

令和元年6月11日現在

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08221

研究課題名(和文) ネフロネクチンによる制御性B細胞分化抑制機序の解明と新規自己免疫疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for regulatory B cell differentiation by nephronectin and establishment of a novel therapeutic strategy for autoimmune diseases

研究代表者

今重之(KON, Shigeyuki)

福山大学・薬学部・教授

研究者番号：90344499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外基質ネフロネクチン(Npnt)のカルシウム結合能が免疫抑制性B細胞である制御性B細胞分化を介して自己免疫疾患抑制に関与することを明らかにする目的で実験を進めた。種々のNpnt欠損変異体を作製し、カルシウム結合領域をカルシウムの放射性同位体を用いて検討した結果、Npntの細胞接着配列であるRGDモチーフを含むLink領域に存在することを明らかにし、その領域に対する抗体を作製した。当該抗体を自己免疫疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルEAE投与した結果、自己免疫疾患抑制能を有さないことがわかった。本研究から、Npntのカルシウム結合能は自己免疫疾患には影響しないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制機能を有するB細胞である制御性B細胞(Breg)は、自己免疫疾患との関与が推察されているが、その分化メカニズムの多くは不明である。当研究室では、細胞外基質ネフロネクチン(Npnt)研究からNpntがCa結合タンパク質であること、自己免疫疾患増悪化に関与すること、Breg分化を抑制する機能を有することを見出していることから、NpntのCa結合能のBreg分化への関与を予想し、NpntのCa結合領域を同定した。NpntのCa結合領域に対する抗体を作製し、Breg分化や自己免疫疾患抑制効果を検討した結果、NpntのCa結合能はBreg分化には影響与えないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：We found that nephronectin (Npnt), which is an extracellular matrix, is involved in autoimmune diseases, and inhibits regulatory B cell (Breg) differentiation. We also found that Npnt is a calcium-binding protein. It has reported that calcium signaling is important for Breg differentiation. Therefore, we asked whether calcium-binding ability of Npnt is involved in the autoimmune diseases via inhibition of Breg differentiation. To identify the calcium-binding site of Npnt, radioactive isotope of calcium was used. Then, we identified the site in Link region. An antibody against calcium-binding region of Npnt was generated by immunization of the synthetic peptide and injected into experimental autoimmune encephalitis (EAE) model. EAE score examination revealed that there is no difference between anti-calcium-binding region of Npnt antibody and control antibody. These data suggest that calcium-binding ability of Npnt is not involved in the autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：ネフロネクチン 制御性B細胞 カルシウム結合 自己免疫疾患

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抑制性免疫細胞は、自己免疫疾患やがん治療に結びつくことから、抑制性免疫細胞の分化制御機序を解明することは重要である。免疫抑制能を有する制御性 T 細胞は、分化誘導させることで免疫系を抑制させ、自己免疫疾患を抑制する一方で、制御性 T 細胞の分化抑制は、免疫系を活性化させ、抗がん作用を発揮する<sup>①②</sup>。実際に、制御性 T 細胞に発現するケモカイン受容体である CCR4 の抗体は制御性 T 細胞機能を抑制することで抗腫瘍免疫を亢進させ、リンパ腫を治療できる画期的な抗体医薬となっている<sup>③</sup>。しかしながら、免疫抑制能を有する制御性 B 細胞に関しては、自己免疫疾患抑制に重要な細胞として注目されているものの<sup>④</sup>、特異的な分化制御機構が不明であることから医薬開発の動向は見られていない。

申請者が着目している Npnt は、 $\alpha 8 \beta 1$  インテグリンを生理的受容体として腎臓発生に関与する細胞外基質である。申請者らは独自に開発した Npnt のサンドイッチ ELISA 定量系を用いることで Npnt がマウス自己免疫疾患モデル血中で発現亢進すること、Npnt に対するポリクローナル抗体がマウス自己免疫疾患モデルの増悪化を抑制できることから、Npnt は自己免疫疾患増悪化能を有することを明らかにした。Npnt の生理的受容体である  $\alpha 8 \beta 1$  インテグリンに対する中和抗体を新たに作製して検討したが、予想外に  $\alpha 8 \beta 1$  インテグリンは自己免疫疾患に関与しないことから、Npnt は  $\alpha 8 \beta 1$  インテグリンを介さない新たな機序により自己免疫疾患を増悪化させることが判明した。

免疫系細胞における Npnt 発現様式を解析した結果、Npnt は B 細胞活性化に伴い発現することを見出し、Npnt は B 細胞活性化に伴い出現する一部の細胞集団である制御性 B 細胞 (免疫抑制性サイトカイン IL-10 を産生する B 細胞) の分化を抑制する可能性を明らかにした。すなわち、Npnt が制御性 B 細胞分化を抑制 (=免疫系を活性化) させることで自己免疫疾患を増悪化させるという新規機序を推察した。

Npnt による制御性 B 細胞分化抑制機序として以下の 2 つの可能性を考えた。

1. B 細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入増大が IL-10 産生 B 細胞 (=制御性 B 細胞) 分化を亢進させる結果が報告されている<sup>⑤</sup>。我々は Npnt が  $\text{Ca}^{2+}$  との結合能を有し、さらに Npnt 添加により B 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  流入を抑制できることを明らかにしている。これらのことから、B 細胞活性化に伴い発現増強する Npnt が、局所の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を減少させ、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入を抑制させることで制御性 B 細胞分化を抑制する可能性がある。

2. 新たな Npnt 結合分子が制御性 B 細胞分化を抑制する可能性もある。

### 2. 研究の目的

本研究では、Npnt による自己免疫疾患増悪化機構は、 $\text{Ca}^{2+}$  結合を介するのか、新規 Npnt 結合分子を介するのかを明らかにし、それらが制御性 B 細胞分化に影響を与えるのかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Npnt とその変異体タンパク質の精製

pM-secSUMOstar ベクター (LifeSensors Inc.) は、N 末に His タグが付加された状態で目的タンパク質と SUMO との融合タンパク質として哺乳類細胞に発現させることができるベクターである。Npnt とその変異体遺伝子は、それぞれ pM-secSUMOstar ベクターに導入し 293 細胞に遺伝子導入後、無血清培養上清をコバルト固定化金属アフィニティクロマトグラフィ (IMAC) レジンである TALON ビーズ (Takara) を用いて精製した。

#### (2) $\text{Ca}^{2+}$ オーバーレイアッセイ

Npnt の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位は、 $\text{Ca}^{2+}$  オーバーレイアッセイにて行った。種々の Npnt 変異体を SDS-PAGE で泳動後、PVDF 膜に転写し、 $\text{Ca}^{2+}$  の放射性同位体である  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) で 10 分間反応させ、画像はスキャナタイプ画像解析装置 (Amersham Typhoon scanner) にて検出した。

#### (3) 質量分析

Npnt 結合分子同定は、野生型 Npnt 精製タンパク質を質量分析 LC-MS/MS で解析することで同定した。

#### (4) $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位に対する抗体

$\text{Ca}^{2+}$  結合部位に対する抗体は、 $\text{Ca}^{2+}$  結合部位のペプチドを合成し、キャリアタンパク質として KLH に合成ペプチドを導入後ウサギに免疫して抗血清を得た。抗原として使用した合成ペプチドをビーズに結合させたカラムを用いて、抗血清から精製タンパク質を得た。

#### (5) 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) モデル

EAE モデルは、C57BL/6 マウスに MOG ペプチドと Complete Freund Adjuvant とのエマルジョンを尾根部に免疫し、百日咳毒素を MOG ペプチド免疫日と 2 日後に静脈内投与により発症させた。抗体は、MOG ペプチド免疫日の 1 日前と 2 日後に 400  $\mu$ g/匹を腹腔内投与した。EAE の麻痺を指標とした EAE スコアは、以下の通り行った。0. 症状無し、1. 尾の麻痺、2. 運動失調、3. 後肢の軽麻痺、4. 後肢の麻痺、5. 四肢麻痺。

#### 4. 研究成果

##### (1) Npnt の $Ca^{2+}$ 結合部位の同定

Npnt の  $Ca^{2+}$  結合部位は、 $Ca^{2+}$  オーバーレイアッセイにて検討した。Npnt は、EGF-like repeats、Linker segment、そして MAM domain から構成される分子であることから、それらの領域のみからなる Npnt 変異体タンパク質を精製し、 $Ca^{2+}$  結合能の検討を行った。その結果、Link 領域内に  $Ca^{2+}$  結合部位が存在することを明らかにした (図 1)。その後、Link 領域をさらに短くした変異体を作製することで、44 アミノ酸からなる Npnt の  $Ca^{2+}$  結合部位を明らかにした。Npnt の  $Ca^{2+}$  結合能の自己免疫疾患との関与を明らかにするために、マウス Npnt の相同部位からなる Npnt 変異体タンパク質を精製し、ヒト Npnt の  $Ca^{2+}$  結合領域タンパク質 (hNpnt-Ca) とマウスの相同領域 (mNpnt-Ca) の  $Ca^{2+}$  結合能の最終的な確認を行った結果、両分子とも  $Ca^{2+}$  結合能を有することを明らかにすることができた (図 2)。すなわち、ヒト、マウス Npnt の  $Ca^{2+}$  結合部位の同定に成功した。

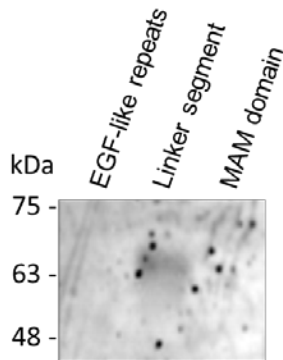


図 1. Npnt 各領域の  $Ca^{2+}$  結合能

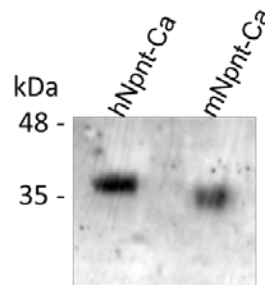


図 2. hNpnt-Ca、mNpnt-Ca の  $Ca^{2+}$  結合能

##### (2) Npnt の $Ca^{2+}$ 結合部位に対する抗体作製と自己免疫疾患モデルへの関与

mNpnt-Ca 領域が  $Ca^{2+}$  結合能を有することを見出したことから、mNpnt-Ca の 44 アミノ酸のペプチドを合成し、ポリクローナル抗体 (anti-mNpnt-Ca Ab) を作製した。得られた抗体を用いて自己免疫疾患モデルである EAE モデルの抑制効果を検討した。また、既に EAE モデル抑制効果を有することが分かっている Npnt に対する抗体 (anti-mNpnt Ab) も同時に投与した。その結果、これまでの結果通り anti-mNpnt Ab は EAE 増悪化抑制効果を示す一方で、anti-mNpnt-Ca Ab は抑制効果を示さないことが分かった (図 3)。このデータから、Npnt の  $Ca^{2+}$  結合領域は自己免疫疾患には関与しない可能性が示唆された。

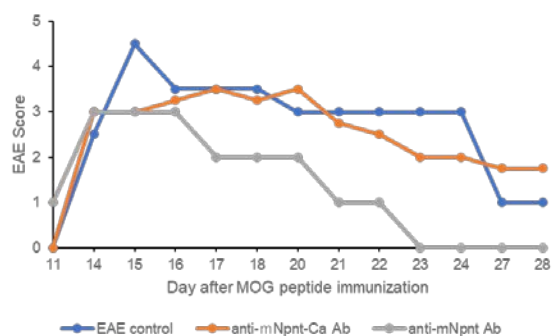


図 3. 抗Npnt-Ca抗体によるEAE抑制効果

現在、anti-mNpnt-Ca Ab による制御性 B 細胞分化抑制効果の検討を開始している。

##### (3) Npnt 結合タンパク質の同定

Npnt 結合タンパク質が Npnt による自己免疫疾患増悪化や制御性 B 細胞分化に関与することも考えられることから、Npnt 遺伝子導入 293 細胞の培養上清から Npnt タンパク質を精製し、質量分析法にて Npnt 結合タンパク質の同定を試みた。その結果、数種の候補を得ることができ、その中の一つの分子が、免疫細胞分化に関わる機能や免疫疾患への関与が示唆されていることが分かった。現在、候補分子の自己免疫疾患における発現や機能について検討を進めている。

<引用文献>

- ①Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M.、Regulatory T Cells and Immune Tolerance、Cell、Vol.133、2008、775-787
- ②Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy、Current Opinion in Immunology、Vol.27、2014、1-7
- ③Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jäger E, and Sakaguchi S、Proc Natl Acad Sci USA、Vol.110、2013、17945-17950
- ④Rosser EC, Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function、Immunity、Vol.42、2015、607-612
- ⑤Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y、Immunity、Vol.34、2011、703-714

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ①Yamashita M, Ukibe K, Matsubara Y, Sakai F, Kon S, Arima Y, Murakami M, Nakagawa H, Miyazaki T. Lactobacillus helveticus SBT2171 attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Front. Microbiol. Vol.8、2018、2596
- ②Kon S, Uede T. The role of  $\alpha 9 \beta 1$  integrin and its ligands in the development of autoimmune diseases. J Cell Commun Signal. Vol.12、2018、333-342
- ③Matsumoto N, Kon S, Nakatsuru T, Miyashita M, Inui K, Saitoh K, Kitai Y, Muromoto R, Uede T, Matsuda T. A Novel  $\alpha 9$  Integrin Ligand, XCL1/lymphotactin, is Involved in the Development of Murine Models of Autoimmune Diseases. J Immunol. Vol.199、2017、82-90、
- ④Saitoh K, Kon S, Nakatsuru T, Inui K, Ihara T, Matsumoto N, Kitai Y, Muromoto R, Matsuda T#. Anti-IL-17A blocking antibody reduces cyclosporinA-induced relapse in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Biochemistry and Biophysics Reports. Vol.8、2016、139-145

〔学会発表〕(計 6 件)

- ①重政 歩美、本田 真知子、今 重之、新たな反応性を有する抗 $\beta 8$  インテグリン抗体を用いた肝線維化モデル抑制効果の検討、第 41 回日本分子生物学会年会(横浜市)2018年11月28~30日
- ②本田 真知子、宮崎 純子、今 重之、抗オステオポンチン抗体を用いた非アルコール性脂肪肝炎増悪化抑制効果の検討、第 57 回日本薬学会中国四国支部会(米子市)2018年11月10~11日
- ③川崎 岬、重政 歩美、本田 真知子、今 重之、新規 $\alpha 4$  インテグリンスプライシングバリエーションの同定とその機能解析、第 57 回日本薬学会中国四国支部会(米子市)2018年11月10~11日
- ④李 順姫、本田 真知子、山本 祥子、幡山 圭代、松崎 秀紀、武井 直子、吉留 敬、西村 泰光、今 重之、大槻 剛巳、珪肺症血漿における細胞外マトリックス・ネフロネクチンの上昇、第 88 回日本衛生学会学術総会(東京都)、2018年3月22~24日
- ⑤藤岡 和征、本田 真知子、今 重之、新規カルシウム結合タンパク質であるネフロネクチンは自己免疫疾患増悪化に関与する、第 56 回日本薬学会中国四国支部会(徳島市)2017年10月21~22日
- ⑥谷川 安布、本田 真知子、今 重之、細胞外基質ネフロネクチンのサンドイッチ ELISA システムの構築、第 56 回日本薬学会中国四国支部会(徳島市)2017年10月21~22日

〔図書〕(計 0 件)

〔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://web.fukuyama-u.ac.jp/pharm/htmls/Labo/labs/mol.immun/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

無し

(2) 研究協力者

無し

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。