

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16115

研究課題名（和文）Bリンパ球が誘導する免疫寛容におけるクロマチン構造調整蛋白SATB1の機能解明

研究課題名（英文）Function of Special AT-Rich sequence binding protein 1 in B cells' tolerance

研究代表者

小澤 孝幸（Ozawa, Takayuki）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90815474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：私達の研究では、SATB1蛋白がB細胞において、SATB1蛋白がどのような機能を持っているか、ということ調べました。

SATB1蛋白は、遺伝子の発現を調整する蛋白です。レポーターマウス解析の結果、SATB1陰性のNaive細胞に対し、SATB1陽性Naive細胞は、抗原刺激に対して反応しやすく、死ににくい性質を持っていることがわかりました。B細胞のみでSATB1が発現しないマウス（cKOマウス）を作成して解析すると、cKOマウスのB細胞でも、本来抗原刺激を受けると発現しなければならない表面蛋白を発現しにくくなっていました。SATB1がNaive B細胞の活性化に重要である可能性が示唆されました

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究によって、SATB1がB細胞の免疫活性を調整する一つの要因であることがわかりました。B細胞の働きの異常は、自己免疫疾患や癌など、さまざまな病気の原因となることがわかっています。この研究でわかったSATB1とB細胞の関係は、こういった病気の新しい治療法を見つける糸口なる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the role of SATB1 on mature B cells. SATB1 controls various genes' expression by remodeling chromatin architecture. By analyzing SATB1/tomato reporter mice, we found SATB1 high Naive B cells are more likely to activate against antigen stimulation than SATB1 low naive B cells. We made B cell specific SATB1 knock out mice (cKO mice) and analyzed them. We found that naive B cells of cKO mice reduced expression of antigen presenting molecule such as MHC II and CD86 against B cell receptor stimulation. These results suggested that SATB1 helps naive B cells to be activated against antigen stimulation.

研究分野：B細胞

キーワード：B細胞

1. 研究開始当初の背景

SATB1 は、免疫グロブリン重鎖遺伝子のエンハンサー近傍に存在する AT-rich 配列に結合する蛋白である (Dickinson et al. Cell 1992)。ゲノム DNA の base unpairing region に結合し、離れた領域にあるクロマチンをループ状にまとめることで、その部分にクロマチン修飾蛋白や各種転写因子を引き寄せ、多数の遺伝子の発現調整を行っている (Cai S et al. Nat genet 2006)。

申請者らも、SATB1 の造血・免疫系における機能について研究を行ってきた。その成果として、骨髄中の造血幹細胞において SATB1 の発現がリンパ球系への分化を強く誘導することや、老化した造血幹細胞の機能も部分的に回復させ得ることを示した (Sato & Yokota et al. Immunity 2013)。さらに、SATB1 発現量を生体内でモニタリングできるレポーターマウスを製作し解析を進めている (Doi et al. Blood 2015, 2016)。

SATB1 は胸腺での高発現に基づき、T リンパ球系における機能を中心に解析されてきたが、申請者は独自の解析で成熟 B リンパ球においても SATB1 が高発現していることを見出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「B リンパ球が誘導する免疫寛容は SATB1 によって誘導的に調節される。」という命題の真偽を検証し、その検証を通じて得られた知見を、免疫寛容を調節する新たな技術へと展開することである。

B リンパ球の分化・成熟過程に沿った SATB1 の発現変化に関し、我々のレポーターマウスでの解析結果を示す (図 1)。骨髄中の B リンパ球前駆細胞は、SATB1 の発現量が極めて低いが、脾臓で機能的 B リンパ球へと最終分化する過程において、SATB1 は顕著に誘導され、Naïve B cell へ分化した段階で peak を迎える。Naïve B cell は immunoglobline の発現では IgM 陽性 IgD 陽性の phenotype を示すとされているが、SATB1 の発現はとくに免疫グロブリンの発現変化と相関しており、SATB1 陽性細胞のほとんどが IgM 弱陽性・IgD 陽性の分画に存在する (図 2)。

IgD/IgM を共に発現する分画は、Naïve B 細胞として認識されている。特に、IgD 強陽性 B 細胞は自己反応性 B リンパ球の制御は生体の維持にとって重要であり、IgD を介した抗原刺激が B リンパ球を無反応状態 (anergy) にし、免疫寛容を誘導すると理解されてきた (Goodnow CC et al. Nature 1988)。しかし、IgD からの刺激に関わる細胞内でのシグナル伝達経路や、調節を受ける遺伝子については明らかにされておらず、どのような分子メカニズムで B リンパ球の機能が精巧に調節されているのかは、全く謎に包まれたままである

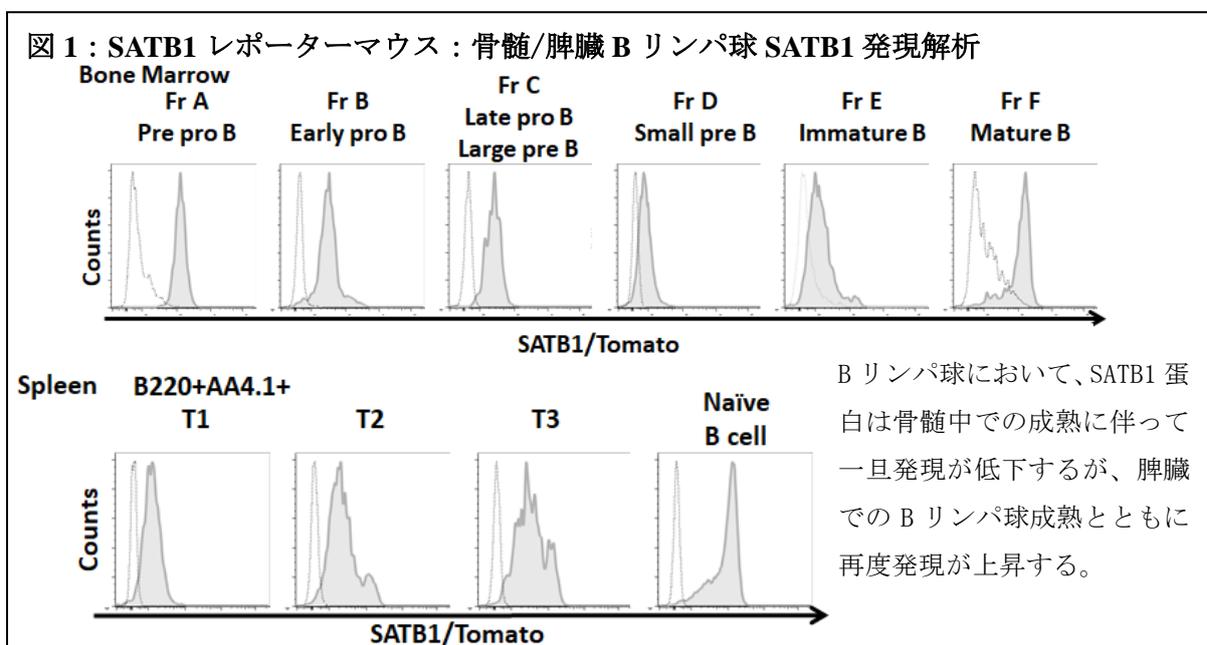
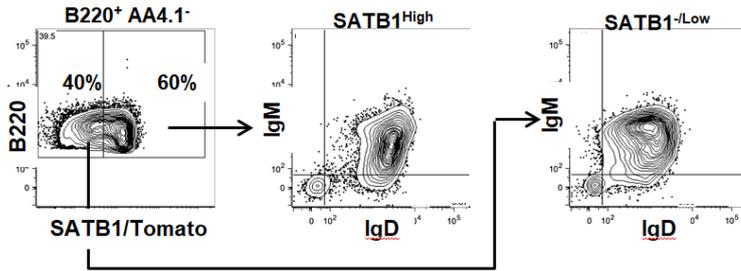


図 2 : SATB1 レポーターマウス : 脾臓 B リンパ球 SATB1 陽性分画の IgM/IgD 発現解析



脾臓 B リンパ球の SATB1 陽性分画の免疫グロブリン発現状況を解析すると、大部分の細胞が IgD 陽性分画であった。

3. 研究の方法

本研究において我々は免疫寛容を誘導する IgD 陽性 B リンパ球の機能調整、遺伝子発現調整において SATB1 の機能的役割を分子レベルで明らかにすることを目的とする。具体的には下記に列挙する通りである。

(1) レポーターマウスによる、SATB1 陽性細胞の性質の解析

SATB1/Tomato レポーターマウスを用いて、IgM 弱陽性～陰性・IgD 陽性 SATB1 陽性分画をフローサイトメトリーで分離、サイトカインへの反応性を解析することで、SATB1 陽性細胞の性質を解析する。

(2) SATB1 欠損で生じる生体内 B リンパ球の分化・動態・サイトカイン分泌能の変化の解析

B リンパ球特異的な Mb1-Cre マウスと SATB1 flox/flox マウスを交配させ、lox-Cre システムによって B リンパ球特異的 SATB1 ノックアウトマウス (KO マウス) を作製し、フローサイトメトリーを用いて骨髄、脾臓、末梢リンパ節の B リンパ球分画を解析し、B リンパ球の分化障害の有無や、細胞表面マーカーの発現障害の有無を検索する。また 抗 IgM 抗体の投与に対する増殖とアポトーシスを検討する。野生型との差異を検討することで SATB1 発現の機能的意義を明らかにする。

(3) SATB1 の発現に関連する遺伝子変化の同定と解析

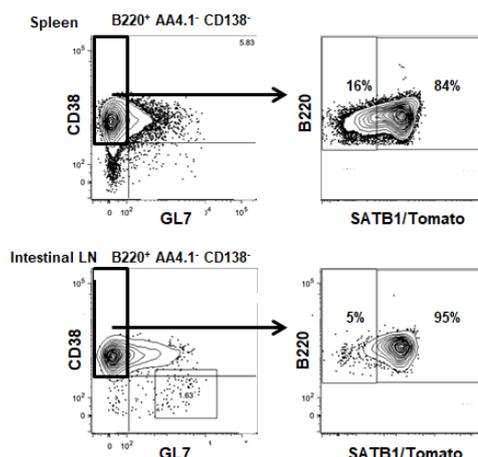
cKO マウスの B 細胞の遺伝子発現を RT-PCR, RNA-sequence によって解析する。

4. 研究成果

(1) レポーターマウスの解析

SATB1/Tomato レポーターマウスの B 細胞をフローサイトメトリーで解析すると、脾臓 Naïve B 細胞で存在した、SATB1 陰性 Naïve B 細胞は、末梢リンパ節の Naïve B 細胞では存在しないことがわかった (図 3)。

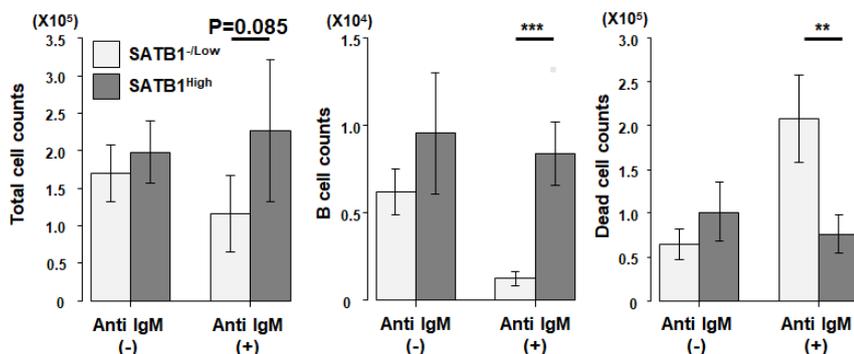
図 3: SATB1 発現 : 脾臓およびリンパ節の Naïve B 細胞



脾臓 Naïve B 細胞で存在した、SATB1 陰性 Naïve B 細胞は、末梢リンパ節の Naïve B 細胞では存在しない

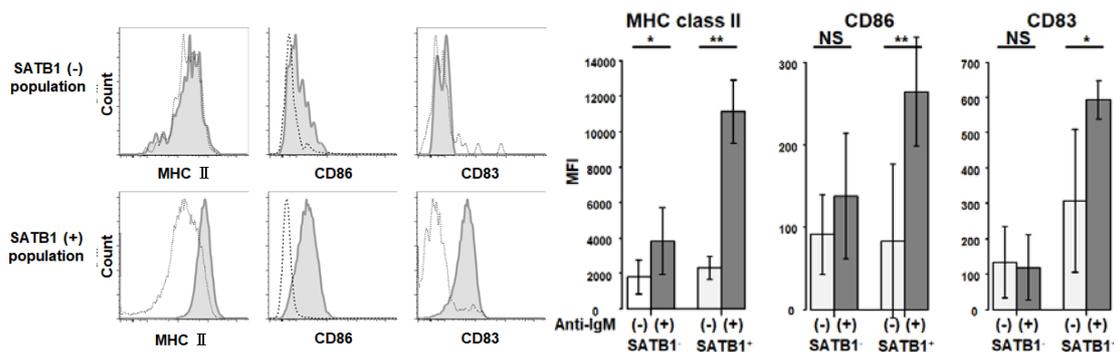
次にレポーターマウス脾臓の SATB1 陽性 Naïve B 細胞と SATB1 陰性 Naïve B 細胞を *in vitro* で培養した。SATB1 陽性 Naïve B 細胞に比較して、SATB1 陰性 Naïve B 細胞は BCR に刺激を受けた際の死細胞数が有意に多かった (図 4)。また、SATB1 陰性 Naïve B 細胞に比較して、SATB1 陽性 Naïve B 細胞は BCR に刺激を受けた際に MHC II や CD86、CD83 の発現が増加することがわかった (図 5)。

図 4: Anti-IgM 投与下での SATB1 陰性/SATB1 陽性 Naïve B 細胞培養結果①



左から順に、SATB1 陽性/陰性 Naïve B 細胞の 24h 培養後全細胞数、B 細胞数、死細胞数。SATB1 陽性 Naïve B 細胞に比較して、SATB1 陰性 Naïve B 細胞は BCR 刺激を受けた際の死細胞数が有意に多い

図 5: Anti-IgM 投与下での SATB1 陰性/SATB1 陽性 Naïve B 細胞培養結果②



左図: SATB1 陽性/陰性 Naïve B 細胞を 24h 培養後、MHC II、CD86、CD83 の発現状況 (灰色ヒストグラム: 24 培養後、点線: 培養前)。

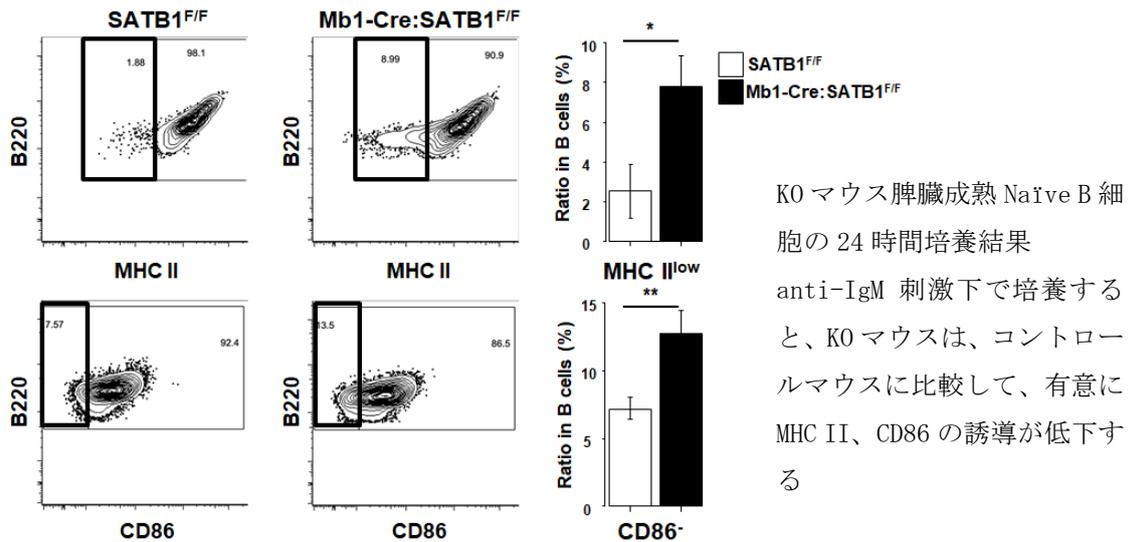
右図: SATB1 陽性/陰性 Naïve B 細胞を 24h 培養後、MHC II、CD86、CD83 の MFI。SATB1 陰性 Naïve B 細胞に比較して、SATB1 陽性 Naïve B 細胞は BCR 刺激を受けた際に MHC II、CD86、CD83 を発現する。

(2) SATB1 欠損で生じる生体内 B リンパ球の分化・動態・サイトカイン分泌能の変化の解析

B リンパ球特異的な Mb1-Cre マウスと SATB1 flox/flox マウスを交配させ、lox-Cre システムによって B リンパ球特異的 SATB1 ノックアウトマウス (KO マウス) を作製し、この脾臓成熟 Naïve B 細胞を *in vitro* で anti-IgM 刺激下で培養してみると、コントロールマウスに比較して、KO マウスでは有意に MHC II、CD86 の誘導が低下することがわかった (図 6)。

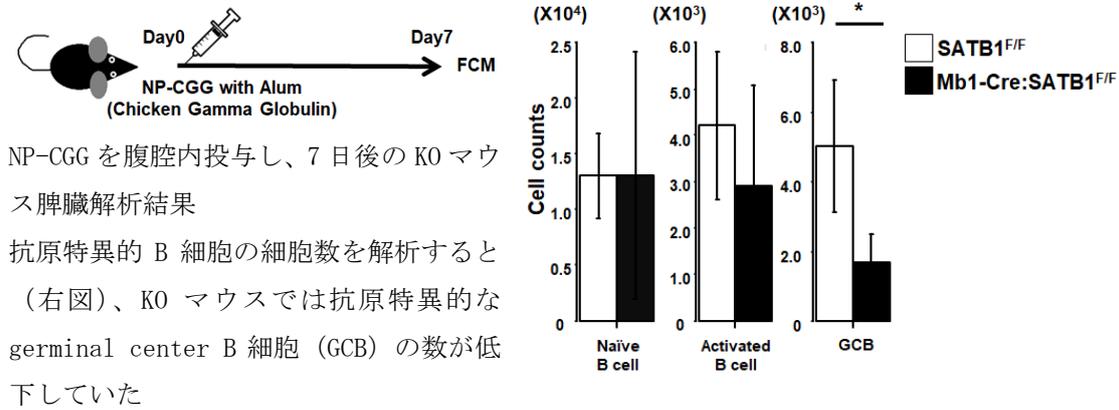
また、KO マウスに対して NP-CGG を腹腔内投与することで免疫感作させ、抗原特異的に反応をした B 細胞を誘導すると、KO マウスでは、コントロールマウスに比較して、抗原特異的 Germinal Center B cell の誘導が低下することが示された (図 7)。

図 6: KO マウス脾臓成熟 Naïve B 細胞の anti-IgM に対する反応 (*in vitro*)



KO マウス脾臓成熟 Naïve B 細胞の 24 時間培養結果 anti-IgM 刺激下で培養すると、KO マウスは、コントロールマウスに比較して、有意に MHC II、CD86 の誘導が低下する

図 7: KO マウスの抗原特異的 B 細胞誘導結果



NP-CGG を腹腔内投与し、7 日後の KO マウス脾臓解析結果 抗原特異的 B 細胞の細胞数を解析すると (右図)、KO マウスでは抗原特異的な germinal center B 細胞 (GCB) の数が低下していた

(3) SATB1 の発現に関連する遺伝子変化の同定と解析

野生型マウスの脾臓 Naïve B リンパ球を対象群として、KO マウスの Naïve B リンパ球の遺伝子発現変化を RNA-sequence によって解析した。その結果、MHCII や CD86 の発現に関わる、CIITA、CD83、MARCH1 などの遺伝子に優位な差は認めなかった。代わりに CCL17、CCL22 といったケモカインレセプターが KO マウスにおいて有意に減少していた。また IL12、IL23 と言った helper T 細胞の誘導に関わるサイトカインの産生も低下していた。Pathway 解析では、細胞外マトリックスの遺伝子発現に関する Pathway と、リンパ球-リンパ球以外の細胞の細胞間接着に関わる Pathway が有意に変動していた。

(4) まとめ

レポーターマウスの解析結果から、Naïve B 細胞には、刺激を受けて、生存、増殖、抗原提示をするために、準備段階として SATB1 の発現が必要である、という可能性が示された。SATB1 陽性 B 細胞が、免疫寛容状態である IgD 発現 B 細胞で多い、という結果も踏まえると、B リンパ球が誘導する免疫寛容が、特定の抗原刺激によって解除される際に、SATB1 の発現が必要である、という可能性が考えられる。

KO マウスの解析でも、Naïve B 細胞の抗原提示能は一定の障害を受けていた。また、その後のメカニズムは不明であるが、*in vivo* の観察にて、抗原刺激に対し、germinal center B 細胞が誘導できず、免疫に対する活性が低下している phenotype が確認された。RNA-seq の結果から考えると、SATB1 は、直接的に MHC II や CD86 などの発現調整を行っているわけではなく、MHC II や CD86 を発現するために必要な細胞の遊走、細胞間接着をケモカインレセプターなどの分泌を介して促しており、KO マウスではこの点が障害されるため、B リンパ球に関わる免疫活性が低下している、ということが考えられた。

本研究は、SATB1 が B リンパ球の免疫システムに関わる一つの重要な知見であり、今後、さらなる研究によって、SATB1 を介した B リンパ球の免疫能の調整が理解されることが期待される。またその結果として、免疫疾患に対する新たな治療法の開発が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takayuki Ozawa
2. 発表標題 Special AT-rich Sequence Binding Protein 1(SATB1) is markedly expressed in the Dark Zone Germinal Center B cells on Murine Spleen
3. 学会等名 24th Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Ozawa
2. 発表標題 Special AT-rich Sequence Binding Protein 1(SATB1) is Involved in the Formation of Germinal Center B cells in the Murine Spleen
3. 学会等名 The 10th Japanese Society of Hematology International Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤孝幸
2. 発表標題 マウス脾臓のB細胞分化におけるSATB1蛋白の機能的意義について
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Ozawa
2. 発表標題 Special AT-Rich Sequence Binding Protein 1 Is Involved In the Formation of Splenic B Cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤孝幸
2. 発表標題 Special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1) is involved in the induction of anergic B cells
3. 学会等名 第80回 日本血液学会 2018年10月12日(金)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤孝幸
2. 発表標題 SATB1蛋白によるマウスB細胞の抗原提示能の誘導
3. 学会等名 第82回 日本血液学会 2020年10月10日(土)
4. 発表年 2020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