

平成21年 5月29日現在

| |
|--|
| 研究種目：基盤研究 (C) |
| 研究期間：2007～2008 |
| 課題番号：19591169 |
| 研究課題名 (和文) CBL 会合アダプター(CIN85)による正常ならびに自己免疫疾患 B 細胞の機能制御 |
| 研究課題名 (英文) c-Cbl-interacting protein of 85 kDa (CIN85) regulates the function of normal and autoimmune B cells |
| 研究代表者 新納 宏昭 (NIIRO HIROAKI) 九州大学・大学病院・助教 研究者番号:20380636 |

研究成果の概要：B 細胞抗原受容体(BCR)下流の正負シグナルのバランス調節は、自己反応性 B 細胞を自己寛容あるいは自己免疫の方向へ誘導するかの運命決定の上で重要である。本研究では、c-Cbl 会合アダプター(CIN85)が BCR 下流においてこのようなシグナルバランス調整に重要な分子であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：自己免疫疾患、細胞・組織、免疫学、シグナル伝達、内科

1. 研究開始当初の背景

近年、自己免疫疾患におけるB細胞の重要性が、抗CD20抗体を使用した殺B細胞療法が効果をあげていることより再認識されている。ただ、抗CD20抗体療法は、骨髄プレB細胞からブレプラズマ細胞の段階までのB細胞を非特異的に除去するため、自己免疫疾患の病態を担う自己反応性B細胞を標的とした治療というには程遠い。我々は、理想的な治療法の開発のためには、自己反応性B

細胞の機能制御メカニズムをより明らかにする必要があると考える。

自己抗原のB細胞抗原受容体(BCR: B cell receptor)への結合後、生存・増殖・分化・抗原提示などの機能が抑制された自己寛容性B細胞となるか、あるいはこれらの機能の亢進した自己免疫性B細胞となるかの運命は、細胞内における刺激性ならびに抑制性シグナルのバランスにより決定される(Niiron and Clark. Nat. Rev. Immunol. 2002)。

この自己反応性B細胞の運命決定(自己寛容 vs 自己免疫)において、BCR下流の抑制性シグナルはきわめて重要である(Cannons and Schwartzberg. *Curr. Opin. Immunol.* 2004)。我々は、この抑制性シグナルの制御に、上流シグナル分子と標的分子をつなぐアダプター分子が重要だと考える。

Cbl ファミリー蛋白の c-Cbl, Cbl-b は、血液細胞を含む種々の細胞で発現している分子である。Cbl-b 欠損マウスにおいては自己免疫疾患の発症を見ることより、この分子は抑制性シグナルに関与する (Bachmaier et al. *Nature* 2000)。最近、Cbl に会合する新規アダプター分子として、CIN85(c-Cbl-interacting protein of 85 kDa)が同定された。CIN85 は、3つのSH3ドメイン、proline-rich ドメイン (PRD)、coiled-coil ドメイン(CC)のアダプタードメインで構成されている。その後の研究で、CIN85 はそのアダプタードメインを介してCblのみならず、様々なシグナル分子と直接会合しうることが判明した。ここで興味深いのは、CIN85 と会合しうる分子の中に、BLNK, PI3K, PLC γ , BtkといったBCRの刺激性シグナルに関与する分子ならびにSrc-family kinase, SHIPといったBCRの抑制性シグナルに関与する分子の両方を含んでいる点である。以上より、我々は、CIN85がCblと同様、BCR下流の抑制性シグナルの制御に重要な役割を果たすのではないかと考えた。

また、我々がこのアダプター分子に着目したもう一つの理由として、CIN85がendophilinなどのレセプターの取り込みやプロセッシングに関与する分子とも結合しうる点である。実際、CIN85はEGFレセプターの細胞内取り込みと分解を促進する (Soubeyran et al. *Nature* 2002)。B細胞におけるBCRの役割は、シグナル伝達のみでなく、自らが抗原を取り込み、プロセスし、MHCともにT細胞に提示する。この過程において、取り込んだ抗原を分解へ導くか、またはMHCと会合させ抗原提示へ導くかの振

り分け(sorting)が重要であるが、この過程の分子機構については現時点では明確でない。そこで、我々は、CIN85がBCR下流におけるこのsortingの過程にも重要な役割を果たすのではないかと考えた。すなわち、CIN85は、抗原を取り込んだ後に主に抗原を分解の方向へ導くことで、MHC上への抗原提示を抑制している可能性がある。

現在まで、CIN85によるB細胞の機能制御については、国内・国外ともに全く報告がない。

2. 研究の目的

(1)ヒトB細胞におけるCIN85のBCRシグナル伝達の制御機構について分子レベルで明らかにし、B細胞の生存、増殖、分化、抗原提示機能への作用を明らかにする。

(2)臨床検体から純化したB細胞を使用し、ヒト自己免疫疾患B細胞におけるCIN85の発現ならびに機能異常を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CIN85によるBCRシグナル伝達制御メカニズムの解明 (新納, 赤司)

我々は野生型ならびにドメイン欠損型CIN85を発現したB細胞株を既に樹立した。これらの細胞を使用し、BCR刺激時のLyn・Syk・Btkの活性化、Cbl・BLNKのリン酸化、PI3K・PLC γ 2の活性化、Ca flux, NF κ B・MAPキナーゼ (ERK, JNK, p38MAPK, ERK)の活性化状態をリン酸化にてモニターすることで、CIN85の各アダプタードメインの機能的意義を明らかにする。

CIN85の機能解明には、上記のような外因性CIN85を導入する系のみでは不十分である。そこで、B細胞の内因性CIN85をノックダウンするloss-of-functionの系を使用する。B細胞株へは通常のRNAiオリゴ導入は効率が悪いいため、標的配列をデザインし挿入したCIN85 RNAiベクターを作成した。我々は、これらのベクターを使用し内因性CIN85発現が強クノックダウンされた細胞株を既に樹立した。これらの細胞を使用し、上記と同様に、各BCRシグナル伝達分子の活性化状態を明ら

かにする。

正常ヒトB細胞は、in vitroでは死にやすく通常の遺伝子導入は困難である。そこで、我々は遺伝子導入の方法を検討し、純化B細胞に、野生型ならびにアダプタードメイン欠損型CIN85コンストラクト、CIN85 RNAiベクターを発現させて、BCRシグナル伝達分子の活性化状態を評価する。さらに、正常B細胞では、BCRシグナルによる生存、増殖、分化などの機能発現の評価も可能なため、この点に関してもCIN85の作用について明らかにする。

(2) CIN85による抗原提示制御メカニズムの解明 (新納)

我々は、CIN85がBCRの取り込みやプロセスの過程を制御するかを解析する。CIN85野生型、アダプタードメイン欠損型、RNAiベクター発現細胞を使用し、BCRの取り込み、プロセスの過程をフローサイトメトリーにて解析する。

(3) 自己免疫疾患B細胞におけるCIN85の発現ならびに機能異常の解明 (新納, 赤司)

CIN85 mRNAの発現レベルは、前述のようにB細胞サブセットで異なるので、自己免疫疾患B細胞(CD19⁺)をセルソーターにてサブセット分画へ純化を行い、real-time PCRを使用し定量的に評価する。また、CIN85抗体を使用して蛋白レベルの確認も行う。

4. 研究成果

(1) CIN85の各アダプタードメインの機能解明

野生型、SH3ドメイン欠損型CIN85を発現したB細胞株を使用して研究を行った。その結果、CIN85のSH3ドメインはCb1とBLNKとの結合にきわめて重要であり、CIN85は抗原受容体刺激によるCa fluxに対して作用することが判明した。

(2) CIN85ノックダウンによるB細胞機能の解明

CIN85の機能解明には(1)のような外因性CIN85を導入する系のみでは不十分と考え、CIN85 shRNAベクターによる内因性CIN85発現

が90%程度にまでノックダウンされたB細胞株を使用し、CIN85は Syk, PLCγ2などといったB細胞抗原受容体シグナル伝達における重要な分子の活性化を制御することが判明した。

(3) ヒト正常B細胞におけるCIN85の機能解明

CIN85による B細胞機能制御の解明には(1)や(2)のようなB細胞株のみを使用した研究では不十分と考え、健常人より純化したB細胞に nucleofectionシステムによりCIN85 shRNAベクターを導入した。その結果、CIN85がノックダウンされたB細胞では、BCRによるB細胞生存や増殖が変化することが判明した。

(4) CIN85による抗原提示制御メカニズムの解明

BCRは、生存、増殖、分化に必要なシグナルを産生すると同時に、自らは抗原を取り込みプロセスするという抗原提示機能の上で重要である。CIN85野生型、アダプタードメイン欠損型、RNAiベクターによるCIN85ノックダウン細胞を使用し、刺激後のBCRの取り込み(internalization)についてフローサイトメトリーを使用し評価した。その結果、いずれの細胞においてもBCRのinternalizationはコントロール細胞と同様であり、B細胞の抗原提示能の最初の段階である抗原の取り込みについて、CIN85は作用しないことが判明した。

(5) 自己免疫疾患B細胞におけるCIN85の発現異常の解明

CIN85によるBCRシグナルの可能性は、このアダプター分子の自己免疫疾患(特にSLE)におけるB細胞の機能異常への関与を示唆する。自己免疫疾患B細胞(CD19⁺)をナイーブならびにメモリーB細胞サブセットの分画まで純化を行い、real-time PCRによるCIN85 mRNAの定量的評価ならびにwestern blotによるCIN85蛋白の定量的評価を行った。その結果、健常人B細胞サブセットに比べ、自己免疫疾患B細胞サブセットにおいてCIN85発現がmRNAならびに蛋白レベルの両方において低い傾向にあることが判明した。

以上の研究成果より、CIN85は、抗原受容体を介したB細胞機能を制御することに

より、自己免疫疾患における自己反応性B細胞の運命決定に重要なアダプター分子であることが強く示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Kikushige Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, Iino T, Mori Y, Iwasaki H, Nihiro H, Takenaka K, Nagafuji K, Harada M, Ishikawa F, Akashi K: Human Flt3 Is Expressed at the Hematopoietic Stem Cell and the Granulocyte/Macrophage Progenitor Stages to Maintain Cell Survival. *J. Immunol.* 180(11): 7358-7367, 2008 査読有
- ② Arita S, Baba E, Shibata Y, Nihiro H, Shimoda S, Isobe T, Kusaba H, Nakano S, Harada M: B cell activation regulates exosomal HLA production. *Eur. J. Immunol.* 38(5): 1423-1434, 2008 査読有
- ③ Shimoda S, Harada K, Nihiro H, Yoshizumi T, Soejima Y, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Nakamura M, Komori A, Migita K, Nakanuma Y, Ishibashi H, Selmi C, Gershwin ME: Biliary epithelial cells and primary biliary cirrhosis: the role of liver-infiltrating mononuclear cells. *Hepatology* 47(3): 958-965, 2008 査読有
- ④ Ishikawa F, Nihiro H, Iino T, Yoshida S, Saito N, Onohara S, Miyamoto T, Minagawa H, Fujii SI, Shultz LD, Harada M, Akashi K: The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* 110(10): 3591-3600, 2007 査読有
- ⑤ Kawano A, Shimoda S, Kamihira T, Ishikawa F, Nihiro H, Soejima Y, Taketomi A, Maehara Y, Nakamura M, Komori A, Migita K,

Ishibashi H, Azuma M, Gershwin ME, Harada M: Peripheral tolerance and the qualitative characteristics of autoreactive T cell clones in primary biliary cirrhosis. *J. Immunol.* 179(5): 3315-3324, 2007 査読有

- ⑥ Sadanaga A, Nakashima H, Akahoshi M, Masutani K, Miyake K, Igawa T, Sugiyama N, Nihiro H, Harada M: Protection against autoimmune nephritis in MyD88-deficient MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 56(5): 1618-1628, 2007 査読有

[学会発表] (計2件)

- ①第52回日本リウマチ学会総会 2008. 4. 22 札幌 演題名: SLE B細胞機能異常における新規アダプター分子CIN85の関与 新納宏昭、ジャバルザデシアマック、有信洋二郎、小野伸之、赤司浩一
- ②第51回日本リウマチ学会総会 2007. 4. 28 横浜 演題名: 新規アダプター分子CIN85によるヒトB細胞の機能制御機構 新納宏昭、ジャバルザデシアマック、吉本五一、赤司浩一

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed1/immune/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新納 宏昭 (NIIRO HIROAKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 20380636

(2) 研究分担者

赤司 浩一 (AKASHI KOICHI)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 80380385