

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590437

研究課題名（和文）イムノグロブリンクラススイッチにおけるPI3Kによる制御機構の解析

研究課題名（英文）PI3-K plays a critical role in the class switch recombination of immunoglobulin

研究代表者

藤猪 英樹 (FUJII HIDEKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50356250

研究成果の概要（和文）：本研究では イムノグロブリンのクラススイッチ(CSR)制御機構におけるPI3K(p85 α)と、関与するサイトカインシグナルとの関係について解析を行った。その結果、lipopolysaccharide (LPS)刺激によるIgG1、IgG3へのCSRがp85 α ノックアウトマウス由来のB細胞において著減することを確認し、CSRに必須であるgerm line transcription (GLT)、post switch transcript (PST)の形成、およびactivation induced cytidine deaminase(AID)の発現も減少していることを確認した。一方、LPS刺激にIL-4刺激を加える事により、p85 α ノックアウトマウス由来のB細胞にみられるIgG1、IgG3へのCSR不全が解除される事を見出した。以上の事はPI3Kが抗体のCSRの制御に深く関与している可能性を強く示唆するものであることに加え、その反応がサイトカインシグナルなどにより可逆的に制御可能であることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of PI3K in B cells. p85 α deficiency inhibited IgG3 antibody production stimulated with lipopolysaccharide (LPS) by using B cells derived from p85 α ^{-/-} mice. We next evaluate the expression of germ line transcription (GLT), post switch transcript (PST), and activation induced cytidine deaminase (AID) in p85 α ^{-/-} B cells, compared with that in p85 α ^{+/-} B cells. Stimulated by LPS and IL-4 for induction of the class switch recombination (CSR) to IgG1, the expression of GLT, PST, and AID in both p85 α ^{+/-} and p85 α ^{-/-} B cells had no difference, but stimulated by LPS for induction of the CSR to IgG3, the expression of GLT, PST, and AID in p85 α ^{-/-} B cells became lower than that in p85 α ^{+/-} B cells. These results indicate that the expression of GLT, PST, and AID depressed by p85 α deficiency in B cells inhibits the CSR to IgG3. Our results indicate that PI3K plays a critical role of the CSR to IgG3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：イムノグロブリン、クラススイッチ、PI3K、IL4、LPS

1. 研究開始当初の背景

花粉症をはじめとするアレルギー症状は、IgE が媒体となる症状であることから、IgE の産生亢進が抑制できればアレルギー症状の発症阻止が期待される。IgE へのクラススイッチ組換え(class switch recombination, CSR)は遺伝子再構成においてほぼ最終産物と考えられるため、CSR の進行を止めるなどの制御が出来れば、アレルギー発症の抑止に直結する。CSR を人為的に制御することが可能となれば、抗体が原因となるあらゆる疾病の予防および治療に寄与出来る事から、本研究では、疾病コントロールに直結する CSR 制御方法を、膜リン脂質代謝酵素である PI3K の CSR における転写因子活性化をターゲットとして明らかにする事を目的とする

2. 研究の目的

(1) p85 α ノックアウトマウスの B 細胞で LPS の反応性が落ちている事より、PI3K が関与する LPS 刺激の B 細胞活性化シグナル経路を Akt 依存性の有無を中心に明らかにする。

(2) LPS/TLR4 からのシグナルカスケードのうち、PI3K が CSR に関与して正あるいは負に制御している分子を IL-4 刺激の有無を用いて明らかにする。

(3) IL-4 存在下で補完されるシグナルカスケードを明らかにし、PI3K を介した CSR 制御の標的分子を検索する。特に IL-4 の主なシグナル伝達分子である STAT6 を介した転写因子 NF κ B/I κ B および NFAT の活性化を中心に解析する。

3. 研究の方法

IL-4 のサイトカイン刺激、および LPS の toll-like receptor 刺激から B 細胞に入る様々なクラススイッチリコンビネーション(CSR)誘導刺激と PI3K との関わりを明らかにすることを目的として、PI3K ノックアウトマウスおよび正常マウス由来の B 細胞を用いて、以下の検討を行った。

(1) IgG1、IgG3 へのイムノグロブリンクラススイッチを調べるために、PI3K(p85 α)のヘテロマウスとノックアウトマウスの脾細

胞から IgG1(-)IgG3(-)B 細胞(CD19(+))細胞を FACS を用いて IgM 高発現(high)、低発現(low)の細胞にそれぞれ分離した。

IgG3 へのクラススイッチを誘導するために LPS で、IgG1 へのクラススイッチを誘導するために LPS と IL4 で、IgG1(-)IgG3(-)CD19(+)/IgM high または low 脾細胞を 4 日間刺激し、ELISA にて IgG1、IgG3 の産生量を測定した。

(2) (1)と同様にして IgG1(-)IgG3(-)CD19(+)脾細胞を IgG3 へのクラススイッチを誘導するために LPS で、IgG1 へのクラススイッチを誘導するために LPS と IL4 で 4 日間刺激し、刺激した細胞から染色体 DNA を抽出後、digestion circularization-PCR(DC-PCR)を用いて、染色体 DNA レベルでの IgG3 または IgG1 へのイムノグロブリンクラススイッチが起きているかを調べた。

(3) (1)と同様にして IgG1(-) IgG3(-)CD19(+)脾細胞を、LPS または、LPS と IL4 で刺激し、経時的(24、48、72 時間後)に細胞を回収し、蛋白質を抽出後、ウェスタンブロッティングにて activation induced cytidine deaminase(AID) の発現を、TransAM[®] Transcription Factor Assays システムで NF κ B 活性を調べた。

4. 研究成果

(1) PI3K(p85 α)の機能消失状態において、IgM 発現 B 細胞の IgG1 へのイムノグロブリンクラススイッチは障害されていないが、IgG3 へのイムノグロブリンクラススイッチが障害されていることが確認された。

(2) PI3K(p85 α)の機能消失により、IgG3 へのイムノグロブリンクラススイッチにおいて、染色体 DNA レベルで障害が生じているか検討した結果、PI3K(p85 α)の機能消失に伴い、染色体 DNA レベルで IgG3 へのイムノグロブリンクラススイッチが障害されていることが DC-PCR 方によって確認された。

(3) PI3K(p85 α)の機能消失に伴い、AID の発現が抑制されるため、染色体 DNA レベルでの IgG3 へのイムノグロブリンクラススイッチが障害され、IgG3 産生が低下することが示唆された。さらに、これらの現象が c-Rel の発現低下を中心とした NF κ B の活性低下に起

因することも明らかにした。

また、PI3K(p85 α)の機能消失下では、LPS 刺激によるシグナル伝達が障害されて、イムノグロブリンクラススイッチの障害が生じるが、IL4 刺激が加わると、イムノグロブリンクラススイッチが回復されることを明らかにした。

以上の結果より、PI3K がイムノグロブリンの CSR の制御に深く関与している可能性を強く示唆するものであることに加え、その反応がサイトカインシグナルなどにより可逆的に制御可能であることが強く示唆された。今後、PI3K サブユニットの特異阻害薬を用いることにより、人為的にクラススイッチを制御する可能性を検討し、アレルギー、及び感染症治療、抗体による自己免疫疾患への応用を試みる。

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 8 件)

- ① Ato M, Takahashi Y, Fujii H, Hashimoto S, Kaji T, Itamura S, Horiuchi Y, Arakawa Y, Tashiro M, Takemori T. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. *Vaccine*. 2013 Apr 19;31(17):2184-90. (査読あり) doi:10.1016/j.vaccine.2013.02.016.
- ② Ohtani M, Hoshii T, Fujii H, Koyasu S, Hirao A, Matsuda S. mTORC1 in Intestinal CD11c+CD11b+ Dendritic Cells Regulates Intestinal Homeostasis by Promoting IL-10 Production. *J Immunol*. 2012 May 15;188(10):4736-40. (査読あり) doi: 10.4049/jimmunol.1200069
- ③ Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, Nagao K. Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J Exp Med*. 2011 Dec 5.208(13):2607-13. (査読あり) doi: 10.1084/jem.20111718

- ④ Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, Iwakura Y, Yoshimura A, Yamada T, Kuwana M, Fujii H, Koyasu S, Amagai M. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3677-88 (査読あり) doi: 10.1172/JCI57379

- ⑤ Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto SI, Kaji T, Tsunetsugu-Yokota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, Takemori T. HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int Immunol*. 2011 Jul;23(7):433-41. (査読あり) doi: 10.1093/intimm/dxr031

- ⑥ Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Koganei M, Sasaki H, Nagashima Y, Amo K, Aoki K, Morimoto C, Takeda E, Terauchi Y. Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation and Liver Steatosis Are Prevented by DPP-4 Inhibition in Diabetic Mice. *Diabetes*. 2011 Apr;60(4):1246-57. (査読あり) doi: 10.2337/db10-1338

- ⑦ Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 2010 Jan 28;463(7280):540-4. (査読あり) doi: 10.1038/nature08636

- ⑧ Nitta T, Murata S, Sasaki K, Fujii H, Ripen AM, Ishimaru N, Koyasu S, Tanaka K, Takahama Y. Thymoproteasome Shapes Immunocompetent Repertoire of CD8(+) T Cells. *Immunity*. 2010 Jan 29;32(1):29-40. (査読あり) doi: 10.1016/j.immuni.2009.10.009

[学会発表] (計 9 件)

- ① Hideki Fujii PI3K gamma is a Negative Regulator of Alloreactive CTL Induction,

Keystone Symposia、2013年02月24日～2013年03月01日、Keystone, Colorado, USA

(3)連携研究者
なし

② 藤猪英樹 制御性 T 細胞機能発現における PI3K の役割
第 22 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2012 年 7 月 6～7 日

③ Hideki Fujii Role of class IA PI3K in regulatory T cell function 99th Annual Meeting The American Association of Immunologists 2012 年 05 月 04 日～2012 年 05 月 08 日 Boston, Massachusetts USA

④ 藤猪英樹 Role of class IA PI3K in regulatory T cell function.
第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、千葉、2011 年 11 月 27～29 日

⑤ 藤猪英樹 抑制性 T 細胞機能における PI3K の役割
第 21 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2011 年 6 月 3～4 日

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 藤猪英樹、小安重夫、抗原 pp174-175、
藤猪英樹、小安重夫、ハイブリドーマ pp332-333、
藤猪英樹、小安重夫、免疫沈降方法 pp410、
免疫の事典、488 項、2011、朝倉書店
桂義元、河本宏、小安重夫、山本一彦編

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤猪 英樹 (FUJII HIDEKI)
慶應義塾大学医学部・助教
研究者番号：50356250

(2) 研究分担者

なし