

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08384

研究課題名(和文) SLE関連多型に触発された構造モジュール組換えによる抗原受容体活性化機構の解明

研究課題名(英文) A novel functional antigen receptor TMD module identified as an SLE-associated SNP-related structure

研究代表者

本田 善一郎 (Honda, Zen-ichiro)

お茶の水女子大学・保健管理センター・客員教授

研究者番号：70238814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Fc受容体架橋時に静止時の不活性な膜貫通部(TMD)2量体から活性型TMD2量体への組み換えが生じそこではGASright motif 会合が機能することを提唱した。活性型 FcγRIIAでの検証を 1) Cys scanning会合部マッピング、2) 構造バイオインフォマティクス、3)モデル細胞、モデルマウス解析によって行い仮説の正当性を示した。研究の端緒となったヒトSLE関連抑制型FcγRIIB TMD多型の機能解析を進め疾患多型のみが恒常的TMD2量体を形成し逆説的に抗アポトーシスシグナルを活性化することを見出した。複数の共刺激分子TMDが同様の機構で作用する可能性を検証している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fc受容体(FcR)は自然免疫細胞、B細胞に広く分布し、抗体を介して外来、自己抗原を処理するとともに、免疫細胞活性化、成熟、サイトカイン産生を調節して液性免疫応答を方向づける。ヒトFcR遺伝子多型が自己免疫疾患、感染症、免疫不全と強く関連し、抗体製剤が炎症性疾患、悪性新生物治療の主要な薬剤として位置付けられること、FcR多型がその効果に影響を与えることから、FcR活性化機構の解明は新規治療開発に重要な情報となることは明らかである。本研究はTMD会合という新たなメカニズムを提唱しその意義を検証するものであり、新規の治療標的構造解明につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We proposed that transition from an inactive transmembrane dimer (TMD) to an active dimer occurs following Fc receptor crosslinking, with the GASright motif association as an essential structural process, and that the hypothesis could be validated biochemical, structural informatics, and model cell and animal analysis. During the research period, the hypothesis was successfully validated in active FcγRIIA through 1) Cys scanning TMD docking mapping, 2) structural bioinformatics, and 3) model cell and mouse analyses. Analysis of the human SLE-associated polymorphism of the suppressor FcγRIIB TMD has revealed that only the disease-related polymorphism constitutes a constitutive TMD dimer, and it paradoxically activates downstream anti-apoptotic signaling. We are also examining if co-stimulatory molecules may function via similar TMD interaction-dependent mechanisms.

研究分野：炎症学・臨床免疫学

キーワード：Fc受容体 TMD4ファミリー Fc(γ)RIIB 全身性エリテマトーデス 膜貫通部位 2量体

1. 研究開始当初の背景

免疫グロブリン IgG Fc 受容体 Fc(gamma)Rs は抗体を介して外来・自己抗原を内在化し処理するとともに細胞の活性化、成熟、サイトカイン産生を促進、あるいは抑制して生体の液性免疫応答の方向性を決定づける。ヒト Fc(gamma)R 遺伝子多型は自己免疫疾患、感染症、免疫不全と強く関連する。また、抗体製剤は炎症性疾患、悪性新生物の主要な治療薬剤であり、Fc(gamma)R 多型はその効果に影響を与える。これらの知見は Fc(gamma)R の免疫恒常性維持、疾患感受性における重要性を示すと共に、併せて Fc(gamma)R シグナル伝達メカニズムが重要な治療標的の一つであることを示している。

Fc(gamma)R の細胞膜貫通シグナル伝達は 3 段階に分かれると考えられ、1. 細胞外へのリガンド (IgG 免疫複合体) 結合による受容体多量体架橋、2. 膜貫通部位 (TMD) を含む受容体機能部位の相互作用、3. Src ファミリーチロシンキナーゼ活性化と細胞内 ITAM/ITIM のチロシンリン酸化、が連続して生じる。これらの中で、2. 膜貫通部位 (TMD) を含む受容体機能部位の相互作用は十分に理解されておらず、重要な研究課題として残されている。

我々はヒト全身性エリテマトーデス (SLE) に強く関連する Fc(gamma)RIIB (抑制型 Fc 受容体) の TMD 構造多型: FCGRIIB: 695T>C (Ile232Thr) の機能解析を行い、疾患型多型は細胞膜機能ドメイン 脂質ラフトから排除され、B 細胞シグナルに対する抑制機能が減弱していることを見出した。この知見は広く引用され (申請時 199 回引用)、その後の報告から Thr232 疾患型多型のリガンド (IgG 免疫複合体) 親和性が低下していること、同多型の細胞膜情の運動性が低下していることが示されたが、抑制機能不全を説明する構造的なメカニズムは解明されていない。

Fc(gamma)RIIB TMD 疾患多型の機能異常を説明する仮説として、TMD を介する分子会合が Ile232Thr 多型によって影響を受け変化する可能性が考えられる。Fc(gamma)RIIB は単量体でありそれ自身の構造はシンプルだが、B 細胞受容体など他の多量体受容体と相互作用して抑制機能を発揮することから解析時に複数の分子を含む複雑なシステムを考慮する必要があり最初の研究対象としては必ずしも適していない。一方、活性化形 Fc(gamma)RIIA は Fc(gamma)RIIB と細胞外-膜貫通部位において 97%の相同性をもち、細胞内部位には ITAM を有するキメラ分子であり、ホモ 2 量体化により活性化することから TMD 相互作用における構造機能相関比較的容易に改正することができると考えられ、さらにその結果は Fc(gamma)RIIB 232Thr 疾患型多型の機能解析に有用な示唆を与える可能性がある。

我々は Fc(gamma)RIIA を最初の対象として選び、TMD の系統的 Cys 導入 (Cys scanning) 変異体を作成しヒト B 細胞株 ST486 に導入して一連の細胞株を作成した。これらの細胞株に Cys 特異的クロスリンカー処理を行うことで、架橋依存性に生じる TMD 近接部位を同定した。その結果をもとに構造シミュレーションを行って TMD 2 量体の候補構造を複数同定した。Cys scanning による検討から、受容体は静止時にすでに 2 量体を形成しているが TMD は開いており、架橋後に初めて特異的な会合面が現れ、会合面には Gly Ala などの小アミノ酸が 3 残基ごとに位置する GAS (Gly/Ala/Ser) right motif が存在することを見出した。さらに、GAS right motif コンセンサス配列に変異を導入することで TMD 会合が消失し、同時にシグナルが減弱することを見だし、同会合面が機能的な TMD 会合部位 (activating TM interface: *aTMI*) であることを結論づけた。抑制型 Fc(gamma)RIIB TMD 多型 Ile232Thr は *aTMI* 相同部位の C 末端側 (細胞内側) に隣接している。Fc(gamma)RIIB Ile232, Thr232 のそれぞれの TMD の *aTMI* 相同部位に Cys 置換を導入して静止時の 2 量体形成を検討したところ、疾患型 Thr232 のみが同部位を介して 2 量体を形成していることを見出した。この結果は Fc(gamma)RIIB 疾患形多型が *aTMI* 相同部位において静止時に近接しホモ 2 量体を形成する傾向が強いことを示唆している。

2. 研究の目的

活性化型 Fc(gamma)RIIA の *aTMI* を介する架橋時 TMD 2 量体構造を atomic level で検討し、最も適切と考えられる構造を提唱する。抑制型 Fc(gamma)RIIB の疾患型多型 Thr232 は *aTMI* 相同部位において常時近接し 2 量体を形成すると考えられる。同様に Fc(gamma)RIIB Thr232 に特異的にみられる TMD 2 量体構造を atomic level で検討し、最も適切と考えられる構造を提唱する。Fc(gamma)RIIB Thr232 は本来の免疫シグナル抑制機能から逸脱しているが、TMD 2 量体化がその原因となる可能性がある。Thr232 の抑制シグナル減弱メカニズムを解析し、TMD 2 量体化との関連を検証する。Fc(gamma)RIIA, B は単量体構造を取るが他の Fc 受容体、および B 細胞受容体は多量体構造をとる。多量体を構成するサブユニットの内、4 回膜貫通分子 tetraspanin ファミリー (Fc(epsilon)R beta 鎖、CD81 分子) が TMD 会合を介して受容体と会合し、TMD 接合面を介して細胞内にシグナルを伝える可能性を想定している。tetraspanin ファミリー分子 TMD に見られる GAS right motif に注目して、TMD を介する受容体サブユニット多量体形成、シグナル伝達の構造的メカニズムに関する検討をおこなう。TMD 会合を介する Fc 受容体、B 細胞受容体の会合、シグナル伝達は十分に理解されておらず、得られた知見は基礎科学的な価値を持つとともに、新たな創薬標的的部位となると考えられる。

3. 研究の方法

既に確立した Cys scanning および構造インフォーマティクスを主として用い、TMD 会合部位の

候補シーケンスを見出し、TMD 会合を生化学的に検出し定量的に評価するとともに、atomic level での TMD 2 量体構造を考察する。TMD 会合部位に変異を導入し、シグナルの変化を見ることで、TMD 会合部位の機能的な重要性を検証する。

4. 研究成果

活性化型受容体 Fc(gamma)RIIA *aTMI* (GAS right motif を含む) を介する TMD2 量体構造候補として計算科学の手法により複数の 2 量体構造を見出し、これらの候補の中から、Cys scanning による接合面のピッチ、GAS right motif に共通する右手交差構造 (right-handed crossing) および交差角度の制限など実験的、文献的な制限から最も確からしい 2 量体構造候補の絞り込みを行った。*aTMI* の機能的な意義の検証を *aTMI* の GAS right motif コンセンサス変異体の細胞導入および動物モデルを用いて行い、*aTMI* の受容体シグナルにおける重要性を確認した (投稿準備中)。抑制型 Fc(gamma)RIIB 多型の機能解析から、ホモ多量体化した Fc(gamma)RIIB Thr232 が下流の抗アポトーシスシグナルを活性化することを見出した。Thr232 にみられる機能変化が恒常的 2 量体化に帰せられるかを変異導入、シグナル解析を行って検証している (投稿準備中)。Tetraspanin 分子 Fc(epsilon)R beta 鎖の第一 TMD に会合部位候補を見出しており、beta 鎖をゲノム編集の手法で除去した RBL 細胞株 (マスト細胞株) を作成して、Cys scanning、機能解析を行う準備を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kohei Kobatake, et al., Zen-Ichiro Honda, Wataru Yasui, Shigeo Horie, Peter C Black, Akio Matsubara, Hiroaki Honda	4. 巻 26
2. 論文標題 Kdm6a Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with p53 Dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 2065 ~ 2079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-19-2230	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 -

1. 著者名 Keiyo Takubo, et al., Zen-Ichiro Honda, Norimasa Yamasaki, Ayako Nakamura-Ishizu, Fumio Arai, Noboru Motoyama, Tomohisa Hatta, Tohru Natsume, Toshio Suda, Hiroaki Honda	4. 巻 120
2. 論文標題 MBTD1 preserves adult hematopoietic stem cell pool size and function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 e2206860120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2206860120	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0件

〔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
研究分担者	本田 浩章 (Honda Hiroaki) (40245064)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	
研究分担者	由良 敬 (Yura Kei) (50252226)	お茶の水女子大学・基幹研究院・教授 (12611)	

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
研究分担者	市 育代 (Ichi Ikuyo) (50403316)	お茶の水女子大学・基幹研究院・准教授 (12611)	
研究分担者	河野 肇 (Kono Hajime) (60585074)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	

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