

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09491

研究課題名(和文) B細胞性リンパ腫の新規制御機構

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanism of B-cell lymphoma

研究代表者

高村 祥子(赤司祥子)(Akashi-Takamura, Sachiko)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00325599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞性リンパ腫の新規制御機構として、血清タンパクMD-1によるB細胞活性化制御が示唆された。MD-1はB細胞活性化を誘導するRP105に会合し、かつ脂質結合分子でもあることから脂質結合とB細胞活性化との関連が考えられる。MD-1結合脂質とその受容体によるB細胞活性化増強作用と、MD-1欠失にともなうSLEモデルマウスでのB細胞性リンパ腫移行傾向とがどう関係するのかに関してはさらなる解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：As a new control structure of B cell lymphoma, B-cell activated control by serum protein MD-1 was suggested. Because MD-1 is a lipid binding molecule and it also associates with RP105 inducing B-cell activation, lipid combination and the connection with the B-cell activation are thought about. Further analysis is necessary how the B cell lymphoma tendency is gained in the MD-1 deleted SLE model mouse by the B-cell activation reinforcement through Lipid and the receptor.

研究分野：免疫学

キーワード：MD-1 RP105 脂質受容体 S1P

1. 研究開始当初の背景

びまん性大細胞性リンパ腫 (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) とは非ホジキンリンパ腫の中で主体を占める大型B細胞増殖型のリンパ腫であり、日本では全悪性リンパ腫中33%も占める発症頻度の高い疾患である。EBウイルス感染をはじめとする免疫反応の持続が、免疫グロブリン再構成に伴う染色体転座などの遺伝子変化の蓄積とあいまって発症するとされているものの、多くは原因不明である。標準治療として抗体薬であるリツキサンに、ステロイドと3種類の抗がん剤を組み合わせた多剤併用療法が行われており5年生存率は80%前後となっているが、難治例では30%を切る状況である。このような状況から、発症原因の解明は非常に重要となっている。

われわれは Toll-like Receptor (TLR) に会合する血清タンパク、MD-1 や MD-2 を発見した。MD-1 はエンドトキシンショックの原因となるリポポリサッカライド (LPS) の受容体である TLR4/MD-2 複合体のように、RP105 という TLR4 類似の膜貫通タンパクに結合しており、RP105 や MD-1 に対する抗体で架橋すると脾臓 B 細胞に強い活性化を誘導できる。MD-1 による B 細胞活性化の有無を個体レベルで調べるため、作製した MD-1 欠失マウスをワイルドタイプマウスと比較検討したが大きな影響は認めなかった。しかしながらマウスのバックグラウンドを B6 から SLE 発症マウスである B6/lpr に変えると、**MD-1 欠失マウスではリンパ節や脾臓の腫大が著しく増強し、中には肝臓にもリンパ球浸潤を認め、**転移がん状態を呈するものが認められた。B6-lpr マウスは Fas 遺伝子の変異により異常 T 細胞の増殖をきたすマウスであるが、MD-1 欠失群では逆に B 細胞がモノクローナルに増殖し、B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) を発症しておりまたその発症頻度も上昇していた。以上のように SLE 発症マウスのように異常リンパ球が増殖しやすい状況下で MD-1 が欠失すると、B 細胞性リンパ

腫になることがあるという結果を見出した。これらの結果は、血清中 MD-1 が通常は B 細胞増殖を抑制し B 細胞性リンパ腫を制御している可能性を示している。

2. 研究の目的

以上よりまずは(1)、(2)の目的を挙げた。

(1) MD-1 による B 細胞性リンパ腫発症制御機構を明らかにする。

(2) B リンパ球増殖制御方法を検討する。

次に MD-1 が脂質を内包するポケットをもつことに着目して MD-1 結合脂質を検討した結果、S1P (Sphingosine-1-phosphate) との関連が示唆された。リゾリン脂質の一つである S1P はリンパ球の migration に重要であり、受容体 S1P1 とともに B 細胞の成熟や活性化にも影響しているという報告もある。以上より

(3) BCR・S1P1 と MD-1 との関係を明らかにする。

という目的も追加した。

最終的には B 細胞リンパ腫発症メカニズムを脂質応答の観点から解析し、免疫機構における脂質応答の役割を検討する。また脂質受容体拮抗剤や MD-1 を用いた B リンパ球増殖制御方法も探る。またヒトでも同様な結果が得られるか、ヒト検体での解析も予定する。

3. 研究の方法

前述 3 項目に関してそれぞれ以下の方法での解析を計画した。

(1). MD-1 による B 細胞性リンパ腫制御機構を明らかにする。

① MD-1 会合脂質 S1P による B 細胞活性化機構を明らかにする。

② S1P/S1P 受容体 シグナルへの MD-1 の影響を明らかにする。

(2) B リンパ球増殖制御方法を検討する。

① 精製 MD-1 (2011., J. Mol. Biol.) や S1P1 アンタゴニストである FTY720 を B6MD-1 欠失/B6/lpr (自己免疫疾患マウス) に投与し、

B細胞リンパ腫を縮小できるか検討する。

- ②MD-1欠失/B6/lprマウスにB6MD-1Tgをかけあわせて、リンパ腫が発症しにくくなるか検討する。
- ③MD-1欠失/B6/lprマウスに高脂肪食を投与することでS1Pが増えるとリンパ腫が改善または増悪するかどうか検討する。

(3)ヒト検体でのBCR・S1P1とMD-1との関係を明らかにする。

- ①ヒトでもマウス同様S1P1とBCRとが共沈し、ヒトB細胞の活性化においてもS1P1が影響するかどうか、ウエスタンやFACS、共焦点顕微鏡で検討を行う。
- ②ヒトリンパ腫患者の健常部と病変部とで、S1P1やMD-1の発現に変化があるかどうかを、消化管や皮膚の生検検体でreal-time PCRなどで検討する。また組織標本でS1P1やBCRの共局在を確認する。
- ③ヒト血清中のS1P濃度が、健常時や治療時と発症時とで異なるかを検討する。
- ④ヒト血清中MD-1濃度を、抗体を用いたサンドイッチELISAの系を確立して検討する。この為ヒトMD-1抗体作製も予定する。

4. 研究成果

(1). MD-1によるB細胞性リンパ腫制御機構を明らかにする。

①MD-1がS1Pをはじめ種々のリゾリン脂質とも結合することを、精製MD-1と脂質を用いたNative Page法にて見出した。②MD-1とのかかわりを調べるためS1P受容体欠失マウスで検討したところ、RP105抗体刺激やB細胞受容体刺激などによるB細胞の活性化や増殖反応がワイルドタイプに比べ減弱していることがわかった。またこのB細胞ではimmature B細胞が増加しmature B細胞が減少していたことから、S1PシグナルはB細胞の成熟分化にも関与することがわかった。なおS1P1アンタゴニストやスフィンゴシンキナーゼインヒビターによる結果でもS1P機能阻害によりB細胞活性化が抑制されるという結

果を得た。以上よりS1PシグナルはB細胞活性化において重要であることがわかった。

③B細胞受容体(BCR)やS1P受容体に対する抗体を用いた免疫沈降結果から、BCRとS1P受容体とが会合していることが判明し、S1PシグナルがBCRシグナルを強める機能があると考えられた。④MD-1ノックダウンB細胞ラインを用いた結果から、MD-1がS1P-S1P受容体との結合を負に制御していることが考えられた。⑤マウスMD-1に対するモノクローナル抗体を作製し、これらを用いてサンドイッチELISAの系を作った。これによりマウス血清中にも分泌されたMD-1タンパクが1ミリリットルあたり0.25-1.11マイクログラム存在することが判明した。

なおマウス解析に関してはSLEモデルマウスにMD-1欠失マウスをかけあわせたマウスにおいて、各兄弟同士のヘテロマウスと比べて脾腫、リンパ節腫大などのSLE症状の増悪を統計的に認めている。さらにMD-1欠失マウスをかけあわせたマウスにおいて、Bリンパ球浸潤やB細胞性リンパ腫への傾向が見られるものの統計的に差が得られるほど症例数がそろっていないため引き続き飼育・解析を続けている。B細胞性リンパ腫への移行を示すイムノグロブリン遺伝子再構成でのモノクローナルな増殖傾向が、マウスの症状が進行した半年以上でないと出現しないため長く時間がかかる結果となっている。

(2)Bリンパ球増殖制御方法を検討する。

MD-1結合脂質のひとつ、S1Pの受容体がB細胞受容体(BCR)と会合していることを以前から見出していたが、このS1P-S1P1によるB細胞活性化増強作用と、(1)のMD-1欠失にともなうB細胞性リンパ腫移行傾向とどう関係するのかに関して、シグナル解析を中心に検討中である。計画(2)①~③に関してはin vivoでのBリンパ球増殖レベルの解析方法確立が難しく進めにくい状況になり、(1)や(3)の解析完了後に行うこととした。

(3)ヒト検体でのBCR・S1P1とMD-1との関係を明らかにする。

S1P1 と MD-1 との遺伝子発現において関連は見いだせなかったが、B 細胞性リンパ腫とはある関連を見出しており、その利用可能性を検討している。なおヒト血清中 MD-1 濃度を、抗体を用いたサンドイッチ ELISA の系で検討する方法を確立したためこちらも検討を進めてゆく。

また発展として、作製したマウスMD-1に対するモノクローナル抗体を用いてELISAシステムを確立し、血清MD-1は感染、高栄養食、虚血再灌流障害などのストレスの際に高く発現してくることも見出し学会や論文に報告した(論文⑨、学会⑤⑥⑩⑪、図書①)。今後はこのMD-1の上昇にどのような意味があるのか、並行して明らかにしていく。

さらに発展として、MD-1と機能的に関連があるToll-like Receptor2 (TLR2)やTLR4に会合する分子として補体制御分子C4b-binding protein (C4BP)を見出し、C4BPが細胞レベルだけでなく生体レベルでもTLR2応答を制御していることを論文にまとめ発表した(論文⑤⑥、学会①③⑫⑬、図書②)。また作製したモノクローナル抗体などをさらに生体レベルで利用しやすくする手段として、抗体遺伝子投与による受動免疫法の効果的な投与方法を確立し発表した(論文①⑦、学会②④⑦)。

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 10 件)

①Yamazaki, T., M. Nagashima, D. Ninomiya, A. Aina, A. Fujimoto, I. Ichimonji, H. Takagi, N. Morita, K. Murotani, H. Hasegawa, J. Chiba, and S. Akashi-Takamura. 2018. Neutralizing Antibodies Induced by Gene-Based Hydrodynamic Injection Have a Therapeutic Effect in Lethal Influenza Infection. *Front Immunol* 9:47. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00047 査読有

②Kusumoto, Y., H. Okuyama, T. Shibata, K. Konno, Y. Takemoto, D. Maekawa, T. Kononaga, T. Ishii, S. Akashi-Takamura, S.I. Saitoh, R. Ikebuchi, T. Moriya, M. Ueda, K.

Miyake, S. Ono, and M. Tomura. 2018. Epithelial membrane protein 3 (Emp3) downregulates induction and function of cytotoxic T lymphocytes by macrophages via TNF-alpha production. *Cell Immunol* 324:33-41. DOI: S0008-8749(17)30220-4 [pii] 10.1016/j.cellimm.2017.12.001 査読有

③Iijima, J., S. Kobayashi, S. Kitazume, Y. Kizuka, R. Fujinawa, H. Korekane, T. Shibata, S.I. Saitoh, S. Akashi-Takamura, K. Miyake, E. Miyoshi, and N. Taniguchi. 2017. Core fucose is critical for CD14-dependent Toll-like receptor 4 signaling. *Glycobiology* 27:1006-1015. DOI: 10.1093/glycob/cwx075 4096881 [pii] 査読有

④Okamoto, N., K. Mizote, H. Honda, A. Saeki, Y. Watanabe, T. Yamaguchi-Miyamoto, R. Fukui, N. Tanimura, Y. Motoi, S. Akashi-Takamura, T. Kato, S. Fujishita, T. Kimura, U. Ohto, T. Shimizu, T. Hirokawa, K. Miyake, K. Fukase, Y. Fujimoto, Y. Nagai, and K. Takatsu. 2017. Funiculosin variants and phosphorylated derivatives promote innate immune responses via the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2 complex. *J Biol Chem* 292:15378-15394. DOI: 10.1074/jbc.M117.791780 M117.791780 [pii] 査読有

⑤Morita, N., T. Yamazaki, Y. Murakami, R. Fukui, I. Yamai, I. Ichimonji, A. Nakashima, F. Nagaoka, H. Takagi, K. Miyake, and S. Akashi-Takamura. 2017. C4b-binding protein negatively regulates TLR4/MD-2 response but not TLR3 response. *FEBS Lett* 591:1732-1741. DOI: 10.1002/1873-3468.12693 査読有

⑥Morita N, Yamai I, Takahashi K, Kusumoto Y, Shibata T, Kobayashi T, Nonaka MI, Ichimonji I, Takagi H, Miyake K, Akashi-Takamura S. 2017. C4b binding protein negatively regulates TLR1/2 response. *Innate Immun* 23(1):11-19,2017.DOI:10.1177/1753425916672312 査読有

⑦山崎達也、千葉丈、高村(赤司)祥子 インフルエンザウイルス感染に対する抗体・プラスミド療法 臨床免疫・アレルギー科 68(1) P38-45, 2017 <http://www.kahyo.com/brand/b-M201707-681> 査読無し

⑧Marlini, M., A. Mabuchi, B.L. Mallard, N. Hairulhisyam, S. Akashi-Takamura, J.L. Harper, and A.M. Wheatley. 2016. Delayed

liver regeneration in C3H/HeJ mice: possible involvement of haemodynamic and structural changes in the hepatic microcirculation. *Exp Physiol*101:1492-1505.DOI:10.1113/EP085727 査読有

- ⑨ Thomas Jennings, R., E. Odkhuu, A. Nakashima, N. Morita, T. Kobayashi, I. Yamai, M. Tanaka, T. Suganami, S. Haga, M. Ozaki, Y. Watanabe, Y. Nagai, K. Takatsu, T. Kikuchi-Ueda, I. Ichimonji, Y. Ogawa, H. Takagi, T. Yamazaki, K. Miyake, and S. Akashi-Takamura. 2016. Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. *Int Immunol* 28:503-512. DOI: dxw031 [pii] 10.1093/intimm/dxw031 査読有
- ⑩ Deguchi, A., T. Tomita, U. Ohto, K. Takemura, A. Kitao, S. Akashi-Takamura, K. Miyake, and Y. Maru. 2016. Eritoran inhibits S100A8-mediated TLR4/MD-2 activation and tumor growth by changing the immune microenvironment. *Oncogene* 35:1445-1456. DOI: 10.1038/onc.2015.211onc2015211[pii] 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

- ① S. Akashi-Takamura, Morita, N., T. Yamazaki, I. Ichimonji, Y. Murakami, R. Fukui, T. Shibata, T. Kobayashi, Y. Kusumoto, K. Miyake. C4b-binding protein negatively regulates cell-surface TLRs response. 日本免疫学会学術集会 2017 年
- ② T. Yamazaki, A. Ainai, I. Ichimonji, Morita, N., S. Akashi-Takamura. Neutralizing Antibodies Induced by Gene-Based Hydrodynamic Injection Have a Therapeutic Effect in nasal Influenza virus Infection. 日本免疫学会学術集会 2017 年
- ③ 高村祥子、森田奈央子、山崎達也 補体制御因子 C4BP は TLR4/MD-2 応答も制御する 日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2017 年
- ④ 山崎達也、千葉丈、高村(赤司)祥子 インフルエンザウイルス感染に対する中和抗体遺伝子を用いた治療法の検討 日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2017 年
- ⑤ S. Akashi-Takamura, Thomas Jennings, R., E. Odkhuu, A. Nakashima, N. Morita, T. Kobayashi, M. Tanaka, T. Suganami, S. Haga, Y. Nagai, K. Miyake. Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. 第 19 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム慢性炎症・機序と制御 2017 年

- ⑥ S. Akashi-Takamura, Thomas Jennings, R., A. Nakashima, N. Morita, T. Kobayashi, Y. Watanabe, Y. Nagai, K. Takatsu, T. Kikuchi-Ueda, I. Ichimonji, H. Takagi, T. Yamazaki, K. Miyake. Novel antibodies detect the increased level of soluble MD-1 during inflammation. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016 年
- ⑦ T. Yamazaki, A. Ainai, S. Akashi-Takamura. Antibody-based immunotherapy with plasmid vector for influenza virus infection. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016 年
- ⑧ N. Tanimura, S. Takamura, K. Miyake. Regulatory roles against sphingosine-1-phosphate activity via MD-1. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016 年
- ⑨ N. Okamoto, H. Honda, S. Akashi-Takamura, Y. Nagai, K. Takatsu. Agonistic effects of synthetic derivatives of funiculosin on mouse/human TLR4/MD-2. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016 年
- ⑩ S. Akashi-Takamura. Novel antibodies detect the increased level of soluble MD-1 during inflammation. 第 22 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2016 年
- ⑪ Sachiko Akashi-Takamura, Richard Thomas Jennings, Erdenezaya Odkhuu, Akina Nakashima, Naoko Morita, Toshihiko Kobayashi, Ikuko Yamai, Miyako Tanaka, Takayoshi Suganami, Sanae Haga, Michitaka Ozaki, Yasuharu Watanabe, Yoshinori Nagai, Kiyoshi Takatsu, Takane Kikuchi-Ueda, Isao Ichimonji, Yoshihiro Ogawa, Kensuke Miyake MD-1 is a valuable biomarker for inflammatory responses. Keystone symposia Q7&Q8(Immunometabolism in Immune function and Inflammatory Disease) 2016 年
- ⑫ 森田奈央子、高村(赤司)祥子 補体制御因子 C4BP は TLR2 応答も制御する 第 21 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2015 年
- ⑬ Morita N, Odkhuu, E., Ichimonji I., Miyake K, Akashi-Takamura S. C4b binding protein influences TLR2 response. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 2015 年
- ⑭ Tanimura N., Akashi-Takamura S., Yamakawa N., Miyake K. MD-1 negatively regulates b cell-related inflammation. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 2015 年

〔図書〕(計 2 件)

①一文字功、高村(赤司)祥子 医学図書出版 エンドトキシン・自然免疫研究 20 自然免疫における化学生物学の貢献 2017 年 P50～53 (抗 MD-1 抗体による, 炎症反応における血清中 MD-1 の測定意義)

②森田奈央子、高村(赤司)祥子 医学図書出版 エンドトキシン・自然免疫研究 19 新たな基礎と臨床の架け橋 2016 年 P1～5 (TLR の制御機構と新規制御因子について)

[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

教室:

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/M-I2/index.html>

大学:

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060702/06.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高村 祥子 (赤司 祥子)

(TAKAMURA Sachiko)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00325599

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

オドク エリデネザヤ

(Odkhuu Erdenezaya)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40737681

(現在モンゴル大学医学部 講師)

(4) 研究協力者

なし ()