慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | B細胞における細胞内シグナル制御因子の生理的機能の解明 |
| Sub Title | Physiological roles of signal transducers and modulators in the regulation of B cell functions |
| Author | 小林, 隆志(Kobayashi, Takashi) |
| Publisher | |
| Publication year | 2011 |
| Jtitle | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2010. ) |
| JaLC DOI | |
| Abstract | B細胞の分化・活性化を制御するCD40やToll様受容体のシグナル伝達を担うTRAF6は、B細胞において個体の適切な液性免疫応答を惹起するのに必要であるばかりでなく、特定のB細胞分化にも必須であることが明らかになった。一方、サイトカインシグナルの制御因子であるSOCS1は、IL-4/STAT6シグナルを抑制し過剰なIgE産生を抑えることで個体のアレルギー感受性を制御していることが明らかになった。 |
| Notes | 研究種目：基盤研究(C)<br><br>研究期間：2008～2010<br><br>課題番号：20590492<br><br>研究分野：免疫学<br><br>科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学 |
| Genre | Research Paper |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20590492seika |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20590492
研究課題名（和文）　Ｂ細胞における細胞内シグナル制御因子の生理的機能の解明

研究課題名（英文）　Physiological roles of signal transducers and modulators in the regulation of B cell functions.

研究代表者
小林　隆志　(KOBAYASHI TAKASHI)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：30380520

研究成果の概要（和文）：B 細胞の分化・活性化を制御する CD40 や Toll 様受容体のシグナル伝達を担う TRAF6 は、B 細胞において個体の適切な液性免疫応答を惹起するのに必要であるばかりでなく、特定の B 細胞分化にも必須であることが明らかになった。一方、サイトカインシグナルの制御因子である SOCS1 は、IL-4/STAT6 シグナルを抑制し過剰な IgE 産生を抑えることで個体のアレルギー感受性を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Physiological roles of signal transducers and modulators in B cells were investigated. It has been clarified that TRAF6, a signal transducer of CD40 and Toll-like receptor family, is necessary for an appropriate humoral immune response and the development of a certain B cell subset. On the other hand, SOCS1, a suppressor of cytokine signaling, regulates the susceptibility to IgE-dependent allergic responses *in vivo* by suppressing IL-4/STAT6 pathway and subsequent IgE production in B cells.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 総　計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：シグナル伝達、B 細胞、抗体、アレルギー

## １．研究開始当初の背景

サイトカインは自然免疫と獲得免疫において重要な役割を果たし、病原菌の排除に必須なばかりでなく、過剰なサイトカインやそのシグナルはアレルギーや炎症性疾患と深い関係がある。

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 および IgE)、いわゆるアイソタイプによって決定される。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（アイソタイプスイッチ）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 NF-κB 経路を介して B 細胞を活性化しアイソタイプ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、アイソタイプ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。さらにサイトカインのシグナルは

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サイトカインであるインターロイキン4(IL-4)は、シグナル伝達分子／転写因子であるSTAT6を介してIgG1およびIgEへのアイソタイプスイッチを誘導する。一方、Th1細胞から産生されるインターフェロンγ（IFNγ）はSTAT1を介してIgG2a（IgG2c）へスイッチを誘導するとされる。さらにTGFβ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かった。

TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)は、CD40やToll様受容体のシグナル伝達を担うアダプター分子であり、研究代表者らによって樹状細胞の活性化と正常な分化に不可欠の分子であることがこれまでに示された。しかし、全身性TRAF6欠損マウスは生後３週間以内に死亡してしまうので、個体における液性免疫応答の長期的解析は困難であり、B細胞におけるTRAF6の生理的役割は不明であった。

一方、SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1)は、インターフェロンやインターロイキンなどのサイトカインシグナル経路（JAK-STAT経路）を抑制する細胞質内分子であり、全身性SOCS1欠損マウスはIFNγに依存する重篤な炎症性疾患を呈し生後３週間以内に死亡する。従って、SOCS1についても長期的な液性免疫応答の解析は困難であり、B細胞におけるSOCS1の機能は不明であった。

## ２．研究の目的

本研究の目的は、CD40やToll様受容体のシグナル伝達を担うアダプター分子TRAF6とサイトカインシグナルの抑制因子SOCS1のB細胞での生理的機能を解明し、病態との関連を明らかにすることである。

## ３．研究の方法

TRAF6およびSOCS1のB細胞での生理的役割を明らかにするため、B細胞特異的ノックアウトマウスを作製し、その表現型を*in vivo*および*in vitro*系で評価し機能解析を行った。B細胞特異的遺伝子欠損マウスの作製は、通常のCre-loxPシステムを用いた。即ち、B細胞特異的プロモーターでCre酵素を発現するCD19Creマウスと、標的遺伝子（TRAF6あるいはSOCS1）をloxPサイトで挟んだゲノム構造を有するFloxマウスを交配することで、B細胞特異的に標的遺伝子を破壊した。

*in vivo*系の評価では、マウスの血清中の各アイソタイプ抗体をELISA法によって測定した。また、マウスを抗原で免疫し、抗原特異的抗体価も同様に解析した。抗原刺激によって誘導される胚中心（Germinal Center）の形成は免疫組織学的解析およびフローサイトメトリー法によって評価した。マウス体内におけるB細胞の分化は、フローサイトメトリー法によって解析した。また、アレルギー感受性を調べるため、皮膚アナフィラキシーモデル、喘息モデルおよび鼻炎モデルを作製した。

*in vitro*系の評価では、B細胞を分離・回収し、サイトカインやToll様受容体リガンド等で刺激し、シグナル伝達経路の活性化をウェスタンブロット法によって評価したり、培養上清中の抗体価やサイトカイン産生をELISA法によって評価したりした。

## ４．研究成果

### （１）B細胞におけるTRAF6の生理的役割

B細胞におけるTRAF6の生理的役割を解明するためB細胞特異的TRAF6欠損マウスを作製した。TRAF6欠損B細胞を抗CD40抗体やToll様受容体リガンドであるLPS、CpG-ODNで刺激した時の細胞増殖は著しく低下していたが、B細胞受容体（BCR）刺激による細胞増殖は正常であった。同様に、細胞内シグナル伝達経路の活性化（Erk, p38, JNK, IkB, Akt のリン酸化）も障害されていた。このことはB細胞の活性化にTRAF6が不可欠であることを示唆する。

B細胞特異的TRAF6欠損マウスの血清中の抗体価をELISA法で解析したところ、IgMおよびIgG2bが有意に低下していた。さらに、T細胞非依存的抗原に対するIgMの産生も有意に低下していた。一方、T細胞依存的抗原反応を調べたところ、胚中心の形成に大きな差は認められなかったものの、抗原特異的IgG1およびIgG2bの産生が著しく低下していた（図1）。また、長期生存型プラズマ細胞が産生するIgG1も低下していた。即ち、TRAF6は、抗原特異的抗体のアイソタイプスイッチや長期生存型プラズマ細胞の誘導に必須の機能を担うことが明らかになった。

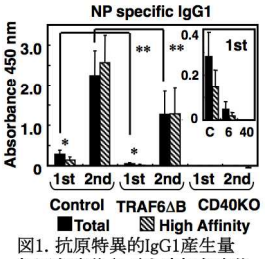


図1. 抗原特異的IgG1産生量
初回免疫後(1st)と追加免疫後(2nd)の抗体価を測定した。
TRAF6ΔB;B細胞特異的TRAF6欠損マウス

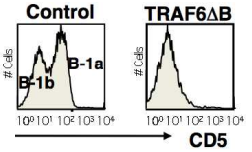


図2. 腹腔内B1細胞の解析
腹腔内CD19陽性、CD11b陽性、CD23陰性B1細胞のCD5の発現を解析した。

さらに、B 細胞特異的 TRAF6 欠損マウスは成熟 B 細胞が減少しており、予想外にも腹腔内の CD5 陽性 B1 細胞（B1-a 細胞）が完全に欠損していた（図 2）。以上の結果から、B 細胞内の TRAF6 は液性免疫応答に重要であるだけでなく、特定の B 細胞分化にも必須であることが初めて明らかになった。

（２）B 細胞における SOCS1 の生理的役割

B 細胞における SOCS1 の生理的役割を解明するため B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスを作製した。B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスの骨髄、脾臓およびリンパ節での B 細胞の成熟分化は正常であった。

SOCS1 欠損 B 細胞を IFNγや IL-4 で刺激した時の細胞内シグナル伝達経路の活性化（STAT1 および STAT6 のリン酸化）は共に亢進していた。このことは、B 細胞で SOCS1 が欠損すると IFNγ/STAT1 シグナル経路と IL-4/STAT6 シグナル経路が共に増強することを示唆する。

B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスの血清中の抗体価を ELISA 法で解析したところ、IgG1, IgG2c および IgE のレベルが有意に上昇することを見いだした。IgG1 および IgE の産生亢進は、培養系において B 細胞を抗 CD40 抗体＋IL-4 共刺激することでも認められ、また、これらの表現型は STAT6 欠損マウスとのかけ合わせによって正常化した。一方、IgG2c の産生亢進は、CD40 抗体＋IFNγ共刺激した培養 B 細胞でも認められ、STAT1 欠損マウスとのかけ合わせによって正常化した。従って、SOCS1 欠損による IgG1 および IgE の産生亢進は、過剰な IL-4/STAT6 シグナルによるものであり、IgG2c の産生亢進は、過剰な IFNγ/STAT1 シグナルによるものであることが示唆された。

B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスを各種抗原で免疫し抗原特異的抗体産生を調べたところ、Th1 応答を優位に惹起する CFA をアジュバントに用いた場合、抗原特異的 IgG2c がわずかに上昇したが、その他のアイソタイプの産生量は野生型マウスと同程度であった。一方、Th2 応答を優位に惹起する Alum をアジュバントとした場合、抗原特異的 IgE の産生が劇的に上昇した（図 3）。

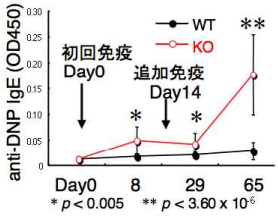

図3. 抗原特異的IgE産生量
WT;野生型, KO; B細胞特異的SOCS1欠損マウス

さらに、B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスのアレルギー感受性を調べるためにアレルギーモデルを作製し検討した。皮膚アナフィラキシーモデル（Active Cutaneous anaphylaxis（ACA）モデル）実験では、抗原刺激による血管透過性の亢進が B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスで認められた。また、気道炎症モデル（喘息モデル）実験を試みたところ、肺胞洗浄液中の好酸球の浸潤が B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスで有意に亢進していた。さらに、鼻炎モデルにおいても鼻粘膜中の細胞浸潤やくしゃみの増加が変異マウスで認められた。従って、B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスはアレルギー高感受性であることが示唆された。以上の結果から、B 細胞において SOCS1 は、IL-4/STAT6 シグナルを抑制し過剰な IgE 産生を抑えることでアレルギー感受性を制御していることが明らかとなった。

（３）まとめ

本研究において研究代表者が作製した B 細胞特異的遺伝子欠損マウスを用いることで、これまで液性免疫応答の長期解析が困難であった B 細胞における TRAF6 と SOCS1 の生理的機能および病態学的機能が初めて明らかになった。国際的にも、このようなアプローチで B 細胞における TRAF6 と SOCS1 の機能解析を行った報告はなく新規性が高い研究である。また、TRAF6 が B 細胞の活性化と分化に重要であること、SOCS1 が IgE 産生とアレルギー感受性の制御に重要であることの発見は、今後、感染症やアレルギーなどのヒト疾患の新たな制御法の確立に貢献することが期待される。

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 17 件）

① 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】

② Kobayashi T, Kim TS, Jacob A, Walsh MC, Kadono Y, Fuentes-Pananá E, Yoshioka T, Yoshimura A, Yamamoto M, Kaisho T, Akira S, Monroe JG, Choi Y. TRAF6 is required for generation of the B-1a B cell compartment as well as T cell-dependent and -independent humoral immune responses. **PLoS ONE**.;4(3):e4736. (2009) 【査読有り】

③ Koga K, Takaesu G, Yoshida R, Nakaya M, Kobayashi T, Kinjyo I, Yoshimura A. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. **Immunity** 30(3): 372-383 (2009) 【査読有り】

④ Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, Okamoto F, Yoshioka T, Choi Y, Akira S, Kawai T, Yoshimura A, Kobayashi T. TRAF6 and MEKK1 Play a Pivotal Role in the RIG-I-like Helicase Antiviral Pathway. **J Biol Chem**. 283(52): 36211-36220. (2008) 【査読有り】

⑤ Sanada T, Takaesu G, Mashima R, Yoshida R, Kobayashi T, Yoshimura A. FLN29 deficiency reveals its negative regulatory role in the Toll-like receptor (TLR) and retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicase signaling pathway. **J Biol Chem**. 283(49): 33858-33864. (2008) 【査読有り】

⑥ Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, Chinen T, Saeki K, Nakaya M, Takaesu G, Hori S, Yoshimura A, Kobayashi T. Foxp3 inhibits RORgamma t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgamma t. **J Biol Chem**. 283(25): 17003-17008. (2008) 【査読有り】

⑦ Takaki H, Ichiyama K, Koga K, Chinen T, Takaesu G, Sugiyama Y, Kato S, Yoshimura A, Kobayashi T. STAT6 inhibits TGF-beta 1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. **J Biol Chem**. 283(22): 14955-14962. (2008) 【査読有り】

⑧ King CG, Buckler JL, Kobayashi T, Hannah JR, Bassett G, Kim T, Pearce EL, Kim GG, Turka LA, Choi Y. Cutting edge: requirement for TRAF6 in the induction of T cell anergy. **J Immunol**. 180(1): 34-38 (2008) 【査読有り】

〔学会発表〕（計 13 件）

① Takashi Kobayashi, Yuko Matsunaga, Miyuri Kawasumi, Satoru Fukuyama, Hiromasa Inoue, Akihiko Yoshimura. Loss of SOCS1 in B cells results in hyper IgE syndrome (HIES) and predisposes to allergy in mice. 14th International Congress of Immunology, August 27 2010, Kobe, Japan

② 小林隆志、松永悠子、川澄みゆり、福山聡、井上博雅、吉村昭彦：B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウスにみられる高 IgE 血症とアレルギー病態の解析.：第３９回日本免疫学会総会・学術集会.2009 年 12 月 4 日、大阪国際会議場（大阪）

③ 小林　隆志：RNA ウイルス応答シグナルにおける TRAF6 および関連分子の役割．第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会．2009 年 6 月 26 日、京都

④ Takashi Kobayashi, Anand Jacob, Tae Soo Kim, Miyuri Kawasumi, Akihiko Yoshimura, Masahiro Yamamoto, Tsuneyasu Kaisho, Shizuo Akira, Yongwon Choi. TRAF6 Is Required for Generation of the B-1a B Cell Compartment as well as T Cell-Dependent and-Independent Humoral Immune Responses. The 1st international Kishimoto foundation symposium, Immune Regulation: Present and Future, May 25 2009, Osaka, Japan

⑤ Ryoko Yoshida, Akihiko Yoshimura and Takashi Kobayashi. TRAF6 and MEKK1 Play Pivotal Roles in the RIG-like Helicase/IPS-1 Antiviral Pathway. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 9 2008, Awaji, Japan.

〔図書〕（計 6 件）

① 永淵正法，塚本 浩，新納宏昭，小林隆志：秀潤社，自己免疫疾患と炎症，細胞工学 29（8）：769 -776，(2010)

② 小林隆志、川澄みゆり、濱野真二郎．医薬ジャーナル社，感染症制御における制御性 T 細胞.アレルギー・免疫 vol.16 (5)：708 -714．(2009)

③ 知念孝敏、金城市子、吉村昭彦、小林隆志．科学評論社,TGF -β , IL -10 を産生する抑制性ヘルパーT 細胞の 誘 導 と STAT3/SOCS3 による制御．臨床免疫・アレルギー科 vol.50(2)：238 -246.(2008)

④ 吉村昭彦、知念孝敏、市山健司、小林隆志．秀潤社，サイトカインによる Th17 と iTreg の分化制御．細胞工学 vol.27(2)：137 -143.(2008)

〔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

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

小林　隆志（KOBAYASHI TAKASHI）

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：３０３８０５２０

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし