

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：33708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590466

研究課題名(和文) IgE産生を制御するMARCH Iの解析

研究課題名(英文) The immunological analysis of MARCH I regulating IgE production

研究代表者

星野 真理(大村真理)(HOSHINO, Mari)

岐阜医療科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：10313511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：E3ユビキチンリガーゼ、Membrane-associated RING-CH protein I(MARCH I)は、免疫系の制御に様々な働きを持つが、MARCH IによるIgE産生性低下のメカニズムの解析と、その臨床病態との関連性の探求を行うことが、本研究の目的である。

MARCH I欠損マウスの免疫反応は、抗原特異的抗体反応・T細胞反応、特に抗原特異的なIgE反応が著しく減少していた。次に、メカニズムの解析として樹状細胞におけるMARCH Iの欠損が免疫反応低下に影響していることが、明らかになった。以上の結果は、MARCH Iが、易感染性に関与する可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Membrane-associated RING-CH I (MARCH-I) has been suggested as a E3 ubiquitin ligase for the regulation of immune system.

In this study we observed lower antigen(Ag)-specific antibody responses, especially and drastically lower Ag-specific IgE responses and lower Ag-specific T cell responses when MARCH I deficient mice were systemically immunized, compared with control mice. Next, we showed that MARCH I deficiency in dendritic cells was important for the decrease of immune responses such as low IgE production. This study revealed that MARCH I might be responsible for susceptibility to infection.

研究分野：免疫学、微生物学

キーワード：E3ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

私たちのグループは、新規 E3 ユビキチンリガーゼファミリー、MARCH (membrane-associated RING-CH protein) ファミリーの機能の解析を行ってきた。その結果、その中の一つ、MARCH 1 は、抗原提示に関連する分子、MHC クラス II (MHC II), B7-2 の膜分子をユビキチン化することにより、生体内 (樹状細胞と B 細胞) での発現を制御していることを見出した (参考文献 1)。また、MARCH 1 は、MHC クラス II と B7-2 をユビキチン化することにより免疫機能を抑制することができる (参考文献 2、3)。更に、MARCH 1 の欠損マウスにおいて、樹状細胞や B 細胞等の抗原提示細胞 (起動細胞) に機能異常があり、その異常は、B7-2 ではなく MHC II を介して起こることを見出した (参考文献 4)。

また、海外との共同研究を通じて、樹状細胞 (DC) の中でもサブセット pDC と cDC との間で MARCH 1 の活性・不活性化が異なること (Nat Immunol. (11):1244-52, 2008)、これまで明らかにならなかった活性化マーカー CD83 が MARCH 1 と結合することにより MHC II と B7-2 の発現を上昇させるというメカニズム (J Exp Med. 208(1): 149-165. 2011) も明らかにした。

参考文献:

1. Ohmura-Hoshino, M*, Matsuki, Y*, Goto, E., Aoki, M., Mito-Yoshida, M., Uematsu, M., Hasegawa, T., Koseki, H., Ohara, O., Nakayama, M., Toyooka, K., Matsuoka, K., Hotta, H., Yamamoto, A. and Ishido, S. Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J.* 7;26(3):846-54, 2007. *These authors contributed equally to this work.
2. Ohmura-Hoshino, M., Goto, E., Matsuki, Y., Aoki, M., Mito, M., Uematsu, M., Hotta, H. and Ishido, S. A novel family of membrane-bound E3 ubiquitin ligases. *J. Biochem.* (Tokyo) 140(2):147-54. 2006.
3. Baravalle G, Park H, McSweeney M, Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Ishido S, Shin JS. Ubiquitination of CD86 is a key mechanism in regulating antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 187(6):2966-73. 2011.
4. Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Mito-Yoshida M, Goto E, Aoki-Kawasumi M,

Nakayama M, Ohara O and Ishido S. Requirement of MARCH-1-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cell. *J Immunol.* 183(11):6893-7. 2009.

2. 研究の目的

1. 研究開始当初の背景にも述べたように、MARCH 1 は、免疫系においてさまざまな働きを持つことが明らかになってきているが、新たに、免疫異常を呈する MARCH 1 欠損マウスに抗原を感作させた場合、アレルギーに重要な IgE の産生がみられない現象が観察された。

その、これまでに明らかになっていない MARCH 1 による IgE 産生性低下のメカニズムの解析と、臨床病態との関連性の探求を行うことが、本研究の目的である。これにより MARCH 1 の新たな免疫制御のシステムとそのメカニズムについて明らかにできる。また、臨床病態と MARCH 1 との関連性を明らかにすることが、ヒト疾患の診断、治療および予防への貢献につながると考える。

3. 研究の方法

(1) MARCH 1 と臨床病態との関連性

IgE 産生が関与する感染動物モデルを用い、住血吸虫などの寄生虫感染への IgE 産生性低下の影響を掘り下げる。

IgE 産生が低下した MARCH 1 欠損マウスに住血吸虫などの寄生虫を感染させ、寄生虫感染の場合の IgE 産生性の低下、感染防御効率について検討する。感染後においても MARCH 1 欠損マウスでの IgE 産生性は、低下していることが予想されるが、それに伴う感染防御率も低下しているかを解析し、易感染性における MARCH 1 の関与を明らかにする。

(2) MARCH 1 欠損マウスの IgE 産生性低下のメカニズムの解析

IgE 産生に Th2 経路が重要であることから、まず抗原感作後、MARCH 1 欠損マウスが通常の Th2 反応を示すかの検討のために Th 細胞反応をコントロール群と比較する。

結果として (1) Th2 反応のみが下がる場合と (2) 全体の反応が下がるために Th2 反応も下がる場合がある。(1) の場合、なぜ Th2 反応のみがさがるのか、Th 反応を起こす樹状細胞に Th2 をさげる要因 (ex. Th1 反

応を起こすサイトカインの量の増加)があるか、T細胞自身のTh2への向かいやすさがあるかをそれぞれの細胞を単離し、細胞を培養してサイトカイン産生量を測定する。

現在使用しているMARCH I欠損マウスは、コンベンショナル欠損マウスであるため、すべての細胞でMARCH Iが欠損している。そのため、どの細胞のMARCH I欠損が原因でIgE産生性が低下しているか不明である。そこで、MARCH Iコンディショナル欠損マウスを用いることによりMARCH Iの発現が高い樹状細胞もしくはB細胞でMARCH Iを特異的に欠損させ、いずれの細胞のMHCクラスII・B7-2の過剰発現によりIgE産生が低下するか、メカニズムを明らかにする。

そのために樹状細胞、B細胞でそれぞれ特異的に欠損できるCD11c-creマウス、CD19-creマウスを用いて、実験に使用するMARCH Iコンディショナル欠損マウス-CD11c-cre, MARCH Iコンディショナル欠損マウス-CD19-creの作製のための掛け合わせを行う。

MARCH Iコンディショナル欠損マウス-CD11c-cre, MARCH Iコンディショナル欠損マウス-CD19-creを用いて、抗原を感作後、IgE産生量などの免疫反応を検討し、IgE産生性低下の原因細胞の同定、つまり、原因細胞が、樹状細胞もしくはB細胞かを明らかにする。

4. 研究成果

(1) MARCH I欠損によるIgE産生性低下の臨床病態への影響を明らかにするためにIgE産生が関与する感染動物モデルを用い、MARCH I欠損マウスの免疫反応の検討を行なった。MARCH I欠損マウスに住血吸虫を感染させ、寄生虫感染後のEPGの経時的変化、血清中IgE、Igサブタイプの変化、末梢血中の好中球などの免疫細胞の動態観察等から易感染性を検討したところ、EPGの経時的変化、末梢血中の好中球、B細胞、T細胞、NKT細胞、NK細胞数は、欠損マウス、コントロール間でほとんど変化が見られなかった。また、総IgE産生量についても変化が見られなかった。これらのことから寄生虫感染時において、MARCH Iの欠損は、影響を与えないことが明らかになった。

(2) MARCH I欠損マウスにおける免疫反応について解析を行った。MARCH I欠損マウスに腹腔内免疫を行ったところ、抗原特異的なIgG, IgGサブクラスおよびIgMの反応は、コントロール群と比較して低く、特に抗原特異的なIgE反応が著しく減少していた。また、T細胞の増殖反応やTh1とTh2サイトカインの産生といった抗原特異的なT細胞反応もMARCH I欠損マウスでは低下していた。

この結果は、MARCH Iが易感染性に関与する可能性を示唆している。更に、MARCH Iの制御によってIgEを制御することによりアレルギー反応を操作・抑制できる可能性を秘めている。

(3) (2)で示したMARCH I欠損マウスにおける免疫反応低下のメカニズムの解析の1つとして、どの細胞種でのMARCH I欠損(MHCクラスII・B7-2のコピキチン化欠損)が、IgE産生性低下に影響しているかの解析を行った。MHCクラスII、B7-2が発現している抗原提示細胞について調べた結果、樹状細胞におけるMARCH I欠損がIgE産生性低下を含む免疫反応低下に影響していることが、明らかになった。この結果は、樹状細胞自身のMHCクラスIIおよびB7-2の過剰発現で自らおよび全体の免疫反応を制御している可能性を示す新しい知見であり、一連の免疫反応の収束のメカニズムを示唆するものである。

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2件)

星野 真理、樹状細胞の生存維持とMHCクラスIIのコピキチン化。臨床免疫・アレルギー科、59(4): 491-9、2013。

Li Y, Li S, Hoshino M, Ishikawa R, Kajiwara C, Gao X, Zhao Y, Ishido S, Uono H, Wang JY. HSP90a deficiency does not affect immunoglobulin gene hypermutation and class switch but causes enhanced MHC class II antigen presentation. Int Immunol. 査読有、24(12): 751-758. 2012

[学会発表](計3件)

Ohmura-Hoshino M. MHC ubiquitination in dendritic cells is necessary for the normal immune responses. 第43回日本免疫学会、2014年12月、京都国際会議場(京都府京都市)

Ohmura-Hoshino M, Ishido S. Systemic immune responses in MARCH 1-deficient mice. 第42回日本免疫学会、2013年12月、幕張メッセ(千葉県千葉市)

Ohmura-Hoshino M. High antigen-specific IgE production in MARCH 8 transgenic mice. 第41回日本免疫学会、2012年12月、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 真理(HOSHINO, Mari)
岐阜医療科学大学・保健科学部・教授
研究者番号： 10373511

(2) 研究協力者

星野 克明(HOSHINO, Katsuaki)
香川大学・医学部・教授
研究者番号： 50324843