

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09532

研究課題名(和文) 脱リン酸化調節分子G5PRによる自己抗体産生細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of phosphatase regulatory subunit G5PR in the differentiation of autoantibody producing cells from B1 cells

研究代表者

北畠 正大 (Masahiro, Kitabatake)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60457588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：全身性自己免疫疾患では、IgG型の高親和性自己抗体が産生されて組織障害を引き起こすが、どのような機序によって誘導されるかは明らかになっていない。本研究では、自己免疫疾患モデルマウスにおいて、自己抗体産生細胞の前駆細胞と考えられているB1細胞が二次リンパ組織の胚中心に移行し、IgGへのクラススイッチや形質細胞への分化を引き起こすことを明らかにした。また、濾胞樹状細胞や濾胞ヘルパーT細胞からの刺激に加え、TLRリガンドやサイトカイン刺激がG5PRの発現を増強し、JNK活性を抑制することによってB1細胞から自己抗体産生細胞への分化が促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Self-reactive IgG autoantibodies are hallmark of autoimmune diseases, and often cause tissue damage. Although B1 cells, which naturally produce self-reactive IgM, are thought to be the precursor cells of IgG autoantibody-secreting cells in autoimmune diseases, the underlying mechanisms of differentiation process remain poorly understood. Here, we showed that activated B1 cells from autoimmune-prone mice migrated into germinal center of secondary lymphoid organ and then underwent a process of class switch recombination to IgG and differentiation into antibody-producing plasma cells. In addition, stimulation of TLR ligand and various cytokines in the germinal center like environment induced G5PR expression in B1 cells, leading to JNK suppression and plasma cell differentiation. These results suggest that regulation of G5PR/JNK pathway might be a potential therapeutic target for autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：自己抗体 G5PR JNK 形質細胞分化 胚中心

## 1. 研究開始当初の背景

生体に備わっている免疫系は自己と非自己を識別することができ、通常、非自己である外来性の抗原が侵入してきた時には排除するが、自己の抗原に対しては免疫応答を引き起こさない。しかし、自己に対する免疫寛容が破綻すると自己に対する免疫応答が誘導され、自己免疫疾患を発症する。全身性エリテマトーデス (SLE) に代表される全身性自己免疫疾患では IgG 型の高親和性自己抗体が産生され、組織障害を引き起こすことが知られている。一方、健常人においては IgM 型の低親和性自己抗体が検出されるが、疾患を発症しない。このことから、IgM 型の低親和性自己抗体産生 B 細胞が活性化・異常増殖し、IgG 型の高親和性自己抗体を産生する細胞へと分化することが疾患発症のトリガーであると考えられる。しかし、その過程は十分に解明されていない。

B 細胞は、胎児期の肝臓で発生し、CD5 を発現する B1 細胞と、骨髄で分化する通常の B 細胞 (B2) に大別される。B1 細胞は B2 細胞とは異なる分化系列に由来し、マウスでは主に腹腔・胸腔中に存在し、自己増殖している。B1 細胞の抗原受容体のレパートリーは限定されており、微生物の感染に対して低親和性の IgM 型抗体を早期に産生し、感染防御に寄与する。その一方、自己と交差反応性を示す抗体を自然産生することが知られている。SLE 自然発症モデル New Zealand Black/New Zealand White F1 (BWF1) マウスでは B1 細胞が異常増殖すること、B1 細胞を除去することにより自己抗体の産生が低下し、症状が軽減することが示されている (Int.Immunol.1995.7:877)。また、SLE 患者や関節リウマチ患者においても B1 細胞 (CD5 陽性 B 細胞) の増加が認められている。これらは、B1 細胞の異常増殖が自己免疫疾患発症の原因であることを示唆する。

B1 細胞の異常増殖を引き起こす原因としては、抗原受容体 (BCR) シグナル伝達の異常が挙げられる。BCR への抗原の結合は B 細胞の活性化、細胞増殖と同時に細胞死を誘導する。これらのシグナルを正に制御する分子 CD19 の過剰発現マウス、負に制御する分子 Lyn、CD22、CD72 の欠損マウスは B1 細胞の異常増殖を引き起こし、自己免疫疾患を発症することが示されている (Annu.Rev.Immunol.2002.20:253)。BCR シグナル伝達の下流はタンパク質リン酸化-脱リン酸化により制御されている。セリン・スレオニン脱リン酸化酵素 PP2A はリン酸化カスケードを負に制御するが、その標的分子は結合する調節サブユニットによって決定される。申請者らの研究グループは PP2A と結合し、その機能を制御する調節サブユニットとして G5PR を同定している (GenesCells.2002.7:821)。G5PR は様々な細胞で恒常的に発現するが、特に抗原刺激された B 細胞で発現が上昇し (BBRC.2006.340:338)、胚中心 B 細胞に強く

発現する。G5PR 欠損 B 細胞は抗原刺激による JNK および Bim のリン酸化が亢進して細胞死が増加し、G5PR の過剰発現は細胞死を抑制することが示されている (J.Exp.Med.2005.202:707)。これらの結果は、G5PR が抗原受容体シグナルを調節することを示し、G5PR の発現変化は自己反応性 B 細胞クローンの排除に影響を与えることを示唆する。申請者は自然発症型の自己免疫疾患モデルマウス New Zealand Black マウスの腹腔 B1 細胞で G5PR が高発現していたことから、C57BL/6 マウス背景で G5PR 過剰発現 (G5PR<sup>Tg</sup>) マウスを作製した。このマウスは加齢により腹腔 B1 細胞が増加し、抗 DNA 抗体、抗核抗体といった自己抗体の産生、腎系球体に免疫複合体の沈着が認められた。このことは G5PR<sup>Tg</sup> マウスが新規の自然発症型自己免疫疾患モデルであることを示す (Kitabatake *et al.*, J.Immunol. 2012)。G5PR<sup>Tg</sup> マウスの B1 細胞は BCR 刺激による JNK、Bim の活性化が低下しており、BCR 誘導性細胞死が低下していた。また、G5PR<sup>Tg</sup> マウス由来の B1 細胞を胚中心様環境で刺激 (iGB 培養) した結果、IgG1 へのクラススイッチや形質細胞への分化が誘導され、IgG 型の抗 DNA 抗体を産生することが明らかとなった (Kitabatake *et al.*, J.Immunol.2015)。これらの結果は、G5PR が抗原受容体シグナル伝達の調節を介して自己反応性 B1 細胞の排除を制御しているだけでなく、B1 細胞におけるクラススイッチや自己抗体産生細胞への分化をも制御することで、自己抗体産生ならびに疾患発症を制御していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、自己免疫疾患発症時に活性化・分化した B1 細胞から IgG 型の高親和性自己抗体が産生されるという仮説をもとに、B1 細胞の IgG 型自己抗体産生細胞への分化を制御する刺激、シグナル伝達経路、場を明らかにすることで、疾患発症時の自己抗体産生の分子メカニズムを明らかにし、新規疾患治療戦略確立への基礎とすることを目的とする。具体的には以下の 2 点を明らかにする。

- (1) 自己免疫疾患モデルマウスの B1 細胞の活性化、クラススイッチ、形質細胞分化ならびに自己抗体産生を誘導する刺激やシグナル伝達経路の解析から、B1 細胞が IgG 型の高親和性自己抗体産生細胞へと分化する分子メカニズムを明らかにする。
- (2) 活性化した B1 細胞を自己免疫疾患モデルマウスへと移入することで、生体内での B1 細胞の動態とクラススイッチならびに自己抗体産生細胞への分化の場を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 自己反応性 B1 細胞の IgG 型自己抗体産生細胞分化の誘導機構の解析

自己免疫疾患モデル BWF1 マウスおよび C57BL/6 (B6) マウスの腹腔から B1 細胞 (CD5+CD11b+B220+細胞) を、脾臓から B2 細胞 (CD5-B220+細胞) をセルソーターによりそれぞれ分離し、胚中心様環境 (iGB 培養) で 4 日間または 7 日間培養した。活性化 B1 細胞の IgG へのクラススイッチ、形質細胞分化、JNK のリン酸化をフローサイトメトリーにより、抗 DNA 抗体産生を ELISA により、遺伝子発現は定量性 PCR により解析した。また、培養中に TLR リガンド、サイトカイン、JNK 阻害剤 (SP600125) または抗原受容体刺激 (anti-IgM F(ab)<sup>2</sup>) を加え、その影響を解析した。

#### (2) 活性化 B1 細胞の生体内動態とクラススイッチおよび形質細胞分化の場の同定

若齢の BWF1 マウス(雌、2 ヶ月齢)の腹腔から B1 細胞 (CD5+CD11b+B220+細胞) をソーティングにより分離した。胚中心環境 (iGB 培養) で 3 日間活性化させた後に細胞を回収し、IgG1-CD138-細胞分画をソーティングにより分離した。5 × 10<sup>6</sup> 個の細胞を CFSE でラベルし、加齢 BWF1 マウス (雌、8-10 ヶ月齢) に尾静脈より移入した。移入 2 日後の脾臓の細胞をフローサイトメトリーならびに免疫組織化学染色により解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 自己反応性 B1 細胞の IgG 型自己抗体産生細胞分化の誘導機構

B1 細胞が IgG 型の高親和性自己抗体産生細胞へと分化する過程には、AID が引き起こす体細胞突然変異とクラススイッチ、ならびに形質細胞分化が必要である。B 細胞が効率的に体細胞突然変異、クラススイッチを起こす場としては胚中心が知られており、北村らによって開発された胚中心様環境培養 (CD40L と BAFF を発現する feeder 細胞を用いて IL-4/IL-21 存在下での培養; iGB 培養) は高率に B 細胞のクラススイッチや形質細胞分化を誘導することができる (Nat. Commun.2011.2:465)。申請者は iGB 培養を用いて B1 細胞も IgG へのクラススイッチと形質細胞分化を起こすことができることをすでに確認している。そこで、自己免疫疾患モデル BWF1 マウスの B1 細胞を iGB 培養することで、自己抗体産生細胞への分化を解析した。

BWF1 マウスの B1 細胞は、B2 細胞や B6 マウス由来の B1 細胞と比較して、iGB 培養による形質細胞への分化が亢進しており、IgM 型と IgG 型の双方の自己抗体を大量に

産生した。また、BWF1 マウスの B1 細胞は未刺激時から他の細胞よりも G5PR を高発現していたが、iGB 培養によって G5PR の発現はさらに上昇し、JNK の活性化を低下させた。そこで、JNK の活性化低下と形質細胞分化の関連性を検証するために、B6 マウス由来の B1 細胞を JNK 阻害剤存在下で iGB 培養した。その結果、JNK 抑制により形質細胞への分化が促進されることが明らかとなった。これは、G5PR による JNK 抑制が B1 細胞の自己抗体産生細胞への分化を促進させることを示唆する。また、TLR リガンドや I 型 IFN による刺激は G5PR の発現を誘導すること、TLR リガンドや IL-5 による刺激は形質細胞分化を促進することが明らかとなった。一方、抗原受容体刺激は IgG へのクラススイッチ、形質細胞分化には影響しなかった。

これらの結果より、自己反応性 B1 細胞は胚中心環境による活性化時に、TLR リガンドやサイトカイン刺激を受けることで、G5PR の発現が上昇し、JNK の活性化が抑制され、自己抗体産生細胞へと分化することが示唆された (図 1)。

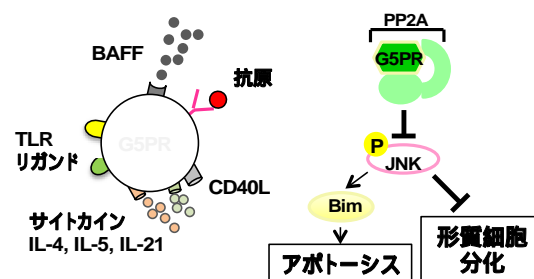


図1 B1細胞から自己抗体産生細胞への分化におけるG5PRの発現誘導とその機能

#### (2) 活性化 B1 細胞の生体内動態とクラススイッチおよび形質細胞分化の場

自己反応性の B1 細胞が成体のどこで活性化して、分化やクラススイッチを起こすのかを調べるために、自己免疫疾患を発症しているマウスへ活性化 B1 細胞の移入実験を行った。若齢の BWF1 マウスの腹腔から B1 細胞をソーティングにより分離し、iGB 培養によって活性化させた後、ソーティングにより IgG へクラススイッチした細胞と形質細胞に分化した細胞を除いた。この細胞集団を CFSE で蛍光ラベルし、加齢した BWF1 マウスに移入した。加齢 BWF1 マウスは IgM 型および IgG 型の自己抗体を産生しており、脾臓に胚中心を自然形成している。移入 2 日後の脾臓における移入細胞の分化およびその場をフローサイトメトリーならびに免疫組織化学染色により解析した。

フローサイトメトリーの解析結果から、移入した細胞は脾臓で検出され、一部が IgG1 陽性細胞または CD138 陽性細胞へと分化し

ていることが確認された。また、免疫組織化学染色の解析から、移入した細胞は脾臓の濾胞内胚中心領域、マントル領域、濾胞外に認められた。胚中心に認められた細胞の一部はIgG1を発現していた。このことは、胚中心へ移行したB1細胞は、そこでさらなる刺激を受けてIgMからIgG1へとクラススイッチしたことを示唆する。胚中心でのB細胞の活性化、クラススイッチや高親和性抗体産生細胞の選択には、濾胞樹状細胞によって提示される抗原からのシグナルが重要であると考えられているが、加齢BWF1マウスにおいて自然形成される胚中心は、どのような抗原によって誘導されるかは明らかになっていない。今回移入した活性化B1細胞はポリクローナルであることから、B1細胞のクラススイッチは抗原非特異的な刺激によるものと推察される。また、濾胞外領域内には、CD138を発現する移入細胞が認められ、濾胞外領域でのB1細胞から形質細胞への分化が示唆された。しかしながら、本実験では移入した細胞中にIgG1とCD138の共陽性細胞は検出できなかった。IgMからIgG1へとクラススイッチしたB1細胞が、最終的に形質細胞へと分化し、長期生存型形質細胞として骨髄へと移行し、自己抗体を産生し続けるかはさらなる検証が必要である。

これらの結果より、活性化した自己反応性B1細胞は二次リンパ組織へと移行し、胚中心でIgGへのクラススイッチと抗原受容体の親和性成熟を引き起こし、形質細胞へと分化することが可能であることが示唆された(図2)。

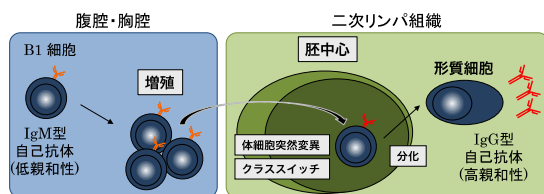


図2 自己反応性B1細胞の活性化・分化と胚中心

(3) 本研究において得られた成果の国内外における位置付け

B1細胞は1980年代に発見された後、国内外の研究者により精力的に解析され、自己免疫疾患における自己抗体産生細胞の前駆細胞と考えられてきた(J.Exp.Med.1983.157:202, Science.1987.236:81, Immunol.Rev.1986.94:53, Immunol.Rev.2000.175:70)。しかし、B1細胞の自己抗体産生細胞への分化過程や動態を解析することは困難であったため、その分子メカニズムや生体内での場合は明らかとなっていなかった。本研究では、胚中心様環境iGB培養系を用いることで、自己反応性B1細胞が二次リンパ組織の胚中心でIgGへのクラススイッチを引き起こすこと、活性化時にTLRリガンドやサ

イトカインの刺激によってG5PRの発現を誘導し、JNK活性を抑制することで抗体産生細胞への分化を促進することを明らかにしたものである。この成果はこれまでの仮説を裏付けるものであり、自己免疫疾患発症のメカニズムを理解する上で重要な知見だと考える。

#### (4) 今後の展望

本研究では、自然発症型自己免疫疾患モデルマウスを用いて、B1細胞が胚中心環境下でG5PRの誘導を介してJNK活性を抑制し、IgG型の自己抗体産生細胞へと分化することを示した。一方、B1細胞が最初に活性化を引き起こす機序については明らかにできず、さらに研究を進めていく必要である。また、SLEなどの自己免疫疾患の患者において、実際にB1細胞がクラススイッチを引き起こしてIgG型の自己抗体を産生しているか、この過程がG5PR/JNKによって制御されているかについてもさらなる検証が必要である。しかし、G5PRの過剰発現は抗体産生細胞への分化だけでなく、自己反応性B細胞の細胞死も抑制することから、G5PRの発現を抑制することで、自己抗体産生を制御できる可能性がある。これらの点を明らかにすることで、自己免疫疾患発症の機序の理解が進み、新たな治療戦略の確立へと進むことが期待できる。

#### 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3件)

(1) Matsumura Y, Kitabatake M, Ouji-Sageshima N, Yasui S, Mochida N, Nakano R, Kasahara K, Tomoda K, Yano H, Kayano SI, Ito T. Persimmon-derived tannin has bacteriostatic and anti-inflammatory activity in a murine model of Mycobacterium avium complex (MAC) disease. PLoS One. 12:e0183489. (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0183489. eCollection 2017.

(2) Kai Y, Tomoda K, Yoneyama H, Kitabatake M, Nakamura A, Ito T, Yoshikawa M, Kimura H. Silencing of Carbohydrate Sulfotransferase 15 Hinders Murine Pulmonary Fibrosis Development. Mol Ther Nucleic Acids. 17:163-172. (2017). doi: 10.1016/j.omtn.2016.12.008.

(3) Yasui F, Itoh Y, Ikejiri A, Kitabatake M, Sakaguchi N, Munekata K, Shichinohe S, Hayashi Y, Ishigaki H, Nakayama M, Sakoda Y, Kida H, Ogasawara K, Kohara M. Sensitization with vaccinia virus

encoding H5N1 hemagglutinin restores immune potential against H5N1 influenza virus. *Sci Rep.* 6:37915. (2016). doi: 10.1038/srep37915.

〔学会発表〕(計6件)

(1) Kitabatake M, Konishi M, Matsumura Y, Uji-Sageshima N, Imakita N, Ito T. CD8+ T cells play a critical role for the murine model of immune reconstitution inflammatory syndrome. 第46回日本免疫学会総会・学術集会. 2017年

(2) Kitabatake M, Konishi M, Matsumura Y, Uji-Sageshima N, Imakita N, Ito T. Critical role of interferon secreted CD8+ T cells in *Mycobacterium avium* complex infection in immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) model. *Cytokine* 2017. 2017年

(3) Kitabatake M, Tomoda K, Kubo K, Ito T. Cigarette smoke attenuated colon inflammation in ulcerative colitis model. *Immunology* 2017. 2017年

(4) 北島正大、B細胞の異常活性化と自己免疫疾患、第9回奈良県立医科大学基礎医学教育協議会合同講演会. 2016年

(5) Kitabatake M, Konishi M, Matsumura Y, Uji-Sageshima N, Imakita N, Ito T. Establishment of immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) model and critical role of CD8+ T cells. 第45回日本免疫学会総会・学術集会. 2016年

(6) Ikejiri A, Yasui F, Itoh Y, Kitabatake M, Sakaguchi N, Ogasawara K, Kohara M. Highly pathogenic avian influenza A H5N1 virus causes severe symptoms due to insufficient interaction of dendritic cells with T cells. 第44回日本免疫学会総会・学術集会. 2015年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北島 正大 (KITABATAKE, Masahiro)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60457588