

平成 21 年 6 月 6 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2005 年度～2008 年度

課題番号：17590440

研究課題名（和文） B 細胞抗原受容体固有の Cyclin D2 誘導シグナル伝達経路の解析

研究課題名（英文） The properties of B cell antigen receptor mediated induction signals

研究代表者

五十嵐 英哉（IGARASHI HIDEYA）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40291538

研究成果の概要：B リンパ細胞は抗原受容体（BCR）を介して抗原（異物）を認識し、その異物を排除するために抗原特異的な抗体を産生する。この抗原の結合により BCR からもたらされる信号は、B リンパ細胞の分化段階に応じて、細胞の分化、活性化、細胞死といった様々な細胞反応を引き起こす。本研究において、新規のタンパク脱リン酸化酵素調節サブユニットである G5PR が、リンパ細胞の生存に必須の分子であり、BCR 信号伝達の調整に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	900,000	0	900,000
2006 年度	900,000	0	900,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,600,000	540,000	4,140,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：B 細胞、抗原受容体、シグナル伝達、発現制御、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗原侵入後に末梢リンパ組織で形成される胚中心でその発現が増強する新規の哺乳動物プライマーゼ GANP (Germinal Center associated nuclear protein) を新たにクローニングし、その機能解析を行っていた。GANP ノックアウトマウスの解析から、GANP が胚中心 B 細胞における抗体遺伝子の体細胞超突然変異、その結果としての抗体の親和性成熟に重要な分子であることがわかった。しかし、GANP 自身にはプライマーゼ活性しか見いだせず、mutator としての機能がどのようにして発揮されるのかについてはわからなかった。

また GANP 分子を欠損すると細胞の癌化が起こり、DNA の修復機構や細胞周期における役割も示唆された。

(2) GANP の多彩な生物学的活性は、GANP と会合する機能分子によってもたらされる可能性が考えられたため、酵母ツーハイブリッド法により GANP 結合分子を同定した。

(3) 同定された分子はタンパク脱リン酸化酵素である PP2A の調節サブユニットである PR タンパクと、タンパクレベルで相同性を有していたため、G5 (GANP fragment 5 binding) PR と名付けた。PP2A は histone H2AX の脱リン酸化を行い、DNA 損傷を制

御していることが示唆されていたので、GANP に会合する G5PR が、PP2A の活性調節を通して GANP の機能を発揮している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

G5PR の生物学的機能を

(1) 細胞レベル

(2) 個体レベル

で、明らかにする。

3. 研究の方法

(1) G5PR 欠損マウスの作製

G5PR が調節サブユニットとして結合する PP2A の酵素サブユニットを遺伝子ノックアウト法により欠損させたマウスは胎生致死になること、また会合分子である GANP 欠損マウスも胎生致死であることから、G5PR の欠損マウスも胎生致死になって解析できない可能性があることが懸念されたため、コンディショナルノックアウト法により組織特異的に欠損させる手段をとった。G5PR 遺伝子のエクソン2および3の前後にバクテリアのリコンビネースである Cre に認識される flox 配列を挿入したノックアウトベクターを構築し、相同組み換え法によって、G5PR-flox マウスを得た。このマウスと、B 細胞マーカーである CD19 の遺伝子座に Cre がノックインされ、CD19 のプロモーター制御下に Cre を発現するようにした CD19-Cre ノックインマウスを交配して、B 細胞において G5PR が欠損する子孫マウスを得て解析に供した。同様に、T 細胞抗原受容体 (TCR) シグナル伝達分子である Lck チロシンキナーゼのプロモーター制御下に Cre を発現する Lck-Cre トランスジェニックマウスとの交配により、T 細胞において G5PR が欠損する子孫マウスを得て解析に供した。

(2) G5PR が過剰発現細胞の作製

分子を欠失させたことにより、細胞自身の分化が停止したり、細胞死を起こしてしまうようなケースでは解析が不能になってしまうので、リンパ細胞株に G5PR 発現ベクターを導入し、G5PR を過剰発現した細胞を作製して解析に供した。

4. 研究成果

(1) G5PR は B 細胞生存因子である。

B 細胞コンディショナルノックアウトマウスは正常に出生、発育し、外見上異常を認めなかった。しかし、脾臓は対照の野生型マウスに比べて小さく、B 細胞の数は半分に減少していた (図 1)。

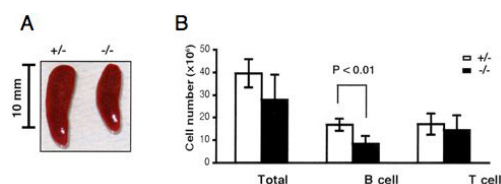


図 1. A. 対照マウス (+/-) と G5PR 欠損マウスの脾臓の概観。 B. 脾臓の細胞総数 (total)、B 細胞数 (B cell)、T 細胞数 (T cell)。

また、脾臓に残っていた B 細胞を抗 BCR 抗体で刺激したところ、対照 B 細胞は細胞増殖を示したのに対し、G5PR 欠損 B 細胞はほとんど増殖が見られなかった。解析の結果、増殖に関連する分子群は正常に機能していたが、細胞死が増殖能を上回ったために見かけ上増殖が見られなかったことが判明した。細胞死が亢進している原因を調べたところ、細胞死実行分子である Bim の発現および活性化の亢進と、その上流と考えられる c-Jun terminus kinase (JNK) のリン酸化の亢進、すなわち活性化の亢進が認められた。このマウスに抗原を投与しても抗体産生能は対照に比べて低く、二次リンパ組織での胚中心形成能も低下していた。これらの結果から、G5PR は末梢において B 細胞が抗原と接触したときに、BCR からもたらされる B 細胞生存シグナルに深く関与していることが示唆された。

(2) G5PR は BCR を介する細胞死誘導シグナルを抑制する。

B 細胞の抗原受容体架橋による Activation-induced cell death (AICD) は免疫寛容と抗体の成熟に関与している。G5PR は、B 細胞が AICD から回避するために重要な分子であろうことが B 細胞コンディショナルノックアウトマウスの解析から明らかになった。次に B 細胞分化と G5PR 発現誘導の関係を解析し、G5PR の B 細胞クローン選択における役割を明らかにすることを目的とした。新生仔期 C57BL/6 マウス (生後 4 日以内) の脾臓の未熟 B 細胞と、成体の脾臓 B 細胞とをセルソーターによって分離し、抗 IgM 抗体刺激後の細胞増殖、AICD の感受性、および G5PR の mRNA の発現量を RT-PCR によって比較、検討した。IgM^{lo}IgD^{hi} の成熟 B 細胞を抗 IgM 架橋によって刺激すると B 細胞の増殖が起こり、それとともに G5PR の発現が上昇した。一方、IgM^{hi}IgD^{lo} の未熟 B 細胞は同刺激により細胞死が誘導されるが、この細胞では G5PR の発現誘導は全く認められなかった。このことは新生仔マウスの未熟 B 細胞や、非致死性放射線照射後に生じる末梢の移行期 B 細胞においても認められなかった。従って、成熟 B 細胞においてのみ発現上昇が起こるものと考えられる。さらに分化段階の異なる BTK 欠損 B 細胞 (CBA/N) と BTK⁺ B 細胞 (野生型) を用いて G5PR の発現誘導を比較した。その結果、G5PR の発現誘導と AICD からの回避は常に相関性を示し、その最終分化にはチロシンキナーゼ BTK の存在が必要であることが明らかになった。抗 IgM 刺激による AICD には未熟 B における Casapse-3 依存性

の細胞死と成熟 B 細胞における Caspase-3 非依存性の細胞死があることが明らかとなった。そこで G5PR による細胞死回避が未熟 B 細胞においても機能することができるかどうかを、抗 IgM 刺激で細胞死を起こす未熟 B 細胞腫瘍株 WEHI-231 に G5PR を過剰発現させた系で抗 IgM 刺激で刺激し検討した結果、明らかな細胞死の抑制効果を認めた (図 2)。

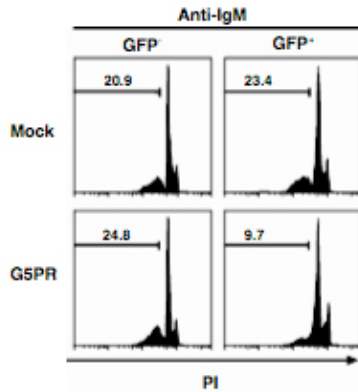


図 2. G5PR 過剰発現 WEHI-231 細胞における BCR 誘導性細胞死の抑制。GFP+ は G5PR が過剰発現した細胞集団であることを表している。図中の数字が大きいほど、死んでいる細胞の割合が多いことを示している。

G5PR はその脱リン酸化酵素活性の制御機能によって pro-apoptotic 分子 Bim のリン酸化の持続や JNK の活性化亢進を抑制することが明らかになっている。末梢で抗原刺激を受けた B 細胞が増殖・分化して抗体産生細胞になる過程で、抗原刺激依存性に AICD が起こる。成熟 B 細胞ではその AICD から回避する必要があると思われる。抗原刺激が同時に AICD の発現誘導を起こさせるということは末梢のリンパ組織における B 細胞の選択の機構を明らかにする上で重要であると考えられた。

(3) T 細胞分化・生存における G5PR の役割 BCR と T 細胞抗原受容体 (TCR) は構造のみならずシグナル伝達経路においても多くの共通点を有している。したがって T 細胞が抗原ペプチド+MHC 複合体を認識した際に細胞内に伝達されるシグナルにおける G5PR の役割を明らかにする目的で、Lck-cre トランスジェニックマウスと floxed-G5pr マウスを交配し、T 細胞特異的 G5PR 欠損マウスを得た。このマウスの胸腺は 1/3 に萎縮し、胸腺細胞は正常の 10 分の 1 に減少していた (図 3)。

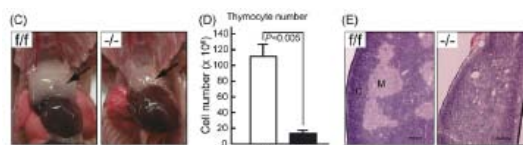


図 3. (C) 対照マウス (f/f) と G5PR 欠損マウスの胸腺の概観。(D) 胸腺の細胞総数。(E) (C) 対照マウス (f/f) と G5PR 欠損マウスの胸腺の組織切片 (ヘマトキシリン染色)。C : cortex (皮質)、M : medulla (髄質)。

CD4/CD8 二重陰性胸腺細胞は正常マウスとほぼ同数であったが、CD4/CD8 二重陽性胸腺細胞は正常の 10% しか認められず、CD4 or CD8 単陽性胸腺細胞は殆ど認められなかったことから、G5PR は DN 細胞から DP 細胞への分化に必須か、DP 細胞の生存に必須であろうと考えられた。G5PR 欠損 B 細胞は培養中に高率にアポトーシスを起こして死滅すること、また TUNEL 解析によって胸腺の皮質においてアポトーシスに陥っている細胞が増えていることから、G5PR は DP 細胞の細胞死の抑制において重要な役割を果たしているだろうことが示唆された。G5PR は脱リン酸化酵素結合制御ユニットであることから、胸腺細胞での種々のキナーゼ活性を見たところ、JNK と p38 MAP kinase の活性の恒常的活性化を認めたものの、アポトーシス実行分子である Bim の発現ならびにその活性化を認めなかったため、B 細胞とは異なるメカニズムで T 細胞の生存に関わっていることが示唆された。検討を重ねたところ G5PR 欠損 CD4/CD8 二重陽性胸腺細胞ではアポトーシスシグナルを伝達する FasL の発現が野生型に較べて倍程度上昇していることが明らかとなった。JNK の標的分子として FasL が示唆されていることから、おそらく G5PR が JNK を直接、あるいはその上流を抑制して FasL の発現を抑制的に制御し、CD4/CD8 二重陰性胸腺細胞から CD4/CD8 二重陽性胸腺細胞に分化するときの生存に深く関与していることが明らかとなった。

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 6 件)

- ① Yan Xing, Xiaodan Wang, Hideya Igarashi, Hiroshi Kawamoto and Nobuo Sakaguchi. Protein phosphatase subunit G5PR that regulates the JNK-mediated apoptosis signal is essential for the survival of CD4 and CD8 double-positive thymocytes. *Mol. Immunol.* 45:2028-2037, 2008. 査読あり
- ② Hideya Igarashi, Yoshihiro Baba, Yoshinori Nagai, Eijiro Jimi, Sankar Ghosh and Paul W Kincade. NF- κ B is dispensable for normal lymphocyte development in bone marrow but required for protection of progenitors from TNF α . *Int. Immunol.* 18:653-659, 2006. 査読あり

- ③ Faisal Muhmudul Huq Ronny*, Hideya Igarashi*, and Nobuo Sakaguchi. (* equal contribution). BCR-crosslinking induces a transcription of protein phosphatase component G5PR that is required for mature B-cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340:338-346, 2006. 査読あり
- ④ Xing, Yan, Hideya Igarashi, Xiaodan Wang, and Nobuo Sakaguchi. Protein phosphatase subunit G5PR is needed for inhibition of BCR-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, 202:707-719, 2005. 査読あり
- ⑤ Yousuke Kawatani, Hideya Igarashi, Takeshi Matsui, Kazuhiko Kuwahara, Satoru Fujimura, Nobukazu Okamoto, Katsumasa Takagi, and Nobuo Sakaguchi. Double-stranded DNA breaks in the *immunoglobulin V-region* gene were detected at lower frequency in affinity-maturation impeded GANP^{-/-} mice. *J. Immunol.*, 175:5615-5618, 2005. 査読あり
- ⑥ Hideya Igarashi, Kay L. Medina, Takafumi Yokota, Isabel D. Rossi, Nobuo Sakaguchi, Philip C. Comp and Paul W. Kincade. Early Lymphoid Progenitors in Mouse and Man are Highly Sensitive to Glucocorticoids. *Int. Immunol.* 17:501-511, 2005. 査読あり

[学会発表] (計 18 件)

- ① Masahiro Kitabatake, Hideya Igarashi, Teppei Toda, Mareki Ohtsuji, Hiromichi Tsurui, Sachiko Hirose, Nobuo Sakaguchi, NZB-like autoimmunity was induced in the transgenic mice of B cell survival molecule G5PR、第 38 回日本免疫学会学術集会、12/1-3/2008、京都
- ② Teppei Toda, Masahiro Kitabatake, Hideya Igarashi, Nobuo Sakaguchi、Alteration of receptor editing activity in the B cell differentiation of NZB mouse、第 38 回日本免疫学会学術集会、12/1-3/2008、京都
- ③ Katsuhiko Ishihara, Hideya Igarashi, Toshiyuki Fukada, Masaaki Murakami and Toshio Hirano, Search for cell-intrinsic abnormalities of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis、第 37 回日本免疫学会学術集会、11/20-22/2007、東京
- ④ Masahiro Kitabatake, Hideya Igarashi, Teppei Toda, Mareki Ohtsuji, Hiromichi Tsurui, Sachiko Hirose, Nobuo Sakaguchi, Role of G5PR in the development of autoimmune disease、第 37 回日本免疫学会学術集会、11/20-22/2007、東京
- ⑤ Xing Yan, Wang Xiaodan, Hideya Igarashi, Hiroshi Kawamoto and Nobuo Sakaguchi, Protein phosphatase subunit G5PR regulates the JNK-mediated apoptosis signal and is required for survival of CD4⁺CD8⁺ double-positive thymocytes、第 37 回日本免疫学会学術集会、11/20-22/2007、東京
- ⑥ 刑岩、王晓丹、五十嵐英哉、阪口薫雄、Protein phosphatase subunit G5PR is required for survival of CD4⁺CD8⁺ double-positive thymocytes、第 66 回日本癌学会学術総会、10/5/2007、横浜
- ⑦ Hideya Igarashi, Teppei Toda, Takeshi Matsui, Xing Yan, and Nobuo Sakaguchi, GANP regulates JAK/STAT signal transduction pathway in germinal center B cells. 第 36 回日本免疫学会総会、12/11/2006、大阪
- ⑧ Okamoto Nobukazu, Hideya Igarashi, and Nobuo Sakaguchi、GANP is a master regulator for normal division process of mammalian cells、第 36 回日本免疫学会総会、12/11/2006、大阪
- ⑨ Xing Yan, Wang Xiaodan, Hideya Igarashi, and Nobuo Sakaguchi, G5PR is indispensable for differentiation and survival of T lineage cells、第 36 回日本免疫学会総会、12/11/2006、大阪
- ⑩ Wang Xiaodan, Xing Yan, Hideya Igarashi, and Nobuo Sakaguchi, Role of G5PR in the survival of T cells in early T lineage cell development、第 36 回日本免疫学会総会、12/11/2006、大阪
- ⑪ Teppei Toda, Hideya Igarashi, and Nobuo Sakaguchi, Generation of mature follicular B-cells with early B-lineage cell phenotype、第 36 回日本免疫学会総会、12/11/2006、大阪
- ⑫ 五十嵐英哉、阪口薫雄、RNAプライマーゼ GANPに会合するアルギニンメチル化酵素PRMT5の同定と機能の解析、第 65 回日本癌学会総会、9/28/2006、横浜
- ⑬ 岡元信和、五十嵐英哉、阪口薫雄、RNAプライマーゼGANPによる転写調節機能についての解析、第 65 回日本癌学会総会、9/28/2006、横浜
- ⑭ 刑岩、王晓丹、五十嵐英哉、阪口薫雄、T細胞特異的G5PR欠損マウスにおける胸腺細胞の分化異常および細胞死亢進のメカニズム、第 65 回日本癌学会総会、9/28/2006、横浜
- ⑮ Xing-Yan、五十嵐英哉、王晓丹、阪口薫雄、Protein phosphatase component G5PR plays a crucial role in the inhibition of BCR-induced apoptosis accompanied with the activation of JNK and Bim、第 35 回日本免疫学会総会・学術集会、12/14/2005、横浜
- ⑯ 藤村 睦、松井 健、五十嵐英哉、桑原一彦、阪口薫雄、DNA脱メチル化によるB細胞分化段階選択的な遺伝子発現、第 35 回

日本免疫学会総会・学術集会、12/14/2005、
横浜

⑰五十嵐英哉、戸田哲平、阪口薫雄、自己免疫疾患マウスにおける腹腔B-1細胞の receptor editingと生存についての分子制御、第35回 日本免疫学会総会・学術集会、12/14/2005、横浜

⑱五十嵐英哉、Xing-Yan、G5PR欠損B細胞における抗原受容体刺激惹起性のBim活性化異常によるアポトーシス誘導、第64回 日本癌学会学術総会、9/14/2005、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 英哉 (IGARASHI HIDEYA)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40291538