

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17844

研究課題名(和文) APOBEC3・AID二重欠損マウスを用いた白血病疾患モデルの構築と機能解析

研究課題名(英文) The functional analysis of leukemia disease and the construction of this disease model using APOBEC3/AID double knockout mice

研究代表者

月本 翔太 (Tsukimoto, Shota)

近畿大学・大学病院・助教

研究者番号：40790762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：APOBEC3はT細胞に発現は大変少なく、胚中心B細胞に強発現していること、そしてAPOBEC3は核以外の部分に存在していることをフローサイトメトリーおよび免疫組織学的染色で示すことができた。また造血幹細胞からの分化段階において、細胞障害性T細胞とヘルパーT細胞の分化でAPOBEC3タンパク質の発現に差があること、胸腺内のリンパ球前駆細胞の比較的早い段階でAPOBEC3タンパク質の発現が見られることが胸腺で見ることができた。また骨髄のような造血幹細胞から分化を始めた初期の段階ではAPOBEC3の発現は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APOBEC3をノックアウトしたマウスにおいて、Bリンパ腫が自然発症する現象が認められたことが本研究のスタートであった。この研究成果は、APOBEC3の動きを生理学的・組織学的に可視化できるマウスが出来上がったことが大きな成果である。

今後は、このマウスを使ってAPOBEC3とレトロウイルス感染の関連、そしてAPOBEC3ノックアウトマウスでのBリンパ腫発症の機序を説明することができるツールの一つとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Flow cytometry and immunohistological staining showed that APOBEC3 is very poorly expressed on T cells and strongly expressed on germinal center B cells, and that APOBEC3 is present outside the nucleus. In the thymus, APOBEC3 protein is expressed relatively early in the differentiation of lymphoid progenitors in the thymus, indicating that APOBEC3 protein is differentially expressed in cytotoxic T cells and helper T cells during differentiation from HSCs. APOBEC3 expression was not observed in the early stages of differentiation from hematopoietic stem cells, such as in the bone marrow.

研究分野：免疫学 麻酔科学

キーワード：APOBEC3 胚中心B細胞 FLAGノックインマウス 造血幹細胞 骨髄球系前駆細胞 リンパ球系前駆細胞 胸腺

1. 研究開始当初の背景

一般に、ヒトのがんは多段階の遺伝子変化を経て発生すると考えられている。多段階発癌の分子メカニズムを理解する上で、ウイルス発がんの実験系が果たしてきた役割には多大なものがあり、その中でもフレンド白血病ウイルス複合体は、他のレトロウイルスによる発がんの系と異なり、免疫系が完成した成体マウスへの接種で急性に赤白血病を誘発することができた。ウイルス発がんの分子メカニズム、ウイルス発がんに対する宿主免疫応答の役割を、2008年宮澤ら[1]によって報告した。さらにフレンド白血病ウイルスによる発がんの過程において、以前は造血系細胞の持つ受容体型チロシンキナーゼ Stk の短駆型である sf-Stk と gp55 とが複合体を形成し赤芽球前駆細胞に対する増殖誘導が生じる、その増殖誘導は生じた細胞にウイルス感染が生じると宿主遺伝子の発現に異常が生じることがあるといわれ、2段階発がん説が言われていたが、フレンドウイルスによる白血病誘発に極めて抵抗性の高い実験系マウス C57BL 系 (C57BL/10 (B10) や C57BL/6 (B6)) において sf-Stk の発現を欠損し、CD4 陽性 T リンパ球も欠損していた場合、多血症および赤白血病が生じる。また同様に CD8 陽性 T リンパ球を欠損する B6 マウスではフレンドウイルス感染後においても多血症や脾腫、白血病を発症することはなかった。こういった結果から、sf-Stk を発現する感受性系統のマウスでも、CD4 陽性 T リンパ球を予めフレンドウイルス抗原で感作しておくことで白血病を発症しない、さらに NK 細胞の存在が必須であることが分かっている[2, 3]。つまり、フレンドウイルスによる赤白血病の発症に sf-Stk を介する赤芽球前駆細胞の増殖誘導は必要でなく、1)造血系細胞転写制御因子 (Sfp1 や Fli1 遺伝子など) への SFFV プロウイルス組込みだけでいきなり白血病が起こる可能性があること、2)複製能を持つマウス白血病レトロウイルスによる白血病発症も最初に感染させたウイルスの組込みでいきなり白血病が生じる可能性があることを示した。その具体的な機序として、2008年宮澤らによって、1)同種由来のレトロウイルスに対する生理的な抵抗因子として存在する apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3)があること、2)抵抗性の APOBEC3 対立遺伝子を持つ B6 及び B10 系統のマウスではフレンド白血病ウイルス感染後、早期に中和抗体が産生されること、3)その一方で感受性の持つ対立遺伝子を持つ BALB/c や A 系統のマウスではウイルス複製が B6 マウスより 100 倍ほど促進され長期にわたってウイルス血症が持続することが報告された[4]。さらに抗体産生制御に関して、2008年に Greene らはウイルス中和抗体産生に関与し、免疫グロブリン分子抗原結合部位の体細胞高頻度突然変異とクラススイッチにかかわる activation-induced cytidine deaminase(AID)もウイルス抗原エピトープを認識する抗原結合部位の形成に関与している可能性があると報告している。また抗レトロウイルス中和抗体の産生促進する遺伝子 Recovery from Friend virus 3 (Rfv3)と APOBEC3 は同じ染色体上に存在し、遺伝子マッピングデータから Rfv3 遺伝子産物が APOBEC3 であるとも言われている。そして T リンパ球の約 3 倍程度 APOBEC3 が発現している B 細胞において、APOBEC3 欠損下ではマウスフレンド白血病ウイルスは B 細胞に特異的に感染し、中和抗体産生阻害だけでなく、骨髄から二次リンパ組織に移動した直後の transitional B リンパ球も減少させることから、APOBEC3 は transitional B リンパ球を F-MuLV 感染による死滅から守っていると考えられると報告した[5]。

2014年、Mario L. Santiago らによって、これまで APOBEC3 は B 細胞の細胞質内に存在するといわれていたが、「細胞分裂中の広範囲の核膜破壊によって mA3 は Ig DNA が急速に増殖する GC B 細胞にアクセスすることを可能にすると仮定する」、すなわち核内に存在している可能性があることを報告[6]し、今後の検討課題の一つでもある。

そして、APOBEC3 の生理作用として、フレンドウイルス感染に自然抵抗性の B6 マウスから APOBEC3 遺伝子をノックアウトすると、フレンドウイルスの複製が 100 倍ほど促進され、重症化することも証明された[4]。さらに研究を進めるうちに、APOBEC3 欠損 B6 マウスと AID 欠損 B6 マウスを配合させた APOBEC3/AID 2 重欠損マウスにおいて、脾腫だけでなく胸腺腫などが自然発症し、腹部が腫脹する現象が見られた。それらは一定の割合で発症し、生存期間も短いことも分かった。

2. 研究の目的

一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼ APOBEC3 は、シチジン(C)を脱アミノ化反応によりウリジン(U)へと変換し、レトロウイルス複製制限因子として機能する RNA/DNA 編集酵素群の一つである。これまで APOBEC3 遺伝子ノックアウトマウスに対して、マウス乳癌ウイルス (MMTV) やマウス白血病ウイルス (MuLV) に感染させると著しいウイルス複製促進、高病原性を示すことが知られ、また他の癌腫でも APOBEC3 特異的なゲノム変異が高確率で認められることが分かっている。ゲノム変異における APOBEC3 の役割が明らかになったとはいえ、その変異が発がんそのものに及ぼす影響は不明である。

そういったウイルス感染によって様々な病態が生じることはわかっていると同時に APOBEC3 の RNA レベルの解析は比較的進んでいたが、タンパク質レベルでの解析は特異的な抗体がないことなど技術的に困難な面が多々存在していた。そこで APOBEC3 の細胞

内および組織内分布を解析することで、機能解析につながると考えた。

FLAG タグ融合は、目的タンパク質に融合して発現される短い8アミノ酸の、親水性ペプチド (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) を用い、目的遺伝子のN末端などに結合させるものである。目的の遺伝子または他の遺伝子の機能等を変化させたりするなど不利益の面も生じる可能性がある一方で、ウェスタンブロット、免疫組織化学、免疫沈降、フローサイトメトリー、タンパク質精製やタンパク質間相互作用、細胞の微細構造、タンパク質同定等、多くのアプリケーションによって ANTI-FLAG 抗体を用いたタンパク質の検出、精製がさらに容易になる。マウス APOBEC3 のN末端に FLAG タグを、CRISPER-Cas9 による遺伝子編集技術を用いて、FLAG ノックインマウスを作製した。

また近畿大学免疫学が得意とするレトロウイルス感染プロトコルによって FLAG ノックインマウスを用いて、APOBEC3 の機能解析をより進めることが研究の目的の一つである。

3. 研究の方法

FLAG ノックインマウスの生理学的機能解析

B6 マウスから遺伝子導入技術を用いてマウスを作製したため、FLAG ノックインマウスを用いて APOBEC3 の発現に異常がないか確認を行った。

- (1) RT-PCR
- (2) Western-Blot
- (3) real-time PCR
- (4) フローサイトメトリー
- (5) 免疫組織化学染色 (脾臓、パイエル板、胸腺など)

FLAG タグを持たない B6 マウスにおいてはどの方法でも FLAG-APOBEC3 タンパク質は検出されず、一方で FLAG ノックインマウスからはすべて FLAG-APOBEC3 タンパク質は検出可能であった。

・FLAG-APOBEC3 タンパク質の脾臓における細胞内・組織局在の検証

本研究実験中における脾臓の免疫組織学的染色では、FLAG-APOBEC3 は B220 陽性かつ CD3 陰性細胞領域、すなわち胚中心と思われる領域に高発現していること、およびその染色部位は、核が染色されず抜けていることが見て取れた。その結果をもとにフローサイトメトリー法にて更なる B 細胞分画の検索を実施した。B220 陽性、GL-7 陽性、CD95 陽性分画に FLAG-APOBEC3 タンパク質が高発現していることが分かり、胚中心 B 細胞に FLAG-APOBEC3 タンパク質が高発現していることを強く裏付けすることができた。

・FLAG-APOBEC3 タンパク質の胸腺における細胞内・組織局在の検証

脾臓のフローサイトメトリー法において、T 細胞分画 (CD3 陽性、CD19 陰性) では FLAG-APOBEC3 タンパク質の発現量は、B6 マウスと同程度であった。しかしながら、RT-PCR や免疫組織化学的染色の結果からは、APOBEC3 タンパク質の存在はすでに報告されていた。すなわち、分化段階において成熟する過程で APOBEC3 タンパク質の発現が減少する可能性があると考え、リンパ球前駆細胞から分化段階における FLAG-APOBEC3 タンパク質の発現量を検討した。その結果、CD8 陰性 CD4 陰性 CD44 陰性 CD25 陰性分画から CD25 が陽性化する段階で、FLAG-APOBEC3 タンパク質の発現が B6 マウスと比較して上昇し始めることが分かった。その後、CD8 陽性 CD4 陽性分画まで B6 マウスと比較し FLAG-APOBEC3 タンパク質の発現量に差があったが、CD8 陽性 CD4 陰性分画 (細胞障害性 T 細胞) では FLAG-APOBEC3 タンパク質の発現量に差はあったが、CD8 陰性 CD4 陽性分画 (ヘルパー T 細胞) には FLAG-APOBEC3 タンパク質の発現量に B6 マウスとの差はなくなった。

・FLAG-APOBEC3 タンパク質の骨髄における細胞内・組織局在の検証

さらに造血幹細胞における FLAG-APOBEC3 タンパク質発現量の検討を行った。ここでは Sca-1、c-Kit 分画で検討したが、どの分画でも B6 マウスと明らかに差が生じる細胞分画は存在しなかった。

APOBEC3/AID 2 重欠損マウスを用いた生理学的および組織学的評価

本研究実施前から、APOBEC3/AID 2 重欠損マウス (WKO マウス) では、腫瘍による腹部腫脹・膨満が認められた。それら WKO マウスの腫瘍は免疫学的組織染色の結果から B リンパ腫であるという所見は得ていた。さらに B6 マウス、APOBEC3 ノックアウトマウス、AID ノックアウトマウス、WKO マウスの 4 系統において、WKO マウスは生存期間が一番短く、次いで APOBEC3 ノックアウトマウス、AID ノックアウトマウスと B6 マウスには有意な差はなかった。この結果から、APOBEC3 はリンパ腫発生に関与している可能性が示唆され、上記 FLAG-APOBEC3 の機能解析を急いだ経緯が存在する。

4 . 研究成果

以上のことから、APOBEC3 は胚中心 B 細胞に強発現し、またそれは核以外の部分に存在していることを示した (Tsukimoto.S, et al. Distinctive High Expression of Antiretroviral APOBEC3 Protein in Mouse Germinal Center B Cells. *Viruses*, 2022. DOI: 10.3390/v14040832)。さらに分化段階において、細胞障害性 T 細胞とヘルパー T 細胞の分化で APOBEC3 タンパク質の発現に差があること、胸腺内のリンパ球前駆細胞の比較的早い段階で APOBEC3 タンパク質の発現が見られることが胸腺で見ることができた。

近畿大学免疫学教室が得意とするフレンドウイルス感染による FLAG-APOBEC3 タンパク質の発現変化を見ることにより、マウスレトロウイルス複製を制御している APOBEC3 のより機能解析を進めることで、より APOBEC3 の機能解析につながると考える。

さらに APOBEC3 が胚中心 B 細胞に高発現することが分かってきたため、その結果と APOBEC3/AID ダブルノックアウトマウスに自然発現する B リンパ腫との関連に関して「基盤研究 (B) APOBEC3 欠損による B リンパ腫発生の分子機構」で今後突き詰めていき、生理学的・組織学的解析を行っていく予定である。

参考文献

1. Masaaki. M et al. *Host genetic factors that control immune responses to retrovirus infections*. Vaccine Volume 26, Issue 24, 6 June 2008, Pages 2981-2996
2. Sachiyo Tsuji-Kawahara, Masaaki Miyazawa .et al. *Differential requirements of cellular and humoral immune responses for Fv2-associated resistance to erythroleukemia and for the regulation of retrovirus-induced myeloid leukemia development*. J Virol. 2013 Dec;87(24):13760-74
3. NORIMASA IWANAMI, MASA AKI MIYAZAWA et al. *Role of Natural Killer Cells in Resistance against Friend Retrovirus-Induced Leukemia*. JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2001, p. 3152–3163
4. Masaaki Miyazawa et al. *Mouse APOBEC3 Restricts Friend Leukemia Virus Infection and Pathogenesis In Vivo*. JOURNAL OF VIROLOGY, Nov. 2008, p. 10998–11008
5. Sachiyo Tsuji-Kawahara, Masaaki Miyazawa. et al. *Persistence of Viremia and Production of Neutralizing Antibodies Differentially Regulated by Polymorphic APOBEC3 and BAFF-R Loci in Friend Virus-Infected Mice*. JOURNAL OF VIROLOGY, June 2010, p. 6082–6095
6. Mario L. Santiago, et al. Immunoglobulin somatic hypermutation by APOBEC3/Rfv3 during retroviral infection. PNAS May 27, 2014 vol. 111 no. 21
7. Yoriko Saito et al. *Overcoming mutational complexity in acute myeloid leukemia by inhibition of critical pathways*, Science Translational Medicine, doi: 10.1126/scitranslmed.aao1214

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shota Tsukimoto, Yoshiyuki Hakata, Sachiyo Tsuji-Kawahara, Takuji Enya, Tetsuo Tsukamoto, Seiya Mizuno, Satoru Takahashi, Shinichi Nakao and Masaaki Miyazawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Distinctive High Expression of Antiretroviral APOBEC3 Protein in Mouse Germinal Center B Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 832
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shota Tsukimoto, Sachiyo Tsuji-Kawahara, Takuji Enya, Yoshiyuki Hakata, Tetsuo Tsukamoto, Masaaki Miyazawa
2. 発表標題 Distinctive high expression of antiretroviral APOBEC3 protein in germinal center B cells.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 月本 翔太, 博多 義之, 塚本 徹雄, 塩谷 拓嗣, 宮澤 正顯
2. 発表標題 FLAG-ノックインマウスを用いたAPOBEC3タンパク質の組織・細胞内局在の解析
3. 学会等名 近畿大学大学院サイエンスネットワーク2019・第9 回院生サミット
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮澤 正顯 (Miyazawa Masaaki) (60167757)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河原 佐智代 (Kawahara Sachiyo) (60297629)	近畿大学・医学部・特任講師 (34419)	
研究協力者	博多 義之 (Hakata Yoshiyuki) (30344500)	近畿大学・医学部・講師 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関