

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02669

研究課題名(和文) 免疫特性と癌化に及ぼすリンパ球増殖限界制御の分子基盤

研究課題名(英文) Regulation of lymphocyte cell division and oncogenesis

研究代表者

保田 朋波流 (YASUDA, TOMOHARU)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：40334429

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)：リンパ球の増殖限界を制御する分子についてトランスクリプトームとプロテオームの組み合わせによる解析からCdkn2a遺伝子を特定した。さらにB細胞増殖限界とArfの発現誘導に相関があることを見出し、Arfを欠損するマウスを新規に作製した。B細胞特異的にEBウイルス癌遺伝子を発現するリンパ腫モデルとの掛け合わせを行った結果、B細胞リンパ腫の進展に重要であることがわかった。Arf以外にもB細胞増殖限界をエピジェネティックに制御する新たな因子を本研究課題で同定することに成功し、胚中心B細胞の反応持続時間や免疫応答などへの影響について解析を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ球は病原体など異物を認識すると増殖を開始し、それらが抗体産生細胞、細胞傷害性細胞、長期記憶細胞など多岐に役割の異なる細胞に分化し、即時あるいは生涯に渡る感染防御に寄与する。免疫細胞の分裂増殖は抗原特異的なクローンを増幅するだけでなく分化方向の決定とも連動することが知られており、免疫特性を決定する重要なファクターである。リンパ球の増殖が適切に制御されない状態、つまり増殖不応答状態では免疫不全につながり、逆に増殖が過度に亢進した状態では自己免疫疾患、リンパ増殖性疾患、リンパ腫発症などにつながるため、本研究の推進によりそれら疾患の克服に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The cell division of immune cells not only amplify antigen-specific clones but also determine the direction of differentiation, that is critical for determining how immunity work. Immune cells that respond to the antigen must be arrested at the appropriate time after the onset of division, but the regulatory mechanism is unclear. The Cdkn2a gene was identified by the combination of transcriptome and proteome for the molecular basis that controls the growth limit of lymphocytes. Among the proteins encoded by the Cdkn2a gene, we found that there was a correlation between the B cell proliferation limit and the Arf expression. In addition to Arf, we were able to identify new factors that epigenetically controlling B cell proliferation limit. B cell-specific knockout mouse of candidate gene was generated, and analysis of the effects on germinal center B cell response duration and immune response has been performed.

研究分野：免疫

キーワード：B細胞 リンパ腫 細胞分裂 細胞老化 免疫応答 体細胞変異

1. 研究開始当初の背景

本研究課題では、免疫系の正常と病理に直結するリンパ球分裂増殖の制御メカニズムに関して、相互に関連する以下2つの問題について特にBリンパ球生物学の観点から提起し明らかにする。(1)リンパ球の中でも特に外来蛋白抗原に应答したB細胞は、脾臓やリンパ節といった二次リンパ組織における特徴的構造である胚中心領域において活発な細胞分裂を行う。これら細胞は胚中心(GC)B細胞と呼ばれ、分裂増殖により特定の抗体を産生するクローンを増幅させるだけでなく、抗原認識部位への変異導入、抗体のクラス変換、抗体産生細胞や記憶細胞への分化を細胞分裂と連動して行う。従って、GC B細胞の分裂回数は細胞個々の状況にも応じて制御されることで外来(あるいは自己)蛋白抗原に対する免疫特性に直接影響するものと考えられる。しかしながら一旦分裂を開始した細胞がどのような制御メカニズムで分裂停止に至るのか実態が不明である。(2)GC B細胞は抗体遺伝子座に二本鎖切断や体細胞遺伝子変異を導入する特性上、抗体遺伝子座(IgH, IgL)での染色体転座を引き起こしやすい。そのため大多数のリンパ腫はGC B細胞由来であり、Bcl2, Bcl6, Mycなどの遺伝子座と抗体遺伝子座間での染色体転座が引き起こされた場合にそれら遺伝子が恒常的に過剰発現することで癌化のドライバーとして働く。しかしながら癌ドライバー変異を生じたB細胞がどのようにして無限増殖能を獲得し、リンパ腫へと進展するのか明らかでない。

2. 研究の目的

染色体転座などにより癌遺伝子として働く遺伝子の多くはGC B細胞など単に活性化したB細胞でも高発現しており、なおかつ癌遺伝子の恒常的発現のみでは細胞が不死化されないことが実験的に示されている。そこで申請者は「分裂回数が有限な活性化B細胞と無限であるBリンパ腫細胞との間の本質的な差異は癌遺伝子を発現するかどうかではなく、細胞分裂を停止させる機能が破綻しているかどうかであるのではないか」という考えに至った。本申請課題ではB細胞の分裂停止を誘導する分子メカニズムについて明らかにすることで、問題の本質的理解を目指す。

3. 研究の方法

(1)申請者はEBV癌遺伝子による増殖期B細胞で顕著に発現誘導され、不死化リンパ腫で発現が消失する蛋白質の一つとしてArfを同定している。Arfはある一定の分裂回数を経た細胞で発現し細胞増殖を停止させる細胞老化関連蛋白質であるが、リンパ球の増殖制御や不死化における役割は詳しく調べられていない。そこで抗原に应答したB細胞の分裂回数や癌遺伝子発現B細胞の不死化とArfの発現レベルとの関係性を調べることで、B細胞の分裂限界制御におけるArfの役割を明らかにする。I-a)癌遺伝子によるArfの誘導と不死化抑制能 EBV癌遺伝子以外にもBcl6などのBリンパ腫ドライバーをGC B細胞で発現させた時にArfが発現誘導されるか、また細胞分裂限界と発現が相関するか確認するとともに、それらリンパ腫ドライバーマウスにおいてArf遺伝子を破壊した場合に不死化及びリンパ腫発症が促進されるか検証する。I-b)正常GC B細胞の分裂回数や増殖限界、免疫特性におけるArfの役割 Arfの発現変化を1細胞レベルで検出するArfレポーターマウスを作製し、抗原に増殖应答したGC B細胞でのArf発現変化を分裂回数や分化指標(胚中心B細胞/記憶B細胞/抗体産生細胞)と合わせて調べる。また生

体内における Arf 発現 B 細胞で増殖阻害が引き起こされるのか明らかにするとともに、外来抗原に対する二次応答や B 細胞分化、加齢に伴う免疫応答性の変化との関係についても作製した Arf レポーターマウスと Arf 欠損マウスを用いて調査する。I-c) リンパ腫細胞において Arf の発現が負に制御されるメカニズム リンパ腫での Arf 発現抑制が転写レベルで生じていることを確認している。しかしそれがプロモーター領域の体細胞変異によるのか、制御転写因子の変化によるのか、あるいはエピジェネティックな要因によるのか不明である。そこで不死化前後の B 細胞における Arf ゲノム配列、エピジェネティクス、制御転写因子について比較解析することで Arf 発現抑制のメカニズムを明らかにする。

(2) 分裂限界制御因子の同定 Arf レポーターを発現する GC B 細胞と発現しない GC B 細胞間で発現の異なる遺伝子を RNAseq 法で調べることで分裂限界を迎えた細胞で特異的に変化する遺伝子を網羅的に同定する。分裂限界制御因子として新規に同定された遺伝子および同定済みの B 細胞不死化前後で変動する遺伝子群は In vitro での B 細胞 Crispr ノックアウトスクリーニングにより分裂限界や不死化への影響を調べる。

(3) ヒトリンパ腫細胞における分裂制御因子の機能 Arf を含め上記で同定された遺伝子および制御メカニズムについてヒトリンパ腫細胞株においても同様の機能を示すか過剰発現や Crispr 遺伝子破壊/遺伝子置換によって確認する。

(4) 任意誘導型染色体転座モデルマウスの作製 代表的な B リンパ腫の染色体転座遺伝子である Bcl6 や Bcl2 について、タモキシフェン誘導型 Cre-loxP 組換えシステムを用いた IgH 遺伝子座へのヒト型転座モデルマウスを開発する。これらマウスにおいて GC B 細胞由来のリンパ腫が発症するか確認するとともに、癌ドライバーに加えて Arf など細胞分裂抑制因子がリンパ腫発症に重要かどうか調べる。

4. 研究成果

免疫細胞の分裂増殖は抗原特異的なクローンを増幅するだけでなく分化方向の決定とも連動することが知られており、免疫特性を決定する重要なファクターである。抗原に反応した免疫細胞は分裂開始後に適切なタイミングで分裂停止されなければならないが、その制御メカニズムについては明らかでない。本研究課題では癌遺伝子により活性化した B 細胞において、不死化前後で発現が顕著に制御される因子として新規に見出した細胞老化制御遺伝子群や癌抑制遺伝子群の機能解析を足がかりに、リンパ球の増殖限界を制御する分子基盤と免疫特性やリンパ腫発症におけるその役割の解明を目指した。リンパ球の増殖限界を制御する分子メカニズムについてトランスクリプトームとプロテオームの組み合わせによる解析から Cdkn2a 遺伝子を特定した。Cdkn2a 遺伝子によってコードされる蛋白質のうち、B 細胞増殖限界時期と Arf の発現誘導時期に相関があることを見出し、Arf を欠損するマウスを新規に作製した。B 細胞特異的に EB ウイルス癌遺伝子を発現するリンパ腫モデルとの掛け合わせを行った結果、B 細胞リンパ腫の進展に重要であることを明らかにすることができた。また Arf 以外にも B 細胞増殖限界をエピジェネティックに制御する新たな因子を本研究課題で同定することができた。またこの新しい因子について B 細胞特異的なノックアウトマウスを作成し、胚中心 B 細胞の反応持続時間や免疫応答などへの影響について解析を開始することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yasuda Tomoharu, Saito Yuichi, Ono Chisato, Kawata Kazuhiko, Baba Akemi, Baba Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation and characterization of CD19-iCre mice as a tool for efficient and specific conditional gene targeting in B cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84786-6	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 -
1. 著者名 Huang Shiyu, Yasuda Tomoharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Pathologically Relevant Mouse Models for Epstein-Barr Virus-Associated B Cell Lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.639844	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 -
1. 著者名 Sakurai Tetsuya, Kukimoto-Niino Mutsuko, Kunimura Kazufumi, Yamane Nana, Sakata Daiji, Aihara Ryosuke, Yasuda Tomoharu, Yokoyama Shigeyuki, Shirouzu Mikako, Fukui Yoshinori, Uruno Takehito	4. 巻 4
2. 論文標題 A conserved PI(4,5)P2-binding domain is critical for immune regulatory function of DOCK8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000873	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 -
1. 著者名 Sommermann Thomas, Yasuda Tomoharu, Ronen Jonathan, Wirtz Tristan, Weber Timm, Sack Ulrike, Caesar Rebecca, Zhang Jingwei, Li Xun, Chu Van Trung, Jauch Anna, Unger Kristian, Hodson Daniel J., Akalin Altuna, Rajewsky Klaus	4. 巻 117
2. 論文標題 Functional interplay of Epstein-Barr virus oncoproteins in a mouse model of B cell lymphomagenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 14421 ~ 14432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1921139117	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 該当する

1. 著者名 Imami K, Yasuda T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Measuring protein synthesis during cell cycle by Azidohomoalanine (AHA) labeling and flow cytometric analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio-Protocol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3215	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 -

1. 著者名 Imami, K., Milek, M., Bogdanow, B., Yasuda, T., Kastelic, N., Zauber, H., Ishihama, Y., Landthaler, M., Selbach, M.	4. 巻 72
2. 論文標題 Phosphorylation of the ribosomal protein RPL12/uL11 affects translation during Mitosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cell	6. 最初と最後の頁 84-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2018.08.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Imami, K., Yasuda T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Measuring Protein Synthesis during Cell Cycle by Azidohomoalanine (AHA) Labeling and Flow Cytometric Analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e3215
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9件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 抗原受容体と免疫細胞の維持機構
3. 学会等名 第一三共 消化器疾患セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 抗原受容体と免疫寿命のコントロール
3. 学会等名 広島市医師会 第135回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoharu Yasuda, Klaus Rajewsky
2. 発表標題 B cell division in the heterogeneous pre-tumor microenvironment is required for lymphoma development
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 EBウイルスとヒト免疫系の共生/共進化
3. 学会等名 中国四国ウイルス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 EBV-LMP1による宿主抗原性転換と細胞傷害性T細胞分化
3. 学会等名 第1回 感染に起因する腫瘍の共同研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 広島市 抗原受容体とB細胞寿命
3. 学会等名 第65回 広島大学第二外科同門研修会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 抗原受容体シグナルとB細胞寿命
3. 学会等名 第46回 広島大学健康長寿研究拠点HiHAセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 EBウイルスとヒト免疫系の共生 / 共進化
3. 学会等名 広島免疫学リサーチセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuda, T., Baba, Y., and Rajewsky, K.
2. 発表標題 Active B cell division on plasma cell niche is required for lymphoma development.
3. 学会等名 The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
ドイツ	Max Delbruck Center			