

## 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 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790457

研究課題名（和文）液性免疫系における核内 I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ BNS の役割の解明研究課題名（英文）Key roles of a nuclear I $\kappa$ B molecule, I $\kappa$ BNS, in the regulation of humoral immunity

## 研究代表者

藤間 真紀（TOUMA MAKI）

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：40542246

研究成果の概要（和文）：転写因子 NF- $\kappa$ B の制御因子である核内 I $\kappa$ B 分子の一つである I $\kappa$ BNS が、B リンパ球の分化や抗体産生において重要な役割を担っていることを明らかにし、これまで自然免疫系の制御因子としての報告が多かった核内転写制御因子 I $\kappa$ BNS の新たな役割を示した。

研究成果の概要（英文）：I $\kappa$ BNS has been identified as a member of the I $\kappa$ B family of NF- $\kappa$ B inhibitors, which is recognized as a regulatory factor of innate immunity. In this study, I found that I $\kappa$ BNS KO B cells are deficient in proliferation, immunoglobulin production and plasma cell differentiation. These results suggest a previously unidentified role for I $\kappa$ BNS in humoral immune regulation.

## 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	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：獲得免疫

## 1. 研究開始当初の背景

炎症や免疫応答において重要な転写因子の一つに NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B) がある。NF- $\kappa$ B 転写因子の制御因子には様々あるが、その内の一つである I $\kappa$ BNS は、炎症性サイトカインの産生抑制による自然免疫応答の制御に重要であることや、T リンパ球の機能維持に重要であることが報告されていたが、生体におけるその機能や作用機序には不明な点も多く残されていた。

もともと NF- $\kappa$ B 転写因子は B リンパ球で見出された因子であり、その活性化は B リン

パ球が主体となる液性免疫応答においても重要である。そのため、NF- $\kappa$ B の活性化調節因子の一つである I $\kappa$ BNS が B リンパ球の分化や機能に関与していることも十分に考えられた。

## 2. 研究の目的

液性免疫系における NF- $\kappa$ B の重要性に注目し、その活性化調節因子の一つである I $\kappa$ BNS の B リンパ球の分化及び抗体産生における役割の解明を目指した。本研究によって NF- $\kappa$ B による免疫応答の調節機

構の理解が更に進むと期待された。

### 3. 研究の方法

ジーンターゲットングによって作成された *I $\kappa$ BNS* ノックアウトマウスを用いて、リンパ球サブセットの分化と *I $\kappa$ BNS* の発現動態を *in vivo*, *ex vivo* 両システムで解析することで、Bリンパ球の分化・成熟、機能発現における *I $\kappa$ BNS* の役割を明らかにする。

また、*I $\kappa$ BNS* ノックアウトマウスに各種の抗原を投与し、抗体産生細胞の分化及び抗原特異的抗体の産生能を野生型マウスと比較することで、生体の液性免疫応答における *I $\kappa$ BNS* の役割を明らかにする。

更に、*I $\kappa$ BNS* 欠損マウスで見られる表現型が、*I $\kappa$ BNS* を欠く B 細胞に内因するものであるかを検討する目的で、成熟 B 細胞を欠損する  $\mu$ MT マウスをりようした。このマウスに *I $\kappa$ BNS* 野生型あるいは *I $\kappa$ BNS* 欠損マウスの骨髓細胞を移植し、B 細胞のみ *I $\kappa$ BNS* を発現しない体内環境での B 細胞分化や液性免疫応答を解析した。

### 4. 研究成果

野生型マウス (C57BL/6) と *I $\kappa$ BNS* 欠損マウスの B 細胞を下記(1)~(5)のように比較することで、B 細胞の分化や性状における *I $\kappa$ BNS* の役割を探った。

(1) *I $\kappa$ BNS* 欠損マウスにおける B 細胞サブセットを解析し、正常マウスのもとと比較した。

(2) B 細胞増殖刺激因子による *I $\kappa$ BNS* 欠損 B 細胞の増殖活性及び抗体産生量を解析した。

(3) *I $\kappa$ BNS* 欠損マウスの脾臓やリンパ節の組織学的解析を行った。

(4) 免疫応答における *I $\kappa$ BNS* の役割を調べるために、T 細胞依存性あるいは T 細胞非依存性抗原に対する抗原特異的抗体の産生応答を解析した。

(5) *I $\kappa$ BNS* 欠損マウスで見られる B 細胞関連の表現型が *I $\kappa$ BNS* 欠損 B 細胞に内因するかを検証するために、骨髓キメラマウスの作成及びキメラにおける免疫応答の解析を行った。

研究結果：

(1) *I $\kappa$ BNS* の欠損によって骨髓 preB 細胞のコロニー形成数の減少は見られたものの、B 細胞の初期分化制御因子 (Pax5, E2A, Ebf1) 発現は正常であり、骨髓中の B 細胞数も野生型マウスと比べて有意な差は見られなかった。一方、*I $\kappa$ BNS* 欠損マウスの末梢リンパ組織では、腹腔 B1 細胞の欠如や脾臓における辺縁帯 B 細胞の分化遅延が観察された。

(2) *I $\kappa$ BNS* 欠損 B 細胞では、リポ多糖や抗 CD40 抗体刺激で誘導される増殖活性の低下や抗体産生細胞への分化障害が観察された。また、*I $\kappa$ BNS* 欠損マウスでは通常飼育下での血清中の IgM と IgG3 が野生型マウスに比べて著しく少なかった。

(3) *I $\kappa$ BNS* 欠損マウスでは、脾臓の辺縁帯 B 細胞が 5~6 ヶ月齢までに野生型と同等のレベルに達するが、若齢期では野生型マウスに比べ、辺縁帯 B 細胞が有意に少ない (図 1)。

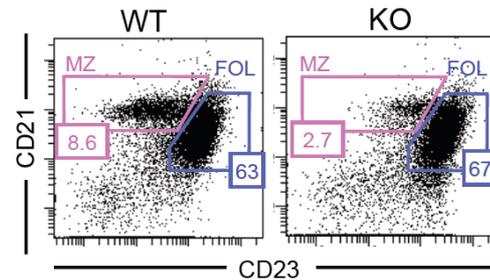


図 1. 野生型 (WT, 左) および *I $\kappa$ BNS* 欠損 (KO, 右)マウスの脾臓 B 細胞のフローサイトメトリー解析。*I $\kappa$ BNS* 欠損マウスの脾臓では辺縁帯 B 細胞 (MZ) の割合が低下している。

また、*I $\kappa$ BNS* 欠損マウスの脾臓やリンパ節では胚中心が少なかった (図 2)。

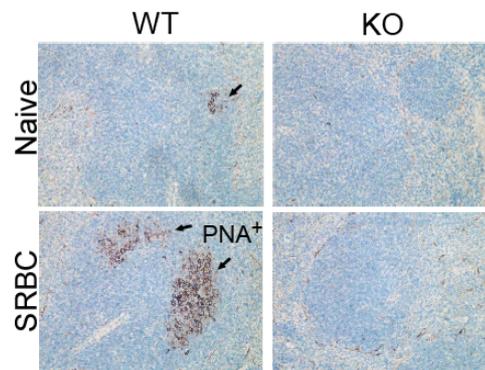


図 2. 野生型 (WT, 左) および *I $\kappa$ BNS* 欠損 (KO, 右)マウスの脾臓の組織解析。ヒツジ赤血球を腹腔注射前 (Naive) と注射 5 日後 (SRBC) に脾臓を摘出し、胚中心の形成を PNA 染色によって検出した。

(4) *I $\kappa$ BNS* 欠損マウスでは T 細胞非依存性抗原 (TNP-Ficoll) に対する特異的抗体の産生応答が誘導されなかった。一方、T 細胞依存性抗原 (TNP-KLH) に対しては野生型マウスより少ないものの、*I $\kappa$ BNS* 欠

損マウスにおいても抗原特異的抗体の産生が誘導された(図3)。

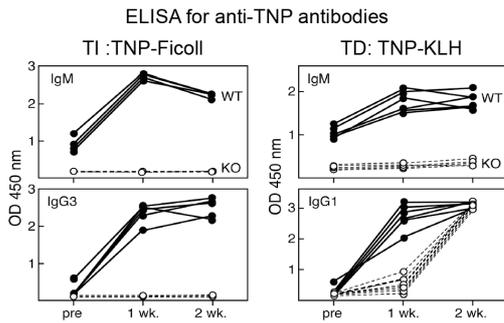


図3. 野性型(WT, 黒丸)および I $\kappa$ BNS 欠損マウス(KO, 白丸)を TNP-Ficoll(左)あるいは TNP-KLH(右)で免疫し、経時的に血清中の抗 TNP 抗体価を調べた。

以上のことから、I $\kappa$ BNS の欠損は B 細胞の初期分化には大きく影響しないが、末梢リンパ組織で見られる B 細胞亜集団の分化や抗体産生等の機能発現には I $\kappa$ BNS が必要であることが示唆された。特に I $\kappa$ BNS 欠損マウスにおける B1 細胞の欠損、辺縁帯 B 細胞の発達遅延、IgM や IgG3 産生の低下からは、I $\kappa$ BNS が T 細胞非依存性抗原に対する液性免疫応答に重要な役割を果していることが推察される。

(5) 更に、I $\kappa$ BNS 欠損マウスで見られるこれらの機能障害が、I $\kappa$ BNS を欠く B 細胞に起因するものであるかを検討する目的で、B 細胞を作れない  $\mu$ MT マウスに I $\kappa$ BNS 欠損マウスの骨髄細胞を移植し、B 細胞のみ I $\kappa$ BNS を発現しない体内環境での液性免疫応答を解析した(図4)。

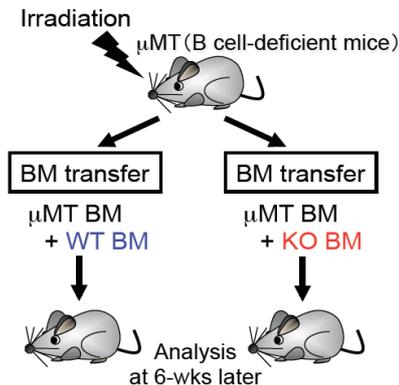


図4.  $\mu$ MT 骨髄キメラマウスの作成。放射線照射した  $\mu$ MT に、I $\kappa$ BNS 欠損あるいは野性型マウスの骨髄細胞を移入し、6 週間後に再構築されたリンパ組織を解析した。

その結果、I $\kappa$ BNS 欠損マウスで見られた TD 抗原刺激による IgG1 産生の遅延は見られなくなったが、その他の TI 抗原応答の障害や B 細胞分化動態の変化は再現された(図5)。

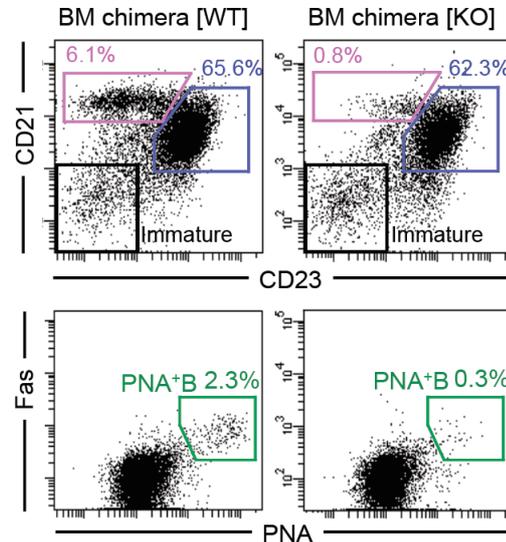


図5. 野性型(WT, 左)あるいは I $\kappa$ BNS 欠損(KO, 右)マウスの骨髄細胞を移入した  $\mu$ MT マウスの脾臓 B 細胞のフローサイトメトリー解析。I $\kappa$ BNS 欠損骨髄のレシピエントで、脾臓の辺縁帯 B 細胞(上段)と PNA 陽性胚中心 B 細胞(下段)の生成が野性型骨髄のレシピエントに比べて少ない。

これらの結果から、I $\kappa$ BNS が辺縁帯 B 細胞や胚中心 B 細胞の分化に重要であることが明らかとなった。更に、この分子が免疫グロブリンの産生や抗原特異的抗体の産生にも関与しており、I $\kappa$ BNS の欠損は T 細胞に依存的な抗体産生には大きな影響を与えないものの、T 細胞非依存性抗原に対する応答には重要な役割を担っていることが明らかになった。

本研究では B 細胞における I $\kappa$ BNS の作用機序の解析にも着手したが、残念ながらその解明にはいたらなかった。今後は I $\kappa$ BNS による NF- $\kappa$ B の制御機構を解明することが課題となる。

#### 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 1 件)

- ① Touma M, Keskin DB, Shiroki F, Saito I, Koyasu S, Reinherz EL, Clayton LK.,

Impaired B Cell Development and Function in the Absence of IκBNS., *The Journal of Immunology*, 187 (8): 3942-52., 2011, 査読有り

〔学会発表〕（計2件）

- ① 第40回日本免疫学会総会・学術集会, 2011年11月27日～11月29日, 千葉幕張メッセ, 2-G-W36-5-O/P口頭, ポスター発表, Bリンパ球の分化・機能発現におけるIκBNSの役割 (Impaired differentiation and function of B cells in the absence of IκappaBNS), Ibuki Saito, Maki Touma, Linda K. Clayton
- ② 第14回国際免疫学会 14<sup>th</sup> International congress of Immunology, 2010年8月24日～8月28日, 神戸国際会議場, WS/PP-030-04口頭, ポスター発表, A key role for IκBNS in control of B cell development and function, M. Touma, D.B. Keskin, E.L. Reinherz, L.K. Clayton

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤間 真紀 (TOUMA MAKI)  
新潟大学・自然科学系・助教  
研究者番号: 40542246

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: