

平成23年 5月 31日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20580334
 研究課題名（和文）
 TGF- β スーパーファミリーの機能分担によるアレルギー炎症の制御機構
 研究課題名（英文） Regulation of allergic inflammation by TGF- β superfamily proteins
 研究代表者
 小川 健司 (OGAWA KENJI)
 独立行政法人理化学研究所・分子リガンド探索研究チーム・専任研究員
 研究者番号： 50251418

研究成果の概要（和文）：

アレルギー炎症の成立における TGF- β ファミリータンパク質の機能を解明するために、B 細胞およびマクロファージにおける ActivinA および TGF- β 1 の作用を検討した。活性化マクロファージは、アクチビン産生を増加する一方、TGF- β 1 の産生は減少させる。また、TGF- β 1 は B 細胞の IgA クラススイッチを誘導するが、ActivinA は IgG の分泌を促進することが明らかになった。アクチビンと TGF- β の機能は一部重複するものの明らかに異なっており、両因子が炎症に際して機能的な分業をしている可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

In order to determine the roles of the TGF- β superfamily proteins in allergic inflammation, we studied the effects of activin A and TGF- β 1 in mouse macrophages and B lymphocytes. Production of activin A was increased, while the expression of TGF- β 1 was decreased in macrophages upon activation. Pretreatment with activin A significantly increased IgG, but not IgA and IgM, production, while TGF- β 1 significantly enhanced IgA and suppressed IgM production in B cells. The functions of activin A partly overlap but are clearly distinct from that of TGF- β 1 in macrophages and B cells, indicating that these two factors have distinct functions in allergic inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード： Activin A、TGF- β 、B リンパ球、マクロファージ、IgA、MMP-9、Toll-like receptors

1. 研究開始当初の背景

哺乳類などの高等動物に見られる「獲得免疫」は、外来の異物を効率的に排除するために特化した生体防御機構である。高度に洗練されたこの機構は、しかしながら、わずかな狂いによって宿主に重篤な問題を引き起こしてしまう側面をも合わせ持っている。本来病原性のない物質に対する過剰な免疫応答によって引き起こされるアレルギーは、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎（花粉症）、気管支喘息（小児喘息）、食物アレルギーなどの症状を引き起こし、社会問題にさえなっている。

現在、アレルギーなどの炎症性疾患には、ステロイド剤が対症薬として応用されている。しかし、既存のステロイド剤は、その一方で強力な副作用（糖尿病、骨粗鬆症などの増悪）が問題視され、副作用のない抗炎症薬の開発が望まれている。

TGF- β 1 は、TGF- β スーパーファミリーに属する多機能因子であり、強い炎症抑制作用ならびに免疫抑制作用を示すことから、副作用の無い新たな治療法の開発に期待が寄せられ、多くの研究者が研究を進めている。しかし現状では、TGF- β スーパーファミリーの免疫担当細胞に対する作用は十分に理解されているとは言えず、臨床応用のためには、これらの問題を解決することが将来に焦眉の急である。我々は、この様な観点から TGF- β スーパーファミリーの他の主要メンバーである ActivinA に着目し、免疫担当細胞における ActivinA の発現と機能に関する研究を行い、多数の興味深い知見を得ている。

[ActivinA は Th2 サイトカインである]

我々は免疫応答で中心的な役割を果たすヘルパーT細胞における ActivinA 産生とその機能について研究した。その結果、CD4⁺T細胞が抗原刺激を受けて活性化すると、ActivinA を産生する事が示された。CD4⁺T細胞が活性化すると、炎症などの細胞性免疫を担うタイプ1ヘルパーT細胞(Th1)またはアレルギーや抗体産生などの液性免疫に重要な役割を果たすタイプ2ヘルパーT細胞(Th2)のいずれかに分化する。この内、高いレベルの ActivinA を産生するのは Th2 である事が明らかとなった(図参照)。この結果は、Activin A がアレルギーや抗体産生などの Th2 が引き起こす免疫応答に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。実際に、他の Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13, etc)と同様、Activin A はマクロファージの M-2 への機能的分化に

働く事が明らかとなった。

[ActivinA はエフェクターT細胞で産生される]
近年、ユニークなサブプレッサーT細胞のポピュレーションとして、CD4⁺CD25⁺ regulatory T細胞が注目されている。この細胞は TGF- β を高発現し、免疫抑制に働く事が知られている。エフェクターT細胞である CD4⁺CD25⁻ T細胞が ActivinA を産生するのに対して、サブプレッサーT細胞である CD4⁺CD25⁺ regulatory T細胞は、活性化しても ActivinA を全く産生しない事が明らかになった(図参照)。また TGF- β 1 がT細胞の増殖を濃度依存的に抑制するのに対し、ActivinA はT細胞に対する増殖抑制作用を示さなかった。これらの結果から、CD4⁺ T細胞における ActivinA の発現と機能は TGF- β 1 とは完全に異なり、両因子が免疫調節において明確な役割分担をしている事が示唆された。

[ActivinA と TGF- β 1 は B細胞とマクロファージでは異なる働きを示す]

ActivinA と TGF- β 1 は、TGF- β スーパーファミリーに属する類縁の分子ではあるが異なる分子であり、異なるレセプターに結合する。にもかかわらず、両者の細胞内情報伝達分子は同一(Smad2/Smad3)と考えられている。実際に、汎用される細胞株においては、二つの因子は類似する作用を示す事が多数の報告から裏付けられている。しかし、二つの異なる分子がいかに進化して来たかに関する論理的な説明は、現在に至るも一切なされていない。我々は、ActivinA と TGF- β 1 が異なる作用を示す組織または細胞が、体内のどこかに存在し、それがこの二つの因子の作用の本質を解明する「鍵」になるであろうと想定した。我々は、我々自身の得たデータから、この可能性があるのは免疫担当細胞に違いないとの仮説のもとに研究を進めた結果、B細胞とマクロファージでは、ActivinA と TGF- β 1 が明らかに異なる働きをする事を発見した。TGF- β 1 は B細胞の IgA クラススイッチを誘導し、増殖を抑制するが、ActivinA は IgG の分泌を促進し、増殖を促進する事が明らかになった。また TGF- β 1 はマクロファージの MMP-2 および MMP-9 分泌を促進するが、ActivinA は MMP-2 のみ分泌を促進した。これらの細胞を用いた研究によって、両因子のシグナリングの違いを解明する可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究では、上記の知見を踏まえ、以下4課題の研究を実施し、研究目的の達成を目指す。

1. Th2 タイプ炎症細胞に対する ActivinA と

TGF- β 1 の作用

2. ActivinA と TGF- β 1 のシグナリングの相違の解明
3. Regulatory T 細胞に対する ActivinA と TGF- β 1 の作用
4. アレルギー制御に対する ActivinA と TGF- β 1 の機能分担

「ActivinA と TGF- β 1 のシグナリングの相違の解明」は、免疫担当細胞という枠にとどまらず、全ての細胞に応用しうる高い学問的価値を生み出すものである。また本研究によって得られる成果が、臨床の現場に応用され、アレルギー、自己免疫疾患、臓器移植などの諸問題の解決につながるであろうことは、最大限に期待されるべき研究成果の一つである。

3. 研究の方法

我々が、ヘルパーT細胞における ActivinA 産生とその機能について研究を進めた結果、Th2 が高濃度のアクチビンを産生する事が明らかとなった。これは Activin A がアレルギーや抗体産生などの Th2 が担う液性免疫応答に重要な役割を果たしている可能性を示している。本研究では、アレルギー炎症に働く免疫担当細胞に焦点を当て、ActivinA の機能を TGF- β 1 との比較において明らかにする。平成 20 年度には、抗体産生に重要な役割を果たす B 細胞と、抗原提示や炎症に重要な役割を果たすマクロファージを用いて研究を実施する。

(1)腹腔マクロファージに対する ActivinA と TGF- β 1 の作用

3%Thioglycolate (TGC)を腹腔内に投与した BALB/c マウスから、3 日後に腹腔内マクロファージを単離する。これらのマクロファージを LPS および IL-4、IL-13、IFN- γ 、TNF- α などのマクロファージの分化に影響するサイトカインでの存在下で培養して活性化させる。この培養系に ActivinA と TGF- β 1 を添加した際の、走化性 (Migration assay)、NO 産生 (Griess assay)、細胞障害活性 (Cytotoxic assay)、MHC 発現 (FACS)、サイトカインおよびケモカイン分泌 (ELISA)など、マクロファージの重要な機能に及ぼす影響を検討する。

(2)脾臓 B 細胞に対する ActivinA と TGF- β 1 の作用

BALB/c マウスの脾臓から B 細胞を単離し、LPS および IL-4、IL-5、IFN- γ などの免疫グロブリンの分泌やクラススイッチを誘導するサイトカインでの存在下で培養して活性化させる。この培養系に ActivinA と TGF- β 1 を添加した際の、増殖 (BrdU assay, MTT assay)、サイトカイン分泌 (ELISA)、免疫グロブリン

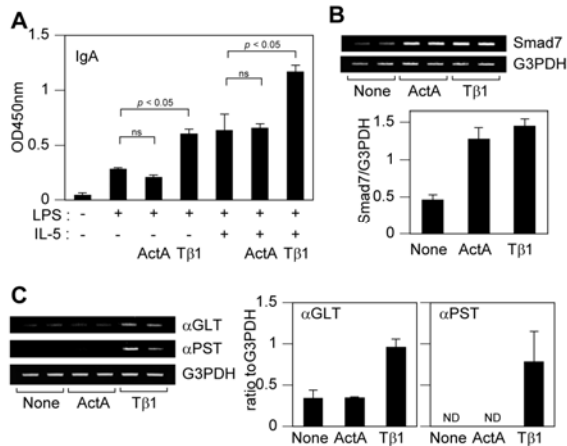
分泌 (ELISA)、クラススイッチ (ELISA, RT-PCR) を検討する。また、ActivinA と TGF- β 1 の B 細胞に対する走化性を検討する(Migration assay)。

4. 研究成果

アクチビンは、細胞の増殖・分化などの調節に働く多機能因子である。我々は、免疫担当細胞におけるアクチビンの作用に着目し、アクチビンが種々の免疫担当細胞の活性化にともなって分泌される事を明らかにして来た。アクチビンは免疫応答に重要な働きをする因子であると考えられ、免疫抑制作用を有する TGF- β とは明確な役割分担をしている可能性が浮き彫りになっている。我々は、獲得免疫と自然応答の双方において重要な役割を果たすマクロファージにおけるアクチビン産生とその機能についての研究を進めた結果、マクロファージが Toll-like receptor-4 (TLR-4)のリガンドである LPS の刺激を受けて活性化するとアクチビンを産生することが明らかとなった。LPS によるアクチビン産生は、mRNA レベルで調節されている。一方、炎症抑制性サイトカインである TGF- β 1 およびその受容体の発現は LPS によって抑制された。我々は、マクロファージの matrix metalloproteinase (MMP)産生に及ぼすアクチビンの効果について検討した結果、LPS 刺激の有無に拘わらず、マクロファージによる MMP-2 の mRNA 発現および活性は、アクチビンによって促進された。MMP-9 発現および活性に対しては、アクチビンの効果は認められなかった。一方、TGF- β は単独で MMP-2 と MMP-9 の産生を刺激するが、LPS によって誘導される MMP-9 の産生は抑制した。つまり、アクチビンと TGF- β の活性は一部重複するものの明らかに異なっており、両因子が炎症に際して機能的な分業をしている可能性が示された。活性化したマクロファージが産生するアクチビンは、パラクラインまたはオートクラインによってマクロファージ自身を含む炎症性細胞に働き、MMP-2 の発現調節を介して、基底膜の分解や細胞の炎症局所への浸潤に働く可能性が示唆された。

ActivinA と TGF- β 1 は、ともに TGF- β ファミリーに属する多機能因子である。両者は類縁の分子ではあるが異なる遺伝子にコードされ、異なる受容体に結合する。しかし、両者のシグナル伝達は同一の分子(Smad2/Smad3)が担うと考えられて来た。我々は、ActivinA と TGF- β 1 が異なる作用を示す組織または細胞が、体内のどこかに存在し、それがこの二つの因子の作用の本質を解明する「鍵」になるであろうと想定した。我々は、我々自身の得た研究結果から、この可能性があるのは免疫担当細胞に違いないとの仮説のもとに研究を進めた結果、抗体を産生し、液性免疫に重要な働きをする B 細胞では ActivinA と TGF- β 1 が明らかに異なる働きをすることを発見した。TGF- β 1 は B 細胞の IgA クラススイッチを誘導し、増殖を抑制するが、ActivinA は IgG の分泌を促進し、増殖を促進

することが明らかになった。



我々の研究成果は、B細胞を用いた研究によって、両因子の細胞内シグナルの違いを解明しうる可能性を明示している。我々は、両因子のB細胞での作用の違いをより詳細に検討した。B細胞における Smad7 の発現は、ActivinA、TGF-β1 の何れの刺激によっても、刺激後 2.5 時間で誘導されることが明らかになった。これは、両因子により Smad2/3 シグナルが活性化したことを示している。一方、IgA 遺伝子 (germline and postswitched a transcripts) の発現は、TGF-β1 では誘導されるが、ActivinA によっては誘導されないことが明らかとなった。これらの結果から、TGF-β と activin のシグナル伝達には、既知の Smad 経路以外の経路が存在し、これが両因子の作用の違いを表す原因となっている可能性が示された。

我々は獲得免疫と自然応答の双方において重要な役割を果たすマクロファージにおけるアクチビン産生とその機能についての研究を進めた。Toll-like receptors (TLRs)は、細菌やウイルスなどの病原微生物に由来する因子を認識し、自然免疫応答に重要な役割を果たす。中でも小胞体に局在する TLR7 は一本鎖 RNA をリガンドとし、RNA ウイルスの感染を感知して活性化するとサイトカインの産生を介して抗ウイルス自然免疫応答を誘導する。本研究の結果、TLR-7 のアゴニストである R848 の刺激を受けて活性化したマクロファージは、アクチビンを産生することが明らかとなった。また、この R848 によるアクチビン産生は、mRNA レベルで調節されている事が示された。次に、R848 刺激後のアクチビン mRNA レベルの経時変化を検討した。I 型インターフェロン(IFN-α, IFN-β)の mRNA が刺激後 1 時間以内に急激に上昇し、4 時間以内には刺激前のレベルに戻るのに対し、アクチビン mRNA がピークに達するまでには約 4~6 時間を要し、その後発現上昇が持続する傾向が見られた。アクチビンと同様の経時変化を示す iNOS の発現誘導は、シク

ロヘキシミド処理によって阻害されたが、アクチビンの発現誘導は完全には阻害されなかった。このことは、TLR7 活性化によるアクチビンの誘導には新規タンパク質合成を必要としない可能性を示唆している。実際に、TLR7 シグナルで活性化される転写因子の NFκB がアクチビンの転写を促進することがレポーターアッセイによって明らかにされた。アクチビンは抗ウイルス免疫応答に重要な働きをする因子であると考えられる。

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)

- ① Ogawa K, Funaba M, Tsujimoto M. The effects of TGF-β1 on the expression type IV collagenases in mouse peritoneal macrophages. *Mol Biol Rep*38: 1451-1456 (2011) 査読有
- ② Murakami M, Kawachi H, Ogawa K, Nishino Y, Funaba M. Receptor expression modulates the specificity of transforming growth factor-β signaling pathways *Genes to Cells* 14: 469-482 (2009) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 小川健司、舟場正幸、吉田稔「マクロファージの抗ウイルス自然免疫応答におけるアクチビンの機能」第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 17 日、帯広畜産大学(帯広)
- ② Ogawa K, Funaba M, Tsujimoto M. NFAT and c-Myc are responsible for Th2-specific expression of activin A. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. November 5th 2009, Cheonju, Korea

〔図書〕(計 1 件)

- ① Ogawa K and Funaba M Academic Press, New York, Activin in humoral immune responses. In: *Activins and Inhibins. Vitamins and Hormones* (Gerald Litwack Ed) Vol 85, 2011, 19pages, pp 237-255

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 健司 (OGAWA KENJI)

独立行政法人理化学研究所・分子リガンド探索研究チーム・専任研究員
50251418

(2)研究分担者

(3)連携研究者