

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19424

研究課題名（和文）B細胞受容体による多様な応答誘導を可能にする分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular bases enabling various BCR responses

研究代表者

三宅 健介（Miyake, Kensuke）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：B細胞に発現する抗原受容体（B cell receptor, BCR）は、増殖から、活性化、死滅まで多様な応答を誘導する。多様性の分子基盤の一つとして、BCRとTLR複合体が生存・増殖を誘導する可能性を検討した。IL-3依存性細胞株Ba/F3細胞に、BCR、TLR9を発現させた。この細胞を用いて、IL-3非存在下で生存、増殖を誘導できるか検討した。その結果、抗IgM抗体によるIgMの架橋とTLR9リガンドによる刺激で、生存・増殖が確認できた。この細胞を用いることで、BCRによる生存・増殖誘導の分子基盤についての解析が可能となることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B細胞受容体からのシグナルは活性化、増殖、分化など多様なB細胞応答を誘導するがその分子基盤は不明である。応答の多様性を説明する分子基盤として、BCRとTLR9との複合体を解析するための細胞株を確立することに成功した。この細胞を用いることで、BCR-TLR9複合体の形成や活性化に関わる分子の検索などが可能となる。その解析で得られる知見はB細胞の生存・増殖の制御に重要であることが予想される。つまり、抗体産生を誘導するアジュバントの開発やB細胞リンホーマの治療薬開発に資することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The antigen receptor expressed on B cells (B cell receptor, BCR) induces a variety of responses, from proliferation to activation and cell death. Little is known about the molecular basis of this diversity. We hypothesized that the diversity depends on various forms of BCRs such as BCR alone and the BCR-TLR complex, and that the latter induces survival and proliferation. We expressed BCR and TLR9 in the IL-3-dependent cell line Ba/F3. Using these cells, we investigated whether survival and proliferation could be induced in the absence of IL-3. As a result, survival and proliferation were induced in the presence of both anti-IgM antibody and the TLR9 ligand. This cell line is valuable to study the molecular basis of BCR-induced survival and proliferation.

研究分野：免疫学

キーワード：Toll様受容体 B細胞受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B細胞抗原受容体 (B cell receptor、BCR) は、抗原特異的な B 細胞の分化、増殖、死滅を誘導することで抗原特異的なクローン選択を可能とする。単一の受容体が分化から増殖・生存・死滅まで多様な応答を誘導する分子基盤については現在でも不明である。さらに BCR が欠損するとすべての B 細胞は死滅することから (Lam et al., Cell 1997, Srinivasan et al, Cell 2009)、BCR は抗原非依存的に増殖・生存を決定している可能性がある。一部の B 細胞リンホーマでは、BCR に加えて 1 本鎖 DNA センサー Toll-like receptor 9 (TLR9) も増殖・生存を決定する。Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) において、L265P MyD88 が Driver mutation として検出される。L265P MyD88 は TLR9 や BCR と複合体をエンドリソソームで形成し、増殖・生存シグナルを伝達する (Phelan et al., Nature 2018)。DLBCL の増殖・生存には BCR、TLR9 とともに必須であるが、正常 B 細胞の増殖・生存には BCR だけが必須である。正常 B 細胞では、TLR9 だけでなく、TLR7 や他の分子も BCR と複合体を形成し、生存・増殖を誘導している可能性がある。したがって、多様な BCR 応答は、BCR 単独に加えて、BCR と TLR との複合体などによって誘導されている可能性が考えられる (図 1)。

2. 研究の目的

本研究では、BCR が単独で機能するだけでなく、TLR9 などと高次複合体を形成し、B 細胞の増殖・生存を誘導する可能性を検討する。その解析を通して、BCR による多様な応答は、BCR 単独だけでなく、複合体でも誘導されることを示す。

3. 研究の方法

(1) BCR・TLR によって増殖する Ba/F3 細胞の確立
IL-3 依存性細胞株 Ba/F3 に B 細胞複合体 (IgM, CD79a, CD79b)、TLR9 複合体 (TLR9, Unc93b1) を発現させ、BCR、TLR9 の刺激で増殖する細胞株を確立する。

(2) BCR・TLR9 依存性増殖に関わるシグナル経路の解析

BCR 架橋と TLR9 リガンド刺激で増殖・生存が誘導される Ba/F3 細胞を用いて、増殖・生存に関わるシグナル伝達分子を阻害剤を用いてスクリーニングし、遺伝子欠損で確認する。

(3) BCR-TLR9 複合体における CD20 についての解析 CD20 は BCR に会合する膜 4 回貫通型のタンパク質であるがその詳細な機能は不明である (図 2)。CD20 が BCR と TLR9 の会合を増強し、BCR・TLR9 複合体が誘導する細胞増殖を増強する可能性を検討する。また、B 細胞リンホーマの治療に用いるリツキシマブなどの抗ヒト CD20 抗体が BCR と TLR9 の会合に及ぼす影響を、ヒト B 細胞株を用いて解析する。

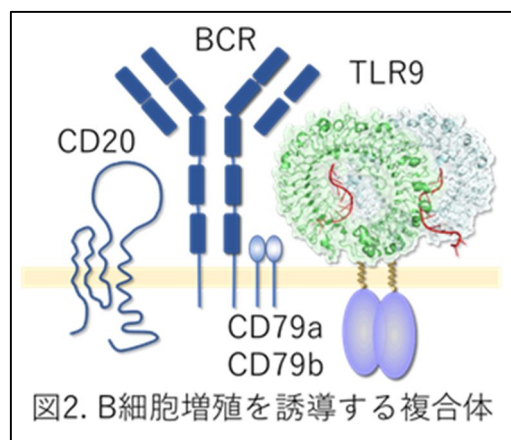
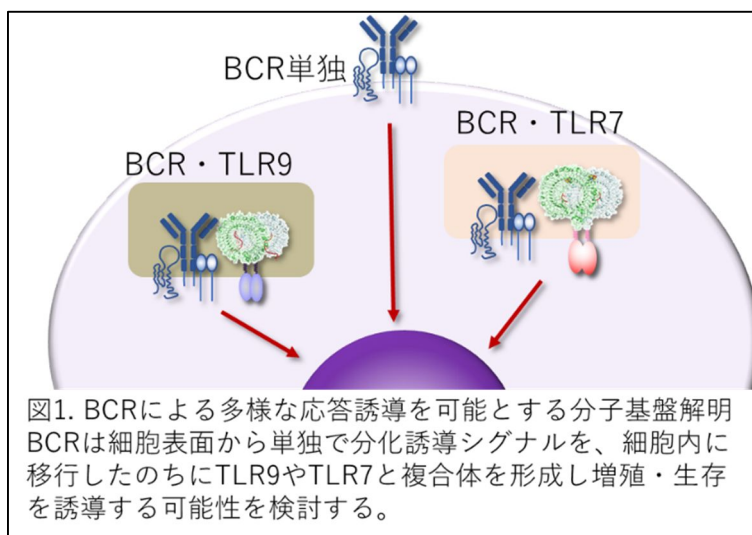
(4) BCR-TLR 複合体の多様性についての解析 ヒト B 細胞は TLR9 に加えて TLR7 も発現するが、ヒト B 細胞リンホーマにおいては、TLR7 は BCR と会合しない (Phelan et al., Nature 2018)。しかしながら、そこで、Ba/F3 細胞を用いて、BCR との関係における TLR9 と TLR7 の違いを検討する。

(5) 正常 B 細胞での検証 正常 B 細胞を用いて、増殖に関わるシグナル伝達分子の検証、IgM・TLR9/7 の会合、IgM-TLR9/7 複合体の局在、巨大リソソームの形成などを確認する。

4. 研究成果

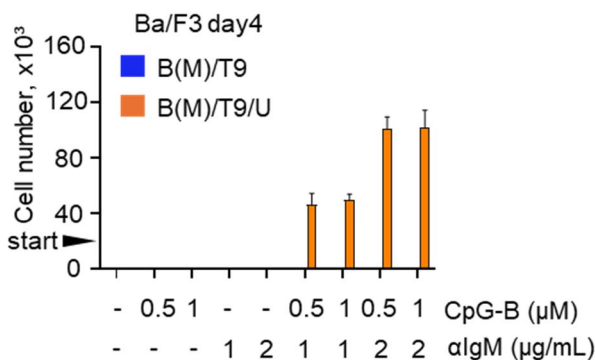
(1) BCR・TLR によって増殖する Ba/F3 細胞の確立

IL-3 依存性細胞株 Ba/F3 に B 細胞複合体 (IgM, CD79a, CD79b)、TLR9 複合体 (TLR9, Unc93b1) を発現させ、抗 IgM 抗体、CpG-B で刺激し、4 日後の細胞数を数えた。抗 IgM 抗体、CpG-B、それ



それぞれ単独では増殖を誘導できなかったが、両方加えると、Ba/F3 細胞は増殖した(図3)。Unc93B1 非存在下では(青)、増殖は認められなかった。当初の計画通り、BCR/TLR9 依存性の細胞増殖を Ba/F3 細胞で再現することができた。

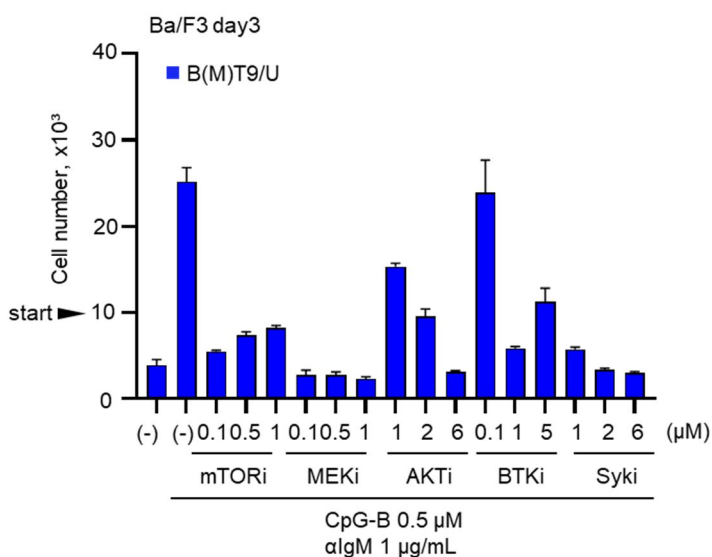
図3 Ba/F3細胞におけるBCR/TLR9依存性増殖



(2) BCR・TLR9 依存性増殖に関わるシグナル経路の解析

BCR 架橋と TLR9 リガンド刺激で増殖・生存が誘導される Ba/F3 細胞を用いて、シグナル伝達分子阻害剤の効果を検討した。その結果、mTORC1、MEK、AKT、Bruton tyrosine kinase (BTK)、Syk の阻害剤、すべてが容量依存的に阻害効果を示した(図4)。したがって、これらの分子が BCR/TLR9 複合体の下流で活性化されている可能性が示された。

図4. BCR/TLR9依存性増殖に対するシグナル阻害剤の効果



(3) BCR-TLR9 複合体における CD20 についての解析

BCR・TLR9 を発現する Ba/F3 細胞に CD20 か CD19/CD81 を発現させ、BCR/TLR9 刺激による増殖への影響を現在検討している。B 細胞リンホーマもすでに入手しており、リツキシマブなどの抗ヒト CD20 抗体の生存・増殖に及ぼす効果についても現在、解析を進めている。

(4) BCR-TLR7 複合体についての解析

ヒト Ba/F3 細胞に BCR と TLR7 を発現させた細胞株の作成を終えている。現在、抗 IgM 抗体と TLR7 リガンド R848 での刺激が生存・増殖に及ぼす影響を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chowdhury Sajid Iftekhar, Inui Masanori, Yamazaki Tatsuya, Tomono Susumu, Takagi Hidekazu, Biswas Mrityunjoy, Saitoh Shin Ichiroh, Miyake Kensuke, Akashi Takamura Sachiko	4. 巻 -
2. 論文標題 The anti TLR4 monoclonal antibody Sa15 21 enhances inflammatory cytokine production in LPS stimulated macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	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） 10.1002/1873-3468.14619	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 Kuchitsu Yoshihiko, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 453 ~ 466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-023-01098-9	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 Liu Xiaoxiao, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 IMPDH inhibition activates TLR VCAM1 pathway and suppresses the development of MLL fusion leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	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） 10.15252/emmm.202115631	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 Leibler Claire, John Shinu, Elsner Rebecca A., Thomas Kayla B., Smita Shuchi, Joachim Stephen, Levack Russell C., Callahan Derrick J., Gordon Rachael A., Bastacky Sheldon, Fukui Ryutaro, Miyake Kensuke, Gingras Sebastien, Nickerson Kevin M., Shlomchik Mark J.	4. 巻 23
2. 論文標題 Genetic dissection of TLR9 reveals complex regulatory and cryptic proinflammatory roles in mouse lupus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1457 ~ 1469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-022-01310-2	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 Sakaniwa Kentaro, Fujimura Akiko, Shibata Takuma, Shigematsu Hideki, Ekimoto Toru, Yamamoto Masaki, Ikeguchi Mitsunori, Miyake Kensuke, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 TLR3 forms a laterally aligned multimeric complex along double-stranded RNA for efficient signal transduction	5. 発行年 2023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/s41467-023-35844-2	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 Maeda Fumio, Kato Akihisa, Takeshima Kosuke, Shibazaki Misato, Sato Ryota, Shibata Takuma, Miyake Kensuke, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Shimizu Eigo, Imoto Seiya, Miyano Satoru, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Takeuchi Koh, Maruzuru Yuhei, Koyanagi Naoto, Jun Arii, Yasushi Kawaguchi	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of the Orphan Transporter SLC35E1 in the Nuclear Egress of Herpes Simplex Virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	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) 10.1128/jvi.00306-22	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 三宅 健介
2. 発表標題 マクロファージのリソソーム核酸ストレス応答によって誘導される疾患
3. 学会等名 第76回日本口腔外科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅 健介
2. 発表標題 リソソーム核酸ストレスに対するマクロファージ応答によって誘導される疾患
3. 学会等名 第42回阿蘇シンポ ジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kensuke Miyake
2. 発表標題 Immune disorders due to lysosomal nucleic acid stress
3. 学会等名 The Japanese-German Immunology Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kensuke Miyake
2. 発表標題 Diseases due to lysosomal nucleic acid stress
3. 学会等名 Nucleic acid immunity meeting 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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