

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590368

研究課題名(和文) 免疫応答におけるSFRP2の機能解析

研究課題名(英文) The analysis of the role of SFRP2 function in immune system

研究代表者

八木 知人(Yagi, Tomohito)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50453098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：SFRP2は競合的にWntを阻害し調節を行っている。Wntシグナルが血液細胞において重要な役割を果たしているが、SFRP2のリンパ球における機能は不明である。今回、SFRP2遺伝子改変マウスを用いてBリンパ球におけるSFRP2の機能解析を行った。SFRP2欠損マウスの脾臓由来Bリンパ球ではBCRシグナルを介したカルシウムシグナルが阻害されていた。カルシウムシグナルはリンパ球の刺激伝達に非常に重要であり、その下流のPLC $\gamma$ 2の活性化も阻害されていることから、Bリンパ球の活性化に関与していることが示唆された。今後Bリンパ球の異常活性化のより引き起こされる自己免疫疾患の病態を検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：In the Wnt pathway, the secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2, Stromal cell Derived Factor 5; SDF5) is thought to act as one of the several competitive inhibitors of Wnt. However, the precise role of SFRP2 is still poorly understood especially in B lymphocytes. Here, we studied the function of SFRP2, comparing the SFRP2 defective as well as normal B lymphocytes in mice. As a result, we revealed that calcium influx from extracellular to intracellular space in splenic B cells was clearly affected by the defect of SFRP2. In addition, the phosphorylation of phospholipase Cgamma2 was observed to be disrupted in splenic B cells. In this regard, SFRP2 is suggested to be involved in the calcium transport in the B cells as well as in the B cell receptor signaling pathway.

研究分野：分子生物学、血液学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学 免疫応答 SFRP2

## 1. 研究開始当初の背景

Secreted frizzled related proteins(SFRPs) は Cysteine-rich domain(CRD)を持つ frizzled receptor と共通の CRD 構造をもつが、膜貫通ドメインを持たないタンパク質である。そのため Wnt ligand と膜貫通ドメインを持つ frizzled receptors の結合を阻害する機能を持つと考えられている。SFRP2/SDF5 は Wnt-4 の発現とよく似たパターンを示し、Wnt-4 シグナルのアンタゴニストの一つとして働いていることが報告されている。近年、田代らは SFRP1 とともに SFRP2 が胚の発達に大きく関与していることを報告した。Wnt シグナルは細胞の生存、極性、胚組織の発達、細胞の悪性化など多くの機能をもち、Beta-catenin / serine-threonine kinase glycogen synthase-3 Beta (GSK3B)を介在して血球系細胞の分化や造血幹細胞の維持、再構築にも関与していることが示唆されている。また SFRPs はいくつかの悪性腫瘍でアポトーシスシグナル抵抗性を誘導する事が知られており、血液悪性疾患である急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病では CpG island のメチレーションが起き、遺伝子の発現量の変化によるシグナル伝達の変化が分化誘導の異常および悪性化に関与している可能性が報告されている。しかしながら、Wnt/GSK3B シグナルが免疫系でも重要な役割を担っていると考えられているが、このシグナルに寄与している SFRPs の免疫応答への関与については未だ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

SFRP2 は Beta-catenin / GSK3B を介在して胚形成に重要な役割を担っている。同時に、血球系細胞の分化や造血幹細胞の維持、再構築にも関与していることが示唆されているが、未だ免疫応答での機能は明らかになっていない。本研究では、ノックアウトマウスモデルを用いて SFRP2/SDF5 の免疫系における機能解析を行い、分子生物学特性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ノックアウトマウスのバッククロスによる表現型の安定化は終了したので、SFRP2/SDF5 の免疫応答における機能を解析するために以下の2つの点について重点的に検討する。

(1) SFRP2/SDF5 のリンパ球、骨髄球の分化能における機能解析

フローサイトメトリー

コントロール及び SFRP2/SDF5 ノックアウトマウス(以下ノックアウトマウス)から得られた免疫系組織から得たサンプルを CD3, CD4, CD8, B220, MAC-1 など T, B リンパ球および骨髄球に特異的な抗原を染色し、フローサイトメトリーを用いて免疫応答細胞の早期分化能を評価する。細胞分化の異常を認められた場合、骨髄幹細胞移植で骨髄の再構築を行い、

何に問題があるのか(骨髄幹細胞か骨髄環境なのか)再評価を行う。

細胞分化・増殖アッセイ

コントロール及びノックアウトマウスから得られた末梢リンパ節や脾臓、骨髄等からリンパ球、骨髄球、造血幹細胞を分離し、抗CD3抗体、抗IgM抗体、リポポリサッカライド(LPS)などや目的に合わせたサイトカインを用いて細胞を刺激し分化・増殖能を解析する。また正常細胞内でのSFRP2の過剰発現や発現量を低下させて分化・増殖能を解析するも予定している。

末梢リンパ球のサイトカイン産生能評価  
正常及びノックアウトマウスの末梢リンパ球を採取しモネシン、イオノマイシンや PMA で刺激し CD4, CD45RA, IL-4 や IFN を染色し細胞内サイトカイン産生能を比較する。産生能に差を認めた場合、正常細胞などに SFRP2 の発現量を低下させ再評価する。

(2) SFRP2 のリンパ球、骨髄球の免疫応答における機能解析

アポトーシスアッセイ

SFRP2 がアポトーシスに関与するかを検討するためにリンパ球、骨髄球を刺激し、アポトーシスの早期指標である細胞内カスパーゼを比較する事により正常細胞との反応に差異があるか評価する。

細胞内カルシウムシグナルアッセイ

リンパ球や骨髄球では細胞内カルシウムが、細胞刺激後の早期シグナル伝達に大きく関与しているため、抗 CD3 抗体や抗 IgM 抗体などを用いて細胞を刺激し細胞内カルシウム濃度の変化を検討する。

タンパク質リン酸化アッセイ

タンパク質のリン酸化が免疫応答では重要な役割を果たすため、目的に合わせて細胞を刺激し、p38 や Erk1/2 など目的タンパク質のリン酸化を特異的抗体を用いてフローサイトメーター(Phosflow system)などでリアルタイムに解析する。

細胞核 DNA 量の評価(細胞周期)

ノックアウトマウスより得たリンパ球をサイトカインや抗体等で刺激した後、BrdU にて標識し DNA を単鎖化し、抗 BrdU 抗体と反応させ RNase 処理後 PI で二重染色にて細胞周期を解析する。

## 4. 研究成果

最終年度までの目標である機能解析について、フローサイトを用いた解析を軸に行い、免疫細胞、特に B 細胞に特化して分化における機能解析を行った。B リンパ球について骨髄(図 1 A)、脾臓(図 1 B)においては早期分化能に差異は認めなかった。しかしながら、BCR シグナルを介したカルシウムシグナル伝達の異常と思われる現象を

認め(図2A) またそれが細胞外から細胞内へのカルシウム流入に影響を与えている事が解った(図2B)。

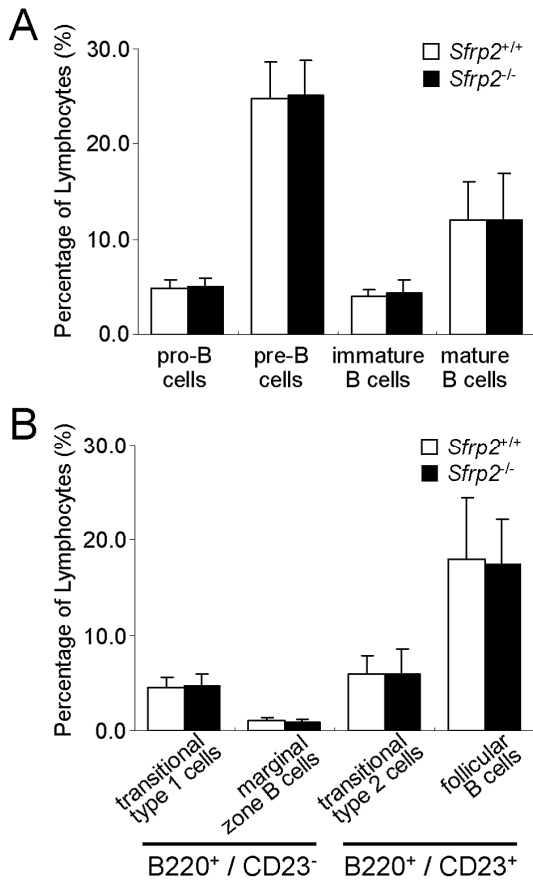


図1 早期分化能解析結果

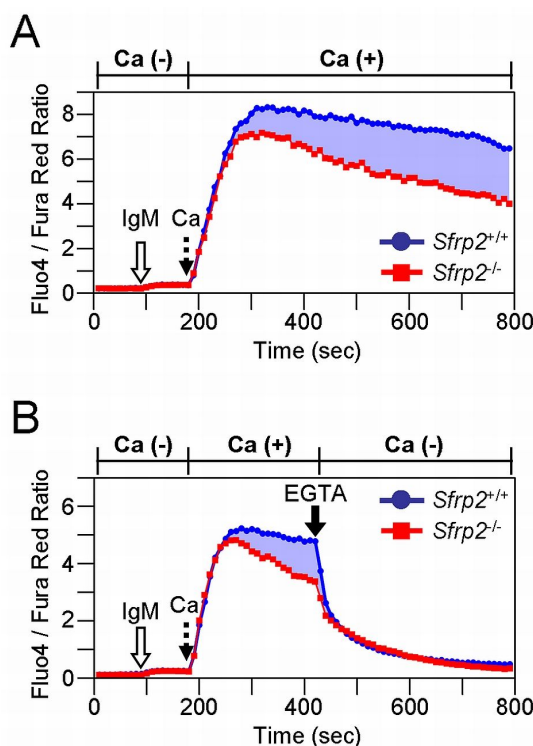


図2 カルシウム流入解析結果

カルシウムシグナルはリンパ球において非常に早期の刺激伝達経路であり、それに引き続くシグナル伝達は細胞の活性化やサイトカインなどの産生に關与する。今回の結果ではカルシウムの細胞内流入にSFRP2が關与していることが示唆された。このことから、主にB細胞でカルシウムシグナルに關与していると考えられているPLCやNFATなどの各種タンパク質の発現量と、それらのリン酸化部位におけるリン酸化、脱リン酸化をウエスタンブロットで解析した。その結果、IgM刺激後のタイムコースを調べたところ、PLCgamma2の活性化についてもK0マウスでは異常を認めた(図3)。

### PLCgamma2

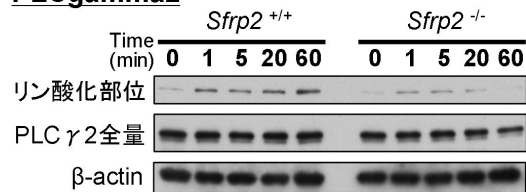


図3 ウエスタンブロット解析結果

これらのことより、SFRP2がBリンパ球においてBCRシグナルを介して活性を調整していることが示唆され、異常なBリンパ球の活性化によって引き起こされる自己免疫疾患などの病態をBCR刺激伝達物質であるSFRP2を介してコントロールすることが可能であるか今後も検討していく。

### 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0件)

[学会発表](計2件)

徳田雄市、田中雅深、八木知人、田代啓

The defects of *Sfrp2* reveal modulating calcium signaling in lymphocytes.

第74回日本血液学会学術集会

2012年10月20日、国立京都国際会館

徳田雄市、田中雅深、八木知人、田代啓

The defect of SFRP2 affects the calcium influx in lymphocytes.

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月4日、神戸ポートアイランド

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

八木 知人 (Yagi, Tomohito)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 50453098

(2)研究分担者

田中 雅深 (Tanaka, Masami)

京都府立医科大学・医学部・プロジェクト  
研究員  
研究者番号：10444994

田代 啓 (Tashiro, Kei)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10263097