

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659239

研究課題名（和文） ADAR1 による体細胞超突然変異導入機序

研究課題名（英文） A role of ADAR1 in induction of somatic hypermutation

研究代表者

徳久 剛史 (TOKUHISA TAKESHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20134364

研究成果の概要（和文）：胚中心B細胞における抗体遺伝子V領域の体細胞超突然変異（Somatic Hypermutation: SHM）導入におけるAdenosine deaminase acting on RNA1(ADAR1)の機能についてADAR1遺伝子改変マウスを用いて調べた。方法は、トランスジェニック（ADAR1-Tg）やコンディショナル欠損（ADAR1-cKO）マウスを抗原NP-CGとアジュバント（Alum）で免疫して、脾臓由来のIgG1陽性の胚中心B細胞の抗体遺伝子V領域（VH186.2）の遺伝子におけるSHM頻度を調べて、正常マウスからの胚中心B細胞におけるSHM頻度と比較解析した。その結果、SHMの頻度はADAR1-Tgマウスでは増加しており、逆にADAR1-cKOマウスでは著しく低下していた。これらの結果から、ADAR1は胚中心B細胞における抗体遺伝子V領域のSHMの導入に機能していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We examined a role of Adenosine deaminase acting on RNA1(ADAR1) in induction of somatic hypermutation (SHM) in germinal center (GC) B cells using ADAR1-transgenic (ADAR1-Tg) and ADAR1-conditional deficient (ADAR1-cKO) mice. After ADAR1-Tg and ADAR1-cKO mice were immunized with NP-CG on Alum, the frequency of SHM in the VH186.2 gene of GC B cells were analyzed. The frequencies in ADAR1-Tg GC B cells and in ADAR1-cKO GC B cells were higher and lower than that in wild type GC B cells, respectively. Thus, ADAR1 plays a role in induction of somatic hypermutations in GC B cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：獲得免疫

1. 研究開始当初の背景

高親和性 IgG メモリーB 細胞は、脾臓やリンパ節内の胚中心で分化する。リンパ濾胞 (Follicle) 内で抗原により活性化された B 細胞が、濾胞ヘルパーT (T follicular helper ; Tfh) 細胞と T/B Collaboration を起こして、Centroblast として増殖して胚中心

を形成する。Centroblast 内では、Activation induced cytidine deaminase (AID) を強発現させて抗体遺伝子 V 領域に体細胞超突然変異 (Somatic Hypermutation: SHM) を導入する。その後、Centrocyte となり IgG ヘクラススイッチして SHM をもつ IgG 抗体を発現させる。この中で高親和性 IgG 抗体を持つ

Centrocyte が濾胞樹状細胞上の抗原と選択的に反応し、GC-Tfh 細胞から IL-4 や IL-21 などの刺激を受けて、メモリー B 細胞へと分化する。

私たちは、胚中心で強発現している BCL6 の欠損 (BCL6-KO) マウスを作製して、BCL6 が胚中心形成に必須であり、胚中心を介した高親和性 IgG メモリー B 細胞の分化に必須であることを明らかにしてきている。次に、BCL6 の胚中心 B 細胞における機能を SHM の導入機序と関連して解析する目的で、BCL6-KO マウスの成熟 B 細胞を活性化して IgG1 ヘクラススイッチさせた時の AID によるスイッチ領域の DNA 突然変異を解析した。その結果、正常マウスの成熟 B 細胞と比較して DNA 突然変異の頻度が倍加し、かつ Adenine (A) から Guanine (G) への突然変異の頻度が異常に上昇していることを見出した。そこで、BCL6-KO マウスの成熟 B 細胞で RNA において A から G (Inosine) への変異誘導活性をもつ遺伝子の発現を解析したところ、Adenosine deaminase acting on RNA1 (ADAR1) 遺伝子の発現が亢進していることを見出した。さらに ADAR1 を正常 B 細胞に過剰発現させてクラススイッチを誘導すると、スイッチ領域の A/T 塩基から G/C 塩基を含む別の塩基への DNA 突然変異が著しく増加することを見出している。

2. 研究の目的

本研究は、RNA 修飾酵素である ADAR1 による活性化 B 細胞の Ig クラススイッチ領域や胚中心 B 細胞での抗体遺伝子 V 領域における A/T 塩基への SHM 導入機序を、ADAR1 遺伝子改変マウスを用いて明らかにする。さらに、BCL6 遺伝子改変マウスで発現異常の見られる ADAR1 遺伝子の発現制御における BCL6 の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ADAR1 による成熟 B 細胞の Ig クラススイッチ領域や胚中心 B 細胞での抗体遺伝子 V 領域における A/T 塩基への SHM 導入機序を明らかにするため、Ig クラススイッチ B 細胞や胚中心 B 細胞における生理的 ADAR1 の発現を Real-time RT-PCR 法で解析する。

(2) ADAR1 遺伝子改変 (トランスジェニック ; ADAR1-Tg やコンディショナル欠損 ; ADAR1-cKO) マウスを用いて、ADAR1 による Ig クラススイッチ領域や抗体遺伝子 V 領域への遺伝子変異導入機序を解析する。Ig クラススイッチ領域の DNA 変異解析では、脾臓由来の成熟 B 細胞を抗 IgM 抗体と抗 CD40 抗体とともに様々な濃度の IL-4 で刺激して IgM 陽性 B 細胞

や IgG1 陽性 B 細胞の Ig-S μ 領域の遺伝子解析をおこなう。また、胚中心 B 細胞での抗体遺伝子 V 領域における A/T 塩基への SHM 導入機序を明らかにするため、抗原 NP-CG とアジュバント (Alum) で免疫して脾臓の胚中心 B 細胞を分取して、抗体遺伝子 V 領域 (VH186.2) の遺伝子解析を行う。

(3) ADAR1 遺伝子の発現制御における BCL6 の機能を明らかにするため、BCL6 遺伝子改変マウス由来の細胞における ADAR1 の発現を Real-time RT-PCR 法で解析したり、ADAR1 遺伝子のプロモーターの支配下にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ組み換え遺伝子を用いて明らかにする。

4. 研究成果

(1) ADAR1 のクラススイッチ B 細胞における発現解析

正常マウスと BCL6-KO マウス脾臓由来の成熟 B 細胞を LPS と IL-4 で刺激し 4 日間培養した。その後経時的に活性化 B 細胞中の ADAR1 と AID の mRNA 量を Real-time RT-PCR 法で解析した。その結果、BCL6-KO の活性化 B 細胞では調べたいずれの時間帯でも ADAR1 の発現は増強していることを見出した (発表論文 1 : J. Biol. Chem. 2013 を参照)。しかし、AID の発現量は、刺激後 2 4 時間で誘導されるが、正常マウスと BCL6-KO マウスでは差が見られなかった。

(2) ADAR1 遺伝子改変マウスを用いたクラススイッチ B 細胞における DNA 変異の導入機序の解析

ADAR1-Tg マウスや ADAR1-cKO マウス脾臓由来の成熟 B 細胞を抗 IgM 抗体と抗 CD40 抗体とともに様々な濃度の IL-4 で刺激して 4 日後の IgM 陽性 B 細胞や IgG1 陽性 B 細胞を FACS で分取した。この IgM 陽性 B 細胞や IgG1 陽性 B 細胞の抗体遺伝子のスイッチ領域の DNA 変異の頻度と A/T 変異の頻度を正常成熟 B 細胞由来の細胞での頻度と比較解析した。その結果、ADAR1-Tg マウスの IgM 陽性 B 細胞や IgG1 陽性 B 細胞では、DNA 変異の頻度 (発表論文 1 : J. Biol. Chem. 2013 を参照) と A/T 変異の頻度が正常マウスと比較して有意に上昇していた。また、ADAR1-cKO マウスの IgG1 陽性 B 細胞では、DNA 変異の頻度と A/T 変異の頻度が有意に低下していた (発表論文 1 : J. Biol. Chem. 2013 を参照)。これらの結果から、ADAR1 は DNA 変異を誘導することが明らかとなった。

(3) ADAR1 の胚中心 B 細胞における発現解

析

正常マウスを抗原 NP-CG とアジュバント (Alum) で免疫して、7 日目と 14 日目における脾臓由来の IgG1 陽性の胚中心 B 細胞を CXCR4 陽性 (High) の Centroblast と陰性 (Low) の Centrocyte に分けて FACS で分取した。これらの胚中心 B 細胞中の ADAR1 や AID の mRNA 量を Real-time RT-PCR 法で解析した。その結果、Centroblast では ADAR1 の発現は抑制されていたが、Centrocyte ではその発現が誘導されることを見出した。逆に AID の発現は Centroblast で強く誘導され、Centrocyte では減少していた。この結果から、ADAR1 は AID と異なり主に Centrocyte でその機能を発現していると考えられた。

(4) ADAR1-Tg マウスを用いた胚中心 B 細胞における SHM 導入機序の解析

ADAR1-Tg マウスを抗原 NP-CG とアジュバント (Alum) で免疫して、免疫後 7 日目と 14 日目における脾臓由来の IgG1 陽性の胚中心 B 細胞を FACS で分取した。これらの胚中心 B 細胞の抗体遺伝子 V 領域 (VH186.2) の遺伝子解析を行った。その結果、ADAR1-Tg マウスの胚中心 B 細胞では、SHM の頻度と A/T 変異の頻度が有意に上昇していることを明らかにした (発表論文 1 : J. Biol. Chem. 2013 を参照)。

(5) ADAR1 による SHM 導入における AID の機能の解析

ADAR1 による SHM 導入において AID が必要であるかを明らかにするために交配により (ADAR1-Tg x AID-KO) マウスを作製した。このマウスを上記 (4) の方法で免疫した後の胚中心 B 細胞における VH186.2 遺伝子の SHM の頻度を解析した。その結果、(ADAR1-Tg x AID-KO) マウスでも AID-KO マウスと同様に胚中心 B 細胞における VH186.2 遺伝子の SHM が全く見られなかった。この結果から、ADAR1 の SHM 導入増強効果において AID が必須であることを明らかにした。おそらくは、ADAR1 は AID と複合体を形成して、その SHM 導入増強効果を発揮していると推察された。

(6) BCL6 による ADAR1 遺伝子の発現制御機序の解析

正常マウスや BCL6-KO、BCL6-Tg マウス由来の成熟 B 細胞での ADAR1 の発現を Real-time RT-PCR 法で解析した。その結果、BCL6-KO マウスの成熟 B 細胞では ADAR1 の発現が亢進し、BCL6-Tg マウスでは逆に低下していた。この結果から、BCL6 が ADAR1 の発現を制御していることが示唆された。そこで、マウスの ADAR1

遺伝子のプロモーター領域における BCL6 の結合配列をデータベースを基に解析したところ、4 か所に BCL6 結合配列を見出した。その領域への BCL6 タンパクの結合を ChIP 法で解析したところ、3 番目の BCL6 結合配列が BCL6 を一番強く結合していることを見出した。次に、3 番目の BCL6 結合配列とルシフェラーゼ遺伝子を用いたプロモーター機能解析法を用いて、3 番目の BCL6 結合配列への BCL6 タンパクの結合や外因性 BCL6 よりルシフェラーゼ遺伝子の発現が抑制されることを見出した (発表論文 1 : J. Biol. Chem. 2013 を参照)。上記の結果から、ADAR1 遺伝子が BCL6 の標的遺伝子のひとつであることを明らかにした。

(7) 生理的 ADAR1 の SHM 導入における機能の解析

ADAR1-cKO マウスを抗原 NP-CG とアジュバント (Alum) で免疫して、免疫後 7 日目と 14 日目における脾臓由来の IgG1 陽性の胚中心 B 細胞を FACS で分取した。これらの胚中心 B 細胞の抗体遺伝子 V 領域 (VH186.2) の遺伝子解析を行い SHM の頻度と A/T 変異の頻度を正常マウスからの胚中心 B 細胞における頻度と比較解析した。その結果、ADAR1-cKO マウスの胚中心 B 細胞では、SHM 頻度と A/T 変異の頻度が低下していることを明らかにした。さらに、CDR1 の領域における SHM が全くみられなかった。この結果から、ADAR1 の一つの機能として AID を CDR1 領域にリクルートするのに必要であることが示唆された。

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 10 件)

1. Tsuruoka, N., Arima, M., Yoshida, N., Okada, S., Sakamoto, A., Hatano, M., Satake, H., Arguni, E., Wang, Ji-Y., Yang, J-H., Nishikura, K., Sekiya, S., Shozu, M., and Tokuhisa, T. ADAR1 protein induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6 gene-deficient cells. *J. Biol. Chem.*、査読有、288:826-836, 2013, PMID: 23209284.
2. Huang, J., Li, X., Kohno, K., Hatano, M., Tokuhisa, T., Murray, P. J., Brocker, T., and Tsuji, M. Generation of tissue-specific H-2K(d) transgenic mice for the study of K(d)-restricted malaria epitope-specific CD8(+) T-cell responses in vivo. *J. Immunol. Methods*、査読有、

- 387:254-261, 2013, PMID: 23142461.
3. Ouchida, R., Mori, H., Hase, K., Takatsu, H., Kurosaki, T., Tokuhisa, T., Ohno, H., and Wang, Ji-Yang. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B cell survival, and humoral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 査読有、109:2699-2706, 2012, PMID: 22988094.
 4. Shigeta, A., Tada, Y., Wang, J.Y., Ishizaki, S., Tsuyusaki, J., Yamauchi, K., Kasahara, Y., Iesato, K., Tanabe, N., Takiguchi, Y., Sakamoto, A., Tokuhisa, T., Shibuya, K., Hiroshima, K., West, J., and Tatsumi, K. CD40 amplifies Fas-mediated apoptosis: a mechanism contributing to emphysema. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 査読有、303:141-151, 2012, PMID: 22610351.
 5. Ohnuki, H., Inoue, H., Takemori, N., Nakayama, H., Sakaue, T., Fukuda, S., Miwa, D., Nishiwaki, E., Hatano, M., Tokuhisa, T., Endo, Y., Nose, M., and Higashiyama, S. BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signalling in angiogenesis. *Blood*, 査読有、119:2688-2698, 2012, PMID: 22279058.
 6. Seto, T., Yoshitake, M., Ogasawara, T., Ikari, J., Sakamoto, A., Hatano, M., Hirata, H., Fukuda, T., Kuriyama, T., Tatsumi, K., Tokuhisa, T., and Arima, M. Bcl6 in pulmonary epithelium coordinately controls the expression of the CC-type chemokine genes and attenuates allergic airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy*, 査読有、41: 1568-1578, 2011, PMID: 21801248.
 7. Hirata, H., Arima, M., Fukushima, Y., Honda, K., Sugiyama, K., Tokuhisa, T., and Fukuda, T. Over-expression of the LTC(4) synthase gene in mice reproduces human aspirin-induced asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 査読有、41:1133-1142, 2011, PMID: 21429049.
 8. Shimada, T., Oda, S., Sadahiro, T., Nakamura, M., Hirayama, Y., Watanabe, E., Abe, R., Nakada, T.A., Tateishi, Y., Otani, S., Hirasawa, H., Tokuhisa, T., and Uno, H. Outcome prediction in sepsis combined use of genetic polymorphisms - A study in Japanese population. *Cytokine*, 査読有、54:79-84, 2011, PMID: 21282064.
 9. Yoshida, N., Kitayama, D., Arima, M., Sakamoto, A., Inamine, A., Takano, H., Hatano, M., Koike, T., and Tokuhisa, T. CXCR4 expression on activated B cells is down-regulated by CD63 and IL-21. *J. Immunol.* 査読有、186:2800-2808, 2011, PMID: 21270405.
 10. Ohtsuka, H., Sakamoto, A., Pan, J., Inage, S., Horigome, S., Ichii, H., Arima, M., Hatano, M., Okada, S., and Tokuhisa, T. Bcl6 is required for the development of mouse CD4⁺ and CD8⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 査読有、186:255-263, 2011, PMID: 21131418.
- [学会発表] (計 9 件)
1. Tokuhisa T. 「Somatic Hypermutation in Germinal Center B Cells」 2nd Chiba-New Zealand joint G-COE symposium. February 23, 2013 (Auckland, New Zealand)
 2. 徳久剛史 「アレルギーは治せるか」 松戸東病院セミナー 平成 24 年 11 月 16 日 (松戸市)
 3. 徳久剛史 「将来構想に基づく博士課程教育リーディングプログラム」 神戸大 G-COE セミナー平成 24 年 10 月 17 日 (神戸市)
 4. 徳久剛史 「免疫記憶細胞の形成と維持」 第 40 回日本臨床免疫学会 教育講演 平成 24 年 9 月 29 日 (東京)
 5. 徳久剛史 「若き臨床研究者たちへ」 第 51 回日本鼻科学会 特別講演 平成 24 年 9 月 28 日 (千葉市)
 6. 徳久剛史 「免疫記憶と慢性アレルギー」 第 6 回日本アミノ酸学会 特別講演 平成 24 年 9 月 28 日 (松戸市)
 7. 徳久剛史 「免疫記憶細胞の形成と維持」 市川免疫研究会 平成 24 年 6 月 27 日 (市川市)
 8. Tokuhisa T. 「B cell activation and memory」 第 40 回日本免疫学会 シンポジウム 平成 23 年 11 月 27 日 (千葉市)
 9. 徳久剛史 「老化すると免疫記憶にもボケがでるか？」 第 11 回日本抗加齢医学会 シンポジウム 平成 23 年 5 月 28 日 (京都)

〔図書〕(計3件)

1. 徳久剛史、「B細胞免疫記憶研究の最先端と今後の展望」羊土社、実験医学 29 : 70-75, 2012.
2. 徳久剛史、「耐性と免疫記憶」東京医学社、小児内科 43 : 1839-1842, 2012.
3. 吉田 修也, 徳久 剛史、「胚中心におけるB細胞の移動とCXCR4の発現調節」科学評論社、臨床免疫・アレルギー科 58:266-274, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

分化制御学教室のホームページのURLは、以下の通りである。

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devgen>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳久 剛史 (TOKUHISA TAKESHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20134364

(2) 研究分担者

有馬 雅史 (ARIMA MASAFUMI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：00202763

(3) 連携研究者

なし