

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 31 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791116
 研究課題名（和文）G5PR過剰発現マウスにおけるB1細胞異常増加と自己免疫疾患
 発症機構の解明
 研究課題名（英文）The analysis of development of autoimmune disease and abnormal
 expansion of B-1 cells in G5PR transgenic mice
 研究代表者
 北畠 正大（KITABATAKE MASAHIRO）
 熊本大学・生命科学研究部・助教
 研究者番号：60457588

研究成果の概要（和文）：

自己免疫疾患では自己反応性B細胞の異常増殖、活性化により、自己抗体が産生され、障害を引き起こす。我々は、セリン/スレオニン脱リン酸化酵素PP2A制御分子であるG5PRの発現異常が、自己反応性B-1a細胞の異常増殖を引き起こし、自己免疫疾患を発症させることを見いだした。B-1a細胞におけるG5PRの過剰発現は、細胞死に関わる細胞内シグナル伝達の活性化を抑制し、抗原刺激による細胞死を顕著に抑制した。これらの結果から、G5PRが自己反応性B-1a細胞の生存、選択を制御し、自己免疫疾患発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the autoimmune disease, auto-reactive B cells are activated and produce the autoantibodies, which induce the tissue injury. We found that abnormal expression of G5PR, one of the B¹ regulatory subunit of the serine/threonine protein phosphatase 2A, induced the expansion of B-1a cells in the peritoneal cavity and generation of autoantibodies in mice. Over-expression of G5PR in B-1a cells suppressed the JNK-mediated apoptotic signal pathway and rescued from activation-induced cell death by antigen stimulation. These results suggest that G5PR may play a pivotal role in B cell selection for B-1a cells and in the development of autoimmune disease.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学、自己免疫疾患、B-1 細胞、抗原受容体シグナル

1. 研究開始当初の背景

全身性自己免疫疾患の患者では自己抗体を産生する自己反応性 B 細胞の増加が認められる。これは自己反応性 B 細胞が細胞死を誘導せずに、増殖・活性化するためと考えられる。抗原受容体への抗原の結合は B 細胞の活性化や細胞増殖を誘導するが、同時に細胞死刺激も誘導する。それは Ig α /Ig β を介して伝達される抗原受容体信号シグナルが PI3K 経路、MAPK 経路、NF- κ B 経路などの様々な分子を活性化させ、細胞周期関連遺伝子やアポトーシス関連遺伝子の転写、翻訳後調節など多様な現象を引き起こすためである。抗原受容体シグナルは種々の分子により正または負に制御されており、それらの発現の異常は抗原受容体刺激による細胞死を変化させ、自己抗体産生源と考えられている B-1a 細胞の異常増殖を引き起こし、自己免疫疾患を発症することが示されている (Annu. Rev. Immunol. 2002. 20:253)。このことは、抗原受容体シグナル伝達の異常が免疫寛容の破綻を引き起こし、自己免疫疾患を発症させることを示唆している。

抗原受容体シグナルの調節機構にはタンパク質リン酸化-脱リン酸化制御があげられる。抗原受容体刺激は Ig α /Ig β の ITAM に動員される Lyn、Syk チロシンリン酸化酵素がその端初となり、種々のアダプター分子を介してセリン/スレオニンリン酸化反応として増幅される。セリン/スレオニン脱リン酸化酵素 PP2A はリン酸化カスケードを負に制御するが、その標的分子は結合する調節サブユニットによって決定される。高親和性抗体の産生に必須な分子である GANP の結合タンパク質として同定された G5PR は PP2A と結合し、PP2A の機能を制御する (Genes Cells. 2002.

7:821)。G5PR は B 細胞において抗原刺激時に Btk を介したシグナルにより発現が上昇すること、胚中心において強く発現すること、G5PR 欠損 B 細胞は抗原刺激による JNK および Bim のリン酸化が亢進して細胞死が増加することから、抗原刺激時のアポトーシスの回避に機能すると考えられている (J. Exp. Med. 2005. 202:707、BBRC. 2006. 340:338)。これらは、G5PR が抗原受容体シグナルを調節することを示し、G5PR の発現変化は自己反応性 B 細胞クローンの排除に影響を与えることを示唆する。

2. 研究の目的

我々は G5PR の発現異常が自己免疫疾患発症と関連する可能性を考え、自己免疫疾患自然発症モデル NZB マウスを解析したところ、異常増殖を引き起こした腹腔 B-1a 細胞で G5PR が高発現していた。そこで、*murin Ick proximal promoter* および *Ig intronic H-chain enhancer* により、B 細胞および T 細胞に G5PR を過剰発現するトランスジェニック (G5PR^{tg}) マウスを C57BL/6 背景で作製した。雌性 G5PR^{tg} マウスは加齢により腹腔 B-1a 細胞の増加、抗 DNA 抗体産生が認められた。このことは、雌性 G5PR^{tg} マウスは加齢に伴い自己免疫疾患を発症する新規の自己免疫疾患モデルマウスであることを示し、G5PR の過剰発現は B-1a 細胞の免疫寛容の破綻を引き起こし、自己免疫疾患を発症させることを示唆する。本申請では G5PR 過剰発現による B-1a 細胞の異常がどのような要因に基づくのかを明らかにし、B-1a 細胞異常増殖の原因究明と自己免疫疾患発症のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) G5PR^{tg}マウスにおける自己免疫疾患発症の解析

自己免疫疾患の発症は雌性の加齢 G5PR 過剰発現マウスにおいて認められたことから、性差、加齢が自己免疫疾患発症に影響するかを解析した。雌雄の G5PR^{tg}マウスにおける抗 DNA 抗体と抗核抗体の産生を ELISA、Hep2 細胞染色により、腎糸球体への免疫複合体の沈着を傾向免疫染色により解析した。

(2) G5PR 過剰発現細胞株における細胞死制御

G5PR を過剰発現させるため組換えレトロウイルスベクターを作製し、マウス B 細胞株 WEHI-231 細胞に感染させ、G5PR を過剰発現する細胞株 (WEHI-G5PR) を樹立した。WEHI-G5PR 細胞を抗 IgM 抗体により抗原受容体刺激を行い、活性化誘導細胞死 (AICD) への影響を FACS により解析した。また、細胞内シグナル伝達分子、apoptosis 関連分子の活性化、発現を western blotting、定量性 RT-PCR により解析した。

(3) G5PR 発現上昇が B-1a 細胞の細胞増殖、細胞死に与える影響の解析

NZB マウスや雌性の加齢 G5PR^{tg} マウスや B-1a 細胞の増加し、自己免疫疾患を発症する。G5PR 過剰発現による B-1a 細胞の抗原受容体刺激および LPS 刺激による細胞増殖、活性化誘導細胞死への影響を [³H]-thymidine 取り込み、FACS により解析した。また、抗原受容体シグナル伝達分子の活性化について western blotting により解析した。

4. 研究成果

(1) G5PR^{tg}マウスにおける自己免疫疾患発症の解析

雌性の加齢 G5PR^{tg} マウスにおいて抗 DNA 抗体の産生が認められたことから、自己抗体産生における性差、加齢の影響を解析した。抗

DNA 抗体および抗核抗体の産生は、若齢の G5PR^{tg} マウスおよび雄性の加齢 G5PR^{tg} マウスでは認められず、雌性の加齢 G5PR^{tg} マウスにのみ認められた。また、自己抗体を検出したマウスは、IgG および C3 からなる免疫複合体の沈着が腎糸球体に認められた。これらの結果より、G5PR 過剰発現による自己免疫疾患発症にはヒト SLE 同様に性差があり、加齢が必要であることが示唆された。

(2) G5PR 過剰発現細胞株における細胞死制御

G5PR 発現上昇により、細胞死への影響、細胞内シグナル伝達に与える影響を詳細に解析するために、まず細胞株を用いて実験を行った。G5PR 過剰発現細胞 (WEHI-G5PR 細胞) は、抗 IgM 抗体によって誘導される細胞死が顕著に抑制された。この際、NF- κ B 経路、Akt 経路、ERK 経路および p38 経路の活性化に変化はなかったが、JNK およびその下流の c-Jun の活性化が抑制されていた。また、抗アポトーシス遺伝子 Bcl-2、Bcl-xL の発現には変化は認められなかったがプロアポトーシス遺伝子である、Bim の発現上昇が mRNA レベルおよびタンパクレベルで抑制されていた。これらの結果から、G5PR の過剰発現は抗原受容体刺激によって誘導される JNK-c-Jun-Bim の経路の活性化を抑制することにより、細胞死を抑制させることが示唆された (図 1)。

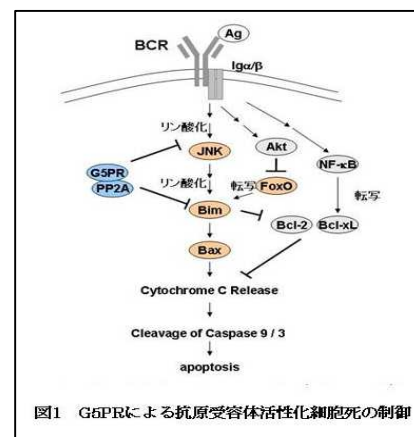


図1 G5PRによる抗原受容体活性化細胞死の制御

(3) G5PR 発現上昇が B-1a 細胞の細胞増殖、細胞死に与える影響の解析

雌性の加齢 G5PR^{tg} マウスは B-1a 細胞の異常増加が認められることから、刺激依存性の細胞死、細胞増殖に与える G5PR 過剰発現の影響を解析した。抗原受容体刺激による細胞死は G5PR^{tg} マウスの B-1 細胞で顕著に抑制されており、誘導される JNK の活性化、Caspase-3 の活性化が抑制されていた。NZB マウスの B-1a 細胞においても、抗原受容体刺激による細胞死の抑制、JNK の活性化の抑制が認められた。一方、抗原受容体刺激および LPS 刺激による細胞増殖は野生型マウスの B-1a 細胞と同等であった。これらの結果より、B-1a 細胞においても、G5PR は JNK を介した経路の活性化を制御し、細胞死を抑制することが、B-1 a 細胞の増加を引き起こし、疾患発症に繋がること示唆された。

本研究により、G5PR を介した脱リン酸化酵素調節による細胞内シグナル伝達の異常が、本来排除されるべき自己反応性 B-1a 細胞の細胞死を抑制し、自己免疫疾患を発症させることを明らかにした。G5PR は本研究室で独自に同定した分子であり、G5PR を介する脱リン酸化酵素の調節による自己免疫疾患発症のメカニズムの解明は、国内外においても独創的な研究であり、これらの成果は、第 40 回および第 41 回日本免疫学会学術集(学会発表①②)において口頭発表に選ばれ、また、免疫学専門誌 Journal of Immunology(雑誌論文②)に掲載された。G5PR^{tg} マウスは単一遺伝子の発現上昇が B-1a 細胞の増加と自己免疫疾患を発症させる新しい疾患モデルであり、疾患発症には性差があり、加齢を必要とすることから、SLE などに認められる性差や加齢、炎症の影響等、ヒトの自己免疫疾患の発症に重要な情報を提供できると考えている。今後、G5PR の発現上昇がいつ、どのようにして起こり、B-1a 細胞の選択、活性化に影響を与える

のか、その分子機構を解析することにより、疾患発症の原因の究明の糸口となると考えられる。また、G5PR や PP2A が新規の自己免疫疾患治療のターゲットや疾患マーカーとなる可能性も含め、新しい治療法の開発が期待される

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 3 件)

- ① Kuwahara Kazuhiko, Nakaya Teruo, Phimsen Suchada, Toda Teppei, Kitabatake Masahiro, Kaji Tomohiro, Takemori Toshitada, Watanabe Takeshi, and Sakaguchi Nobuo.
Lyn signaling to upregulate GANP is critical for the survival of high-affinity B cells in germinal centers of lymphoid organs.
Journal of Immunology、査読有、189巻、2012、3472-3479、
DOI:10.4049/jimmunol.1200649
- ② Kitabatake Masahiro, Toda Teppei, Kuwahara Kazuhiko, Igarashi Hideya, Ohtsuji Mareki, Tsurui Hiromichi, Hirose Sachiko, and Sakaguchi Nobuo.
Transgenic overexpression of G5PR that is normally augmented in centrocytes impairs the enrichment of high-affinity antigen-specific B cells, increases peritoneal B-1a cells, and induces autoimmunity in aged female mice.
Journal of Immunology、査読有、189巻、2012、1193-1201、
DOI:10.4049/jimmunol.1102774

- ③ Phimsen Suchada, Kuwahara Kazuhiko, Nakaya Teruo, Ohta Kazutaka, Suda Taiji, Rezano Andri, Kitabatake Masahiro, Vaeteewoottacharn Kulthida, Okada Seiji, Tone Shigenobu, and Sakaguchi Nobuo.
Selective cell death of p53-insufficient cancer cells is induced by knockdown of the mRNA export molecule GANP.
Apoptosis、査読有、17巻、2012、679-690、DOI:10.1007/s10495-012-0711-8.

[学会発表] (計2件)

- ① 北嶋正大、他、
Survival of antigen-driven germinal center B-cell is controlled by centrocyte-associated expression of apoptosis-regulator G5PR.
第41回日本免疫学会学術集、2012. 12. 07、神戸国際会議場 (兵庫)
- ② 北嶋正大、他、
An apoptotic regulator G5PR is highly expressed in centrocytes and critical for B cell survival in mice.
第40回日本免疫学会学術集、2011. 11. 26、幕張メッセ (千葉)

[図書] (計1件)

- ① 北嶋正大、阪口薫雄、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科 57巻「自己免疫疾患とB1細胞」 2012、pp. 125-132,

[その他]

ホームページ

<http://www.k-immu.jp/ja/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北嶋 正大 (KITABATAKE MASAHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：60457588

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し