

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590573

研究課題名(和文) アレルギー感受性を規定するIgE産生B細胞の分子制御機構と細胞動態の解明

研究課題名(英文) Molecular and cellular mechanism controlling IgE-producing B cells that contributes to the pathogenesis of allergic diseases.

研究代表者

小林 隆志 (Kobayashi, Takashi)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：30380520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：サイトカインシグナルの抑制因子であるSOCS1がB細胞で欠損するマウスは、IgE産生が上昇する。このマウスの胚中心B細胞とメモリーB細胞の形成は正常であったが、アレルギー感受性を検証した結果、気道炎症モデル、鼻炎モデルおよび中耳炎モデル等でアレルギー感受性が亢進していることが示された。一方、アダプター分子TRAF6が制御性T細胞で特異的に欠損すると、制御性T細胞の分化と機能に重要な転写因子Foxp3の発現が不安定になり、T細胞が自然に活性化してTh2型サイトカインが上昇し、B細胞によるIgEの産生が亢進してアレルギー性皮膚炎や関節炎が自然発症することを見出した。

研究成果の概要(英文)：B cell-specific disruption of SOCS1 which is a suppressor of cytokine signaling in mice results in the elevation of serum IgE levels. Homozygous deletion of SOCS1 gene in B cells enhanced the susceptibility to development of allergen-induced airway inflammation, allergic rhinitis and otitis media, but not the development of germinal center B cells or memory B cells. On the other hand, Treg-specific TRAF6 deficient mice dramatically increased Th2 cytokine production leading to the hyper IgE syndrome, and developed allergic skin diseases, arthritis, lymphadenopathy. These results suggest that both SOCS1 and TRAF6 may contribute to the pathogenesis of allergic diseases.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：アレルギー B細胞 シグナル伝達 IgE

1. 研究開始当初の背景

B 細胞は獲得免疫において重要な役割を果たし、病原体の排除に必須なばかりでなく、その過剰な応答はアレルギーや自己免疫疾患と深い関係がある。特に液性免疫応答において、どのエフェクター機構が主に動員されるかは、B 細胞から産生される抗体のクラス (IgM, IgG, IgA, IgD 及び IgE) いわゆるアイソタイプによって決定される。一方、アレルギー疾患は、通常血中にほとんど存在しない抗原特異的な IgE とそれに結合能を有する肥満細胞によって引き起こされる免疫疾患である。アイソタイプの違いは抗体分子の定常部の違いであり、アイソタイプの変化 (クラススイッチ) は抗原刺激と共にヘルパー T 細胞からの CD40L やサイトカインなどの補助分子の刺激が必要とされる。例えば、ヘルパー T 細胞上の CD40L は B 細胞上の TNF 受容体ファミリーに属する CD40 に結合し、転写因子 NF- κ B を活性化してクラススイッチを誘導する。CD40L や CD40 に変異を有するヒトやマウスでは、クラススイッチが起こらず IgM 以外の抗体産生応答が著明に低下し、重篤な液性免疫不全症状を呈する。我々は、CD40 の細胞内シグナル伝達に重要なアダプター分子 TRAF6 が B 細胞特異的に欠損するマウスでは、B 細胞応答が低下し、定常時の IgM レベルおよび抗原特異的 IgG1 産生が低下し、さらに腹腔内 B1a 細胞が欠損することを明らかにした (PLoS ONE, 2009)。

また、TRAF6 が T 細胞で欠損すると、Th2 型のサイトカイン産生が亢進して IgE レベルが上昇することを見出し (Nat Med, 2006) T 細胞内の TRAF6 によって B 細胞の IgE 産生能が間接的に規定されていることが示唆されたが、TRAF6 の欠損により T 細胞が自然に活性化するメカニズムは未だ解明されていない。

一方、サイトカインシグナルもアイソタイプを決める重要な役割を担っている。例えば Th2 細胞から産生される IL-4 は、STAT6 を介して IgG1 および IgE へのクラススイッチを誘導し、Th1 細胞から産生される IFN γ は STAT1 を介して IgG2a (B6 マウスでは IgG2c) へスイッチを誘導するとされる。さらに TGF β や IL-5 は IgA を誘導する。このようにヘルパー T 細胞からの補助分子の刺激が B 細胞の機能制御に重要であることは明らかであるが、そのシグナルを制御する B 細胞内の分子機構は完全に解明されていない。

これまで我々は、サイトカインシグナルの抑制因子である SOCS ファミリー分子について、その生理的・病態学的役割の研究を精力的に進めてきた。SOCS はサイトカインの刺激によって発現が誘導され、そのサイトカインの JAK/STAT 系シグナルを遮断することでネ

ガティブ・フィードバック・ループを形成する。また、サイトカイン間のクロストークや NF- κ B 経路の制御にも重要であることが知られている。8 種類のファミリー分子のなかで特に免疫系で重要な役割を果たすのは SOCS1 と SOCS3 であることが判明している。

これまでの先行研究によりサイトカインシグナルの制御因子である SOCS1 が B 細胞で欠損するマウスでは IgE が著しく上昇することが明らかになったが、これがアレルギー感受性にどのように影響するのか不明な点も残されている。

2. 研究の目的

本研究は、アレルギーの感受性を規定する IgE 産生 B 細胞の機能制御を担う分子機構について、サイトカインシグナルの制御因子 SOCS1 とシグナル伝達分子 TRAF6 に着目し、遺伝子改変マウスを用いて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

通常の Cre-loxP システムを用いて細胞特異的遺伝子欠損マウスを作製した。即ち、B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスの作製は、CD19 Cre マウスと SOCS1 遺伝子を loxP サイトで挟んだゲノム構造を有する SOCS1 Flox マウスを交配して作製した。制御性 T 細胞特異的 TRAF6 欠損マウスの作製は、Foxp3 Cre マウスと TRAF6 Flox マウスを交配して作製した。

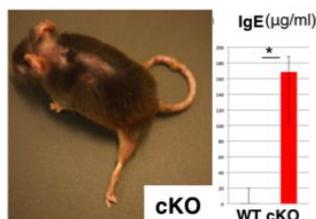
B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスのアレルギー感受性について、気道炎症モデル、鼻炎モデルおよび中耳炎モデルなどで検証した。制御性 T 細胞特異的 TRAF6 欠損マウスの制御性 T 細胞について、T 細胞の養子移入実験や Flow cytometry 法などの各種免疫学的手法によって解析した。

4. 研究成果

サイトカインシグナルの抑制因子である SOCS1 が B 細胞で欠損するマウスは IgE 産生が上昇する。そこで、このマウスのアレルギー感受性を検証した結果、気道炎症モデル、鼻炎モデルおよび中耳炎モデル等でアレルギー感受性が亢進していることが示された。従って、B 細胞内における SOCS1 はアレルギー感受性を制御する重要なファクターであることが明らかになった。また、長期にわたる抗体産生を調べたところ、B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスにおいて抗原特異的 IgG1 産生 B 細胞の割合が有意に増加していたが、それら細胞集団の中の胚中心 B 細胞とメモリー B 細胞の割合には野生型マウスと大きな差は認められなかった。さらに、免疫して 1 年後に再免疫したときの抗原特異的 IgG1 の産生も野生型マウスと有意差はなかったことから、SOCS1 欠損が抗原特異的 IgG1 型メモリー B 細胞の分化・機能には影響しないことが明らかになった。また、同様の方法で抗原特異的 IgE 産生 B 細胞を調べたところ、長期にわ

たる抗原特異的 IgE 産生 B 細胞の有為な増加を認め、1 年後に抗原再刺激した時の IgE 上昇の割合は野生型マウスと差はなかった。以上の結果から、B 細胞における SOCS1 の欠損が長期的な抗原特異的 IgE 産生を促進することが示された。

アダプター分子 TRAF6 が免疫抑制性に働く制御性 T 細胞で特異的に欠損すると、IgE の産生が亢進し、アレルギー性皮膚炎や関節炎が自然発症することを見出した(図)。TRAF6 は、樹状細胞などの抗原提



制御性T細胞特異的TRAF6欠損マウスの皮膚炎と関節炎および血中IgE濃度の上昇

示細胞では Toll-like receptor などのシグナル伝達を担う免疫応答に必須の分子である。Foxp3-Cre マウスと TRAF6 Flox マウスを交配し、制御性 T 細胞特異的 TRAF6 欠損マウスを作製すると、TRAF6 欠損制御性 T 細胞は、正常な *in vitro* 抑制活性を示したが、*in vivo* で誘発した腸炎は抑制できなかつた。制御性 T 細胞のマーカーである Foxp3 を指標に制御性 T 細胞の細胞動態を解析したところ、TRAF6 欠損制御性 T 細胞は野生型制御性 T 細胞に比べレシピエントマウスに移入後 Foxp3 陽性細胞が有意に減少することが示された。さらに、養子移入実験で TRAF6 が欠損した制御性 T 細胞は、移入後すみやかに Foxp3 の発現を落とし、Foxp3 陽性から陰性細胞へ変化することを見出した。生体内でのこれらの変化が、免疫抑制効果の低下を招き、異常な Th2 反応の増強と B 細胞の活性化、IgE 産生の亢進、さらにはアレルギー病態の発症につながったと考えられた。

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 9 件)

Muto G, Kotani H, Kondo T, Morita R, Tsuruta S, Kobayashi T, Luche H, Fehling HJ, Walsh M, Choi Y, Yoshimura A. TRAF6 Is Essential for Maintenance of Regulatory T Cells That Suppress Th2 Type Autoimmunity. *PLoS One*. 8(9):e74639 (2013) 【査読有り】

Matsuo T, Noguchi Y, Shindo M, Morita Y, Oda Y, Yoshida E, Hamada H, Harada M, Shiokawa Y, Nishida T, Tominaga R, Kikushige Y, Akashi K, Kudoh J, Shimizu N, Tanaka Y, Umemura T, Taniguchi T, Yoshimura A, Kobayashi T, Mitsuyama M, Kurisaki H, Katsuta H, Nagafuchi S. Regulation of human autoimmune regulator (AIRE) gene translation by miR-220b. *Gene*. 530(1):19-25

(2013) 【査読有り】

Eshita Y, Ji RC, Onishi M, Runtuwene LR, Noguchi K, Kobayashi T, Mizuno M, Yoshida J, Kubota N, Onishi Y. Supramolecular Targeting of B16F10 Melanoma Cells With Nanoparticles Consisting of a DEAE-Dextran-MMA Copolymer-Paclitaxel Complex In vivo and In vitro. *J Nanomed Biotherapeut Discov* 2: 109. doi:10.4172/2155-983X.1000109 (2012) 【査読有り】

Hinoi E, Ochi H, Takarada T, Nakatani E, Iezaki T, Nakajima H, Fujita H, Takahata Y, Hidano S, Kobayashi T, Takeda S, Yoneda Y. Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor-15 up-regulated in osteocytic cells under hypoxia. *J Bone Miner Res*. 27(4): 938-949 (2012) 【査読有り】

Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A. TGFβ-Activated Kinase 1 (TAK1)-Binding Proteins (TAB) 2 and 3 Negatively Regulate Autophagy. *J Biochem*. 151(2): 157-166 (2011) 【査読有り】

Mori T, Miyamoto T, Yoshida H, Asakawa M, Kawasumi M, Kobayashi T, Morioka H, Chiba K, Toyama Y, Yoshimura A. IL-1beta and TNFalpha-initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *Int Immunol*. 23(11): 701-712. (2011) 【査読有り】

Miyamoto K, Yoshida S, Kawasumi M, Hashimoto K, Kimura T, Sato Y, Kobayashi T, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Hao W, Morioka H, Chiba K, Kobayashi T, Yasuda H, Penninger JM, Toyama Y, Suda T and Miyamoto T. Osteoclasts are dispensable for haematopoietic stem cell maintenance and mobilization. *J Exp Med*. 208(11): 2175-2181 (2011) 【査読有り】

Nagamatsu G, Kosaka T, Kawasumi M, Kinoshita T, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Kobayashi T, Oya M, and Suda T.: A germ cell specific gene, Prmt5 works as somatic cell reprogramming. *J Biol Chem*. 286(12): 10641-10648. (2011) 【査読有り】

Nakaya M, Hamano S, Kawasumi M, Yoshida H, Yoshimura A, Kobayashi T. Aberrant IL-4 production by SOCS3-over-expressing T cells during infection with Leishmania major exacerbates disease manifestations. *Int Immunol*. 23, 195-202, (2011) 【査読有り】

〔学会発表〕(計 6 件)

Kaori Noguchi, Toshiaki Kawano, Takashi Hirano,

Yoshinori Kadowaki, Masashi Suzuki, Takashi Kobayashi. The effects of allergic rhinitis on mucosal immunity of the middle ear in B cell-specific SOCS1 deficient mice. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013年12月(千葉)

Toshiaki Kawano, Takashi Hirano, Yoshinori Kadowaki, Munehito Moriyama, Tarou Iwasaki, Kaori Noguchi, Takashi Kobayashi, Masashi Suzuki. Analysis of the mucosal immune system of middle ear and nose in Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 knockout mouse model with allergic rhinitis The 7th Extraordinary International symposium on recent advances in otitis media. June 12-16, 2013 (Stockholm, Sweden)

小林 隆志, 原 央子, 飛弾野 真也, 野口 香緒里, 中野 雅裕, 永井 健治, 岡野 ジェイムス洋尚, 岡野 栄之. 新規蛍光・化学発光プローブ SuperSTAR 遺伝子を用いた組織特異的レポーターマウスの開発. 第35回日本分子生物学会・学術集会 2012年12月14日(福岡)

野口 香緒里, 佐藤 翔太, 石川 天洋, 徳永 暁憲, 小林 隆志. IL-10 受容体に結合する候補分子 Zimp7 の細胞内局在と機能の解析. 第35回日本分子生物学会・学術集会 2012年12月11日(福岡)

Go Muto, Takashi Kobayashi, Akihiko Yoshimura. Regulatory T cells specific TRAF6 deletion resulted in Th2 type inflammation. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011年11月29日、千葉幕張メッセ(千葉)

Shinya Hidano, Akihiko Yoshimura, Takashi Kobayashi. Analysis of molecular mechanisms underlying hyper production of IgE in B cell-specific SOCS1 deficient mice. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 2011年11月29日(千葉)

〔図書〕(計1件)

小林隆志, 飛弾野真也: サイトカインシグナル抑制因子 SOCS による IgE 産生の制御. 臨床免疫・アレルギー科 vol.56 (2): 151-158. (2011)

〔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

<http://www.med.oita-u.ac.jp/idc/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 隆志 (KOBAYASHI TAKASHI)

大分大学医学部教授

研究者番号: 30380520

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし