

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590347

研究課題名(和文) ALOX5(L22)による抗体産生調節の新基軸

研究課題名(英文) Novel role of ALOX5(L22) in the control of antibody production

研究代表者

一宮 慎吾 (ICHIMIYA SHINGO)

札幌医科大学・保健医療学部・教授

研究者番号：30305221

研究成果の概要(和文)：

本研究ではリンパ濾胞胚中心周囲の静止期B細胞に発現するL22抗原を解析し、脂質代謝酵素であるアラキドン酸5-リポキシゲナーゼ(Alox5)が静止期B細胞や濾胞ヘルパーT細胞の機能維持に働き特異的抗体産生を調節していることを見出した。今後のメタボローム研究によって自然免疫と適応免疫の間に新たな接点が見出され、これまで未解決であった免疫アレルギー疾患や炎症性疾患の病態解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：

We have previously reported L22 mAb with which human primary resting B cells and other immune cells of lymphoid follicles are well defined. In this study, we first identified L22 Ag as arachidonate 5-lipoxygenase (Alox5) and our experimental results illustrated the novel role of Alox5 during the process of specific antibody production by managing naïve and memory B cells as well as follicular helper T cells in vivo. Because Alox5 is a key enzyme giving lipid mediators like leukotrienes, further investigations focusing on metabolome may provide new insights into the mechanisms of innate and adaptive immune responses and the pathogenesis of allergic and chronic inflammatory disorders (Nagashima T, et al. American Journal of Pathology, 2011).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・人体病理学

キーワード： Alox5、慢性炎症、ナイーブB細胞、メモリーB細胞、濾胞ヘルパーT細胞、免疫トレランス、アレルギー、感染症、悪性リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

特異的液性免疫の成立にはB細胞が胚中心細胞となる分化プロセスが必要で、マントル領域にある静止期B細胞はその準備状態にある。しかしながらこのようなマントル領域B細胞の機能制御機構については未だ解明に至っていない。

本学病理学教室ではヒト免疫機構の解明に向けてLシリーズ抗ヒトリンパ球モノクローナル抗体パネルを独自に開発し、免疫細胞や免疫組織の機能的解析を進めてきた。その中のL26抗体(抗CD20抗体)はB細胞系譜を検出するための標準マーカーとして世界的に汎用され広く医学に貢献している。L22抗体はマントル領域に局在する静止期B細胞の細胞質に強く反応する抗体であり(一部はマクロファージにも反応)、先に述べた理由からL22抗原の本体やその機能的意義に大変興味を持たれていた。

L22抗原は長らく不明であったが、我々はヒト扁桃リンパ球を様々な条件で可溶化してL22抗体による免疫沈降を行い、L22抗体と特異的に結合する分子を見出していた。質量分析などによる先行研究からL22抗原がアラキドン酸5-リポキシゲナーゼ(Alox5)であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

Alox5はロイコトリエンやリポキシンなどの脂質メディエーターの産生に与る脂質代謝酵素である。液性免疫におけるAlox5の機能的意義については不明な点が多く、特異的抗体の産生過程でのAlox5機能の解明を本研究の目的とした。解析結果が診断や治療に少しでも結びつくよう視点を定めて研究を推進することは重要と考えており、本研究がヒト免疫組織の機能的な分化マーカーの研究に端を発した研究であることを踏まえ遂行した。

3. 研究の方法

(1) ヒト免疫組織や細胞株を用いた解析

手術摘出した扁桃や胸腺よりセルソータ等を用いて、B細胞やT細胞のサブポピュレーションを単離し解析に用いた。扁桃組織としては睡眠時無呼吸症候群や病巣性扁桃、反復性扁桃炎などを含み、病態形成との関連性も考慮した。また正常免疫組織とともにマントル細胞リンパ腫を含む腫瘍組織や腫瘍細胞株による病理学的検討も併せて行った。

(2) 遺伝子改変マウスを用いた解析

Alox5欠損マウスやRag1欠損キメラマウスにヒツジ赤血球などの異種抗原の投与し、特異的抗体産生能をELISAにて評価した。またリンパ組織からセルソータ等によりリンパ球を単離して機能解析を施行した。

4. 研究成果

マントル領域B細胞は静止期細胞として初期B細胞や記憶B細胞を含み、いずれもAlox5を発現していた。さらにマウスモデルの解析からAlox5は初期B細胞や記憶B細胞の機能維持に影響し、濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)の分化をも調節していることが明らかとなった。ヒト胸腺や扁桃組織を用いた解析から初期ヘルパーT細胞はTfh細胞へ分化することによってシステイニルロイコトリエン受容体群が脱落しており、特定のエイコサノイドがTfh細胞の機能分化に影響していることが示唆された。炎症反応の場でエフェクターヘルパーT細胞亜群の排他的な分化誘導が行われる際に、Alox5関連脂質メディエーターが深く関与している可能性がある。またマントル細胞リンパ腫にもL22抗原が高発現していることが明らかとなり、今後の研究はこのような難治性リンパ腫の診断や治療に結びつくかもしれない。本研究の主な成果はAmerican Journal of Pathologyに掲載された(次項の雑誌論文2を参照)。

医学分野の全般において炎症遷延化のメカニズムに注目が高まっており、通常では収束するはずの炎症応答が持続し慢性化することにより様々な疾患病態の発生や重症化につながる。このような疾患は生活習慣病、免疫アレルギー疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、癌など多岐にわたる一方、炎症遷延化の本体に関しては未だ不明な点が多く残されている。特異的炎症遷延化のプロセスは複雑で様々な細胞が時相を変えて関わるが、本研究の成果は炎症の場で産生されるメタボロームの研究と相まって脂質メディエーターによるB細胞レパトアの保持を含めた新たな慢性炎症の機構につながるかもしれない。病理学の専門性を生かして、これからもヒト免疫機構や慢性炎症の解明に向け尽力したい。

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12件)

- (1) Sakurai N, Nagai K, Tsutsumi H, Ichimiya S. Anti-CADM-140 antibody positive juvenile dermatomyositis with rapidly progressive interstitial lung disease and cardiac involvement. J Rheumatol. 2011, in press. (査読有)
- (2) Nagashima T, Ichimiya S, Kikuchi T, Saito Y, Matsumiya H, Ara S, Koshiba S, Zhang J, Hatate C, Tonooka A, Kubo T, Ye RC, Hirose B, Shirasaki H, Izumi T,

- Takami T, Himi T, Sato N. Arachidonate 5-lipoxygenase establishes adaptive humoral immunity by controlling primary B cells and their cognate T-cell help. *Am J Pathol.* 178: 222-32, 2011. (査読有)
- (3) Kameshima H, Tsuruma T, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Ichimiya S, Kanaseki T, Iwayama Y, Sato N, Hirata K. Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Sci.* Epub ahead of print: 10.1111/j.1349-7006.2011.01918. (査読有)
- (4) Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Kamekura R, Koizumi J, Ichimiya S, Murata M, Tanaka S, Himi T, Sawada N. Poly(I:C) reduces expression of JAM-A and induces secretion of IL-8 and TNF- α via distinct NF- κ B pathways in human nasal epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 250: 29-38, 2011. (査読有)
- (5) Kamekura R, Kojima T, Takashima A, Koizumi J, Ogasawara N, Go M, Takano K, Murata M, Tanaka S, Ichimiya S, Himi T, Sawada N. Thymic stromal lymphopoietin induces tight junction protein claudin-7 via NF-kappaB in dendritic cells. *Histochem Cell Biol.* 133: 339-48, 2010. (査読有)
- (6) Ogasawara N, Kojima T, Go M, Fuchimoto J, Kamekura R, Koizumi J, Ohkuni T, Masaki T, Murata M, Tanaka S, Ichimiya S, Himi T, Sawada N. Induction of JAM-A during differentiation of human THP-1 dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 389: 543-9, 2009. (査読有)
- (7) Sato N, Hirohashi Y, Tsukahara T, Kikuchi T, Sahara H, Kamiguchi K, Ichimiya S, Tamura Y, Torigoe T. Molecular pathological approaches to human tumor immunology. *Pathol Int.* 59: 205-1, 2009. (査読有)
- (8) Tonooka A, Kubo T, Ichimiya S, Tamura Y, Ilmarinen T, Ulmanen I, Kimura S, Yokoyama S, Takano Y, Kikuchi T, Sato N. Wild-type AIRE cooperates with p63 in HLA class II expression of medullary thymic stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 379: 765-70, 2009. (査読有)
- (9) Tsukahara T, Kimura S, Ichimiya S, Torigoe T, Kawaguchi S, Wada T, Yamashita T, Sato N. Scythe/BAT3 regulates apoptotic cell death induced by papillomavirus binding factor in human osteosarcoma. *Cancer Sci.* 100: 47-53, 2009. (査読有)
- (10) Kubo T, Ichimiya S, Tonooka A, Nagashima T, Kikuchi T, Sato N. p63 induces CD4⁺ T-cell chemoattractant TARC/CCL17 in human epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res.* 28: 725-32, 2008. (査読有)
- (11) Tsukahara T, Kawaguchi S, Torigoe T, Kimura S, Murase M, Ichimiya S, Wada T, Kaya M, Nagoya S, Ishii T, Tatezaki S, Yamashita T, Sato N. Prognostic impact and immunogenicity of a novel osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor, in patients with osteosarcoma. *Cancer Sci.* 99: 368-75, 2008. (査読有)
- (12) Koshiba S, Ichimiya S, Nagashima T, Tonooka A, Kubo T, Kikuchi T, Himi T, Sato N. Tonsillar crypt epithelium of palmoplantar pustulosis secretes interleukin-6 to support B-cell development via p63/p73 transcription factors. *J Pathol.* 214: 75-84, 2008. (査読有)
- [学会発表] (計 25 件)
- (1) Nagashima T, Ichimiya S, Matsumiya H, Ara S, Kubo T, Sato N, Himi T. Arachidonate 5-lipoxygenase regulates primary resting B cells and follicular B helper T cells in adaptive humoral immune responses. The 7th International Symposium of Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways. Asahikawa, Japan. July 7-9, 2010.
- (2) 久保輝文、一宮慎吾、菊地智樹、佐藤昇志. p63 は上皮細胞の TARC/CCL17 産生を調節する. 第 99 回日本病理学会総会. 東京. 4 月、2010.
- (3) 荒志保子、一宮慎吾、菊地智樹、松宮弘、高野善英、外岡暁子、今信一郎、長谷川匡、氷見徹夫、佐藤昇志. 新たな甲状腺乳頭癌特異的バイオマーカー-SNX5 の意義とその臨床応用. 第 99 回日本病理学会総会. 東京. 4 月、2010.
- (4) 兵頭秀樹、佐藤大志、晴山雅人、長谷川匡、佐藤昇志、一宮慎吾、菊地智樹、澤田典均. 新しい世紀の病理解剖. 第 99 回日本病理学会総会シンポジウム (後援: 日本学術会議). 東京. 4 月、2010.
- (5) 兵頭秀樹、晴山雅人、長谷川匡、佐藤昇志、澤田典均、一宮慎吾、佐藤大志、菊地

- 智樹. 死亡時撮像画像と解剖所見の融合画像の作成ならびに学生(研修医)実習教材作成・実施に関する研究. 第 69 回日本医学放射線学会総会. 横浜. 4 月、2010.
- (6) Ichimiya S, Nagashima T, Kikuchi T, Matsumiya H, Ara S, Himi T, Sato N. Arachidonate 5-lipoxygenase affords cellular responses of helper T-cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会. 大阪. 12 月、2009.
- (7) Sato N, Hirohashi Y, Tsukahara T, Ichimiya S, Tamura Y, Torigoe T. Cancer, Immunology and Photonics Science. CIF-10. Chitose, Japan. Nov 13-14, 2009.
- (8) Kikuchi T, Ichimiya S, Ara S, Matsumiya H, Nagashima T, Takano Y, Tonooka A, Hasegawa T, Sato N. A novel thyroid cancer specific marker: immunohistochemistry analysis and biological implication of oncogene. The 55th Autumn Congress of Japanese Society of Pathology International poster session. Tokyo, Japan. Nov 19-20, 2009.
- (9) 塚原智英、木村重治、一宮慎吾、川口哲、鳥越俊彦、嘉野真允、和田卓郎、山下敏彦、佐藤昇志. Midwinter Seminar 臨床免疫学の未来: Scythe/BAT3 は骨肉腫抗原 PBF に誘導される細胞死を制御する. 第 32 回日本臨床免疫学会総会. 東京. 11 月、2009.
- (10) 塚原智英、木村重治、一宮慎吾、鳥越俊彦、嘉野真允、和田卓郎、川口哲、山下敏彦、佐藤昇志. Scythe/BAT3 regulates AIF-dependent apoptotic cell death induced by PBF in human osteosarcoma. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜. 10 月、2009.
- (11) 菊地智樹、一宮慎吾、長島勉、外岡暁子、高野善英、長谷川匡、氷見徹夫、佐藤昇志. A novel marker specific for detecting thyroid cancer; immunohistochemical analysis and biological implication. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜. 10 月、2009.
- (12) 一宮慎吾. 特別講演 B 細胞由来脂質メディエーターによるヘルパー T 細胞の機能分化制御—L22 抗原の同定とその機能解析から. 第 89 回北海道医学大会病理分科会・第 42 回北海道病理談話会. 札幌. 9 月、2009.
- (13) 菊地智樹、一宮慎吾、長島勉、高野善英、外岡暁子、今信一郎、長谷川匡、氷見徹夫、佐藤昇志. 新たな甲状腺特異的なバイオマーカーの生物学的意義とその臨床応用. 第 89 回北海道医学大会病理系分科会・第 42 回北海道病理談話会. 札幌. 9 月、2009.
- (14) 塚原智英、木村重治、川口哲、一宮慎吾、嘉野真允、鳥越俊彦、佐藤昇志、山下敏彦. Scythe/BAT3 は骨肉腫抗原 PBF に誘導される apoptosis-inducing factor 依存的な骨肉腫の細胞死を制御する. 第 42 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会. 横浜. 7 月、2009.
- (15) 塚原智英、木村重治、一宮慎吾、鳥越俊彦、嘉野真允、和田卓郎、山下敏彦、佐藤昇志. Scythe/BAT3 は PBF に誘導される AIF 依存的な骨肉腫の細胞死を制御する. 第 98 回日本病理学会総会. 京都. 5 月、2009.
- (16) 菊地智樹、一宮慎吾、長島勉、外岡暁子、長谷川匡、氷見徹夫、佐藤昇志. 新たな甲状腺特異的バイオマーカーの生物学的意義とその臨床応用. 第 98 回日本病理学会総会. 京都. 5 月、2009.
- (17) 長島勉、一宮慎吾、斉藤由幸、菊地智樹、高見剛、氷見徹夫、佐藤昇志. 5-LO 関連脂質メディエーターによる濾胞ヘルパー T 細胞の誘導. 第 98 回日本病理学会総会. 京都. 5 月、2009.
- (18) 佐藤大志、兵頭秀樹、一宮慎吾、秋葉英成、玉川光春、兵頭かずさ、長谷川匡、佐藤昇志、澤田典均、晴山雅人: 死亡時画像診断による教育支援プログラム. 第 68 回日本医学放射線学会学術集会. 横浜. 4 月、2009.
- (19) Nagashima T, Ichimiya S, Saito Y, Kikuchi T, Himi T, Takami T and Sato N. Arachidonate 5-lipoxygenase supports the function of resting B cells. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会. 京都. 12 月、2008.
- (20) 塚原智英、木村重治、一宮慎吾、鳥越俊彦、川口哲、和田卓郎、山下敏彦、佐藤昇志. Scythe/BAT3 は骨肉腫抗原 PBF に誘導されるアポトーシスを制御する. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋. 10 月、2008.
- (21) 長島勉、一宮慎吾、斉藤由幸、菊地智樹、氷見徹夫、佐藤昇志. 5-LO 関連脂質のメディエーターによる抗体産生応答の制御機構. 第 88 回北海道医学大会病理系分科会・第 341 回北海道病理談話会. 札幌. 9 月、2008.
- (22) 塚原智英、木村重治、一宮慎吾、鳥越俊彦、川口哲、和田卓郎、山下敏彦、佐藤昇志: ヒト骨肉腫におけるパピローマウイルス結合因子により誘導されたアポトーシス性細胞死の Scythe/BAT3 による制御. 第 12 回基盤的癌免疫研究会総会. 大宮. 7 月、2008.
- (23) 長島勉、一宮慎吾、斉藤由幸、菊地智樹、

氷見徹夫、佐藤昇志. 5-リポキシゲナーゼ関連脂質メディエーターによる抗体産生応答の制御機構. 第 97 回日本病理学会総会. 金沢. 5 月、2008.

(24) 塚原智英、木村重治、一宮慎吾、鳥越俊彦、川口哲、和田卓郎、山下敏彦、佐藤昇志. Scythe/BAT3 は PBF に誘導される骨肉腫の細胞死を制御する. 第 97 回日本病理学会総会. 金沢. 5 月、2008.

(25) 一宮慎吾. 診断講習会—マンツル細胞リンパ腫の病理組織診断. 第 96 回日本病理学会総会. 金沢. 5 月、2008.

〔図書〕(計 3 件)

(1) 佐藤昇志、廣橋良彦、塚原智英、田村保明、一宮慎吾、鳥越俊彦. バイオ医薬の開発技術とシーズ. 第 30 章 がんペプチド免疫治療. シーエムシー出版、2009.

(2) 兵頭秀樹、一宮慎吾、長谷川匡. オートプシー・イメージング読影ガイド (大友邦監修、分担執筆). 文光堂. 2009.

(3) 一宮慎吾. 症例解説—リンパ節 マンツル細胞リンパ腫の病理組織診断. 病理と臨床. 27: 1094-5, 2009.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 腫瘍マーカーおよびその利用

発明者: 一宮慎吾、外岡暁子、菊地智樹、佐藤昇志

権利者: 札幌医科大学

種類: 特願

番号: PTC/JP2010/056293

出願年月日: 2010 年 4 月 7 日

国内外の別: 国内外

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

(1) 島本和明、長谷川匡、晴山雅人、佐藤昇志、澤田典均、一宮慎吾、門間正子、兵頭秀樹、岩本喜久子、佐藤大志、計良淑子. 平成 20 年度質の高い大学教育推進プログラム (教育 GP) 「死亡時画像診断による教育支援プログラム」最終実績報告書. p1-176、3 月、2011.

(2) 佐藤昇志、鳥越俊彦、田村保明、一宮慎吾、広橋良彦. ヒト癌幹細胞免疫応答機構. 癌研究高度化支援事業 (癌免疫プロジェクト) 研究実績報告書. 平成 21 年度札幌医科大学教育研究高度化プロジェクト報告書. p21-23、3 月、2010.

(3) 張軍、一宮慎吾、佐藤昇志. Identification of drug targets specific to side population of REC-1 mantle cell lymphoma cells by quantitative mass spectrometry analysis. 日中笹川医学奨学金制度第 31 期研究者研究報告会研究報告集. p120-125、2009.

(4) 一宮慎吾. クラゲ蛍光蛋白の科学への貢献—バイオイメージングとノーベル賞. 第 8 回北海道海洋生物科学シンポジウム. 利尻富士町. 6 月、2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一宮 慎吾 (ICHIMIYA SHINGO)
札幌医科大学・保健医療学部・教授
研究者番号: 30305221

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし