

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790365

研究課題名（和文）：プレB細胞受容体シグナルを惹起する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）：Molecular mechanism that control pre-B cell receptor signaling

研究代表者

白鳥 行大 (SHIRATORI IKUO)

東京理科大学・生命科学研究所・助教

研究者番号：90379090

研究成果の概要：

プレB細胞受容体（Pre-BCR）は、H鎖遺伝子再編成の停止（対立遺伝子排除）、細胞増殖の誘導、あるいは軽鎖（L鎖）遺伝子再編成の誘導など、B細胞の初期分化に重要な役割を担っている。しかし、リガンドの必要性を含め Pre-BCR シグナルを惹起する分子メカニズムに関しては、未だ決定的な証拠が得られていない。そこで本研究では上記の未解明な分子メカニズムを申請者らが開発、応用してきたスクリーニング及びクローニングシステムを基に明らかにすることを目的とした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

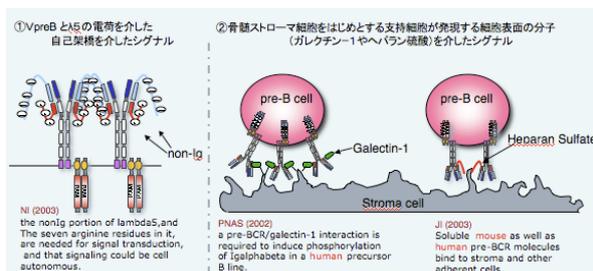
キーワード：プレB細胞受容体、B細胞初期分化

## 1. 研究開始当初の背景

Pre-BCRは免疫グロブリンの $\mu$ 重鎖（ $\mu$ H鎖）及びVpreB、 $\lambda 5$ からなる代替軽鎖の3分子で構成され、さらにH鎖と細胞膜で会合するIg $\alpha/\beta$ によってシグナルが伝達される。Pre-BCRの発現は非常に一過性であり、分化段階早期のプレB細胞にのみ発現が認められる。しかし、H鎖遺伝子再編成の停止（対立遺伝子排除）、細胞増殖の誘導、あるいは軽鎖（L鎖）遺伝子再編成の誘導など、その後続くB細胞分化に非常に重要な役割を担っており、事

実、Pre-BCRを構成する分子の遺伝子欠損マウスは全て、プロB細胞からプレB細胞への分化移行が強く抑制されている。また、ヒトでもPre-BCR構成分子の遺伝子変異による先天性B細胞免疫不全の症例が報告されており、Pre-BCRを介したシグナルはB細胞の初期分化に必須であることが明らかとなっている。興味深いことに、このシグナル生成については、Pre-BCRを構成する $\lambda 5$ の電荷的な自己架橋によるリガンド非依存的なシグナル、及び骨髄

ストローマ細胞など、B細胞分化に重要な支持細胞が発現するGalectin-1やヘパラン硫酸をリガンドとするリガンド依存的なシグナルが報告されている(図1)。実際、代替軽鎖欠損マウスのプロB細胞に $\mu$ H鎖を*de novo*合成で発現させると、組換え活性化遺伝子(RAG)やターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)の発現は停止する。従って、 $\mu$ H鎖対立遺伝子排除にはリガンドの結合が必要ではない可能性がある。しかし、同じマウスのシステムを用いてプレB細胞を*in vitro*で増殖させるためには、 $\lambda$ 5、及びストローマ細胞あるいは高濃度のIL-7が必要であることも明らかにされており、生理的なプレB細胞の増殖にはストローマ細胞上に発現するPre-BCRリガンドが必要である可能性が強く示唆されている。また、リガンドが結合し得ない $\mu$ H鎖によって、Pre-BCR欠損マウスのB細胞分化が回復した例がこれまでに報告されているが、このような欠損型 $\mu$ H鎖はそれ自体、恒常的活性型となっている可能性があるため、これをもってリガンドの必要性を否定することはできない。一方、リガンドの可能性に関してもリガンド発現細胞との結合が示されているのみであり、生理的な機能は一切明らかにされていない。以上のような理由から、Pre-BCRシグナルを惹起する分子メカニズムに関しては、未だ決定的な証拠が得られていないのが現状である。



(図1) Pre-BCR シグナルのリガンド依存性

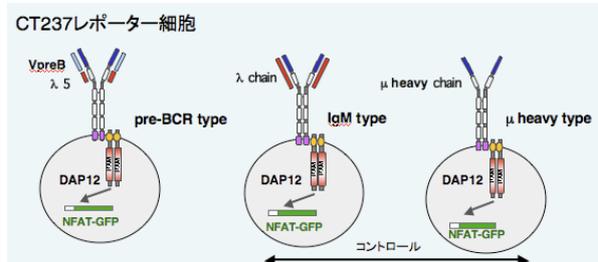
## 2. 研究の目的

申請者は後の「方法」で詳述するNFAT-GFPレポーター細胞や、結合親和性の低い会合分子(リガンド)を検出可能な12量体Fc $\gamma$ キメラタンパクを用いたレトロウイルスcDNAライブラリーの発現クローニング、さらにはTAP(Tandem

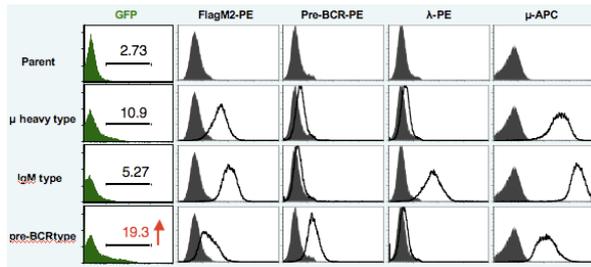
Affinity Purification)法を組み込んだ免疫沈降試料のマス解析などタンパクレベルでのクローニングを得意とし、新規なレセプターとリガンドの相互作用を分子レベルで同定してきた。これらの実験手法は「Pre-BCRシグナルを惹起する分子メカニズムの解明」にも応用が可能である。特に、前述した2つの可能性を相対的に比較するシステムを構築できれば、Pre-BCRを刺激する新たな重要因子の発見にも繋がると考え、本課題を申請するに至った。

## 3. 研究の方法

我々は、共同研究者である荒瀬(大阪大学・微生物病研究所・教授)らが開発したNFAT-GFPレポーター細胞(Ohtsuka et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 特許 WO0207728)に改良を加え、I型膜タンパクであれば種類を問わず強制発現、それに続くシグナル伝達(NFAT-GFP)がモニタリング可能なカセットベクターを構築し、レセプターとリガンドの相互作用の解析に有用なシステムを作製している。(Shiroishi et al. *J. Biol. Chem* 2006)。本研究ではPre-BCRを発現させたNFAT-GFPレポーター細胞を作成し(図2)、レポーター細胞単独での培養、及びマウス骨髄細胞との共培養を行う。そして、上述した2つのシグナルの有無、あるいはシグナルの相対強度を、レポーター細胞が発現するGFPの蛍光強度を指標に比較することにした。なお、このシステムでは遺伝子導入したBCRの発現をDAP12に付加したFALGタグで確認可能であり、かつ、BCRのリガンドが細胞表面分子であっても液性因子であっても解析が可能となる(図3)。



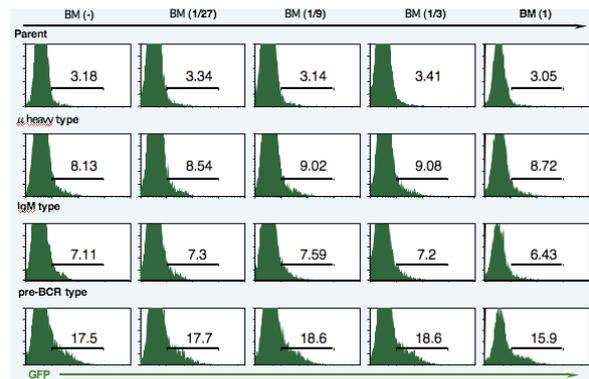
(図2) CT237 レポーター細胞



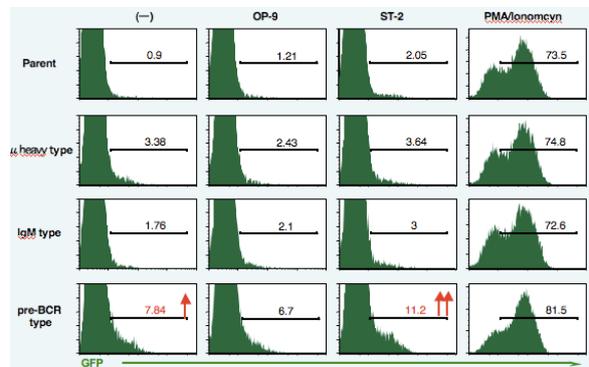
(図3) Pre-BCR 及びコントロール BCR を発現させた CT237 細胞

#### 4. 研究成果

(図2) で示したように、Pre-BCR を発現する CT237 レポーター細胞は、 $\mu$ H 鎖のみ、あるいは IgM 型を発現するレポーター細胞と比べ、単独培養でも GFP の発現が優位に認められた。この結果より、(図1) で示した Pre-BCR の自己架橋によるシグナルが作製したレポーター細胞でも確認できることが明らかとなった。また、B 細胞の初期分化が展開される骨髄中の細胞と共培養を行った結果、細胞数に依存したシグナルの増強は認められなかった(図4)。しかし、興味深いことに B 細胞の初期分化に重要と考えられる骨髄ストローマ細胞の細胞株 OP9、ST2 と共培養を行った結果、ST2 細胞との共培養でのみ、自己架橋によるシグナルより優位に強い GFP シグナルが認められた(図5)。ST2 細胞の培養上清を添加した培地でレポーター細胞を培養しても GFP シグナルの増強は認められないことから、細胞接触依存的な、即ち、Pre-BCR シグナルを惹起するリガンドが ST2 の細胞表面上に発現している可能性が示唆された。以上の結果から、既報のとおり、Pre-BCR は、 $\lambda 5$  の電荷的な自己架橋によるリガンド非依存的なシグナルを細胞内に伝達すること、しかし、自己架橋によるリガンド非依存的なシグナルより強いシグナルが ST2 細胞の細胞表面上に発現するリガンドによって惹起されることが明らかとなった。現在 Pre-BCR の Ig キメラ分子及び ST2 細胞のレトロウイルス cDNA ライブラリーを用いた発現クローニング法で、ST2 の細胞表面に発現するリガンドの同定を行っている。



(図4) CT237 レポーター細胞とマウス骨髄細胞の共培養



(図5) CT237 レポーター細胞と骨髄ストローマ細胞株の共培養

#### 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] 2007-2009 (計6件)

- (1) Kato, A., Ariei, J., Shiratori, I., Akashi, H., Arase, H and Kawaguchi, Y: Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *J. Virol.* 83 (1): 250-261, 2009.
- (2) Satoh, T., Ariei, J., Suenaga, T., Wang, J., Kogure, A., Uehori, J., Arase, N., Shiratori, I., Tanaka, S., Kawaguchi, Y., Spear, P.G., Lanier, L.L. and Arase, H: PILRa is a herpes simplex virus-1 entry co-receptor that associates with glycoprotein B. *Cell.* 132 (6): 935-944, 2008.
- (3) Tabata, S., Kuroki, K., Wang, J., Kajikawa, M., Shiratori, I., Kohda, D., Arase, H. and Maenaka, K: Biophysical characterization of O-glycosylated CD99 recognition by paired

Ig-like type 2 receptors (PILR). *J Biol Chem.* 283 (14): 8893-8901, 2008.

- (4) Wang, J., Shiratori, I., Satoh, T., Lanier, LL. and Arase, H: An essential role of sialylated O-linked sugar chains in the recognition of mouse CD99 by paired Ig-like type 2 receptor (PILR). *J Immunol.* 180 (3): 1686-1693, 2008.
- (5) Tabata, S., Kuroki, K., Maita, N., Wang, J., Shiratori, I., Arase, H., Kohda, D. and Maenaka, K: Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human paired Ig-like type 2 receptor alpha (PILRalpha). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 64 (Pt 1): 44-46, 2007.
- (6) Shiratori, I., Suzuki, Y., Oshiumi, H., Begum, NA., Ebihara, T., Matsumoto, M., Hazeki, K., Kodama, K., Kashiwazaki, Y. and Seya, T: Recombinant interleukin-12 and interleukin-18 antitumor therapy in a guinea-pig hepatoma cell implant model. *Cancer Sci.* 98 (12): 1936-1942, 2007.

[学会発表] 2007-2008 (計 5 件)

- (1) Takuya Nojima, Ikuo Shiratori, Daisuke Kitamura: IL-4 promotes memory-like B cells generation in vitro.  
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2008 年、12 月 1-3 日.
- (2) Shigetsugu Tabata, Kimiko Kuroki, Mizuho Kajikawa, Ikuo Shiratori, Hisashi Arase, Daisuke Kohda, Katsumi Maenaka: Molecular Basis for Ligand Recognition of Paired Ig-Like type2 Receptor (PILR).  
第37回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007年、11月 20-22日.
- (3) Junji Uehori, Ikuo Shiratori, Takeshi Satoh, Jing Wang, Katsumi Maenaka, Hisashi Arase: Regulation of CD8 T cell activation by PILR/CD45 interaction.

第37回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007年、11月 20-22日.

- (4) Takuya Nojima, Ikuo Shiratori, Daisuke Kitamura: Toward the establishment of germinal center-like B cell culture system. 第 37回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007年、11月 20-22日.
- (5) Takeshi Satoh, Jun Arai, Tadahiro Suenaga, Jing Wang, Amane Kogure, Junji Uehori, Noriko Arase, Ikuo Shiratori, Yasushi Kawaguchi, Hisashi Arase: HSV-1 infection through inhibitory receptor, PILRa.  
第37回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007年、11月 20-22日.

[その他]

ホームページ等

研究室のホームページ

<http://www.rs.noda.sut.ac.jp/~ribsjm/indexj.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

白鳥 行大 (SHIRATORI IKUO)

東京理科大学・生命科学研究所・助教

研究者番号：90379090

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：