マウスを Stim1 および Stim2 floxed マウスと交配することにより B 細胞特異的 STIM1 ノックアウト、STIM2 ノックアウトおよび STIM1/STIM2 ダブルノックアウトマウスの作製を行なった。これらマウスを用いて、STIM が B 細胞のカルシウム流入、B 細胞分化、増殖、細胞内シグナル伝達に関与するかを検討した。さらに、これらマウスを様々な抗原で免疫することにより抗体産生反応を解析した。

4. 研究成果

(1) STIM2 が STIM1 に比べタンパク質の安定性が低いことがわかった。これはプロテアソームによるタンパク質分解が原因であった。STIM2 のどの領域がタンパク質の安定性に関与するかを様々な変異体を用いて解析したところ、N 末端の部位を同定した。STIM2 のタンパク質量によって SOC 流入を制御している可能性を示唆する知見である。

(2) Stim2 のコンベンショナルノックアウトマウス (Stim2 ノックアウトマウス) の樹立に成功した。Stim1 ノックアウトマウスとは違い、Stim2 ノックアウトマウスに新生致死は見られなかった。しかし、生後 4-5 週令で致死となることが判明した。未だ原因の特定に至っていないが、STIM2 が個体生存において必須の役割を果たすことが明らかとなった。

(3) B 細胞特異的 STIM1 ノックアウト、STIM2 ノックアウトおよび STIM1/STIM2 ダブルノックアウトマウスの各臓器における B 細胞分化を検討したところ、STIM 分子がなくても B 細胞は正常に分化することがわかった。次に各 STIM ノックアウト B 細胞の SOC 流入を測定した。STIM1 ノックアウト B 細胞は BCR による SOC 流入の障害が顕著に見られたのに対し、STIM2 ノックアウト B 細胞の障害は比較的少なかった。一方、STIM1/STIM2 ダブルノックアウト B 細胞は STIM1 単独ノックアウトと比べてよりシビアな障害が認められた (図 1)。

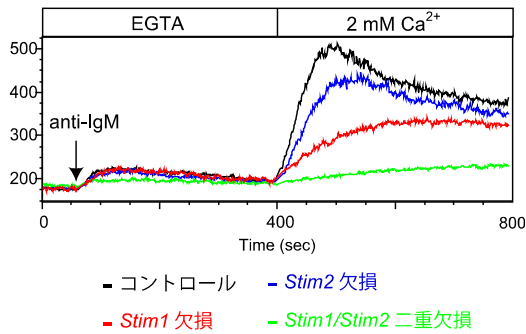


図1 STIM ノックアウト B 細胞の SOC 流入カルシウムフリーの条件下で、B 細胞レセプター刺激 (anti-IgM) 後、カルシウムを加えた。縦軸はカルシウム蛍光強度。

これと相関するように、BCR 刺激で誘導される B 細胞増殖が STIM1/STIM2 ダブルノックアウト B 細胞で顕著にみられた (図 2)。

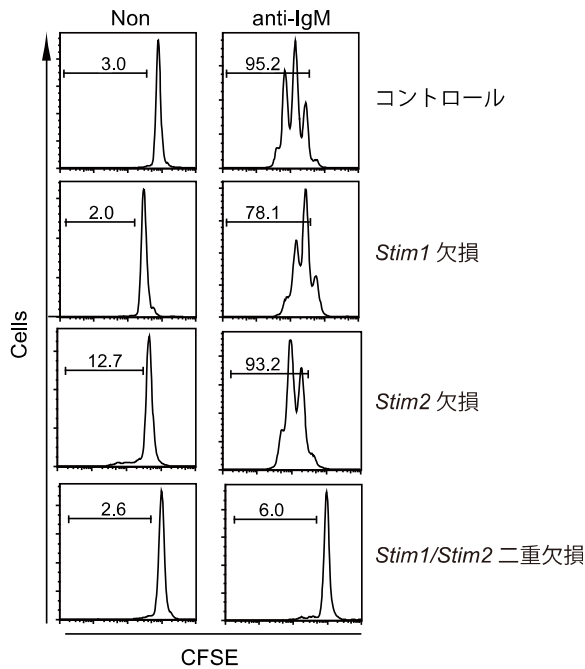


図2 Stim ノックアウト B 細胞の細胞分裂 CFSE でラベルした各精製 B 細胞を B 細胞レセプター刺激 (anti-IgM) して、CFSE の希釈を指標に細胞分裂を評価した。

また、T 細胞依存型および非依存型免疫応答を誘導する抗原を免疫したところ、いずれの STIM ノックアウトマウスも正常に抗体産生をすることがわかった。さらに、BCR 刺激による IL-10 産生能を検討したところ、コントロール B 細胞に比べ、STIM1/STIM2 ダブルノックアウト B 細胞は IL-10 の分泌が少ないことを明らかにした。これがどのシグナル伝達経路の障害で引き起こされるのかを検討す

ることにより、NFAT がその候補であることを突き止めた。つまり、BCR 刺激による STIM 依存的な SOC 流入が NFAT を活性化し、IL-10 産生を誘導するというモデルが考えられ、制御性 B 細胞 (IL-10 産生 B 細胞) の活性化メカニズムの一端を明らかにした重要な知見である。

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 4 件)

1. Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The Calcium Sensors STIM1 and STIM2 Control B cell Regulatory Function through Interleukin-10 Production. *Immunity* in press 査読有

2. Hawkins BJ, Irrinki KM, Mallilankaraman K, Lien YC, Wang Y, Bhanumathy CD, Subbiah R, Ritchie MF, Soboloff J, Baba Y, Kurosaki T, Joseph SK, Gill DL, Madesh M. S-glutathionylation activates STIM1 and alters mitochondrial homeostasis. *J. Cell Biol.* 190, 391-405, 2010. 査読有

3. Kurosaki T, Baba Y. Ca²⁺ signaling and STIM1. *Prog Biophys Mol Biol.* 103, 51-58, 2010. 査読無

4. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B Cell Signaling and Fate Decision. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 21-55, 2010. 査読無

[学会発表] (計 4 件)

1. 馬場義裕. B細胞における小胞体カルシウムセンサーSTIMの生理的役割. 第 83 回日本薬理学会年会シンポジウム. 2010 年 3 月 18 日, 大阪.

2. 馬場義裕. Store-operated Calcium Entry in B cells. 第 39 回日本免疫学会総会シンポジウム. 2009 年 12 月 3 日, 大阪.

3. 馬場義裕. Essential role of STIM1, ER calcium sensor, for store-operated calcium influx and mast cell activation. 第 10 回運動器科学研究会. 2009 年 9 月 18 日, 東京.

4. 馬場義裕. Physiological function for store-operated calcium entry in immune response. The 2nd International Symposium

of WPI-IFReC. 第二回国際世界トップレベル
拠点免疫学フロンティアセンターシンポジ
ウム. 2009年2月12日, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 義裕 (BABA YOSHIHIRO)
大阪大学免疫学フロンティア研究センタ
ー・分化制御研究室・特任准教授
研究者番号：20415269

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：