

令和元年6月19日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05138

研究課題名(和文) 免疫反応の多様性を演出する活性化B細胞分化制御機構—ミトコンドリアとB細胞分化—

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of activated B cell fate which contribute diversity of immune response

研究代表者

菅井 学 (Sugai, Manabu)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：90303891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：獲得免疫とは非常に多様性に富んだ受容体を発現しているリンパ球が担っている反応であり、特異的受容体を介して抗原を認識することで免疫反応が開始される。このうち、抗体産生細胞であるB細胞は、活性化に伴い様々な細胞に分化する事が知られているが、その分化決定機構の詳細は不明である。私たちは、活性化B細胞に起こる二つのイベント(クラススイッチ組換えと形質細胞分化)が、ミトコンドリアの機能的相違によって事前に方向付けられている事を見出した。本研究では、このミトコンドリア機能の相違による活性化B細胞分化制御機構の実態を更に詳細に検討すると共に、ミトコンドリアによる細胞分化制御機構の一般性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分化を司る転写因子ネットワークの重要性は既に広く知られているが、分化決定の初期過程や、その後引き続いて確立される安定した転写因子ネットワーク(分化決定)に至る過程、さらには安定した分化状態から別の分化状態に移行する過程の詳細は不明である。本研究では、この未解明な分野に光を当て、その一端を明らかにした事によって、細胞分化の理解に貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：The acquired immune response is mediated by lymphocytes, which express highly diverse receptors. After lymphocytes specifically recognize the antigen through their specific receptors, immune reactions started. Among the acquired immune cells, B lymphocytes, which produce immunoglobulin, differentiate into various cells upon activation. Precise mechanism that govern cell fate determination processes of activated B cells are not well understood. We previously found that mitochondrial status influence cell fate determination of activated B cells. For instance, the choice of PCD (plasma cell differentiation) or CSR (class switch recombination), which occurs in activated B cells, was dependent on mitochondrial functional activity. In this study, we examined in more detail the control mechanism of activated B cell differentiation by the difference in mitochondrial function.

研究分野：分子生物学 分子免疫学

キーワード：B cell Mitochondria Metabolism Differentiation クラススイッチ組換え 形質細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子生物学的手法の進歩によってもたらされた、遺伝子機能に関する膨大な知識から、細胞分化の理解は飛躍的に深まっている。例えば活性化B細胞では、クラススイッチ組換えに必要な遺伝子群や、形質細胞分化に必要な遺伝子群の多くは既に明らかである。しかし、分化の方向性を決定する初期過程についてはほとんど分かっていない。細胞分化は一般的に instructive な(方向付け)シグナルと細胞内の確率的な現象によって決定される事が知られている。活性化B細胞でも同様な機構の存在は示されているが、実際に『形質細胞に分化するのか? クラススイッチ組換えを誘導するのか?』を決定している、確率的变化や、instructive なシグナルの実態は、今日までまったく不明であった。我々は、このシグナルの一つが『ヘム』であることを明らかにした。この発見は、活性化B細胞は、ミトコンドリアの活性の違いによって、クラススイッチ組換えを起こしやすい細胞集団と、形質細胞に分化しやすい細胞集団に分けられることを見いだしたことが鍵となった。この細胞集団を比較することによって、1) ミトコンドリア活性が高い細胞は、活性酸素種(ROS)の発生が増強した結果、ヘム合成が阻害される事。2) この細胞では、ヘムによって活性が抑制される転写因子 Bach2 の機能が維持されるため、クラススイッチに必須の酵素 AID の発現が誘導され、クラススイッチ組換えが起こる事、を見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、クラススイッチ組換えと形質細胞分化を決定づける分子機構の詳細をさらに明らかにすることを目指した。これに加えて、ミトコンドリアによる分化制御メカニズムの普遍性と、分化する細胞系列の違いによる分化決定メカニズムの違いを明らかにする事も目的とした。

3. 研究の方法

クラススイッチ組換えと形質細胞分化を決定づける分子機構の詳細をさらに明らかにするために、ミトコンドリア状態の異なる細胞(クラススイッチ組換えと形質細胞分化それぞれに適したミトコンドリア状態の細胞)における遺伝子発現の変化を調べる。さらにミトコンドリアによる分化制御メカニズムの普遍性と、分化する細胞系列の違いによる分化決定メカニズムの違いを明らかにする事を目的として、活性化B細胞から分化する様々な細胞系列のミトコンドリアの状態を調べ、ミトコンドリア状態と分化との関係を検索する。これに加え、これらの細胞における遺伝子発現や代謝産物の変化を調べることによって、ミトコンドリア状態変化に依存した分化制御機構の解明を目指す。クラススイッチする細胞と、形質細胞に分化する細胞で発現しているタンパク質を比較した実験を行い、それぞれに特徴的な遺伝子発現パターンの検出に努める。

4. 研究成果

脾臓から調整したナイーブB細胞を LPS+IL4 で刺激し、in vitro にてクラススイッチ組換えと形質細胞への分化誘導を行った。この分化誘導二日目の細胞を Mitotracker Green と Mitotracker Red で染色し、ミトコンドリア活性の高い細胞集団(クラススイッチしやすい細胞)と、ミトコンドリア活性の低い細胞集団(形質細胞に分化しやすい細胞)をセルソーターを用いて分離調製した。これらの細胞で発現している RNA を DNA アレイで解析し、発現しているタンパク質を iTRAQ 法を用いたショットガン解析で調べた。Gene sets enrichment 解析から、ミトコンドリア活性の高い細胞(クラススイッチしやすい細胞)では、順に RNA 分解、スプライソソーム、相同組換えに關与する遺伝子の発現が高いことが明らかになった。ミトコンドリア活性の低い細胞(形質細胞に分化しやすい細胞)では、信頼性の高い順に、タンパク輸送、リボソーム、ナトリウム再吸収に關与する遺伝子の発現が高いことが明らかになった。これに続く遺伝子セットとしては、オートファジー制御、リソソームなどがあげられる。後半の二つは形質細胞分化との関連が以前から報告されている遺伝子群である。個々の RNA 発現量は実際にはタンパク質量と相関しないものも多く、今後、クラススイッチ組換えと形質細胞分化決定に關わる遺伝子を更に詳細に解析するには、すぐれた2次スクリーニング系を立ち上げる必要があり、現在準備中である。さらにこの分化誘導系を用いて、分化決定に關わる代謝産物の検索にも着手したところである。活性化B細胞から分化する様々な細胞系列におけるミトコンドリア状態を調べる実験では「記憶B細胞」、「長期生存形質細胞」、「制御性B細胞」の細胞集団中に性質の異なった亜集団が存在することが明らかになり、これらの細胞集団を単離する事に成功した。今後は、この細胞の性質を詳細に調べ細胞分化に關与する因子の同定を目指す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11件)

1. Katsuhiko Itoh, Gen Kondoh, Hitoshi Miyachi, Manabu Sugai, Yoshiyuki Kaneko, Satsuki Kitano, Hitomi Watanabe, Ryota Maeda, Akihiro Imura, Yu Liu, Chizuru Ito, Shigeyoshi Itohara, Kiyotaka Toshimori and Jun Fujita

Dephosphorylation of protamine 2 at serine 56 is crucial for murine sperm maturation in vivo *Science Signaling* 26 Mar 2019:Vol. 12, Issue 574, eaao7232 (査読有り)
DOI: 10.1126/scisignal.aao7232

2. Akari Nitta, Isei Tanida, Ayumi Igarashi, Takashi Ueno, Manabu Sugai and Koji Aoki
Blocking LC3 lipidation and ATG12 conjugation reactions by ATG7 mutant protein containing C572S *Biochemical and Biophysical Research Communications* 508(2) November 2018 (査読有り)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.11.158
3. Yuji Yamazaki, Yukiko Nambu, Masashi Ohmae, Manabu Sugai and Shunsaku Kimura
Immune responses against Lewis Y tumor-associated carbohydrate antigen displayed densely on self-assembling nanocarriers *Organic & Biomolecular Chemistry* 16(43) October 2018 (査読有り)
DOI: 10.1039/C8OB01955J
4. Yu Isobe, Katsu Takahashi, Honoka Kiso, Kazumasa Nakao, M. Ikeno, Noriaki Koyama, Manabu Sugai, Akira Shimizu, Hironori Haga and Kazuhisa Bessho
Direct evidence for the age-dependent demise of GNAS -mutated cells in oral fibrous dysplasia *Archives of Oral Biology* 93 · May 2018 (査読有り)
DOI: 10.1016/j.archoralbio.2018.05.018
5. Kazuyuki Saito, Katsu Takahashi, Boyen Huang, Masakazu Asahara, Honoka Kiso, Yumiko Togo, Hiroko Tsukamoto, Sayaka Mishima, Masaki Nagata, Machiko Iida, Yoshihito Tokita, Masato Asai, Akira Shimizu, Toshihisa Komori, Hidemitsu Harada, Mary Macdougall, Manabu Sugai and Kazuhisa Bessho
Loss of Stemness, EMT, and Supernumerary Tooth Formation in Cebp^b-/-Runx2⁺-Murine Incisors *Scientific Reports* 8(1):5169 · March 2018 (査読有り)
DOI: 10.1038/s41598-018-23515-y
6. Kentaro Mori, Harumi Nakamura, Hisanori Kurooka, Hitoshi Miyachi, Kota Tamada, Manabu Sugai, Toru Takumi and Yoshifumi Yokota
Id2 Determines Intestinal Identity through Repression of the Foregut Transcription Factor Irx5 *Molecular and Cellular Biology* 38(9):MCB.00250-17 · February 2018 (査読有り)
DOI: 10.1128/MCB.00250-17
7. Risa Ebina-Shibuya, Mitsuyo Matsumoto, Makoto Kuwahara, Kyoung-Jin Jang, Manabu Sugai, Yoshiaki Ito, Ryo Funayama, Keiko Nakayama, Yuki Sato, Naoto Ishii, Yasunobu Okamura, Kengo Kinoshita, Kohei Kometani, Tomohiro Kurosaki, Akihiko Muto, Masakazu Ichinose, Masakatsu Yamashita and Kazuhiko Igarashi
Inflammatory responses induce an identity crisis of alveolar macrophages leading to pulmonary alveolar proteinosis *Journal of Biological Chemistry* · 292 (44):jbc.M117.808535 September 2017 (査読有り)
DOI: 10.1074/jbc.M117.808535
8. Naoki Takahashi, Takako Saeki, Atsushi Komatsuda, Chishio Munemura, Takeaki Fukui, Naofumi Imai, Noriyuki Homma, Tsuguru Hatta, Ken-ichi Samejima, Takashi Fujimoto, Hiroki Omori, Yumi Ito, Yudai Nishikawa, Mamiko Kobayashi, Yukie Morikawa, Sachiko Fukushima, Seiji Yokoi, Daisuke Mikami, Kenji Kasuno, Hideki Kimura, Tomoyuki Nemoto, Yasunari Nakamoto, Kiyonao Sada, Manabu Sugai, Hironobu Naiki, Haruyoshi Yoshida, Ichiei Narita, Yoshihiko Saito and Masayuki Iwano
Tubulointerstitial Nephritis with IgM-Positive Plasma Cells *Journal of the American Society of Nephrology* 28(12):ASN.2016101074 · August 2017 (査読有り)
DOI: 10.1681/ASN.2016101074
9. Kazuyuki Saito, Katsu Takahashi, Masakazu Asahara, Honoka Kiso, Yumiko Togo, Hiroko Tsukamoto, Boyen Huang, Manabu Sugai, Akira Shimizu, Masaharu Motokawa, Harold Slavkin and Kazuhisa Bessho
Effects of Usag-1 and Bmp7 deficiencies on murine tooth morphogenesis *BMC Developmental Biology* 16(1) · December 2016 (査読有り)
DOI: 10.1186/s12861-016-0117-x

10. Yumiko Togo, Katsu Takahashi, Kazuyuki Saito, Honoka Kiso, Hiroko Tsukamoto, Boyen Huang, Motoko Yanagita, Manabu Sugai, Hidemitsu Harada, Toshihisa Komori, Akira Shimizu, Mary Macdougall and Kazuhisa Bessho
Antagonistic functions of USAG-1 and RUNX2 during tooth development *PLoS ONE* 11(8):e0161067 · August 2016 (査読有り)
DOI: 10.1371/journal.pone.0161067

11. 菅井学

ミトコンドリア機能と活性化B細胞分化

医学のあゆみ 257(13) 1327 1328 2016年6月

〔学会発表〕(計 1件)

1. Mitochondrial function in cell fate determination of activated B cells.
Manabu Sugai (Symposium) 生命科学系学会合同年次大会 2017年12月

〔図書〕(計 1件)

1. Koji Aoki and Manabu Sugai
Roles of the Epithelial Autophagy in the Intestinal Mucosal Barrier Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation
ISBN978-4-431-56068-5 eBook Springer (pp.603-616) October 2016 (査読有り)
DOI: 10.1007/978-4-431-56068-5_45

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：黒岡 尚徳
ローマ字氏名：(KUROOKA, hisanori)
所属研究機関名：相模女子大学
部局名：栄養科学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：00293879

研究分担者氏名：森 健太郎
ローマ字氏名：(MORI, kentarou)
所属研究機関名：福井大学
部局名：学術研究院医学系部門
職名：助教
研究者番号(8桁)：50397296

研究分担者氏名：南部 由希子
ローマ字氏名：(NAMBU, yukiko)
所属研究機関名：福井大学
部局名：学術研究院医学系部門
職名： 准教授
研究者番号(8桁)：70580380

研究分担者氏名：林 達成
ローマ字氏名：(HAYASHI, tatsunari)
所属研究機関名：福井大学
部局名：学術研究院医学系部門
職名： 特命助教
研究者番号(8桁)：80781111

(2)研究協力者

研究協力者氏名：坂本寛
ローマ字氏名：(SAKAMOTO,hiroshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。