

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008 年度

課題番号：19590503

研究課題名（和文）B 細胞応答を負に制御するアダプター分子、BANK の機能解析

研究課題名（英文）Analysis for the function of adaptor protein, BANK which negatively regulates immune response

研究代表者

饗場 祐一（Aiba Yuichi）

独立行政法人理化学研究所 分化制御研究グループ 研究員

研究者番号：00273516

研究成果の概要：B 細胞応答を負に制御するアダプター分子である BANK について、その制御機構、また免疫抑制の意義について解析した。BANK に刺激依存的に結合する 85kd の未知のタンパクを発見した。また免疫寛容の誘導時に BANK が関与するかについて、種々の遺伝子改変マウスを用いて解析したが、BANK による免疫応答の負の制御は免疫寛容の誘導には関与しないことが明らかとなった。一方 BANK は抗原刺激後初期の細胞増殖を負に制御することが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：B 細胞 アダプター分子

1. 研究開始当初の背景

BANK は末梢 B 細胞に特異的に発現する約 100kd のアダプター分子として同定、単離された。B 細胞株などを用いた解析から、この分子が lyn などの B 細胞シグナル伝達に重要である分子と会合することが明らかにされ、B 細胞機能に何らかの役割を果たすことが示唆されていた。しかし、細胞株での機構解析がされているにもかかわらず、BANK のより生理学的な機能、さらに B 細胞免疫応答における役割については不明で

あった。我々のグループは、BANK の免疫応答における機能をより生理学的な条件で解析するため、BANK 欠損マウスを作成し、その免疫応答能、さらに BANK 欠損 B 細胞のシグナル伝達能について解析した。その結果、BANK 欠損マウスでは T-依存性抗原に应答して産生される、抗原特異的な IgM 抗体量が増加しており、さらに T-依存性抗原に対する反応に特徴的である胚中心反応が亢進していることが明らかとなった。この結果から BANK は T 依存性抗原に対する免疫応答を

負に制御していることが示唆された。この負の制御がどのような分子レベルでの調節により担われているかを調べるために、BANK 欠損マウスの B 細胞に種々の刺激をあたえ、シグナル伝達経路にある分子の活性化状態を調べたところ、BANK 欠損 B 細胞では、B 細胞抗原レセプターや CD40 分子を介する Akt の活性化が亢進していることが明らかとなった。したがって、BANK による免疫応答の負の抑制は B 細胞上に発現する B 細胞抗原レセプターおよび CD40 分子からの刺激により活性化されるリン酸化酵素、Akt の活性を負に制御することによるものである可能性が示唆された。BANK の B 細胞免疫応答における機能が明らかにされ、また B 細胞のシグナル伝達経路における役割が示唆された一方、この分子による負の制御が免疫システム全体を調節するに当たって、どのような意義を持つかは不明であり、またどのような機構で B 細胞シグナル伝達を調節しているかについては、今後解明されるべき問題として残されていた

2. 研究の目的

免疫寛容とは自己抗原に対する免疫応答を負に制御する機構であると考えられている。外来抗原に対する免疫応答を負に制御することが明らかとなった BANK が、自己抗原に対する免疫応答の負の制御である免疫寛容の誘導にも関与するかについて、BANK 欠損マウスで自己免疫疾患が発症するかについて調べ明らかにする。また免疫寛容誘導のモデルとして広く用いられている、抗 HEL 抗体遺伝子および可溶性 HEL 遺伝子の二重遺伝子導入マウスを用いても調べる。B 細胞抗原レセプターや CD40 分子からの刺激による Akt の活性化を、BANK がどのように抑制しているかについて明らかにするため、B 細胞抗原レセプターや CD40 刺激に依存して BANK に結合する分子を同定し、BANK によるシグナル伝達の負の制御機構を分子レベルで解明することを試みる

3. 研究の方法

(1)免疫寛容誘導において、BANK による免疫抑制機能が関与する可能性についての検討

BANK が免疫寛容誘導に関与するかについて明らかにするため、BANK 欠損マウスが自己抗体の産生などの自己免疫様症状を呈するかについて経時的に血清や尿を回収し、血清中の自己免疫抗体価、および尿中タンパク濃度を測定し調べる。また、BANK が他の免疫抑制にかかわる分子と協調して免疫寛容誘導に関与している可能性を考え、BANK と他の免疫抑制分子との二重欠損マウスを作成し、これらのマウスが自己免疫様症状を

呈するかについても解析する。さらに、中枢性免疫寛容のモデルとして広く用いられている、すべての B 細胞が自己抗原に反応するマウスである抗 HEL 抗体と可溶性 HEL 遺伝子の二重遺伝子導入マウスで、BANK が欠損するマウスを作成し、このマウスで免疫寛容機構の一部が破綻していないかについても検討する。

(2)BANK による B 細胞シグナル伝達抑制の機構についての解析

BANK がどのようにして B 細胞抗原レセプター、および CD40 分子からの刺激による Akt 活性化を阻害しているかについて明らかにするため、B 細胞抗原レセプター刺激、または CD40 分子刺激に依存して結合する分子の同定を試みる。マウス脾臓 B 細胞を抗原レセプターまたは抗 CD40 分子抗体で刺激し、細胞から調整した溶解液から、抗 BANK 抗体を用いた免疫沈降法により BANK および BANK 結合タンパクを精製する。沈降タンパクを SDS page gel で分離し、銀染色法により刺激に依存して出現するバンドがあるかについて検討する。刺激依存性に BANK に結合するタンパクが観察された場合に、このタンパクの性状をさらに詳しく解析する。

4. 研究成果

(1)免疫寛容誘導における BANK の関与の可能性の検討

BANK 欠損マウス、および対照として野生型のマウスで生後 1 ヶ月令のものから一月おきに生後 18 ヶ月令まで血清、及び尿を回収した。血清中の抗一本鎖 DNA 抗体価、抗二本鎖 DNA 抗体価、抗ヒストン抗体価を ELISA 法にて測定した。さらに、上記以外の抗核抗体が血清中に存在するかについて、マウス細胞株の NIH3T3 株を、回収した血清で染色し、細胞株の核が染色されるかを基準に、蛍光抗体染色法により検討した。さらに尿中のタンパク室濃度をタンパク定量用の試験紙を用いて測定した。いずれの方法でも BANK 欠損マウスで抗自己抗体の産生や尿中タンパク質濃度の上昇などは認められなかったことから、BANK 遺伝子単独の欠損はマウスに SLE 様の病状発症には結びつかないことが示唆された。また、生後 12 ヶ月以上の BANK 欠損マウスでも、関節炎などの著変は認められず、生存率も野生型マウスと変化がなかったため、SLE 以外の病状、特に自己免疫疾患の発症にも関与しないことが示唆された。

B 細胞の応答は種々のシグナル伝達経路で調節されていることが知られており、抑制性のシグナル伝達経路も複数知られている。なかでも、CD22, Fc γ レセプター-typeII (Fc γ II) は B 細胞の免疫応答を負に制御することが知られており、BANK に結合するチロシンキ

ナーゼである lyn を介して応答を抑制することが知られている。これらの分子が、BANK と同様のシグナル伝達経路を用いて、応答の負の制御を行っている可能性があるため、CD22 と BANK、Fc γ II と BANK の二重欠損マウスを作成し、これらのマウスで免疫寛容の破綻に伴う自己免疫様症状を呈するかについて検討した。BANK 単独欠損マウス、CD22BANK 二重欠損マウス、Fc γ IIBANK 二重欠損マウスと対照として野生型マウスから、血清と尿を上記と同じ方法で回収し、抗自己抗体価、尿中タンパク濃度を測定した。いずれのマウスでも抗自己抗体産生や尿タンパク質濃度の上昇は認められず、BANK が CD22 分子や Fc γ II と協調して免疫寛容の維持を行っている可能性は低いと考えられた。一方、Fc γ II と BANK の二重欠損マウスでは、それぞれの単独の欠損マウスと比較し、T 依存性抗原投与後の抗原特異的な IgM の産生が亢進していることが明らかとなり、これらの分子が外来抗原に対する応答時には協調して負の制御を行っている可能性が示唆された。

免疫寛容の維持は複数の機構で維持されており、機構の一部の破綻が自己免疫疾患には直ちに結びつかない例も知られている。BANK は末梢の B 細胞に特異的に発現していること、末梢 B 細胞の免疫寛容の誘導は主にクローン麻痺で行われることを考え、クローン麻痺誘導のモデルとして広く認められている抗 HEL 抗体遺伝子及び可溶性 HEL 遺伝子の二重遺伝子導入マウスで BANK を欠損するマウスを作成し、このマウスでクローン麻痺誘導に異常が認められるかについて検討した。すでに報告されているように、抗 HEL 抗体遺伝子と可溶性 HEL 遺伝子の二重欠損マウスでは、正常マウスと比較し末梢 B 細胞の減少が認められるが、BANK 欠損二重遺伝子導入マウスでは末梢 B 細胞数が増加していることが明らかとなった。しかしながら、血清中の HEL 抗体価の上昇は認められず、このモデルでも BANK の欠損により免疫寛容が破綻することはないことが示唆された。さらにクローン麻痺誘導の指標として用いられる、B 細胞抗原レセプター刺激後の細胞内カルシウム濃度上昇の抑制は、BANK 欠損二重遺伝子導入マウスでも二重遺伝子導入マウスと同様に起こることが明らかとなり、クローン麻痺の誘導には BANK が関与しないことが示唆された。一方、BANK 欠損抗 HEL 抗体遺伝子導入マウスの B 細胞を正常マウスに移入し、外来抗原として HEL-OVA を投与したときには、BANK 欠損 B 細胞は正常 B 細胞と比較し、細胞増殖が亢進していることが明らかとなり、外来抗原に対する反応は HEL 抗原に対しても上昇していることが明らかとなった。

本研究課題が進行中に、ヒト SLE 患者で BANK 遺伝子の変異が認められるとの報告が

あり、免疫寛容の破綻とそれに伴う自己免疫疾患の発症に BANK が関与することが示唆されたが、BANK 欠損マウスを用いた解析では、免疫寛容の破綻や自己免疫疾患の発症に BANK が関与する結果は得られなかった。ヒトとマウスの BANK の機能が違う可能性、あるいはここで検討した CD22 や Fc γ II 以外の分子と協調して免疫寛容の維持に関与している可能性があり、今後の検討を要することと考えられる。

(2) BANK による B 細胞シグナル伝達抑制の機構についての解析

BANK がどのようなシグナル伝達経路を介して B 細胞の応答、特に Akt の活性化を抑制するかについて明らかにするため、BANK に刺激依存性に結合するタンパクの同定を試みた。マウス脾臓 B 細胞を抗 B 細胞抗原レセプター抗体または抗 CD40 抗体で刺激し、細胞溶解液を調整した。抗マウス BANK 抗体で免疫沈降後のタンパクを SDS page で分離し、ゲルを銀染色後、刺激に依存して出現するバンドを検索した。抗 B 細胞抗原レセプター刺激後の免疫沈降物では 85 kda のバンドが確認された。このバンドは未刺激の B 細胞および BANK 欠損 B 細胞では認められないことから、抗原レセプター刺激に依存して BANK に特異的に結合するタンパク質であることが示唆された。

このタンパク質の性状をより詳しく解析するため、種々のシグナル抑制に関与する分子に対する抗体を用いて Western blot を行ったところ、抗 SHIP 抗体で 85 kda タンパクが検出できることが明らかとなった。抗 SHIP 抗体のうち、タンパクの N 末端部分を認識する抗体、C 末端部分を認識する抗体、いずれでもこの 85 kda タンパクが認識されることから、このタンパクが SHIP の isoform であることが強く示唆された。

これまで報告されてきた SHIP の isoform の中に 85 kda のものはないため、今後遺伝子レベルでの解析を通じて、BANK の抑制機能が明らかにされるものと考えられる。また、SHIP の isoform には特定の細胞種のみが発現しているものがあり、我々が発見したこのタンパクが BANK と同様に末梢 B 細胞のみで発現しているかなどに関しても検討されるべき課題となる。

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 2 件)

① Conley ME., Farmer DM., Dobbs AK., Howard V., Aiba Y., Shurtleff SA., Kurosaki T. "A Minimally hypomorphic

mutation in Btk resulting in reduced B cell numbers but no clinical disease” 2008, Clinical and Experimental Immunology. Vol. 152; p39-44. 査読有

② Aiba Y., Kameyama M., Yamazaki T., Tedder TF., Kurosaki T. “Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase” 2008, Blood. Vol. 111; p1497-1503. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

饗場 祐一 “BCAP 及び CD19 分子による B 細胞分化の制御” 日本免疫学会総会 学術集会 2007 年 11 月 20 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

饗場 祐一 (Aiba Yuichi)

独立行政法人理化学研究所 分化制御
研究グループ 研究員

研究者番号 : 00273516