

## 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 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790530

研究課題名（和文）pre-BCRダウンレギュレーションにおけるリソソーム膜分子Laptm5の役割

研究課題名（英文）The role for Laptm5 in the down-modulation of pre-B cell receptor

研究代表者

河野 洋平（KAWANO YOUHEI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20401383

研究成果の概要（和文）：

プレB細胞受容体（pre-BCR）はB細胞分化に重要であり、その制御異常により白血病をひきおこすことから、その発現は厳密に制御されていなければならない。しかし、pre-BCRの制御メカニズムについてはあまり調べられていない。我々は今回の研究により、リソソーム膜タンパク質であるLaptm5がpre-BCRの発現終焉に関与していることを発見した。Pre-BCRからのシグナルによりLaptm5が発現増加し、その後pre-BCRのリソソームでの分解を促進することで細胞表面上の活性化pre-BCRの発現を抑制することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Pre-B cell receptor (pre-BCR) expression has to be strictly regulated for normal B cell development, and its dysregulation is associated with anomalies of B-lineage cells, including leukemogenesis. However, it remained elusive on the mechanism underlying pre-BCR down-modulation although transcriptional silencing of pre-BCR component is currently proposed. In this paper, we found that a lysosomal membrane protein, Laptm5 is up-regulated via autonomous pre-BCR signaling, followed by pre-BCR down-modulation by promoting its degradation in lysosomes. Of note, this finding suggests there is another mechanism of pre-BCR down-modulation at the protein level through the regulation of Laptm5.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：プレB細胞、pre-BCR

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本は少子高齢化が大きな社会問題となっており、さらに産科、小児科医の不足がそれに拍車をかけている。その不足の迅速な補充だけでなく、小児疾患に対する新規治療法の開発など、小児医療のさらなる充実化による小児生存率の向上も重要な少子化対策とし

て必要である。小児死亡率で高いのは小児悪性腫瘍であり、そのうち最も多いのは急性リンパ性白血病(ALL)である。中でもB前駆細胞型とよばれる、正常に分化することのできなくなった未分化のB細胞に由来するものが大部分を占めている。このことから正常なB前駆細胞の増殖メカニズムを知るこ

とがこのタイプのがんの理解とその治療にむけての有力な手がかりとなる。こうした意味で B 細胞初期分化の中で増殖と最も関わりの深いものとしてプレ B 細胞レセプター (preBCR) があげられる。preBCR は  $\mu$ H 鎖、VpreB/ $\lambda$ 5 (SL 鎖)、Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ から構成され、骨髄中の B 前駆細胞 (プレ B 細胞) 表面に一過性に発現している。近年、preBCR は恒常的な活性化レセプターであることが明らかとなり、プレ B 細胞の増殖をコントロールすることで B 細胞のホメオスタシスを維持していると考えられている。実際、preBCR 欠損マウスにおいては顕著な B 細胞分化障害がみられているだけでなく、これまでに同定された B 細胞欠損型のヒト先天性免疫不全症の原因遺伝子のすべてが preBCR に関連したものであることからその重要性が明らかとなっている。

これまでプレ B 細胞の増殖における preBCR を介した正のシグナル伝達機構については多くの報告があるが、負に調節するメカニズムはほとんど研究されておらず、ここにきてその重要性が指摘されている。したがって preBCR の発現抑制メカニズムを解明することは学術的研究価値の高いものであるだけでなく、臨床的観点からも大変意義のあるものである。

## 2. 研究の目的

骨髄中の幼弱なプレ B 細胞に発現するプレ B 細胞受容体 (preBCR) は、その発現が高すぎると急性リンパ性白血病 (ALL) を発症し、全く機能しないと免疫不全や自己免疫疾患につながることから、厳密に発現制御されなければならない。我々は preBCR の発現抑制メカニズムを調べ、リソソーム膜分子である Laptm5 が重要な役

割を担うことを新たに発見した。本研究計画ではその作用機序の解明とともに、ALL や自己免疫疾患の新規治療法開発の基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

我々は遺伝子ノックダウン法を用いて preBCR ダウンレギュレーションに関わる分子のスクリーニング系を独自に開発することに成功している。この方法を用いて preBCR ダウンレギュレーションに関わる分子の同定を行った。分子生物学的手法を用いてこの候補分子の変異体を作製することで preBCR ダウンレギュレーションに重要な部位を同定した。また、共焦点顕微鏡やウェスタンブロット法など生化学的手法を利用し、ノックダウン細胞やリソソーム阻害剤などの薬剤を組み合わせることで preBCR のリソソーム分解とこの分子との関係を調べた。その他いくつかのプレ B 細胞株を用いることで、preBCR ダウンレギュレーションにおけるこの分子の役割を調べた。候補分子の遺伝子欠損マウスのプレ B 細胞において preBCR の発現あるいは増殖、分化に異常があるかどうかを調べた。また preBCR 欠損マウスと交配させることにより作製したマウスのプロ B 細胞に preBCR を再構築させた *in vitro* 分化システムを用いて preBCR の発現あるいは増殖、分化を調べた。

## 4. 研究成果

我々はプレ B 細胞株を用いて、preBCR の発現終焉がおこる過程でリソソーム膜分子である Laptm5 が増加することを見つけた。そこで当該年度ではまず preBCR の発現終焉時の Laptm5 の発現を qRT-PCR お

よびウエスタンブロット法にて調べたところ、8-24 時間後に mRNA およびタンパクレベルで Laptm5 が増加していることがわかった。増加した Laptm5 はリソソームに局在していることが共焦点顕微鏡によって観察された。興味深いことに、通常 pre-BCR は細胞内の小胞体に多く分布していたが、preBCR の発現終焉時に laptm5 とともにリソソームに共局在することがわかった。このことから Laptm5 はリソソームでの preBCR 分解を促進することで細胞表面上の preBCR を低下させていることが考えられた。実際、リソソーム阻害剤を添加しておくことで pre-BCR の発現終焉は抑制されることがわかった。また、in vivo でのプレ B 細胞における Laptm5 の役割を調べるため、Laptm5 欠損マウスの preBCR 発現レベルをフローサイトメーターにて調べたところ、野性型マウスと比較して有意に上昇していることがわかった。このことから生体においても Laptm5 が pre-BCR の発現終焉に関与することがわかった。

#### 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 1 件)

1. Kawano, Y., Ouchida, R., Wang, et al.: A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosomal-associated protein transmembrane 5. *Mol. Cell. Biol.* 32: 4462-71, 2012.

[学会発表] (計 3 件)

1. Kawano, Y., Ouchida, R., O-Wang, J., Yoshikawa, S., Yamamoto, M., Kitamura, D., Karasuyama, H.: A novel mechanism

for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosome-associated protein transmembrane 5. Keystone Symposia-B cell development and function-, Keystone, Colorado, USA, 10-15 Feb, 2013

2. Kawano, Y., Ouchida, R., O-Wang, J., Yoshikawa, S., Yamamoto, M., Kitamura, D., Karasuyama, H.: A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosome-associated protein transmembrane 5. The 35<sup>th</sup> MBSJ annual meeting. Fukuoka 2012.12.10-14
3. Kawano, Y., Ouchida, R., O-Wang, J., Yoshikawa, S., Yamamoto, M., Kitamura, D., Karasuyama, H.: Laptm5 down-modulates pre-B cell receptor in an autophagy-independent manner. The 41<sup>th</sup> JSI annual meeting. Chiba 2011.11.27-29.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 洋平 (KAWANO YOUHEI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20401383

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：