

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08878

研究課題名（和文）EAF2による自己反応性胚中心B細胞の除去機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of EAF2-mediated elimination of autoreactive germinal center B cells

研究代表者

王 継揚（WANG, JIYANG）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：80231041

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）：胚中心B細胞のアポトーシス制御因子として、これまでにBCL-2やFASなどの分子が知られているが、本研究では新たに転写伸長関連因子EAF2が胚中心B細胞のアポトーシスを促進することを明らかにした。EAF2欠損マウスでは、自己抗体の産生が誘発され、コラーゲン誘導性関節炎が重症化した。RNAシーケンスの結果、EAF2が抗アポトーシス因子Bcl-2の発現を抑制し、逆にアポトーシス誘発因子Bbc3/Pumaの発現を促進することも明らかになった。これらの結果から、EAF2が自己反応性胚中心B細胞を除去することにより自己免疫疾患を抑制することが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、胚中心B細胞のアポトーシスを制御する新たな因子が発見された。BCL-2やFASなどの従来知られているアポトーシス制御分子と異なり、本研究で発見されたEAF2は胚中心B細胞に特異的に発現し、自己反応性B細胞の除去と自己免疫疾患の抑制に特化した機能を有する点に独創性がある。本研究により、新たなB細胞免疫寛容機構が提示できた。また、本研究は遺伝子改変マウスを中心に進められたが、今後、ヒト胚中心B細胞のアポトーシス制御において、EAF2が同様な機能を発揮することが判明すれば、ヒト自己免疫疾患の発症、診断および治療の手掛かりとなりうるので、社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：BCL-2 and FAS are known to regulate the apoptosis of the germinal center (GC) B cells. In the present study, we have identified the transcription elongation-associated factor EAF2 as a GC B-specific apoptosis inducer. EAF2-deficient mice produce elevated levels of autoantibodies and develop severe collagen-induced arthritis. RNA sequencing analysis revealed that EAF2 suppresses the transcription of the anti-apoptotic factor Bcl-2 and promotes the transcription of the pro-apoptotic molecule Bbc3/Puma. These results collectively demonstrate that EAF2 functions to suppress autoimmunity by facilitating the elimination of autoreactive GC B cells.

研究分野：免疫学

キーワード：アポトーシス 胚中心B細胞 転写伸長因子

1. 研究開始当初の背景

病原体の侵入に対し、B 細胞は T 細胞の補助やサイトカイン刺激により急速に細胞分裂を繰り返し、リンパ節や脾臓の二次免疫器官にて胚中心を形成する。胚中心では、B 細胞の抗体遺伝子に高頻度の体細胞変異がランダムに導入され、その結果、高親和性抗体を産生する B 細胞が選択され、抗体産生細胞や記憶 B 細胞へ分化する。一方、体細胞変異によって生じうる自己抗原に反応する胚中心 B 細胞はアポトーシスによって除去されると考えられている。

これまでの研究で、胚中心 B 細胞のアポトーシスは、BCL family の BCL-2、MCL-1 などの内因性因子と、TNF family の FAS ligand などの外因性因子によって制御されていることが示されている。例えば、BCL-2 を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、脾臓 B 細胞数が著しく増加するとともに、胚中心 B 細胞のアポトーシスが低下し、記憶 B 細胞及び抗体産生細胞数が増加することが示された。一方、胚中心 B 細胞で特異的に FAS を欠損させたマウスでは、脾臓とリンパ節の肥大とともに、成熟 B 及び T 細胞、さらに胚中心 B 細胞が顕著に増加していた。これらの結果はアポトーシス制御が胚中心 B 細胞の形成や液性免疫応答に必須な役割を果たすことを示している。しかしながら、BCL-2 や FAS などの分子はもともと胚中心 B 細胞に特異的に発現しているものではなく、これらの分子の過剰発現や欠損によって誘発される胚中心 B 細胞の機能異常はしばしばリンパ球のホメオスタシスの異常を伴うもので、観察された表現型がどの程度胚中心 B 細胞自身のアポトーシス異常によるものかは必ずしも明確ではない。取り分け、自己反応性胚中心 B 細胞のアポトーシスを特異的に誘導するメカニズムは分かっていない。

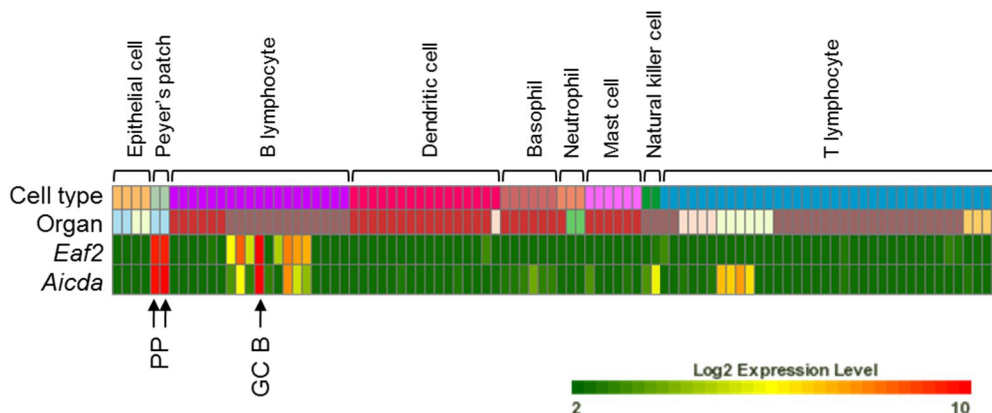


図1 EAF2 はパイエル板 (PP) と胚中心 B 細胞 (GC B) で特異的に高発現する。Activation-induced cytidine deaminase 遺伝子 (*Aicda*) の発現パターンに似ている。

胚中心 B 細胞のアポトーシスを特異的に制御する分子を同定するために、申請者は 90 種類以上の免疫細胞や亜集団における遺伝子発現を比較検討した。その結果、胚中心 B 細胞で特異的に発現しそれ以外の免疫細胞ではほとんど発現しない遺伝子として EAF2 を同定した (図 1)。EAF2 はもともと前立腺がんのアポトーシス誘導因子として発表されていたが、胚中心 B 細胞における機能は不明であった。申請者は EAF2 欠損マウスを作製し解析した結果、EAF2 が胚中心 B 細胞のアポトーシス誘導に重要な役割を果たすこと (図 2) さらには EAF2 欠損マウスが自己抗体を産生し、自己免疫疾患が発症しやすいことを明らかにした。

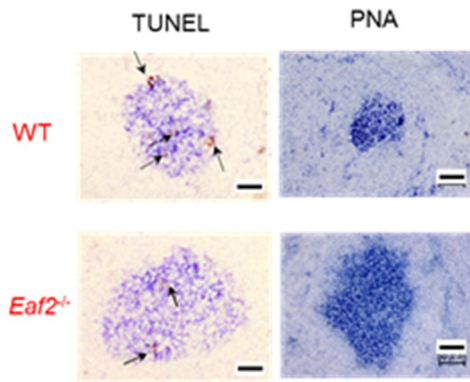


図2 EAF2 欠損マウスでは、T 依存性抗原に対する応答において、胚中心 B 細胞のアポトーシス (TUNEL、矢印) が減少し、胚中心が大きくなる (PNA 染色)。

本研究では、EAF2 が自己反応性胚中心 B 細胞のアポトーシス誘発に果たす役割を明確にするとともに、EAF2 のターゲット遺伝子の同定と EAF2 によるアポトーシス誘導の分子機構を解明する。

2. 研究の目的

1) EAF2 が自己反応性胚中心 B 細胞のアポトーシス誘導に果たす役割を明確にする；2) EAF2 のターゲット遺伝子を明らかにする；3) EAF2 によるアポトーシス誘導の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

3 - 1 EAF2 が自己反応性胚中心 B 細胞のアポトーシス誘導に果たす役割の解明

- 1) WT 及び EAF2 欠損マウスより、胚中心 B 細胞を多く含むパイエル板細胞を回収する。無刺激並びに異なる濃度の F(ab')₂-anti-IgM 抗体の存在下で 0 時間—24 時間培養した後、GL7、FAS、7-AAD、Annexin-V で染色し、生細胞中の胚中心 B 細胞 (GL7⁺FAS⁺) の割合を解析する。この実験により、自己抗原 (F(ab')₂-anti-IgM) による胚中心 B 細胞のアポトーシス誘導における EAF2 の役割を明らかにする。
- 2) Cell sorter を用いて、パイエル板より胚中心 B 細胞を分取してから、1) と同様に F(ab')₂-anti-IgM 抗体の存在下で培養する。培養後、細胞を 7-AAD と Annexin-V で染色し、アポトーシス細胞の割合について解析する。
- 3) WT 及び EAF2 欠損マウスを T 依存性抗原 NP-CGG+Alum で腹腔免疫し、10 日後にマウスに NP-BSA またはコントロールとして BSA を投与する。NP-BSA または BSA を投与してから 4 時間—12 時間後に脾臓の切片を作製し、TUNEL assay により胚中心 B 細胞のアポトーシスについて解析する。

3 - 2 EAF2 ターゲット遺伝子の解析

- 1) WT 及び EAF2 欠損マウス由来の胚中心 B 細胞を用いて、RNA シーケンスを行った結果、268 個の遺伝子の発現が EAF2 欠損胚中心 B 細胞において有意に上昇または低下していた。これらの遺伝子をゲノム構造、発現パターン、細胞内局在さらに機能などの指標に基づき分類し、EAF2 ターゲット遺伝子の特徴を明らかにする。
- 2) EAF2 タンパクの異なる領域に対するペプチド抗体を作製する。
- 3) RNA シーケンスの結果、EAF2 が Bcl-2 及び Puma の発現を制御していることが判明している。EAF2 が直接 Bcl-2 及び Puma 遺伝子の転写伸長反応の制御に関わっているかどうかについて、CHIP assay を用いて明らかにする。

3 - 3 EAF2 によるアポトーシス誘導の分子機構の解明

- 1) ウイルスベクター (pMX-IRES-GFP) を用いて EAF2 を脾臓 B 細胞で一過性に発現させると、アポトーシスが誘導されることが判明している。このアポトーシスが CD40L 単独、CD40L+F(ab')₂-anti-IgM、CD40L+F(ab')₂-anti-IgM+IL-4 などの刺激により阻止できるかどうかについて解析する。
- 2) EAF2 をヒト胚中心 B 細胞株である Daudi で pMX-IRES-GFP を用いて一過性に強制発現させると、アポトーシスが誘導されることをすでに確認している。この際、同時に BCL-2、BCL-xL、BAX または BIM を pMX-IRES-hCD8 を用いて強制発現させた場合、アポトーシスが促進または抑制されるかどうかを解析する。また、EAF2 と BCL family 分子によるアポトーシス誘導の違い (アポトーシス細胞の形態や割合、アポトーシスの速さなど) についても解析する。これらの実験により、EAF2 と BCL family 分子によるアポトーシス制御の類似点や相違点、さらに機能的相互作用を明確にする。

4 . 研究成果

胚中心 B 細胞のアポトーシス制御因子として、これまでに BCL-2 や FAS などの分子が知られているが、本研究では新たに転写伸長関連因子 EAF2 が胚中心 B 細胞のアポトーシスを促進することを明らかにした。EAF2 欠損マウスでは、自己抗体の産生が誘発され、コラーゲン誘導性関節炎が重症化した。RNA シーケンスの結果、EAF2 が抗アポトーシス因子 Bcl-2 の発現を抑制し、逆にアポトーシス誘発因子 Bbc3/Puma の発現を促進することも明らかになった。これらの結果から、EAF2 が自己反応性胚中心 B 細胞を除去することにより自己免疫疾患を抑制することが解明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 11件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Lai Nannan, Liu Luyao, Lin Li, Cui Chaoqun, Wang Ying, Min Qing, Xiong Ermeng, Wang Wenjie, Ying Wenjing, Zhou Qinhu, Hou Jia, Sun Jinqiao, Wang Ji-Yang, Wang Xiaochuan	4. 巻 8
2. 論文標題 Effective and safe treatment of a novel IL2RA deficiency with rapamycin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice	6. 最初と最後の頁 1132 ~ 1135.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaip.2019.09.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hong Rongjian, Lai Nannan, Xiong Ermeng, Ouchida Rika, Sun Jiping, Zhou Yang, Tang Yue, Hikida Masaki, Tsubata Takeshi, Tagawa Masatoshi, Wang Yanqing, Wang Ji-Yang	4. 巻 32
2. 論文標題 Distinct roles of BCNP1 in B-cell development and activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 17 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Xiong Ermeng, Li Yingqian, Min Qing, Cui Chaoqun, Liu Jun, Hong Rongjian, Lai Nannan, Wang Ying, Sun Jiping, Matsumoto Ryohtaroh, Takahashi Daisuke, Hase Koji, Shinkura Reiko, Tsubata Takeshi, Wang Ji-Yang	4. 巻 116
2. 論文標題 MZB1 promotes the secretion of J-chain-containing dimeric IgA and is critical for the suppression of gut inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 13480 ~ 13489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904204116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hong Rongjian, Lai Nannan, Ouchida Rika, Xiong Ermeng, Zhou Yang, Min Qing, Liu Jun, Tang Yue, Hikida Masaki, Tsubata Takeshi, Wang Yanqing, Wang Ji Yang	4. 巻 49
2. 論文標題 The B cell novel protein 1 (BCNP1) regulates BCR signaling and B cell apoptosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 911 ~ 917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201847985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu, J., Wang, Y., Xiong, E., Hong, R., Ohno, H. and Wang, J.-Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of the IgM Fc receptor in immunity and tolerance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Feng Yang-Yang, Tang Miao, Suzuki Mitsuhiro, Gunasekara Chinthika, Anbe Yuki, Hiraoka Yuichi, Liu Jun, Grasberger Helmut, Ohkita Mamoru, Matsumura Yasuo, Wang Ji-Yang, Tsubata Takeshi	4. 巻 202
2. 論文標題 Essential Role of NADPH Oxidase-Dependent Production of Reactive Oxygen Species in Maintenance of Sustained B Cell Receptor Signaling and B Cell Proliferation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2546 ~ 2557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lai, N., Min, Q., Xiong, E., Liu, J., Zhang, L., Yasuda, S. and Wang, J.-Y.	4. 巻 105
2. 論文標題 A tetrameric form of CD40 ligand with potent biological activities in both mouse and human primary B cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 173-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molimm.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Qian, J., Luo, F., Yang, J., Liu, J., Liu, R., Wang, L., Wang, C., Deng, Y., Lu, Z., Wang, Y., Lu, M., Wang, J.-Y. and Chu, Y.	4. 巻 6
2. 論文標題 TLR2 Promotes Glioma Immune Evasion by Downregulating MHC Class II Molecules in Microglia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunol. Res.	6. 最初と最後の頁 1220-1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-18-0020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasuda Shoya, Sun Jiping, Zhou Yang, Wang Yanqing, Lu Qing, Yamamura Masayuki, Wang Ji-Yang	4. 巻 23
2. 論文標題 Opposing roles of IgM and IgD in BCR-induced B-cell survival	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 868 ~ 879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12635	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Li, S., Liu, J., Min, Q., Ikawa, T., Yasuda, S., Yang, Y., Wang, Y.-Q., Tsubata, T., Zhao, Y. and Wang, J.-Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 Kelch-like protein 14 promotes B-1a but suppresses B-1b cell development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 311-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu, J., Zhu, H., Qian, J., Xiong, E., Zhang, L., Chu, Y., Kubagawa, H., Tsubata, T. and Wang, J.-Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 FcuR promotes the survival and activation of marginal zone B cells and protects mice against bacterial sepsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunol.	6. 最初と最後の頁 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu, J., Xiong, E., Zhu, H., Mori, H., Yasuda, S., Kinoshita, K., Tsubata, T. and Wang, J.-Y.	4. 巻 199
2. 論文標題 Efficient induction of Ig gene hypermutation in ex vivo-activated primary B cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3023-3030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1700868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasuda, S., Zhou, Y., Wang, Y., Yamamura, M. and Wang, J.-Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 A model integrating tonic and activated BCR signals to predict the survival of primary B cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-13993-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----