

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15109

研究課題名（和文）B細胞発生・分化における細胞膜リン脂質の役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of plasma membrane phospholipids in B cell development and differentiation

研究代表者

金丸 佳織（Kanemaru, Kaori）

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・助教

研究者番号：40838637

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）：本研究では細胞膜リン脂質を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法による細胞膜リン脂質量の測定方法を確立した。また、その技術を用い、細胞膜リン脂質分解酵素、および合成酵素の発現により、人工白血球幹細胞の幹細胞性を失わせること、B細胞への分化誘導時にB細胞分化よりもミエロイド系細胞への分化が誘導され、B細胞の発生、分化において、細胞膜リン脂質の量が適切なレベルに保たれることが重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において申請者はフローサイトメトリー法による細胞膜リン脂質量の測定方法を確立し、人工白血球幹細胞のB細胞分化における細胞膜リン脂質の役割の一端を明らかにした。この結果により、B細胞発生・分化過程の細胞膜リン脂質量の変化を捉え、細胞膜リン脂質量の役割を解明できると期待される。また、B細胞発生・分化における細胞膜リン脂質量の役割を解明することはリンパ性白血病の病態理解を深めることにもつながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a method for measuring the amount of plasma membrane phospholipids by flow cytometry using a monoclonal antibody that specifically recognizes plasma membrane phospholipids. Using this technique, it was suggested that the expression of plasma membrane phospholipid-degrading and synthesizing enzymes may be important in inducing artificial leukocyte stem cells to lose their stem cell characteristics, in inducing myeloid lineage cell differentiation rather than B cell differentiation during B cell differentiation, and in maintaining appropriate levels of plasma membrane phospholipids during B cell development and differentiation. The results suggest that it may be important to maintain appropriate levels of plasma membrane phospholipids during B cell development and differentiation.

研究分野：脂質生物学

キーワード：細胞膜リン脂質 細胞膜 B細胞分化

1. 研究開始当初の背景

細胞膜構成要素の一つであるリン脂質は遺伝子にコードされておらず、リン脂質を直接操作することが困難なため、その機能については未だ不明点が多い。リン脂質の量は各種脂質代謝酵素により調節されるため、研究代表者はリン脂質代謝酵素の機能解析を通しリン脂質の生理機能の解明を進めてきた。現在までに、細胞膜リン脂質の一種であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸を代謝する酵素ホスホリパーゼ C の遺伝子欠損マウスの作製と解析により、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸代謝の持ついくつかの生理機能を解明してきた (Kanemaru K., *et al. Nat. Commun.* 2012; Kanemaru K., *et al. Cell Death Differ.* 2017)。

これらの研究を行なってくる過程でマウス皮膚組織中のホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸を抗体を用いた免疫染色法により検出したところ、上皮細胞では非上皮細胞と比べ、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の染色強度が強いことを発見した。また培養細胞株を用いた際も上皮細胞株では非上皮細胞株と比べ、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の量が多いことも明らかになった。さらに、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の量的操作を、各種代謝酵素の発現調節により行ったところ、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸を減少させた上皮細胞では、上皮細胞特有の形態や細胞間接着の喪失が観察され、その一方で、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の量を増加させた骨肉腫細胞株が上皮細胞様の形態に変化することが確認された。これらの結果より、細胞膜リン脂質の一種であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸やその代謝酵素が上皮細胞の性質を維持するために重要であり、細胞膜リン脂質が上皮細胞の細胞性質決定において、重要な役割を担っているものと考えられた (Kanemaru K., *et al. Nat. Commun.* 2022)。しかしながら、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸をはじめとした各種細胞膜リン脂質や、その代謝酵素が上皮細胞以外の細胞の性質決定においても重要な役割を果たすのかは未だ不明である。

2. 研究の目的

全ての血液細胞は、造血幹細胞より発生する。現在まで、造血幹細胞から各種血液細胞への分化において、転写因子をはじめとした各種タンパク質が果たす役割は多数報告されているが、血液細胞分化における細胞膜リン脂質やその代謝酵素の果たす役割はほとんど不明である。上述の背景を踏まえて、本研究では、血液細胞の個性や運命決定における細胞膜リン脂質やその代謝酵素の関与を明らかにすることを目指し、血液細胞の中でも、特に B 細胞に着目し、その発生・分化において、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸をはじめとした細胞膜リン脂質やその代謝酵素が果たす役割を明らかにすることを目的として設定した。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜リン脂質を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法による細胞膜リン脂質の検出

ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いることにより、接着細胞や一部組織の凍結切片において免疫染色によるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の検出が可能であった。そこで、抗ホスファチジルイノシトール

4,5-二リン酸抗体を用い、フローサイトメトリーによるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の検出を試みた。白血病細胞株 K562 において、サポニンによる細胞膜透過処理をした後、蛍光標識抗ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸抗体による検出や、ビオチン標識抗体と蛍光標識ストレプトアビジンを用いた検出を行った。さらに、レトロウイルスベクターを用いて、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸合成酵素や分解酵素の過剰発現を行い、これらの酵素によるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の量の変化をフローサイトメトリー法により検出可能かを検討した。

(2) 細胞膜リン脂質代謝酵素の発現操作が人工白血球幹細胞の B 細胞分化に与える影響の解析

生体内の微量な造血幹細胞を特異的な表面抗原を利用して選択的に採取することは可能であるが、採取した造血幹細胞を多分化能を保った状態で培養、増殖させることは容易ではない。そこで、多分化能を保った状態で無限に増殖する人工白血球幹細胞 (Ikawa T *et al. Stem Cell Reports*, 2015)を用い、細胞膜リン脂質代謝酵素の発現操作が人工白血球幹細胞から B 細胞への分化に与える影響の解析を試みた。人工白血球幹細胞に対して、レトロウイルスベクターを用いて、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸合成酵素や分解酵素の過剰発現を行った後、B 細胞への分化を誘導した。B 細胞への分化は細胞表面における CD19 の発現を抗 CD19 抗体により検出することで行った。

(3) 細胞膜リン脂質近傍タンパク質の解析

ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸をはじめとした細胞膜リン脂質は様々な細胞内のタンパク質と協働して機能する。そこで、細胞膜リン脂質による B 細胞分化制御の分子機構を明らかにするために、細胞膜リン脂質の近傍タンパク質の探索を試みた。ビオチンをラジカル化する酵素を、特定の細胞膜リン脂質の結合タンパク質ドメインに付加し、細胞内で発現させ、細胞膜リン脂質の近傍タンパク質のビオチン化と精製を行った。その後、質量分析により、得られたタンパク質の網羅的同定を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞膜リン脂質を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法による細胞膜リン脂質の検出

蛍光標識抗ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸抗体を用いて、フローサイトメトリー法によるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の検出を試みたが、検出感度が低く困難であった。そこで、抗ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸抗体をビオチン標識し、蛍光標識ストレプトアビジンで検出したところフローサイトメトリー法によるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の検出が可能であった。さらに、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸合成酵素や分解酵素の過剰発現を行い、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸量の変化をフローサイトメトリーにおいて調べたところ、合成酵素過剰発現時にはホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸量の増加、分解酵素過剰発現時にはその減少が観察された (図 1)。

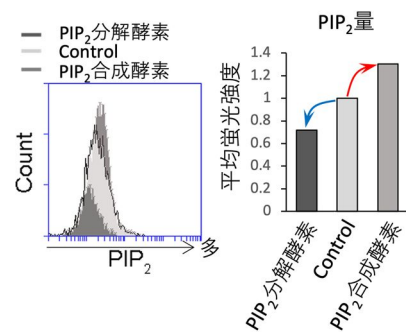


図 1
フローサイトメトリー法による細胞膜ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) の量の確認

(2) 細胞膜リン脂質代謝酵素の発現操作が人工白血球幹細胞の B 細胞分化に与える影響の解析

人工白血球幹細胞をB細胞へと分化誘導した際にホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸量に変化があるかを、(1)に記載したフローサイトメトリー法により調べた。その結果、人工白血球幹細胞をB細胞へ分化させることにより、ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸量が増加することを示唆する結果が得られた。

続いて、ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸合成酵素や分解酵素の過剰発現を行い、ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸量を変化させ、B細胞への分化に与える影響を調べたところ、B細胞への分化が抑制されることが示唆された(図2)。この際、B細胞への分化が抑制された一方で、ミエロイド系細胞への分化が促進されることを示唆する結果も得られた。

また、分化誘導を行っていない人工白血球幹細胞にホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸分解酵素の過剰発現を行った際には、人工白血球幹細胞の増殖が顕著に抑制されることも明らかとなり、このことから、ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸は人工白血球幹細胞の維持にも必要である可能性が考えられた。

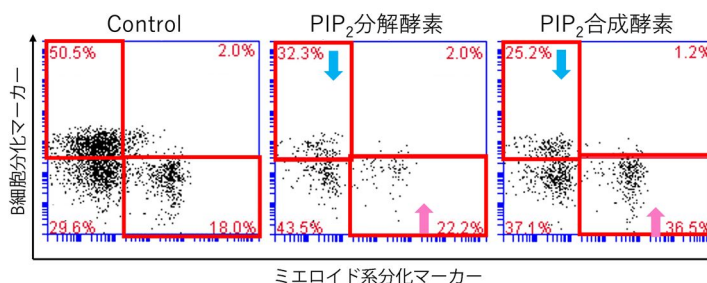


図2 人工白血球幹細胞にホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PIP₂)分解酵素、およびPIP₂合成酵素を発現させ、B細胞へ分化誘導した。その結果、B細胞への分化よりもミエロイド系細胞への分化が促進された。

(3) 細胞膜リン脂質近傍タンパク質の解析

ビオチン化され、精製されてきたタンパク質を質量分析により網羅的に同定したところ、99種類のタンパク質が得られたが、この中にB細胞分化に直接、関与することが報告されている因子は含まれていなかった。しかしながら、大規模な遺伝子発現変化を誘導し得る、いくつかの核内因子が近傍タンパク質として得られてきており、これらの因子が細胞膜リン脂質によるB細胞分化に関わる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanemaru Kaori, Shimozawa Makoto, Kitamata Manabu, Furuishi Rikuto, Kayano Hinako, Sukawa Yui, Chiba Yuuki, Fukuyama Takatsugu, Hasegawa Junya, Nakanishi Hiroki, Kishimoto Takuma, Tsujita Kazuya, Tanaka Kazuma, Itoh Toshiki, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Fukami Kiyoko, Nakamura Yoshikazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is critical for determination of epithelial characteristics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30061-9	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金丸 佳織、古石 陸人、下澤 誠、中村 由和、深見希代子
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸の変化が形質膜コレステロールに与える影響の解析
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金丸 佳織、古石 陸人、北又 学、深見 希代子、中村 由和
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール4,5ニリン酸による上皮性制御機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八代 桃香、金丸 佳織、古石 陸人、牧野 巧、中村 由和
2. 発表標題 ホスホリパーゼC様タンパク質の細胞内局在解析と結合タンパク質の探索
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長澤 健登, 金丸 佳織, 田中 朝日, 原田 陽介, 中村 由和
2. 発表標題 表皮細胞におけるBcl6の機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古石 陸人, 金丸 佳織, 北又 学, 深見 希代子, 中村 由和
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール(4,5)-二リン酸量や上皮性の制御に関わる酵素の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古石 陸人, 金丸 佳織, 八代 桃香, 牧野 巧, 中村 由和
2. 発表標題 ホスホリパーゼC様タンパク質の細胞内局在解析と結合タンパク質の探索
3. 学会等名 2021年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長澤 健登, 金丸 佳織, 田中 朝日, 原田 陽介, 中村 由和
2. 発表標題 表皮細胞におけるBcl6の機能解析
3. 学会等名 2021年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kaori Kanemaru, Kento Nagasawa, Asahi Tanaka, Yohsuke Harada, Yoshikazu Nakamura
2. 発表標題 Functional analysis of BCL6 in epidermal cells
3. 学会等名 第46回研究皮膚科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井田雄貴、田井優貴、金丸佳織、中村由和、原田陽介
2. 発表標題 Foxp3 Bcl6欠損マウスにおける皮膚炎発症機序の解明
3. 学会等名 第70回 日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------