

令和元年6月19日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08834

研究課題名(和文) IgG陽性B細胞特異的に発現する新規シグナル分子によるB細胞選択の解析

研究課題名(英文) Selection of B cells by novel signaling molecule selectively expressed in IgG+ B cells

研究代表者

疋田 正喜 (Hikida, Masaki)

秋田大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60228715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： Parm1ノックアウトマウスの骨髄細胞をB細胞を欠失するマウスに移植して、このマウスで免疫応答を調べたところ、一次応答においてはbK0マウスにおいてもコントロールマウスと同等の免疫応答が観察されたが、bK0マウスにおいてはIgGクラスの二次応答に著しい減弱が認められた。一方で、Parm1欠損B細胞株で抗原受容体(BCR)シグナルに關与する分子群の活性化に与えるParm1の役割を解析したところ、BCRシグナルの増強とカルシウムの応答の増強が認められた。さらに、BCR刺激によりParm1のITIMモチーフに含まれるチロシン残基の微弱なリン酸化が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、未熟B細胞においては強い抗原受容体(BCR)架橋によってアポトーシスに陥るのに対して、抗原に対して高親和性を獲得した記憶B細胞が当該抗原によってBCRを架橋されても死ぬことはなく逆に活性化される分子メカニズムは明らかになっていなかった。本研究の成果により、IgG陽性記憶B細胞においては、IgM陽性B細胞では発現していないParm1が発現しており、この分子の働きによりアポトーシスが回避されていることが世界で初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： When immune responses were examined by reconstituted mice, whose B cells were derived from Parm1-deficient mice, secondary responses were markedly diminished, which was in contrast with relatively normal primary response.

In addition, roles of Parm1 in BCR signaling were examined using Parm1-deficient A20 B cell line and it was revealed that BCR signaling followed by Ca²⁺ influx was significantly augmented in Parm1-deficient cells. Further, weak phosphorylation signal of ITIM motif in Parm1 was induced by BCR stimulation.

研究分野：免疫学

キーワード：記憶B細胞 抗原受容体 シグナル伝達 アポトーシス 胚中心 遺伝子発現

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

1. 研究開始当初の背景

種々の免疫疾患や感染症の治療には、個体レベルで免疫機能を調節することが必須である。しかし、実際には、種々の自己免疫疾患において、どのような機構で自己に対する寛容が破綻するのか、また、どのような分子機構で侵入抗原に対して、より効果的な抗体産生細胞が選択されているのかという点に関しては不明な点が多く残されている。

抗体産生細胞へと分化するB細胞の抗原特異性は、その抗原受容体(BCR)の構造で決定づけられていることは明らかであり、RAG やAID 等が関与する特異性獲得機構は、分子レベルに至るまで詳細な解析が行われていた(*Nat.Rev.Immunol.* 6, p573,2006)。また、特定の抗原特異性を獲得したB細胞前駆体のうち、自己反応性細胞を除去するための骨髄での負の選択をくり抜けた細胞が分化・成熟過程を経て末梢リンパ組織に移動し外来性の抗原に対する防御を担っていることも知られていた。しかし、これらの細胞から外来抗原に反応して胚中心でBCR に体細胞突然変異を受け、より高い親和性を獲得したクローンが効率良く選択される分子機構については必ずしも明らかとなっていなかった(*Immunity* 27, p190, 2007)。

従来は、抗原に対してより高親和性を獲得したクローンが、抗原によるBCR の架橋を受けると、より強いシグナルが伝達されるため活発に増殖を行い正の選択を受けると考えられている。一方で、架橋度が一定のレベルを超える場合は、自己応答性を獲得したと見なされ逆にアポトーシスによる負の選択を受けると言われている。これらの選択過程にBCR からのシグナルを伝える分子群が重要な役割を果たしていることは明らかであるが、正の選択と負の選択を決定づける閾値を決めている分子実体については未知のまま残されていた。したがって、BCR 架橋というまったく同一の現象であるにも関わらず、抗原の種類によって増殖と死という正反対の選択を受け分子機構がシグナル強度の閾値にのみ依存するのか、あるいは未知の機構が存在するのかについて詳細な検討は行われていなかった。

2. 研究の目的

獲得免疫の機能発現に必須な特異抗体を産生する細胞や記憶細胞を生成する場である胚中心においては、B細胞は正の選択と負の選択を受け適切な抗原特異性を持つ細胞のみが分化・増殖することが知られている。一方、胚中心におけるB細胞選択に異常をきたした場合に、種々の自己抗体を産生する細胞が除去されず、ある種の自己免疫疾患発症の引き金になると考えられている。しかしながら、まったく正反対の反応である正の選択・負の選択をB細胞の抗原特異性によって決定づける分子機構は明らかになっていない。そこで、本研究においては、この点に焦点を当てて詳細に解析することで自己免疫疾患の治療法開発の端緒となる知見を得ることを目標とする。

3. 研究の方法

本研究においては、BCR シグナルによって誘導される細胞増殖と細胞死の調節機構においてParml がどのような役割を果たしているのかを分子レベルで明らかにすることを目標の一つとしている。そこで、初年度は主にB細胞株もしくは初代B細胞を用いる生化学的なシグナル分子の解析を重点的に行った。また、in vivo の免疫応答におけるParml の生理的役割を明らかにするために、Parml 欠損マウスにおける免疫応答の詳細についても検討を加えた。さらに、次年度以降では、Parml によるB細胞選択機構の異常が自己免疫疾患発症の引き金になるのか否かについても、モデルマウスを用いる詳細な検討を行い明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

Parm1 ノックアウトマウスの骨髓細胞をB細胞を欠失するマウスに移植することにより、Parm1 をB細胞においてのみ欠失する(bKO)マウスを作製した。コントロールマウスとして、野生型マウス由来の骨髓細胞を同様に移植したマウスを作製した。これらのマウスに抗原として NP-chickenyglobulin(CGG)を免疫したところ、一次応答においては bKO マウスにおいてもコントロールマウスと同等の免疫応答が観察されたが、bKO マウスにおいては IgG クラスの二次応答に著しい減弱が認められた。

一方で、IgG2a 陽性B細胞株である A20 細胞の Parm1 遺伝子を破壊した細胞株を樹立し、抗原受容体(BCR)シグナルに関与する分子群の活性化に与える Parm1 の役割を解析したところ、Parm1 KO A20 細胞においては、BCR 架橋による PLCγ2 の活性化が促進されており、それに伴ってカルシウムの応答も増強されていた。さらに、BLNK のリン酸化も Parm1 KO 細胞において増強されていた。一方で、PI3K や Akt のリン酸化については野生型と同程度にしか認められず、PI3K 下流のシグナル経路には Parm1 は関与していないということが示唆された。

これらの結果から、Parm1 がBCRシグナルを負に制御していることが強く示唆されたため、Parm1 によるシグナル調節機構に Parm1 の細胞質内領域に存在する ITIM モチーフの関与が予想された。そこで、BCR 刺激に伴う Parm1 の ITIM モチーフのリン酸化について検討を加えた。その結果、Parm1 の ITIM モチーフに含まれるチロシン残基の微弱なリン酸化が認められた。これらの結果は、Parm1 の ITIM モチーフが BCR のシグナル調節に関与していることを示唆していると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. The B cell novel protein 1 (BCNP1) regulates BCR signaling and B cell apoptosis., Hong R, Lai N, Ouchida R, Xiong E, Zhou Y, Min Q, Liu J, Tang Y, Hikida M, Tsubata T, Wang Y, Wang JY. Eur J Immunol. 2019 Jun;49(6):911-917.
2. Strain-Specific Manifestation of Lupus-like Systemic Autoimmunity Caused by Zap70 Mutation. Matsuo T, Hashimoto M, Sakaguchi S, Sakaguchi N, Ito Y, Hikida M, Tsuruyama T, Sakai K, Yokoi H, Shirakashi M, Tanaka M, Ito H, Yoshifuji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T., J Immunol. 2019 Jun 1;202(11):3161-3172.
3. Transgelin-2 is upregulated on activated B-cells and expressed in hyperplastic follicles in lupus erythematosus patients. Kiso K, Yoshifuji H, Oku T, Hikida M, Kitagori K, Hirayama Y, Nakajima T, Haga H, Tsuruyama T, Miyagawa-Hayashino A., PLoS One. 2017 Sep 14;12(9):e0184738.

〔学会発表〕(計3件)

1. Mizuki Ishikawa, Kagefumi TODO and Masaki HIKIDA, Regulatory mechanism for intracellular sorting of Parm1 by phosphorylation of NPxY motif. 日本免疫学会学術集会, 2018
2. Honami Sugiyama, Kagefumi TODO and Masaki HIKIDA, Analysis of intracellular localization of Parm1 in B cells. 日本免疫学会学術集会, 2018
3. Mizuki Ishikawa, Kagefumi TODO and Masaki HIKIDA, Regulatory mechanism for intracellular sorting of Parm1 by phosphorylation of NPxY motif. 日本免疫学会学術集会, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gipc.akita-u.ac.jp/~hikida/>

6 . 研究組織

研究分担者、研究協力者なし

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。