

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790466

研究課題名(和文) 誘導型核内 IkappaB 分子による B 細胞機能の制御機序

研究課題名(英文) The roles of nuclear IkappaB protein in the regulation of B cell function

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NF- $\kappa$ B の核内制御因子ひとつである I $\kappa$ BNS が B 細胞の機能発現に重要な役割を担っていることを明らかにした。I $\kappa$ BNS は、B 細胞の胸腺非依存的応答、特に、Toll 様受容体を介した B 細胞の増殖活性や抗体産生に重要であった。また、I $\kappa$ BNS が抑制性サイトカインである IL-10 を産生する制御性 B 細胞の分化にも関与することも示唆された。これまでに報告されていた核内 I $\kappa$ B 分子の自然免疫系の制御機能に加え、I $\kappa$ BNS がリンパ球の機能制御においても重要であり、免疫応答を正と負、両方に制御する因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：A transcription factor nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) plays an essential role in the overall regulation of the immune system and inflammatory responses. Activation of NF-kappaB is tightly regulated by inhibitory proteins termed IkappaB, which consist of classical cytoplasmic and nuclear IkappaBs. Roles of a nuclear regulator of NF-kappaB, IkappaBNS, in the development and function of B cells were studied. We have found that IkappaBNS is important for proliferative activity and antibody production via Toll-like receptor signals. IkappaBNS is also involved in the development of regulatory B cells that produce anti-inflammatory cytokine IL-10. Thus, an additional important role for IkappaBNS in control of the immune response was defined.

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：リンパ球 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系は、生体内への病原体の侵入を感知し排除する生体防御システムの中心を担っている。炎症・免疫応答において、最も重要な転写因子の一つとして Nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) が知られている。しかし、NF- $\kappa$ B は免疫系以外の様々な細胞でも発現しており、多様な生命活動に関与しているユビキタな転写因子であることから、その機能の特異性は多くの制御因子によってもたらされている。NF- $\kappa$ B と結合し、その活性化を直接制御する因子として I $\kappa$ B と呼ばれる因子群がある。I $\kappa$ B 分子群には細胞質に局在して NF- $\kappa$ B の核移行を抑制するグループと、核内で NF- $\kappa$ B と相互作用することで NF- $\kappa$ B の活性制御に従事するグループがある。後者はサイトカインや抗原刺激を受けた免疫細胞で発現が誘導され、主に核に局在するユニークな I $\kappa$ B 分子群であり、これまでに Bcl-3 や I $\kappa$ B $\zeta$ 、I $\kappa$ BNS が報告されている。これらの誘導型核内 I $\kappa$ B 群の役割や作用機序は次第に明らかになっているものの、まだ不明な点も多い。

我々のグループは核内 I $\kappa$ B 分子の一つである I $\kappa$ BNS がリンパ球の分化や機能に重要であることを I $\kappa$ BNS ノックアウトマウスの解析によって明らかにし、報告してきた (*J. Immunol.* 2007)。最近では、I $\kappa$ BNS 欠損マウスでは特定の B 細胞亜集団が欠損することや液性免疫応答が低下していることを報告している (*J. Immunol.* 2011)。また、Bruce Beutler らのグループによる ENU 誘発突然変異マウスを用いた遺伝学的アプローチによる研究でも、液性免疫応答に重要な遺伝子の一つとして *Nfkbid* (I $\kappa$ BNS) が同定、報告されている (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012)。

以上のことから、核内 I $\kappa$ B 分子はユビキタな NF- $\kappa$ B 転写因子のはたらきを細胞種や機能特異的に制御するために重要であり、I $\kappa$ BNS は B 細胞の分化や液性免疫応答に関与することも明らかになった。しかし、その作用機序などの分子メカニズムについての報告は少ない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、誘導型核内 I $\kappa$ B 分子のひとつである I $\kappa$ BNS の欠損が特定の B 細胞サブセットの分化と、生体での抗体産生の異常に繋がることが明らかになってきた。しかし、I $\kappa$ BNS の機能は細胞種毎に異なり、リンパ球の分化や機能制御における I $\kappa$ BNS の作用機序は明らかになっていない。

そこで本研究では、I $\kappa$ BNS による B リンパ球の分化・機能制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

また、I $\kappa$ BNS 欠損マウスでは胸腺非特異的抗原に対する抗体産生の障害が見られるが、特に細菌内毒素であるリポ多糖のような Toll 様受容体を介した活性化が著しく低下してい

る。そこで、B 細胞の Toll 様受容体応答における I $\kappa$ BNS の役割を詳細に調べた。

具体的には、以下の 3 点に取り組んだ。

(1) B 細胞における NF- $\kappa$ B の活性化制御に I $\kappa$ BNS がどのように関与するのかを生化学的実験によって検討する。

(2) 抗体遺伝子への NF- $\kappa$ B および I $\kappa$ BNS の結合様式を解析することで、I $\kappa$ BNS による抗体産生制御のメカニズムを明らかにする。

(3) I $\kappa$ BNS 欠損マウスと野生型マウスの B 細胞の Toll 様受容体応答性を明らかにする。また、B 細胞において Toll 様受容体下流のシグナル伝達経路に I $\kappa$ BNS がどのように関与するのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、我々の協力グループ (Reinherz EL, Dana-Faber Cancer Institute) が独自に樹立した I $\kappa$ BNS ノックアウトマウスと I $\kappa$ BNS に対するモノクローナル抗体を利用した。I $\kappa$ BNS ノックアウトマウスは免疫学の分野で最もよく用いられている C57BL/6 背景のものと BALB/c 背景の 2 系統を利用した。これらのマウス系統は免疫系の性状に大きく関与するヘルパー T 細胞型の偏向が異なることから、両系統のマウスを用いることで、1 系統では見過ごされる I $\kappa$ BNS 遺伝子の機能が明らかになる可能性がある。

さらに、成熟 B 細胞欠損マウス ( $\mu$ MT) や NF- $\kappa$ B p50 分子欠損マウス (*Nfkb1* knockout) マウスの B 細胞を用いて、*in vivo* 実験および生化学的実験を行った。

(1) I $\kappa$ BNS あるいは NF- $\kappa$ B p50 を欠損する *Nfkb1* knockout マウスから分離した B 細胞と野生型 C57BL/6 マウスの B 細胞における I $\kappa$ B 分子・NF- $\kappa$ B 分子の活性や標的遺伝子への結合様式を生化学実験によって解析した。

(2) B 細胞の中心機能である抗体産生における NF- $\kappa$ B の制御機構の解明を目指し、免疫グロブリン遺伝子のスイッチ領域に存在する NF- $\kappa$ B 認識 DNA 配列への I $\kappa$ BNS や NF- $\kappa$ B 分子の結合様式を解析した。

(3) B 細胞の Toll 様受容体応答における I $\kappa$ BNS の役割を明らかにするために、I $\kappa$ BNS 欠損 B 細胞における Toll 様受容体の発現解析や、各種 Toll 様受容体のアゴニストを用いた実験を行った。さらに、Toll 様受容体と B 細胞受容体を介したシグナル伝達様式の比較を行った。

## 4. 研究成果

(1) B 細胞における I $\kappa$ BNS による NF- $\kappa$ B の活性化制御機構について

I $\kappa$ BNS 欠損マウスと野生型マウスの休止期および活性化 B 細胞における I $\kappa$ BNS と NF- $\kappa$ B 分子の経時的相互作用を免疫沈降法にて解析した。また、これらの B 細胞における NF- $\kappa$ B の標的 DNA への結合活性を比較した。

その結果, I $\kappa$ BNS欠損B細胞は, リポ多糖(LPS, グラム陰性菌の内毒素)で刺激した場合の増殖活性が野生型B細胞よりも顕著に低下しているものの, このときのNF- $\kappa$ B分子の発現量や核移行, DNA結合活性は野生型B細胞と同様であった。

更に, I $\kappa$ BNSがNF- $\kappa$ B分子群の中でもp50分子と選択的に結合することや, NF- $\kappa$ B1(p50)欠損マウスでは辺縁帯B細胞の分化遅延やIgG3へのクラススイッチが低下しているなどI $\kappa$ BNS欠損B細胞と似た性状を示すことに着目し, I $\kappa$ BNSの発現がNF- $\kappa$ Bp50分子に依存しているかをNF- $\kappa$ B1欠損マウス由来のB細胞を用いて検討した。

その結果, NF- $\kappa$ Bp50欠損B細胞においても野生型B細胞と同等以上のI $\kappa$ BNS mRNAおよびタンパク質の発現が見られることから, I $\kappa$ BNSの発現はp50に依存しないことがわかった。また, NF- $\kappa$ Bの結合モチーフを持つオリゴヌクレオチドを用いた沈降実験によって, I $\kappa$ BNSがNF- $\kappa$ B p50分子以外の分子とともに標的DNAに会合する可能性が示唆された。

これまでに, マクロファージなどではI $\kappa$ BNSがNF- $\kappa$ B p50分子のホモダマーと結合して, 標的DNAに会合することでNF- $\kappa$ Bの活性化を制御するしくみが報告されている(2006 *J. Immunol.* Kuwata et al.)。本研究では, これまでに知られていない, B細胞特異的なNF- $\kappa$ B活性化のI $\kappa$ BNSによる制御機構の存在が強く示唆されたが, その仕組みの解明は今後の課題である。

## (2) I $\kappa$ BNSによる免疫グロブリン遺伝子のスイッチについて

B細胞の最も中心的な機能である抗体産生に注目してI $\kappa$ BNSの作用機序の解明を目指した。I $\kappa$ BNSの欠損は特定の免疫グロブリン産生の低下に繋がる。IgM以外の免疫グロブリンの産生には「クラススイッチ」が行われる必要がある。これまでの研究で, I $\kappa$ BNS欠損B細胞ではIgG3へのスイッチが低下しているためにIgG3抗体の産生が低いことが示唆された。そこで, IgG3遺伝子のスイッチ領域( $\gamma$ 3スイッチ領域, S $\gamma$ 3)に結合するタンパク質を解析した。

S $\gamma$ 3領域に存在するNF- $\kappa$ Bの結合配列を持つオリゴヌクレオチドを合成し, これに結合するNF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B分子をDNA pulled-down法とwestern blottingによって解析した。その結果, 非常に弱くではあるが, S $\gamma$ 3へのI $\kappa$ BNSの結合が検出された。また, I $\kappa$ BNS欠損B細胞では野生型B細胞よりもS $\gamma$ 3への結合とIgG3へのスイッチに関与することが報告されているNF- $\kappa$ B p50分子の沈降が少なかった。このことから, I $\kappa$ BNSの欠損がNF- $\kappa$ Bp50分子の免疫グロブリンスイッチ領域S $\gamma$ 3への結合活性に影響

する可能性が示唆された。今後これらの検証実験を行い, 新規の抗体産生制御機構を明らかにする。

## (3) I $\kappa$ BNS欠損B細胞のTLR応答について

I $\kappa$ BNS欠損マウスでは胸腺非特異的抗原に対する抗体産生の障害が見られるが, 特に細菌内毒素であるリポ多糖のようなToll様受容体(TLR)を介した活性化が著しく低下している。そこで, B細胞のToll様受容体応答におけるI $\kappa$ BNSの役割を詳細に調べた。

その結果, I $\kappa$ BNSの欠損はTLR 刺激によるB細胞の生存率には影響しないが, TLR1/2, TLR4, TLR6/2, TLR7, TLR9の刺激を介したB細胞の増殖活性と抗体産生細胞への分化にI $\kappa$ BNSが重要であることが明らかになった。

近年, 抑制性サイトカイン IL-10 を産生することで免疫抑制機能を有する制御性B細胞の機能が注目されている。このようなB細胞はマウスの脾臓ではCD1d<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup>という表現型をしていることが報告されている。I $\kappa$ BNS欠損マウスでは, IL-10産生においてコンピテントなCD1d<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup>B細胞が野生型マウスより少なかった。さらに, I $\kappa$ BNS KO B細胞ではWT B細胞に比べ*Il10*発現量およびIL-10産生量が顕著に低いことから, B細胞のIL-10産生にI $\kappa$ BNSが関与していることが強く示唆された。これらから, I $\kappa$ BNSはB細胞の活性化に伴い抗体産生などを介して免疫系を活性化するはたらきに加え, IL-10を産生して過剰な免疫反応を抑えるはたらきにも関与していると考えられた。

## 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 3件)

1. Enhancement of phagocytosis and cytotoxicity in macrophages by tumor-derived IL-18 stimulation. Xu H, Toyota N, Xing Y, Fujita Y, Huang Z, Touma M, Wu Q and Sugimoto K. *BMB Rep.* 2014 May;47(5):286-91.
2. A dominant trait linked to chromosome 1 in DBA/2 mice for the resistance to autoimmune gastritis appears in bone marrow cells. Fujii M, Suzuki K, Suenaga S, Wakatsuki M, Kushida Y, Touma M, and Hosono M. *Exp Anim.* 2014;63(2):155-67.
3. Role of FGF10 on tumorigenesis by MS-K cells. Sugimoto K, Yoshida S, Mashio Y, Toyota N, Xing Y, Xu H, Fujita Y, Huang Z, Touma M and Wu Q. *Genes to Cells.* 2014 Feb;19(2):112-125. doi: 10.1111/gtc.12118

〔学会発表〕(計 5 件)

1. TOUMA Maki, NOGUCHI Mitsuo, HASEGAWA Naoki. A role of I $\kappa$ BNS in TLR-mediated IL-10 production in B cells. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 2013. 12. 11-13.千葉
2. Minami Miura, Mitsuo Noguchi, Maki Touma The atypical I $\kappa$ B protein I $\kappa$ BNS is important for TLR-induced IL-10 production in B cells. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. August 22-27. 2013. Milan, Italy.
3. TOUMA Maki, CLAYTON Linda K. A lack of IkappaBNS leads to impaired function of marginal zone B cells and modulates TLR-induced B cell responses. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 2012. 12. 4-7. 神戸
4. TOUMA Maki, CLAYTON Linda K. A key role for the nuclear I $\kappa$ B protein I $\kappa$ BNS in control of B cell development and function. The 34th Naito Conference. October 16-19, 2012. Sapporo, Japan.
5. Maki Touma, Ibuki Saito, Ellis L Reinherz, Linda K Clayton. B cell development and immunoglobulin production are altered in the absence of IkappaBNS. Annual Meeting of The American Association of Immunologists. May 4-8, 2012. Boston, Massachusetts, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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：