

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590286

研究課題名(和文) PRMT1シグナル伝達系の免疫反応および免疫関連疾患発症における役割

研究課題名(英文) The role of PRMT1 signal on immune response and immune related disease

研究代表者

秦 喜久美 (HATA, KIKUMI)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：30287156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞特異的PRMT1欠損マウスを作成し、B細胞の分化・機能におけるPRMT1の役割を解析した。その結果PRMT1は、B細胞の分化に必要であること、PRMT1を欠失させることにより、T細胞非依存性の抗体産生は減少し、T細胞依存性の抗体産生は増加していることを明らかにした。この結果は、同じ抗体産生であってもT細胞の関与によりそのメカニズムが異なること、PRMT1はそれぞれ正反対に機能していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1), a major PRMT in mammalian cells, has been shown to play a crucial role in multiple biological functions in vitro. To explore the role of PRMT1 in B cells in vivo, we generated B cell-specific PRMT1-deficient (Prmt1^{-/-}) mice using a Cre-loxP system. The Prmt1^{-/-} mice showed a defect in B cell development with diminished levels of serum antibodies. Specific antibody response in Prmt1^{-/-} mice was absent following stimulation with the type 2 T cell independent antigen NP-Ficoll but intact with the T cell-dependent antigen NP-OVA. Our finding is the first evidence that PRMT1 is necessary for lymphocyte functions in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：アルギニンメチル化 抗体産生

1. 研究開始当初の背景

(1) アルギニンメチル化とは、タンパク質修飾の一つで、タンパク質のアルギニン残基をメチル化する反応である。この反応を触媒する酵素が PRMTs (arginine methyltransferases) である。このメチル化が、タンパク質間相互作用が調節することにより、①シグナル伝達、②mRNA のスプライシング、③転写制御、④DNA 修復、⑤タンパク質の局在を制御している。PRMTs はファミリーを形成しているが、生体内では PRMT1 が最も多く発現している。その機能解析が待たれているが、PRMT1 欠損マウスは胎生致死であるため、*in vivo* における解析が遅れている。

(2) ダイナミックな動態を示す免疫担当細胞はこの多様な PRMT1 の機能を解析する有用なモデルである。例えば、リンパ球を中心とする免疫系細胞は成熟・分化により多様なレパートリーを形成し、細胞間相互作用を介して効率的に異物を排除することによって環境への適応性を獲得している。これらの免疫細胞の振る舞いは、細胞膜受容体を介するシグナルが、分岐・収束を繰り返しながら、核・ミトコンドリアなどの細胞小器官へと伝達されるシグナル伝達経路によって決定されている。このシグナル経路の変様には細胞内シグナル伝達分子の修飾が深く関わっており、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化、アルギニンメチル化などの修飾が知られている。

(3) 我々は B リンパ球抗原受容体を介するリンパ球細胞死 (アポトーシス) の誘導機序を解析する中で、ストレスキナーゼ JNKs (c-Jun N-terminal kinases) 活性化がミトコンドリアにおける細胞死のコミットメントに関わっていること、および細胞増殖抑制作用をもつ Btg1/Btg2 が PRMT1 活性化を介して細胞増殖の抑制・細胞死を誘導していることを明らかにした (Hata et al. *Exp Cell Res* 313:3728, 2007)。また、アルギニンメチル化酵素抑制剤を用いた検討により、アルギニンメチル化が抗体産生に重要な役割を果たしていることが分かった (Hata et al. *Microbiol Immunol* 57:185, 2013)。さらに、Reth らは PRMT1 が B リンパ球の抗原受容体複合体と会合しており、B 細胞分化を促進すると主張している (Reth et al. *J Exp Med* 207:711, 2010)。一方、B リンパ球抗原受容体を介する細胞死誘導系では、転写因子 FOXO3a が核移行し、転写調節を介して細胞死誘導に関わっていることが報告されている (Chandramohan et al. *J Immunol* 172:5522, 2004)。

2. 研究の目的

B 細胞の分化・機能におけるアルギニンメチル化酵素 PRMT1 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PRMT1^{fl/fl} と CD19^{+cre} を掛け合わせ、PRMT1^{fl/fl}CD19^{+/+} と PRMT1^{fl/fl}CD19^{+cre} を作成する。PRMT1^{fl/fl}CD19^{+/+} をコントロールマウス、PRMT1^{fl/fl}CD19^{+cre} を B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウスとする。

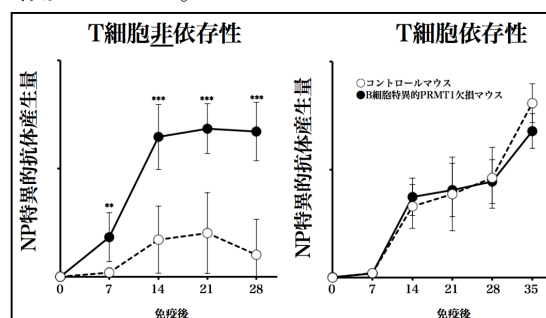
(2) コントロールマウスと B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウスとで、各分化段階での B 細胞の sub population、免疫応答を比較する。

4. 研究成果

(1) コントロールマウスと比較すると、B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウスでは、各分化段階の B 細胞の sub population は有意に減少していた。特定の分化段階に参与していることを示すデータはなかった。

(2) 血清中のイムノグロブリン濃度は、IgM、IgG2a、IgG2b と IgG3 が B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウスで有意に減少していた。IgG1 と IgA は両マウスで差がなかった。

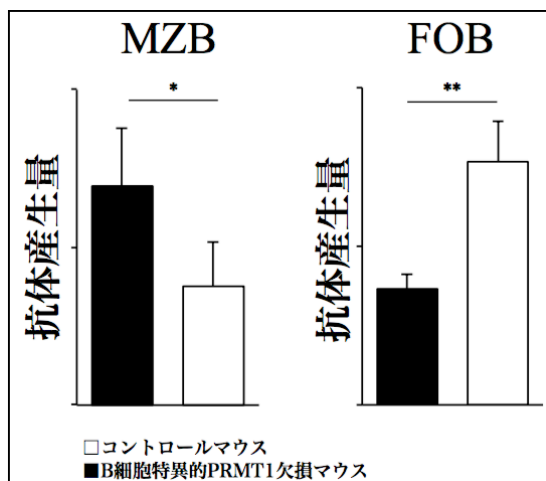
(3) 免疫応答を見るために、両マウスを NP-Ficoll (T 細胞非依存性抗体産生を誘導する) または NP-OVA/Alum (T 細胞依存性抗体産生を誘導する) で免疫し、経時的に血清を回収し NP 特定の抗体の産生を測定した。その結果 T 細胞依存性抗体産生は両マウスで有意な差がなかったが、T 細胞非依存性抗体産生は B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウスで有意に減少していた。



しかしながら、T 細胞非依存性の抗体産生を担う marginal zone B cells (以下 MZB 細胞とする) と T 細胞依存性の抗体産生を担う follicular B cells (以下 FOB 細胞とする) はどちらも、B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウスで有意に減少していた。このことから、T 細胞非依存性の抗体産生の減少は単にその細胞数の減少を反映しており、逆に T 細胞依存性の抗体産生は FOB 細胞数が減少しないにも関わらず抗体産生量に差がないことから、PRMT1 の欠損では 1 個の細胞の抗体産生能が増強している可能性が示唆された。

(4) MZB 細胞と FOB 細胞の抗体産生能を比較するため、それぞれの細胞をソートし *in vitro* で刺激し抗体産生を誘導した。その結果、MZB 細胞では B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウス由来の細胞の方が抗体産生量が低かつ

たが、逆に、FOB 細胞では B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウス由来の細胞の方が抗体産生量が高かった。刺激後の細胞数は、MZB 細胞と FOB 細胞どちらも B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウス由来の方が少なかった。



つまり T 細胞非依存性の抗体産生が減少していたのは、その抗体産生を担う MZB が減少していたのが主な原因と考えられた。一方 T 細胞依存性の抗体産生では、1 個の抗体産生細胞の抗体産生能が増強しており、その増強が抗体産生を担う FOB 細胞の減少を補っているものと考えられる。

(5) MZB 細胞と FOB 細胞を刺激すると、どちらも B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウス由来の細胞数が減少していたことから、B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウス由来の細胞は増殖が抑制されているのではと考えられた。これを確かめるために両マウスからソートした MZB 細胞と FOB 細胞を CFSE ラベルし、刺激後の CFSE の蛍光強度の減衰をフローサイトメーターで測定した。その結果両マウスにおいて CFSE の蛍光強度の減衰をパターンに差が見られなかったことから、コントロールマウスと B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウスでは増殖には差がないことが分かった。

(6) T 細胞非依存性と T 細胞依存性の抗体産生誘導の違いは、B 細胞上の CD40 からのシグナルの有無である。そこで、両マウスから splenic B 細胞を精製し anti-CD40 で刺激し、24 時間後の活性化マーカーの発現を比較した。その結果、CD69、CD80、CD86 及び MHC class II の発現誘導は、両マウスで差は見られなかった。

B 細胞特異的 PRMT1 欠損マウスでは、T 細胞依存性の抗体産生能の増強が認められた。抗体産生量の増強のメカニズムとして先ず考えられるのは、抗体遺伝子の転写・翻訳・分泌の活性化である。また抗体は軽鎖と重鎖のヘテロ 4 量体である。その折りたたみと会合に働いているのが BiP/GRP78 タンパク質である。このタンパク質は PRMT1 をノックダウンした神経細胞では発現が増加していること

が報告されており、今回の抗体産生の増加にもこの BiP/GRP78 タンパク質の関与が示唆される。

B 細胞が抗体産生細胞に分化するときその抗体産生量の増加により小胞体ストレス起き、小胞体ストレスに起因して XBP1 の発現が誘導される。XBP1 は B 細胞の適切な抗体産生に必須な転写因子であり、この XBP1 が PRMT1 の発現を誘導することが報告されている。つまり PRMT1 は小胞体ストレスによって誘導され抗体の品質管理に関与していることが示唆される。この場合においては PRMT1 が欠損していることにより品質管理のチェックを受けることなく抗体が産生されるため、産生量が増加しているのかもしれない。しかしながら、NP 特異的抗体のアフィニティは両マウスで差が見られないことから、品質管理のチェックを補完する何からのメカニズムが存在すると思われる。

現在ガンや自己免疫疾患の治療に使用されている抗体医薬、CHO 培養細胞によって生産されている。抗体医薬は劇的に効く一方医療経済から見るととても高く抗体の生産性を上げることはとても重要である。PRMT1 は抗体産生に関与していることから、PRMT1 を標的にすることにより、患者様の負担の軽減につながると思われる。

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 1 件)

- ① Hata K, Yanase N, Sudo K, Kiyonari H, Mukumoto Y, Mizuguchi J, Yokosuka T, Differential regulation of T-cell dependent and T-cell independent antibody responses through arginine methyltransferase PRMT1 in vivo. FEBS Lett. 査読あり, 590, 2016, 1200-1210. DOI: 10.1002/1873-3468.12161.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 秦喜久美、矢那瀬紀子、水口純一郎 Differential regulation of T-cell dependent and independent antibody responses by protein arginine methyltransferase (PRMT) 1 第 43 回 日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ② 秦喜久美、矢那瀬紀子、水口純一郎 Participation of arginine methyltransferase 1 in B cell development and differentiation. 第 42 回日本免疫学会学術集会 2013 年 12 月 12 日 幕張メッセ (千葉県・千葉市)
- ③ K. Hata, N. Yanase, E. Takada, J. Mizuguchi, Participation of arginine methyltransferase 1 in B cell development and differentiation. 15th

〔図書〕（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 喜久美 (HATA, Kikumi)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：30287156

(2) 研究分担者

高田 栄子 (TAKADA, Eiko)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：50110903