

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590572

研究課題名(和文) 神経軸索伸長阻害因子による自己免疫疾患の新たな制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of neurite outgrowth inhibitor proteins in B cell activation

研究代表者

乾 匡範 (Inui, Masanori)

東北大学・加齢医学研究所・講師

研究者番号：80443985

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)：本研究において、抗体産生細胞であるB細胞の寛容維持における免疫制御受容体-リガンドによる新規制御ネットワーク機構の解明を目的とし、神経軸索伸長阻害因子NogoおよびNogo受容体(NgR1)のB細胞活性化制御における役割を検討した。Nogoが骨髄B細胞や腹腔B-1細胞の分化・生存、さらに脾臓の胚中心B細胞の活性化を負に制御していること、in vitroの解析において、NogoがTLRシグナル伝達に必要であることを示した。このようにNogoがB細胞寛容誘導に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the physiological roles of neurite outgrowth inhibitor protein Nogo and Nogo receptor (NgR1) in B cell activation. Nogo-deficient B cells showed a significant reduction of IL-6 and IgM production in response to LPS, CpG and poly(I:C). Thus, Nogo was indispensable for full activation of nucleic acid-sensing TLR responses in B cells.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞 免疫寛容 TLR

1. 研究開始当初の背景

抗体産生細胞であるB細胞の自己寛容機構が破綻すると、病原性自己抗体の産生が誘導され、全身性エリテマトーデスや関節リウマチなど様々な自己免疫疾患の発症につながる。そのため、B細胞の自己寛容の制御機構を理解することは自己免疫疾患の発症機序の解明、ならびに治療法の開発において必須である。最近、B細胞上に発現する免疫制御性受容体 PirB が自己抗体産生を制御し、自己免疫疾患の発症を抑制することから PirB が B細胞の自己寛容の維持に重要な役割を果たすことが推測された。また PirB の新規リガンドとして神経軸索伸長阻害因子である Nogo (neurite outgrowth inhibitor) や MAG (myelin-associated glycoprotein), OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein) が報告され、これら分子群の相互作用による細胞機能調節機構に興味深い。

2. 研究の目的

申請者は Nogo が免疫系細胞に幅広く発現すること、またその受容体の1つである Nogo 受容体 (NgR) が B細胞や T細胞に発現することを見い出し、Nogo/MAG/OMgpによる PirB 依存的な免疫制御機構と PirB 非依存的な免疫制御機構が存在し、周辺環境に応じて異なる様式で細胞応答のバランスを巧みに調整することで自己寛容の誘導および維持に関わっていることを仮説として提唱する。本研究では、Nogo/MAG/OMgpにより導入される PirB や NgR を介するシグナルが自己抗体の産生ならびに自己免疫疾患の発症にどのように関わっているかを解明するため、B細胞の制御に与えるこれら分子の役割を検討する。

3. 研究の方法

1) 野生型、Nogo 欠損および NgR 欠損マウスの骨髄、脾臓、腹腔より細胞を回収し、フローサイトメトリー解析により B細胞分化・成熟における Nogo および NgR の役割を検討した。

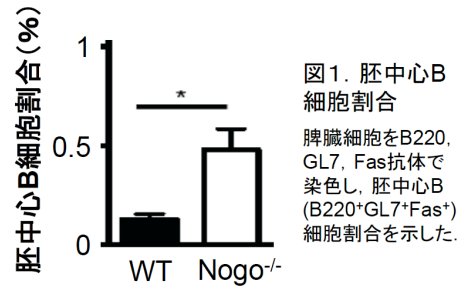
2) 各マウスに Alum および CFA アジュバント存在下で OVA 抗原免疫後、血中抗体価を ELISA 法により、また脾臓における B細胞分布をフローサイトメトリー解析により検討した。

3) 加齢させた各マウスの血清を経時的に採取し、抗 DNA 抗体価を ELISA 法により測定した。また、腎臓など組織の病理組織学的解析を行った。

4) 各マウスの脾臓より単離したナイーブ B細胞を *in vitro* において刺激し、サイトカイン産生や抗体産生能を ELISA 法により、シグナル解析をウェスタンブロット法により行った。

4. 研究成果

1) Nogo および NgR の B細胞分化・成熟における役割を明らかにするため、各遺伝子欠損マウスの脾臓、骨髄、腹腔の B細胞分布を解析した。脾臓における濾胞 B細胞および marginal zone B細胞の数、割合に有意な違いは認められなかったが、Nogo 欠損マウスにおいて、胚中心 B細胞数および割合が野生型マウスと比較して有意に増加していた (図1)。さらに Nogo 欠損マウスにおいて、骨髄における未成熟 B および成熟 B細胞の増加を観察した。一方で、NgR 欠損マウスにおける B細胞分布に野生型との違いは認められなかった。



2) 抗原刺激応答における Nogo の役割を検討するため、Alum および CFA アジュバント存在下において OVA 抗原免疫を行った。その結果、いずれのアジュバント存在下においても Nogo 欠損マウスで OVA 特異的抗体価の上昇が観察された (図2)。さらに、免疫後の胚中心 B細胞、形質細胞の数および割合が有意に野生型マウスより増加していた。

このように、Nogo は B細胞の分化・成熟、さらに抗原刺激に対する応答を負に調節する分子であることが示唆された。

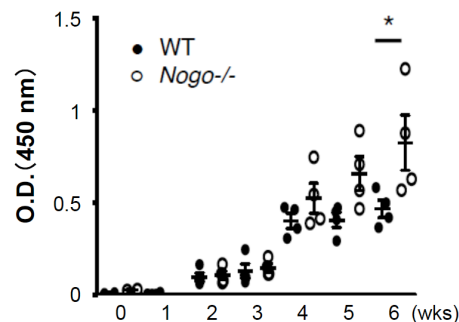


図2. 抗原免疫後の抗体価

OVA抗原をAlumアジュバントの存在下、0週と3週に免疫し、経時的に採取した血清中のOVA特異的IgG抗体価を測定した。

3) Nogo 欠損マウスにおいて、胚中心 B細胞が増加すること、さらに T細胞依存性免疫応答が亢進することから、Nogo 欠損マウスが自己免疫症状を自然発症するかどうかを検討した。しかし、加齢させた Nogo 欠損マウスに特徴的な自己免疫疾患の症状は見い出せなかった。さらに、血清中の抗 DNA 抗体価において野生型マウスとの差は認められず (図

3), 病理組織学的解析においても顕著な差は見られなかった。

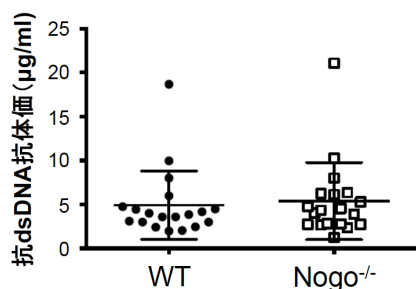


図3. 自己抗体価の測定

加齢させた野生型およびNogo欠損マウス(40週齢)より血清を採取し, 抗dsDNA抗体価を測定した。

4) *in vitro* における各種刺激に対するB細胞応答能を検討したところ, Toll-like receptor (TLR) のリガンド刺激に対し, Nogo欠損B細胞はサイトカインIL-6産生や抗体産生能が著しく低下していることが明らかとなった(図4)。

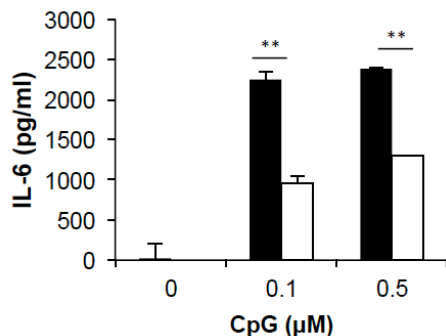


図4. TLRリガンド刺激に対する応答

*in vitro* で脾臓より調整したナイーブB細胞をCpGで刺激し, IL-6産生をELISA法により測定した。

これらの結果より, Nogoは, T依存性抗原に対するB細胞応答を負に, TLR刺激を正に調節することが示唆された。

#### 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 5件)

1. Inui M, Tazawa K, Kishi Y, Takai T: Platelets convert peripheral blood circulating monocytes to regulatory cells via immunoglobulin G and activating-type Fcγ receptors. *BMC Immunol.* in press. (査読有)
2. Kimura A, Endo S, Inui M, Saitoh S, Miyake K, Takai T: Endoplasmic Protein Nogo-B (RTN4-B) Interacts with GRAMD4 and Regulates Innate Immune Responses Through the Nucleic Acid-sensing TLR Pathways. *J. Immunol.* in press. (査読有)
3. Inui M, Hirota S, Hirano K, Fujii H, Sugahara-Tobinai A, Ishii T, Harigae H, Takai T: Human CD43+ B cells are closely related not only to memory B cells

phenotypically but also to plasma blasts developmentally in healthy individuals. *Int Immunol.* in press. (査読有)

4. Kanari Y, Sugahara-Tobinai A, Takahashi H, Inui M, Nakamura A, Hirose S, Takai T: Dichotomy in FcγRIIB deficiency and autoimmune-prone SLAM haplotype clarifies the roles of the Fc receptor in development of autoantibodies and glomerulonephritis. *BMC Immunol.* 15, 47 (2014) (査読有)
5. Tanaka J, Hirano K, Sakamoto Y, Sugahara-Tobinai A, Endo S, Ito-Matsuoka Y, Nakano A, Inui M, Nitschke L, Takai T: Intravenous immunoglobulin suppress IL-10 production by activated B cells *in vitro*. *Open Journal of Immunology.* 2, 149-60 (2012) (査読有)

[学会発表] (計 14件)

1. 乾 匡範, 高井俊行: ヒト末梢血CD20+CD27+CD43+B細胞はプラズマブラストよりもメモリーB細胞に近い特徴を有する. 日本炎症・再生医学会, 万国津梁館(沖縄・名護) (2014年7月2日)
2. 田澤樹乃, 乾 匡範, 岸 義朗, 高井俊行: 血小板と抗血小板抗体による単球からのIL-10産生誘導機構. 日本炎症・再生医学会, 万国津梁館(沖縄・名護市) (2014年7月1日)
3. 乾 匡範, 田澤樹乃, 岸 義朗, 高井俊行: 血小板を介する新たな炎症制御機構の同定. 日本生化学会大会, 京都国際会館(京都・京都市) (2014年10月17日)
4. Kimura T, Inui M, Takai T: Nogo-B (Reticulon 4B) regulates intracellular TLR pathway through interaction with GRAMD4. 日本生化学会大会, 京都国際会館(京都・京都市) (2014年10月17日)
5. Wong YL, Fujii H, Ishii T, Inui M, Harigae H, Takai T: Putative B1 cells and plasmablasts are distinguishable in their inhibitory receptor expression and immunoglobulin secretion profiles. 日本免疫学会学術集会, 京都国際会館(京都・京都市) (2014年12月12日)
6. Kimura T, Inui M, Takai T: The endoplasmic reticulum-resident membrane protein Nogo-B modulates Toll-like receptor responses to nucleic acids in macrophages. 日本免疫学会学術集会, 京都国際会館(京都・京都市) (2014年12月11日)
7. 乾 匡範, 岸 義朗, 高井俊行: 抗ヒト血小板抗体による炎症応答の制御機構.

- 日本炎症・再生医学会，京都国際会館（京都・京都市）（2013年7月3日）
8. 木村俊文，乾 匡範，高井俊行：Nogo タンパク質による TLR シグナルと炎症 応答遺伝子の発現制御機構．日本炎症・再生医学会，京都国際会館（京都・京都市）（2013年7月2日）
  9. Kimura T, Inui M, Takai T: A reticulon family protein Nogo is an active component of TLR-triggered innate immune responses in macrophages. 国際免疫学会議，ミラノコンベンションセンター（イタリア・ミラノ）（2013年8月24日）
  10. Inui M, Tazawa K, Kishi Y, Takai T: Identification of a novel regulatory pathway of inflammation via platelets. 日本免疫学会学術集会，幕張メッセ（千葉・千葉市）（2013年12月13日）
  11. Kimura T, Inui M, Takai T: Modulation of Toll-like receptor signaling by Nogo in macrophages. 日本免疫学会学術集会，幕張メッセ（千葉・千葉市）（2013年12月13日）
  12. 弘田紗瑛子，乾 匡範，高井俊行：健常ヒト末梢血中に同定された新しい CD43 陽性 B 細胞の性状解析．日本分子生物学会年会，神戸国際会議場（兵庫・神戸市）（2013年12月3日）
  13. Kimura T, Inui M, Takai T: Regulation of TLR signaling by a reticulon family protein Nogo in macrophages. 日本免疫学会学術集会，神戸国際会議場（兵庫・神戸市）（2012年12月5日）
  14. Ishida Y, Inui M, Kimura A, Nosaka M, Mukaida N, Kondo T: Essential roles of CCL3-CCR1 axis in the pathogenesis of antigen-induced arthritis. 日本免疫学会学術集会，神戸国際会議場（兵庫・神戸市）（2012年12月5日）

〔図書〕（計 5 件）

1. 乾 匡範，高井俊行：自己免疫病とPirB. 医学のあゆみ，医歯薬出版，245，225-28，（2013）
2. 乾 匡範，高井俊行：免疫グロブリン様受容体による破骨細胞の分化制御．CLINICAL CALCIUM，医薬ジャーナル社，22，1651-57，（2012）
3. 乾 匡範：NogoおよびMHC class Iによる PirBを介した新たなマスト細胞の制御機構．臨床免疫・アレルギー科，科学評論社，58，185-89，（2012）
4. 乾 匡範：ペア型受容体による破骨細胞の分化制御．医学のあゆみ，医歯薬出版，242，660-64，（2012）
5. 乾 匡範，高井俊行：破骨細胞共刺激受容

体による正と負の制御．炎症と免疫，先端医学社，20，240-5，（2012）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/expimu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 匡範 (INUI MASANORI)  
 東北大学・加齢医学研究所・講師  
 研究者番号：80443985

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：