

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461495

研究課題名(和文) サイトカインGIFのGerminal Centerにおける制御の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Cytokine GIF on Germinal Center

研究代表者

西條 美佐 (MISA, SAIJO)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教

研究者番号：10566813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Glycosylation-inhibiting factor (GIF)はCD4 T細胞内で活性化・分泌され、CD4細胞がサイトカインIL-4を分泌するTh2細胞への分化を阻止する分子であることを明らかにしてきた。アレルギーにおいて重要な杯中心(germinal center)においてGIFが濾胞性ヘルパーT細胞への分化・産生とIL-4の分泌を制御し、T細胞依存性抗体IgEの産生を抑制することを明らかにした。GIFのレセプターの候補遺伝子を同定した。我々はさらにGIFにagonisticな抗体を作製し、IL-4の分泌とIgE抗体の産生を阻止するアレルギーの創薬に発展する予定である。

研究成果の概要(英文)：We had so far clarified that glycosylation-inhibiting factor (GIF) secreted from naive CD4 T cells autonomously inhibits the initiation of IL-4 production from CD4 T cells. Now we have detected that GIF suppresses the generation and the cytokine interleukin-4 (IL-4) production of follicular helper T cells (TFH) and consequently suppresses IgE production from B cells in germinal center (GC) by T (cell)-B (cell) interaction. IgE plays a critical role in allergy development. We have also detected some candidates of sequence of GIF receptor. Purification of agonistic antibody to GIF will contribute to the production of new trustworthy medication of allergy by inhibiting production of IL-4 and IgE.

研究分野：免疫学、代謝学、内分泌学、代謝免疫学

キーワード：GIF follicular helper T cell germinal center IgE allergy IL-4

1. 研究開始当初の背景

申請者らはサイトカイン **Glycosylation-inhibiting-factor (GIF)** が CD4 細胞の Th2 への分化を阻止し、さらに B 細胞から T 細胞依存型の IgE 抗体が産生されるのを阻止する他に類をみない機能をもつことを GIF+/+マウスと GIF-/-マウスにアレルギー性気管支喘息を発症させることで見出している。IL-4 産生 CD4 細胞には Th2CD4 細胞の他に Follicular helper CD4 細胞 (以下 TFH) が知られているが、Th2 細胞と TFH 細胞の関連については、不明な点が多い。一方、T 細胞依存性抗体は、胚中心 (germinal center; 以下 GC) で 1. IgE 抗体などへの class switch 2. maturation を経て産生されることが知られているが、これまで明確な作用機序は殆ど知られていなかった。近年、抗体産生には、GC での B 細胞と濾胞特異的な TFH 細胞との相互作用が必須であることが報告されており、蛍光抗体を用いて GC での免疫細胞の相互作用をリアルタイムに可視化することで、抗体産生の機構が明らかになり始めている。申請者はこれまでにアレルギー性気管支喘息発症マウスのモデルにおいて、GIF-/-マウスでは IgE の産生が GIF+/+マウスに較べて著しく高いという研究結果を得ている。以上の学術的背景と我々独自の研究成果より、GIF が CD4 細胞の Th2 分化だけではなく、GC での TFH と GCB 細胞の相互作用をも制御し、抗体産生、アレルギー発症に関与する重要な因子である可能性があると考え、GIF による GC B cell と Follicular helper T cell の相互作用の統御の分子機構とアレルギーの発症の機序について明らかにする構想を得た。

2. 研究の目的

(1) GIF による GC における B, T 細胞相互作用機構、GC B 細胞の分化、TFH 細胞の分化における制御を明らかにし、抗体産生の分子的機

構を解明する。

(2) GIF のレセプターを同定する。

Expression cloning の用法によって GIF のレセプターを同定する。

3. 研究の方法

(1) Germinal Center の細胞の数の検討

GIF+/+, GIF-/-各マウスに Ovalbumin 100ug/IFA を皮下投与し、5 日後に Spleen を摘出、germinal center B cell (IgD low, Fas high, GL7 +, B220+ B cells) の数と、さらに免疫染色によって位置と大きさを検討する。

(2) FACSflow 解析において、IgD low, Fas high, GL7 +, B220+ によって同定した germinal center B 細胞、CXCR5+, CCR7low, CD4+ で同定した TFH 細胞を sorting によって採取し、GC B 細胞の産生、分化に関与する遺伝子、BCL-6, Blimp, GC B 細胞との相互作用において重要な TFH から分泌されるインターロイキン 4 (IL-4) の発現について検討する。

(3) GIF レセプターの cloning

我々は GIF に特異的に結合する monoclonal 抗体 (mAb12) をこれまでに精製している。マウス脾臓由来の resting あるいは activate された B 細胞、T 細胞の cDNA を transduce した cDNA ライブラリーに GIF を添加し、mAb12 に特異的に結合する細胞を FACS staining と sorting によって採取し、sequence を同定する。SiRNA の手法によって、同定した遺伝子が GIF の receptor であることを検討する。

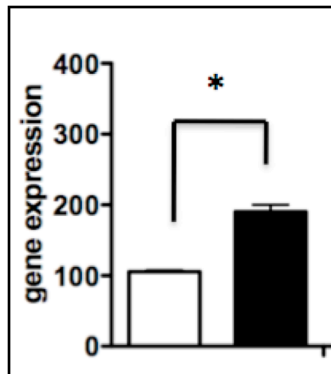
4. 研究成果

(1) Ovalbumin 100ug/IFA を皮下投与し、5 日後に Spleen を摘出し、GC B cell の数を検討したところ、GIF-/-マウスでは GIF+/+マウスと比較して著しくその数が多かった。さらに GC の免疫染色において GIF-/-の GC の形態が GIF+/+の形態と著しく異なっていた。

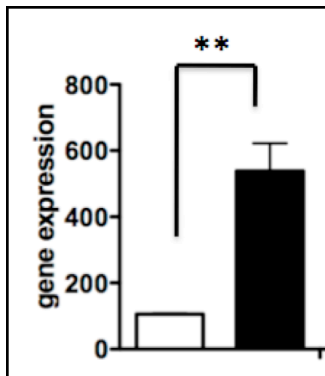
(2) Ovalbumin 100ug/IFA を皮下投与し、5 日後に Spleen を摘出し、GC B cell を sorting し抽出した mRNA を用いて、Bcl-6, Blimp-1 の発現を、sorting した TFH 細胞における IL-4 の発現を検討した。

□ GIF+/+
■ GIF-/-

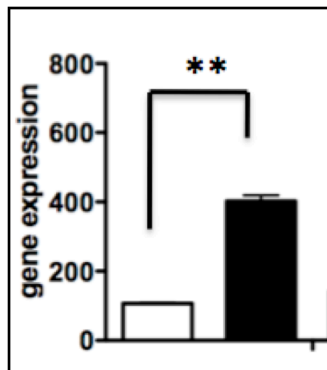
(a) Bcl-6



(b) Blimp-1



(c) IL-4



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
student's *t* test

GIF-/-マウスでは GC B 細胞において Bcl-6(グラフ a), Blimp-1(グラフ b)の発現が GIF+/+ マウスに較べて有意に高く、TFH 細胞においては GIF-/-マウスにおいて IL-4 の発現(グラフ c)が GIF+/+マウスに較べて有意に高いことが明らかになった。

(3) GIF のレセプターの同定

先に述べた方法によって、いくつかの候補遺伝子を得た。現在、siRNA の技法によって候補遺伝子が GIF のレセプターであることを確認している。

以上 GIF が TFH からの IL-4 の分泌を制御することによって GC B 細胞からの IgE 抗体の産生、プラズマ細胞への分化を規制し、アレルギー発症において重要な役割をもつ可能性が示唆された。

今後 GIF レセプターが確認できれば、GIF に対する agonistic な抗体を作製し、TFH からの IL-4 の産生を抑制することで IgE の産生を制御するアレルギー発症を阻止する創薬に発展出来る。

我々は CD4 細胞による IL-4 産生の機構、抗体産生の機序、アレルギー発症の機序における GIF の統御の分子機構的における解析を続けており、アレルギー発症をコントロールする創薬へ研究を繋いでいる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・
特任助教

西條 美佐 (SAIJO Misa)

研究者番号： 50343752

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

名古屋大学・環境医学研究所・教授

菅波 孝祥 (SUGANAMI Takayoshi)

研究者番号： 10566813