

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591267

研究課題名（和文） CBL 会合アダプター(CIN85)による自己反応性 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 autoreactive 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（和文）：

我々は、RNAi ベクターによる CIN85 ノックダウン B 細胞を使用して、CIN85 分子のヒト B 細胞分化への作用を *in vitro* レベルで明らかにした。また、マウス CIN85 RNAi loxP ベクタートランスジェニックマウスを作成し、これらのマウスと Cre トランスジェニックマウスとの組み合わせにて B 細胞特異的ノックダウンに成功し、今後 *in vivo* レベルでの CIN85 アダプター分子の機能解析が可能と思われる。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we have shown a novel effect of CIN85 on the differentiation of human B cells, and have also established B-cell-specific CIN85 knockdown mice that can serve to evaluate an *in vivo* function of this adaptor molecule.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

自己免疫疾患におけるB細胞の重要性は、近年の抗CD20, 抗CD22, 抗BAFF抗体による殺B細胞療法が効果をあげていることより実証された。ただ、これらの治療法は非特異的B細胞を標的としたものであり、自己免疫疾患の本態を担う自己反応性B細胞を標的とした治療にはまだ程遠い。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、自己反応性B細胞は、通常生存・増殖・分化・抗原提示などの機能が抑制された自己寛容性となるが、これらの機能が抑制できないと自己免疫性となる。すなわち、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シグナ

ル伝達の制御はきわめて重要である (Niuro and Clark. Nat. Rev. Immunol. 2002; Cannons and Schwartzberg. Curr. Opin. Immunol. 2004)。

E3ユビキチンリガーゼであるc-CblとCbl-bは、細胞内シグナル分子のユビキチン化という蛋白レベルでの修飾を介してシグナル伝達を巧妙に制御している。最近、B細胞特異的c-Cbl/Cbl-b両欠損マウスが報告された(Kitaura et al. Immunity 2007)。このマウスの特徴として、自己反応性の高いB細胞として知られるT1, MZ (marginal zone), B1細胞数の末梢での増加、BCRシグナル伝達ならびに生存増殖の異常、自己抗原へのアナジュー誘導障害があげられ、さらには全身性自己免疫疾患を自然発症した。以上より、我々は自己反応性B細胞の運命決定にc-Cbl/Cbl-bの機能制御は重要であると考え

る。BCRシグナル伝達において、アダプター分子はアダプタードメインを通じて複数のシグナル分子と会合し、上流シグナルを統合し効率よく下流標的分子へ繋ぐ役目を果たす(Niuro and Clark. Nat. Rev. Immunol. 2002)。最近、c-Cbl, Cbl-b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、その後の研究により、CIN85はc-Cbl, Cbl-b以外の様々なシグナル分子とも会合しうることが判明した。我々は、CIN85がB細胞に強く発現していることから、このアダプター分子を介したB細胞の機能制御に強い興味を持った。まず、我々は、野生株CIN85あるいはアダプタードメイン欠損CIN85をヒトB細胞株に強発現した系を使用し、CIN85はCblに加え、重要なBCRシグナル分子であるBLNKとも強く会合することを明らかにした。

次に、CIN85のB細胞に対する機能的意義をより明らかにするために、野生株CIN85を強発現させたgain of functionの系、内因性CIN85をRNAiベクターでノックダウンさせたloss of functionの系を使用した。その結果、CIN85はBCRシグナル伝達の上流で機能し、

Cblリン酸化を増強し、Syk, BLNK, PLC γ 2といったBCRシグナル分子のリン酸化を抑制した。B細胞の生存、分化、増殖といった機能発現にPLC γ 2は重要であるが、我々は上記RNAiベクターにてヒト正常B細胞の内因性CIN85ノックダウンにも成功し、CIN85は少なくともB細胞の生存・増殖を負に制御していることを見いだした。また、我々は全身性エリテマトーデス(SLE)をはじめとした全身性自己免疫疾患B細胞におけるCIN85発現について検討し、自己免疫疾患B細胞では正常B細胞に比べてCIN85発現が低かった。

現在まで、CIN85による正常ならびに自己免疫疾患B細胞の機能制御についての研究は、国内・国外ともに全く報告がない。

2. 研究の目的

(1) ヒトB細胞を使用し、CIN85のB細胞の形質細胞への分化への作用について明らかにする。

(2) SLEをはじめとする自己免疫疾患由来B細胞におけるCIN85発現異常の機序について明らかにする。

(3) ヒトB細胞を使用した我々のこれまでのin vitroの系の結果に基づき、マウスの系を用いたin vivoレベルでのB細胞特異的CIN85ノックダウンを行う。

3. 研究の方法

(1) CIN85によるヒトB細胞分化への作用の解明(新納, 赤司)

高純度の正常ヒトB細胞サブセット(>99%)を使用した我々の結果では、BCR刺激単独では抗体産生細胞への分化を誘導できず、この分化にはBAFF, CD40, TLR ligandといった共刺激が必須であった。ただ、Cbl-b欠損T細胞の活性化はT細胞受容体(TCR)を介する刺激のみで十分でCD28分子を介した共刺激が必要でないこと(Chiang YJ, et al. Nature 2000; Bachmaier K, et al. Nature 2000)やB細胞における共刺激CD40シグナル下流でもCbl-b分子が機能しているという報告(Qiao, et al. J Immunol 2007)があることから、Cbl

機能が変化したB細胞においては BCR 刺激単独でも B 細胞分化のプログラムを始動できる可能性がある。我々の正常ヒト B 細胞への CIN85 RNAi (GFP)ベクター導入の系では、セルソーターによる高純化 GFP 陽性細胞において CIN85 蛋白発現が～80%程度にまでノックダウン可能である。この高純化 GFP 陽性細胞を使用することにより、CIN85 ノックダウンのヒト B 細胞分化への効果について評価する。まず、形質細胞分化誘導の始動に重要とされる Blimp-1, Xbp-1, IRF-4 遺伝子発現に着目し、我々が既に確立した TaqMan probe による real-time PCR の系にて、これらの遺伝子発現を経時的かつ定量的に評価する。次に、ELISA を使用し培養液中の各種免疫グロブリン産生量の評価ならびに ELISPOT を使用した抗体産生細胞の評価も行う。以上の評価を、まずはヒト CD19 細胞の BCR 刺激単独にて行うが、場合によっては BAFF, CD40, TLR ligand といった共刺激も併用して行う。さらに、これらの検討をセルソーターで分離した B 細胞サブセットごとにも行う。

(2) マウスCIN85 RNAiベクターの作成 (新納)

正常ヒト B 細胞における CIN85 ノックダウンにより B 細胞の機能亢進が見られることと、SLE をはじめとする全身性自己免疫疾患由来 B 細胞で CIN85 発現が低いというこれまでの結果に基づき、CIN85 ノックダウンが *in vivo* レベルにおいて自己反応性 B 細胞の自己寛容破綻をきたし、さらには自己免疫疾患を発症するかをマウスの系にて検証する。

我々はまず RNAi ベクターシステムがマウス B 細胞にも機能しうるかを確認することにした。マウス CIN85 遺伝子上で効率よいノックダウンが予想される約 20bp 配列の 4 か所 (#1～#4) を各々 RNAi ベクターにクローニングし、マウス A20 細胞株に遺伝子導入した。これらの細胞におけるマウス CIN85 mRNA 発現を real-time PCR 法を使用して定量的に評価した。その結果、これらの配列の中には、ヒトの場合と同様、マウス CIN85 mRNA 発現を～80%まで抑制するものがあつた (図 2 での#2 配列)。さらに、我々はこれらの細胞において CIN85

蛋白も mRNA と同等レベルに抑制されていることを確認した。これらのベクターを発現している stable A20 細胞を樹立し、これらの細胞を使用し BCR 刺激による下流のシグナル伝達分子 (特に Syk, Cbl, BLNK, PLC γ 2, JNK, NF κ B 等) の活性化への CIN85 ノックダウンの効果の評価し、CIN85 が細胞に対してヒトの系と同様の作用を示すかどうかを評価する。また、ヒトの場合と同様、正常マウス B 細胞への遺伝子導入も困難とされているが、上記 RNAi ベクターの導入を試み、CIN85 の B 細胞生存、増殖、分化への作用を明らかにする。

(3) CIN85 RNAi loxPベクタートランスジェニックマウスの作成 (新納、赤司)

上記(2)の研究計画において選択したCIN85 ノックダウン効率のよい配列を使用して、RNAi loxPトランスジェニックマウス用の新規ベクターを構築する。このベクターは宮崎純一教授 (阪大) より供与いただいたCAG (promoter)-loxP-CAT-loxP-EGFPベクターをバックボーンにしており、loxP下流にmCIN85 RNAi配列を挿入したものである。通常、loxPに囲まれた CATに続く終止配列により mCIN85 RNAiは発現することはないが、Cre-loxPシステムにより CAT-終止配列が除かれることでmCIN85 RNAiが発現する。この mCIN85 RNAi loxPベクターを発現するトランスジェニックマウスが作成できると、CD19-Creトランスジェニックマウスとのかけ合わせにより、B細胞特異的にCIN85ノックダウンが可能となる。このマウスを使用することにより、個体レベルでのCIN85の機能が解析できる。

(4) 自己免疫疾患由来B細胞におけるCIN85発現異常の機序 (新納)

ヒト自己免疫疾患B細胞における CIN85発現異常の機序についても検討を行う。これまでに我々は、健康人ならびにSLE患者から純化したCD19⁺B細胞よりnaïveならびにmemory B細胞のサブセットに分離し、各々の集団におけるCIN85発現をreal-time PCRを使用したRNAレベル、ウエスタンブロットを使用した蛋白レベルで評価した。その結果、健康人に

比べ、SLE患者由来B細胞ではCIN85発現が mRNAならびに蛋白レベルにて低かった。ただ、その抑制は蛋白レベルでより顕著なことから、主な機序として蛋白レベルでの発現制御異常を予想している。我々のこれまでの検討では、CIN85蛋白リン酸化は認めていないが、ユビキチン化を含むその他の蛋白修飾をうける可能性があり、この点について検討を行う。

4. 研究成果

(1) CIN85 によるヒト B 細胞分化への作用の解明

まず正常ヒト B 細胞へ CIN85 RNAi (GFP) ベクターを導入すると、内因性 CIN85 発現が 10~20%程度まで抑制された。この CIN85 ノックダウン細胞を用いて、B 細胞の抗体産生細胞への分化を Blimp-1 や Xbp-1 遺伝子の発現誘導にてモニターした。その結果、Blimp-1 と Xbp-1 遺伝子の発現は B 細胞抗原受容体 (BCR) 単独刺激では誘導されず、それらの誘導には BCR に加えて Toll-like 受容体 (TLR) の共刺激が必要であった。また、CIN85 は BCR+TLR による B 細胞の分化誘導を抑制することが判明した。以上より、CIN85 はこれまでの生存・増殖への作用に加えて、B 細胞分化への作用も示すことが示唆される。

(2) マウス CIN85 RNAi ベクターの作成

内因性マウス CIN85 を標的とした RNAi ベクターを発現している stable A20 細胞 (マウス B 細胞株) を樹立し、BCR 刺激による下流のシグナル伝達分子の活性化への CIN85 ノックダウンの効果を評価した。その結果、A20 細胞にて内因性 CIN85 発現が 10~20%程度まで抑制されることを確認した。さらに、この細胞を使用して、CIN85 が BCR 刺激による Syk ならびに PLC γ 2 の活性化を抑制することが判明した。以上より、CIN85 はマウス B 細胞に対してもヒトの系と同様の作用を示すことが示唆される。

次に、我々はCIN85 RNAi loxPベクタートランスジェニックマウスの作成を行った。まずはこのマウス作成のための新規ベクターだが

、宮崎純一教授 (阪大) より供与いただいた CAG promoter-loxP-CAT (終止配列)-loxP -EmGFPベクターをバックボーンに loxP-EmGFP 下流にマウスCIN85 (mCIN85) RNAi配列を挿入した。尚、このベクターのCIN85 RNAi配列部位はスクリーニング実験で単独でノックダウン効率の高かった配列をタンデムで2つ連結したものであり、この方法により単独以上のノックダウン効率を確認した。次に上記ベクターが実際に機能することをin vitroで確認するために、このベクターとCre発現ベクターを共にマウスA20細胞 (B細胞株) に導入したところ、コントロールに比してCIN85発現がmRNAならびに蛋白レベルで80%以上抑制されることを確認した。こうして質の確認できたベクターを至適部位にて切断しlinearizeした後、に受精卵にマイクロインジェクションを行い、その後breedingを重ねた結果、F1マウスのgenotypingにてGFP陽性を認めgerminal transmissionがうまくいっていることを確認した。

上記 CIN85 RNAi loxP ベクタートランスジェニックマウス F1 4 ラインを十分に増やした上で、CD19-Cre ならびに CD21-Cre トランスジェニックマウスとの交配を重ね、前者では骨髄 Pro B 細胞の段階からの、後者では成熟 B 細胞の段階からの CIN85 ノックダウンマウスの作成を試みた。数ヶ月にわたる交配を繰り返した結果、CD19-Cre による CIN85 ノックダウンマウスを得ることはできなかったが、CD21-Cre による CIN85 ノックダウンマウスを少数であるが得る事ができた。今後、この後者のマウスの作成を継続しつつ、一方ではこのマウスを用いて、1) 中枢ならびに末梢での B 細胞分化 2) 免疫グロブリン産生 3) B 細胞表面マーカー 4) B 細胞内シグナル伝達 5) B 細胞のサイトカイン産生能 6) B 細胞の生存・増殖 7) 自己免疫疾患発症の有無などについての検討が可能である。

(3) 自己免疫疾患由来 B 細胞における CIN85 発現異常の機序

我々はヒト自己免疫疾患 B 細胞における

CIN85 発現異常の機序の解明も試みた。SLE 患者 B 細胞では CIN85 発現低下が蛋白レベルで顕著なことから、ユビキチン化による蛋白修飾系に着目した。その結果、CIN85 は BCR シグナル伝達分子を標的としたユビキチン化には促進的に作用したが、CIN85 蛋白自体のユビキチン化は明確に認めなかった。現在、microRNA を介した CIN85 蛋白発現制御の可能性についての検討も進めている。

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 8 件)

- ① Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Nihiro H, Iwasaki H, Takenaka K, and Akashi K: Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* (査読有) 20(2): 246-259, 2011 Aug
DOI: [10.1016/j.ccr.2011.06.029](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.029)
- ② Shimoda S, Harada K, Nihiro H, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Nakanuma Y, Leung P, Ansari AA, Gershwin ME, and Akashi K: Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* (査読有) 53(4): 1270-81, 2011 Apr
DOI: [10.1002/hep.24194](https://doi.org/10.1002/hep.24194)
- ③ Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Nihiro H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, and Akashi K: Analysis of immune reconstitution after autologous CD34⁺ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4⁺ T cells. *Rheumatology* (査読有) 50(5): 944-52, 2011 May
DOI: [10.1093/rheumatology/keq414](https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq414)
- ④ Wakasaki T, Masuda M, Nihiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Noda K, Taniyama T, Komune S, and Akashi K: A critical role of c-Cbl interacting protein of 85 kDa in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas via the Ras-ERK pathway. *Neoplasia* (査読有) 12(10): 789-796, 2010 Oct
<http://www.neoplasia.com/pdf/manuscript/v12i10/neo10396.pdf>
- ⑤ Uchino A, Tsukamoto H, Nakashima H, Yoshizawa S, Furugo I, Mitoma H, Oryoji K, Shimoda T, Nihiro H, Tada Y, Yano T, Nonaka T, Oishi R, Akashi K, and Horiuchi T: Tacrolimus is effective for lupus nephritis patients with persistent proteinuria. *Clin Exp Rheumatol* (査読有) 28(1): 6-12, 2010 Jan-Feb
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346231>
- ⑥ Yoshimoto G, Miyamoto T, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Iino T, Rocnik JL, Kikushige Y, Mori Y, Shima T, Iwasaki H, Takenaka K, Nagafuji K, Mizuno S-I, Nihiro H, Gilliland GD, and Akashi K: FLT3-ITD upregulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation *Blood* (査読有) 114(24): 5034-5043, 2009 Dec 3
DOI: [10.1182/blood-2008-12-196055](https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-196055)
- ⑦ Jabbarzadeh-Tabrizi S, Nihiro H, Masui M, Yoshimoto G, Iino T, Kikushige Y, Wakasaki T, Baba E, Shimoda S, Miyamoto T, Hara T, Akashi K: T cell leukemia/lymphoma 1 and Galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naïve and IgM⁺ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. *J. Immunol.* (査読有) 182(3): 1490-1499, 2009 Feb 1
<http://www.jimmunol.org/content/182/3/1490.long>

- ⑧ Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, Uike N, Niuro H, Takenaka K, Nagafuji K, Miyamoto T, Harada M, Takatsu K, Akashi K: Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J. Exp. Med.* (査読有) 206(1): 183-193, 2009 Jan 16
DOI: [10.1084/jem.20081756](https://doi.org/10.1084/jem.20081756)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 第 55 回日本リウマチ学会総会 2011. 7. 19 神戸 演題名: 健常人ならびに SLE 患者 B 細胞における IRAK 発現とその役割
新納宏昭, ジャバルザデ タブリジ シアマック, 大田俊一郎, 野田久美子, 上田尚靖, 田中淳, 藤健太郎, 井上靖, 有信洋二郎, 塚本浩, 堀内孝彦, 赤司浩一
- ② 第 54 回日本リウマチ学会総会 2010. 4. 23 神戸 演題名: ヒト B 細胞における IRAK 発現調節と自己免疫疾患におけるその関与
新納宏昭, Jabbarzadeh-Tabrizi Siamak, 相澤久美子, 上田尚靖, 押領司健介, 三苦弘喜, 井上靖, 有信洋二郎, 塚本浩, 堀内孝彦, 赤司浩一
- ③ 2010 Keystone Symposia February 24, 2010 (Taos Convention Center, Taos, New Mexico, USA) A vital role of CIN85 in Cbl-mediated regulation of B cell survival, growth and differentiation.
Hiroaki Niuro, Siamak Jabbarzadeh-Tabrizi, Kumiko Noda, Yasushi Inoue, Yojiro Arinobu, Koichi Akashi
- ④ 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009. 12. 4 大阪 演題名: Cbl の B 細胞機能制御における CIN85 の役割/A vital role of CIN85 in Cbl-mediated regulation of B cell functions.
Hiroaki Niuro, Siamak Jabbarzadeh-Tabrizi, Kumiko Noda, Yasushi Inoue, Yojiro Arinobu, Shinji Shimoda, Eishi Baba,

Tadayoshi Taniyama, Toshiro Hara,
Koichi Akashi

- ⑤ 96th annual meeting AAI Immunology 2009 May 10, 2009 (Washington State Convention & Trade Center, Seattle, WA) Critical role of CIN85 in Cbl-mediated regulation of B cell function after antigen receptor stimulation.
Hiroaki Niuro, Siamak Jabbarzadeh-Tabrizi, Kumiko Aizawa, Yasushi Inoue, Yojiro Arinobu, Koichi Akashi
- ⑥ 第 53 回日本リウマチ学会総会 2009. 4. 23 東京 演題名: 抗原受容体シグナルによる正常ならびに SLE B 細胞サブセットの生存の制御
新納宏昭, ジャバルザデ タブリジ シアマック, 相澤久美子, 三苦弘喜, 井上靖, 有信 洋二郎, 塚本 浩, 堀内孝彦, 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・医学研究院・教授
研究者番号: 80380385