

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 9 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460604

研究課題名(和文) IgM受容体による液性免疫の促進と自己免疫の回避の分子機構の解明

研究課題名(英文) Role of IgM Fc receptor in enhancing humoral immune responses and preventing autoimmunity

研究代表者

王 継揚 (Wang, Ji-Yang)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：80231041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：以下の研究成果が得られた。1) IgM Fc receptor (Fc $\mu$ R) はIgM B細胞受容体と物理的に相互作用し、高原刺激後の濾胞B細胞の生存と活性化を促進する。2) 外来抗原に対する抗体産生を促進し、かつ自己抗体の産生を抑制する。3) Fc $\mu$ R とIgG受容体(Fc R2B)は競合して、B細胞の活性化を正と負に制御する。4) 辺縁帯B細胞の初期分化、成熟、活性化と抗体産生細胞への分化を促進する。即ち、Fc $\mu$ Rは免疫系の恒常性維持に重要な役割を果たすことを明確にした。

研究成果の概要(英文)：The following achievements were obtained: 1) The IgM Fc receptor (Fc $\mu$ R) physically interacts with the B cell receptor and promotes the survival and activation of antigen-stimulated B cells; 2) Fc $\mu$ R enhances the antibody production against foreign antigens yet suppresses autoantibody production; 3) Fc $\mu$ R and IgG Fc receptor (Fc R2B) compete with each other to positively and negatively regulate B cell activation; 4) Fc $\mu$ R is required for the normal development, maturation, activation and differentiation into antibody-producing plasma cells of the marginal zone B cells. In summary, Fc $\mu$ R plays a critical role in the maintenance of immune system homeostasis.

研究分野：免疫学

キーワード：IgM Fc receptor B lymphocyte Humoral immunity

### 1. 研究開始当初の背景

40年以上前に、抗原特異的なIgMを予め投与しておくことで、直後に投与される抗原に対する特異的IgG抗体の産生が著しく亢進することが示唆された(*J. Exp. Med.* 128: 133-152, 1968)。抗原特異的IgM投与による液性免疫の促進は、IgM抗原複合体により活性化された補体が、濾胞樹状細胞(FDC)上の補体受容体CD21/CD35に結合することによる抗原の捕捉促進や、抗原提示能の増強、並びにB細胞上の補体受容体CD21/CD35を介したB細胞活性化の促進によるものと推測されていた(*J. Exp. Med.* 167: 1999-2004, 1988)。

我々はIgM抗体に特異的に結合する受容体の遺伝子FcμRを世界に先駆けて同定した(*J. Exp. Med.* 206: 2779-2793, 2009)。また、マウスFcμRがB細胞に特異的に発現し、T細胞、樹状細胞や他の免疫細胞には発現しないことも明らかにした(*Int. Immunol.* 22: 149-156, 2010)。FcμRの機能の解明を目的として、我々はFcμR欠損マウスを作製し解析を行った(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: E2699-2706, 2012)。FcμR欠損B細胞を*in vitro*で培養した際、抗原刺激に対する応答性が低下し、逆に死細胞の割合が野生型に比して増加した。対照的に、LPSやCD40リガンドに対する応答性や細胞死に異常がないことから、FcμRは抗原刺激後のB細胞の生存に特異的に寄与することが示唆された。野生型マウスに比べ、FcμR欠損マウスでは、T細胞依存性抗原を免疫することで誘導される胚中心B細胞、記憶B細胞および抗体産生細胞の数が顕著に減少していた。さらにFcμR欠損マウスでは加齢に伴い自己抗体を産生することが判明した。

これらの結果から、IgMは補体受容体のみならず、FcμRを介して外来抗原に対する免疫応答と自己抗原に対する免疫寛容を制御することが示唆された。本研究では、FcμRがB細胞の生存を促進する分子機構を、B

細胞抗原受容体(BCR)との相互作用を中心に明らかにするとともに、FcμRが自己反応性B細胞のアナジー誘導に果たす役割を解明する。さらに、FcμRと補体受容体が液性免疫の制御における役割分担を明確にしたい。

### 2. 研究の目的

本研究期間内に、(1)FcμRがB細胞の生存を促進する分子機構を解明する。(2)自己反応性B細胞のアナジー誘導に果たすFcμRの役割を明確にする。(3)液性免疫におけるFcμRと補体受容体CD21/CD35の役割分担を明確にする。

### 3. 研究の方法

FcμRがB細胞の生存を促進する分子機構を解明する。

#### (1) FcμRとBCRの物理的相互作用

FcμRは抗原刺激後のB細胞の生存に特異的に働くことから、BCRと会合する可能性が考えられる。脾臓B細胞を可溶化しBCRを免疫沈降した後、FcμRとの共沈の有無をウェスタンブロットで解析する。同様に、我々が作製した抗FcμRモノクローナル抗体を用いてFcμRを免疫沈降した後、BCR及びBCRに会合するIg、Igの共沈の有無を解析する。また、この相互作用が、細胞表面のBCRおよびFcμRに結合した血中IgMによる共架橋の可能性を除外するために、血中IgM欠損マウス由来B細胞を対照群として用い比較検討する。

#### (2) FcμR架橋により活性化されるシグナル経路や生存因子の解明

我々が作製した抗FcμRモノクローナル抗体は脾臓B細胞の生存を促進し、FcμRからのシグナル伝達を惹起している可能性が高い。そこで、抗FcμR抗体で刺激した脾臓B細胞のFcμRのチロシンおよびセリンのリン酸化の有無、さらにB細胞生存に関わるNF-κBの活性化やBCL-xL蛋白の誘導の有無について解析する。

#### (3) FcμR架橋によるBCRシグナルへの影響

BCR 架橋により、NF- $\kappa$ B の活性化と BCL-xL 蛋白質の発現が誘導され、B 細胞の生存が促進されることが知られている。そこで、BCR 架橋に加え、Fc $\mu$ R を同時に架橋した場合の NF- $\kappa$ B の活性化と BCL-xL の発現誘導について解析を行い、Fc $\mu$ R からの生存シグナルが BCR 依存性の生存シグナルを促進できるかどうかを明らかにする。

#### (4) Fc $\mu$ R と補体受容体 CD21/CD35 の二重欠損マウスの樹立

Fc $\mu$ R 欠損マウスと CD21/CD35 欠損マウスを掛け合わせ、二重欠損マウスを樹立する。

#### (5) Fc $\mu$ R 欠損と sHel/HeI-Ig マウスの樹立

Fc $\mu$ R 欠損と共同研究者である Goodnow らの sHel/HeI-Ig ダブルトランスジェニックマウスを掛け合わせ、Fc $\mu$ R 欠損-sHel/HeI-Ig マウスを樹立する。

### 液性免疫の制御における Fc $\mu$ R と補体受容体 CD21/CD35 の役割分担の解明

#### (1) WT および Fc $\mu$ R 欠損マウスにおける抗原特異的 IgM 投与による液性免疫の促進の有無

共同研究者の Heyman により供与された羊赤血球 (SRBC) 特異的 IgM 抗体を WT および Fc $\mu$ R 欠損マウスに投与したあと、SRBC で免疫し、SRBC 特異的 IgG 抗体産生を経時的に測定する。これにより、抗原特異的 IgM 投与による液性免疫の促進に果たす Fc $\mu$ R の役割を明らかにする。さらに、Heyman の補体活性化機能を欠失した SRBC 特異的 IgM (Cmu13) を用いて、同様の実験を行う。この実験により、IgM 投与による液性免疫の促進における Fc $\mu$ R と補体受容体双方の共役作用の有無が明らかにされる。

#### (2) Fc $\mu$ R と補体受容体 CD21/CD35 の二重欠損マウスにおける液性免疫応答

WT、単独欠損および二重欠損マウスにおける T 非依存性および T 依存性抗原に対する抗体産生を解析する。T 依存性抗原の場合、二次

応答についても解析し、免疫記憶の成立における Fc $\mu$ R と補体受容体 CD21/CD35 の相互の役割を解明する。また、上記 1) に記述した方法を用いて、IgM による液性免疫の促進における Fc $\mu$ R と補体受容体 CD21/CD35 の役割分担を明確にする。

#### (3) Fc $\mu$ R と補体受容体 CD21/CD35 の二重欠損マウスにおける自己免疫疾患の解析

WT、単独欠損および二重欠損マウスにおける血中の抗 DNA 抗体、抗核抗体、リウマチ因子および尿中蛋白などを経時的に測定する。また、加齢マウスでの腎臓における免疫複体の沈着や糸球体腎炎の有無について、組織切片を用いて明らかにする。これにより、二重欠損マウスにおける自己免疫疾患の増悪の有無を明らかにする。

(4) Fc $\mu$ R 欠損-sHel/HeI-Ig マウスにおける B 細胞の分化、成熟、活性化および抗体産生について解析する。これらの実験により、Fc $\mu$ R が自己反応性 B 細胞のアナジー誘導に果たす役割を解明し、Fc $\mu$ R 欠損マウスにおける自己抗体産生の原因を探る。

### 4. 研究成果

以下の研究成果が得られた。(1) IgM Fc receptor (Fc $\mu$ R) は IgM B 細胞受容体と物理的に相互作用し、抗原刺激後の濾胞 B 細胞の生存と活性化を促進する。共焦点顕微鏡を用いて、Fc $\mu$ R と BCR が B 細胞表面で共局在することを示した。また、抗 IgM 抗体及び抗 Fc $\mu$ R 抗体を用いた免疫沈降実験により、両者が物理的に相互作用することを明らかにした。さらに、抗 Fc $\mu$ R 抗体が抗 IgM 抗体により誘導される B 細胞の生存と活性化を促進することを示した。(2) Fc $\mu$ R が BCR 刺激によって誘導される非典型的 NF- $\kappa$ B の活性化を促進することを見出した。(3) 外来抗原に対する抗体産生を促進し、かつ自己抗体の産生を抑制する。Fc $\mu$ R が成熟 B 細胞の活性化のみならず、自己反応性 B 細胞の除去にも重要な役割を果たすことを見出した。(4)

Fc $\mu$ R と IgG 受容体(Fc R2B)は競合して、B 細胞の活性化を正と負に制御する。即ち、B 細胞の活性化は、B 細胞自身が分泌する IgM と IgG 抗体によって制御されることを明らかにした。(5) 辺縁帯 B 細胞の初期分化、成熟、活性化と抗体産生細胞への分化を促進することを明らかにした。

#### 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 14 件)

1. Li, Y., Takahashi, Y., Fujii, S., Zhou, Y., Hong, R., Suzuki, A., Tsubata, T., Hase, K. and Wang, J.-Y. EAF2 mediates germinal centre B-cell apoptosis to suppress excessive immune responses and prevent autoimmunity. *Nat. Commun.* 査読あり 7: 10836 (2016).
2. Kawamura, K., Wada, A., Wang, J.-Y., Li, Q., Ishii, A., Tsujimura, H., Takagi, T., Itami, M., Tada, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M. Expression of activation-induced cytidine deaminase is associated with a poor prognosis of diffuse large B cell lymphoma patients treated with CHOP-based chemotherapy. *J. Cancer Res. Clin.* 査読あり 142: 27-36 (2016).
3. Liu, X., Jiang, X., Liu, R., Wang, L., Qian, T., Zheng, Y., Deng, Y., Huang, E., Xu, F., Wang, J.-Y. and Chu, Y. B cells expressing CD11b effectively inhibit CD4<sup>+</sup> T cell responses and ameliorate experimental autoimmune hepatitis. *Hepatology* 査読あり 62: 1563-1575 (2015).
4. Wang, L., Ray, A., Jiang, X., Wang, J.-Y., Basu, S., Liu, X., Qian, T., He, R., Dittel, B.N. and Chu, Y. T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis. *Mucosal Immunol.* 査読あり 8: 1297-1312 (2015).
5. Ouchida, R., Lu, Q., Liu, J., Li, Y., Chu, Y., Tsubata, T. and Wang, J.-Y. Fc $\mu$ R interacts and cooperates with the B cell receptor to promote B cell survival. *J. Immunol.* 査読あり 194: 3096-3101 (2015).
6. Lin, W., Fan, Z., Suo, Y., Deng, Y., Zhang, M., Wang, J.-Y., Wei, X. and Chu, Y. The bullseye synapse formed between CD4<sup>+</sup> T-cell and staphylococcal enterotoxin B-pulsed dendritic cell is a suppressive synapse in T-cell response. *Immunol Cell Biol.* 査読あり 93: 99-110 (2015).
7. Lu, Q., Wang, J.-Y., Wang, L., Jiang, X. and Chu, Y. Self DNA from lymphocytes that have undergone activation-induced cell death enhances murine B cell proliferation and antibody production. *PLoS ONE* 査読あり 9: e109095 (2014).
8. Kawai, Y., Ouchida, R., Yamasaki, S., Dragone, L., Tsubata, T. and Wang, J.-Y. LAPTM5 promotes lysosomal degradation of intracellular but not the cell surface CD3 $\xi$ . *Immunol. Cell Biol.* 査読あり 92: 527-534 (2014).
9. Zhang, Y., Wang, J.-Y. and Han, W. A role for CMTM7 in BCR expression and survival in B-1a but not B-2 cells. *Int. Immunol.* 査読あり 26: 47-57 (2014).
10. Ding, Z., Bergman, A., Rutemark, C., Ouchida, R., Ohno, H., Wang, J.-Y., Heyman, B.: Complement-activating IgM enhances the humoral but not the T cell immune response in mice. *PLoS ONE* 査読あり 8: e81299 (2013).
11. Ouchida, R., Mori, H., Ohno, H. and Wang, J.-Y. Fc $\mu$ R (Toso/Faim3) is not an inhibitor of Fas-mediated cell death in mouse T and B cells. *Blood* 査読あり 121: 2368-2370 (2013).
12. Kano, C. and Wang, J.-Y. High levels of AID cause strand bias of mutations at A versus T in Burkitt's lymphoma cells. *Mol. Immunol.* 査読あり 54: 397-402 (2013).
13. Tsuruoka, N., Arima, M., Yoshida, N., Okada, S., Sakamoto, A., Hatano, M., Satake, H., Arguni, E., Wang, J.-Y., Yang, J.-H., Nishikura, K., Sekiya, S., Shozu, M. and Tokuhisa, T. ADAR1 induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6-deficient cells. *J. Biol. Chem.* 査読あり 288: 826-836 (2013).
14. Li, S., Zhao, Y. and Wang, J.-Y. Analysis of Ig gene hypermutation in *Ung<sup>-/-</sup>Polh<sup>-/-</sup>* mice suggests that UNG and A:T mutagenesis pathway target different U:G lesions. *Mol. Immunol.* 査読あり 53: 214-217 (2013).

[学会発表](計 0 件)

[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  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

王 継揚 (Ji-Yang Wang)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・  
特任講師  
研究者番号： 80231041

##### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

大内田 理佳 (Rika Ouchida)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号： 80391887

##### (4) 研究協力者

( )