

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860343

研究課題名(和文) 転写制御因子MeninによるB-1細胞の分化誘導・維持機構の解明

研究課題名(英文) Critical role for differentiation and maintenance of B-1 cells by transcriptional regulator Menin

研究代表者

新中須 亮 (Shinnakasu, Ryo)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：00451758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：B-1細胞は、様々な病原体に対し交差反応性を示すレパトアを予め有しており、感染初期の防御機構に重要な働きを行う。B-1細胞の機能についてはよく解明されているものの、分化誘導機構の解明は進んでいなかった。申請者らはB-1細胞の誘導に関わる遺伝子として転写制御因子Meninを候補として同定した。さらに、B細胞特異的Menin欠損マウスを用いた研究結果から、B-1細胞の著しい減少やB-1細胞由来の自然抗体価の減少を明らかとした。このMeninによるB-1細胞分化・維持に果たす機能として、B-1細胞を誘導するのに重要な前駆細胞の生存維持への役割を本研究では明らかにした。

研究成果の概要(英文)：B-1 cells, which have repertoires showing the cross reactivity to various pathogens in advance, perform an important role in the early stage of infection of the defense mechanism. Although the function of B-1 cells has been elucidated well so far but differentiation and maintenance mechanism of B-1 cells were not progressing. In this project, I have identified the transcriptional regulator Menin as a candidate gene involved in differentiation and maintenance of B-1 cells. From the analysis using B cell specific Menin deficient mice, significantly reduction of of B-1 cells number and reduction of titers of natural antibodies were revealed in Menin deficient mice. As a function of Menin to differentiation and maintenance of B-1 cells, it is revealed that Menin has a critical role for the survive or maintenance of precursor cells of B-1 cells.

研究分野：免疫

キーワード：B - 1細胞 B細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫系は生体がウイルスや細菌といった病原体から自身を防御するために確立した機構である。この生体防御を担う免疫細胞の一つ B リンパ球は、病原体と結合する分子、抗体を分泌し病原体の排除に働いている。B 細胞には B-1 細胞と B-2 細胞の 2 種類の亜集団が存在し、主に骨髄の造血幹細胞に由来する B-2 細胞は生涯にわたり供給され続けるのに対し、個体発生初期に卵黄嚢や胎仔肝臓などの造血組織で発生する B-1 細胞は加齢に伴い幹細胞が失われていき最終的には自己複製することで細胞の維持を行う。また、それぞれの体内での局在は異なり、B-2 細胞は二次リンパ組織に存在するのに対し、B-1 細胞は腹腔や胸腔内に存在する。

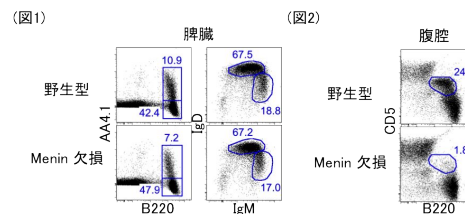
抗体産生細胞へ分化するために T 細胞からの助けを必要とする B-2 細胞と違い、B-1 細胞により産生される自然抗体は、肺炎レンサ球菌やインフルエンザなど様々な病原体に対し交差反応性を示すレパートリーから成っており、あらかじめ共通の抗原に対する抗体を用意していたり、病原体侵入時に素早く産生されることで、感染初期の防御機構に重要な働きを行う。それだけでなく、自然抗体は、老化赤血球の除去、酸化 LDL の除去による動脈硬化の予防、さらには、抗原特異的な抗体産生(獲得免疫)の制御など、生体の恒常性維持にも重要な役割を果たしていることも明らかになっている。

B-2 細胞と B-1 細胞は共に B 細胞抗原受容体を持つ B 細胞で共に抗体産生が主な役割であるにも関わらず、活躍する場面、分化過程は両者で大きく異なる。B-2 細胞に関してはこれまでに多くの研究が行われ、分化誘導機構についても多くのことが解明されているが、それに比べ、B-1 細胞では機能についてはよく解明されているものの、分化誘導機構、特に分子レベルでの解明はほとんど進んでいなかった。そこで本申請で行う研究は、B-1 細胞の分化誘導機構を分子レベルで解明することを主目的とした。

申請者らはそれまでに B-1 細胞分化誘導に関わる遺伝子の探索を行い、多発性内分泌腫瘍症 1 型(Men1 症候群)の原因遺伝子として発見された Men1 遺伝子とその候補遺伝子として同定していた。Men1 遺伝子によりコードされるタンパク質 Menin は内分泌系の細胞で高発現し癌化抑制に関わっていることがよく知られているが、造血系、免疫系細胞での発現も高い(Karges et al., BBA (1999); 1446)。しかしながら、B 細胞での機能についての報告は未だなかった。Menin はエプジェネティックな変化を制御するトライソックス(TrxG)複合体の構成分子で、様々な遺伝子の転写活性化状態の維持を担うことが報告されている(Yokoyama et al., Cell (2005); 123)。このことから Menin は B-1 細胞の分化に直接関わっている可能性や分化

に必須な未知遺伝子の発現制御に関わっている可能性が考えられた。申請者は、Menin の B 細胞での役割を明らかにするために B 細胞分化初期の pre-proB 細胞期から発現誘導される Mb1-Cre と掛け合せた Menin コンディショナル KO マウスを用いて、B 細胞分化への影響について検証した。その結果、驚くべきことに、B-2 細胞の分化・細胞数での異常は全くみられなかった(図 1)のに対し、B-1 細胞が著しく減少していることが明らかとなった(図 2)。さらに定常状態での血清抗体価を検討したところ IgM や IgG3 など B-1 細胞由来の血清抗体価も KO マウスで低く B-1 細胞減少の結果と関連していた。以上の結果より、Menin は B 細胞の中でも B-1 細胞特異的に分化誘導・維持に重要な役割を果たしていることが予想された。

そこで本課題では、Menin の B-1 細胞分化・維持に果たす機能的役割を解明することを目指し研究をスタートさせた。



2. 研究の目的

免疫系の細胞である B 細胞は、抗体を産生しそれにより病原体を排除することが重要な機能である。この B 細胞の亜集団である B-1 細胞は、自然抗体の主な供給源であり、予め病原体に対する抗体を用意していたり、抗原感作後すぐに抗体産生を行うことで、感染初期にとっても重要な役割を果たす。B-1 細胞の生理的な機能や役割についてはこれまでに多くの研究報告がなされてきている。しかしながら、B-1 細胞の分化誘導・維持機構についての解明は遅れており、特に、遺伝子レベルでの制御機構はほとんど分かっていない。最近の申請者の解析から転写制御因子である Men1 遺伝子欠損マウスでこの B-1 細胞が著しく減少していることが明らかとなっていた。そこで本研究課題では、B 細胞特異的 Menin 欠損マウスの B-1 細胞分化・維持への影響についての検討を行い、Menin がどの細胞(分化)段階で B-1 細胞に影響を与えるのか明らかにし、さらに、B-1 細胞分化誘導・維持への Menin の役割についてターゲットとなる遺伝子探索など遺伝子レベルでの分子メカニズムを明らかにすることで、Men1 遺伝子の B-1 細胞分化・維持に果たす機能的役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

『B 細胞特異的 Menin 欠損マウスの B-1 細胞

胞分化・維持への影響についての検討」

(1)「細胞染色による B 細胞特異的 Menin 欠損マウスの B-1 細胞分化能の評価」

Menin 欠損マウスでの B-1 細胞の減少は Menin flox マウス (Crabtree et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (2001); 98) を mb-1 Cre マウス (Hobeika et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (2006); 103) と交配したコンディショナル KO マウスの解析から見つかった。先に示したように mb1-Cre の発現は、B 細胞への分化開始初期の Pre-proB 細胞期から起こるので、B-1 細胞の減少は少なくとも前駆細胞から B-1 細胞への分化誘導が開始して以降に起こると考えられる。そこでまず始めに、mb1-Cre ノックイン Menin コンディショナル KO マウスの腹腔、脾臓、骨髄について、B-1 細胞前駆細胞から B-1 細胞までの分化段階を染め分ける細胞染色を行い、どの分化段階で細胞数の減少が起こり始めるか検討し、Menin が B-1 細胞のどの段階で重要な役割を果たしているのか明らかにする。この細胞染色を用いた検討には 12 種類の細胞表面分子の同時染色 (Ghosn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (2011); 108) という非常に高度な技術を要するため、申請者らはこの分野の第一人者であるスタンフォード大学の Eliver Ghosn 博士、Leonore A. Herzenberg 博士らの協力の下で実験を行なった。

(2)「Menin KO B-1 前駆細胞移入後の B-1 細胞分化誘導能の評価」

これまでの報告から、B-1 細胞と B-2 細胞は異なる幹細胞、前駆細胞から誘導されることが明らかにされており、それを証明するための実験法として、それぞれの前駆細胞をレシピエントマウスに移入して B-2 細胞、B-1 細胞を誘導する方法が既に確立されている (Ghosn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (2011); 108, Montecino-Rodriguez et al., Nat. Immunol., (2006); 7)。そこで申請者もこの方法を用いて Menin コンディショナル KO 細胞の B-1 細胞分化誘導能について検討をおこなった。実験は成熟マウスの脾臓もしくは、胎児肝臓から分離精製した前駆細胞を放射線照射した Rag KO マウスに移入する方法を用いて行い、前駆細胞から成熟 B-1 細胞が誘導される過程のどの段階で影響を受け始めるか検討した。

4. 研究成果

研究代表者はまず始めに、mb1-Cre ノックイン Menin コンディショナル KO マウスの腹腔で激減していた B-1a 細胞が脾臓、骨髄など他の臓器で検出できるかさらに詳細に評価を行ったところ、腹腔と同様に減少していることが明らかとなった。しかしながら、腹腔と比較しその減少の度合いは弱く、脾臓ではわずかではあるが、その存在が確認された。この結果は、前駆細胞から成熟 B-1a 細胞

の分化過程に問題がある可能性はあるが、少なくとも分化の過程で誘導を完全にシャットアウトしてしまう決定的な因子は存在せず、むしろ、大元の幹細胞や逆に末梢の成熟細胞での生存維持に重要な因子に原因があることが予想された。そこで、mb1-Cre ノックイン Menin コンディショナル KO マウスの腹腔、脾臓、骨髄について、B-1 細胞前駆細胞から B-1 細胞までの分化段階を染め分ける細胞染色を行い、どの分化段階で細胞数の減少が起こり始めるか検討し、Menin が B-1 細胞のどの段階で重要な役割を果たしているのか評価を行った。その結果、成熟した Menin 欠損マウスの脾臓では、B-1 細胞の前駆細胞は検出できたが、野生型に比べ、数の減少がみとめられた。これはおそらく、B-1 細胞の前駆細胞は胎仔肝でのみ作られることから、その維持機構に異常があることで、マウスの週齢が上がるにつれて徐々に減少したと予想された。また前駆細胞の移入による、B-1a 細胞を誘導する実験も行い、Menin 欠損マウス由来細胞からの B-1a 細胞の誘導低下も確認しているが、移入後の前駆細胞の数の維持についてもきちんと評価する必要がある。以上の結果から、腹腔でみとめられた Menin コンディショナル KO マウスでの B-1a 細胞減少の原因として、脾臓に存在する胎仔肝由来の前駆細胞の維持ができないために、その後誘導される B-1a 細胞が脾臓ではわずかに検出されたが、腹腔ではほとんど検出できなかった可能性があると考えられた。上記のように、今回の研究に関しては、本来予想していた展開とは異なる結果が出始めており、本研究のテーマとは少し異なる方向に進み始めている。しかしながら、これまでに本研究から得られている結果についても、今後、解析を続けることに十分な価値のあるものだと考えている。そこで、今後は、前駆細胞や幹細胞などの生存維持における Menin の役割について、本研究テーマで予定していた次世代シーケンスを用いた解析などを取り入れてながら、分子レベルでの解明を行っていく予定である。

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)

著者名: Sofia Mayans, Dariusz Stepniak, Sakina F. Palida, Alexandre Larange, Joanna Dreux, Britni M. Arlian, Ryo Shinnakasu, Mitchell Kronenberg Hilde Cheroutre, Florence Lambomez

論文標題: $\alpha\beta$ T cell receptors expressed by CD4(-)CD8 $\alpha\beta$ (-)intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities.

雑誌名: Immunity

発行年月日: 2014年8月21日

巻および頁：Vol. 41(2): p207-2018
DOI：
<http://dx.doi:10.1016/j.immuni.2014.07.010>.
査読：有

〔学会発表〕(計1件)
発表者：新中須 亮
発表標題：メモリーB細胞への選択・生成メカニズム
発表学会：第7回シグナルネットワーク研究会
発表年月日：2015年6月19-21日
会場：沖縄科学技術大学院大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新中須 亮 (Shinnakasu Ryo)

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター
特任助教

研究者番号：00451758