

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790461

研究課題名（和文） プレB細胞レセプターの発現制御機構と急性リンパ性白血病化の解明

研究課題名（英文） The regulation mechanism of pre-B cell receptor expression and pre-B acute lymphoblastic lymphomagenesis

研究代表者

河野 洋平（KAWANO YOUHEI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20401383

研究成果の概要（和文）：

本研究ではプレB細胞上に一過性に発現する恒常的活性化受容体である pre-BCR の発現抑制メカニズムを解明することで、新たなプレB細胞タイプの急性リンパ白血病（ALL）治療法開発の分子基盤を構築することを目的としている。pre-BCR の発現抑制に関与する分子の解析を行ったところ、この分子は、細胞表面への pre-BCR 発現量が増加すると発現が誘導され、リソソームに移行して pre-BCR を分解するという、pre-BCR の自発的な発現調節に関与することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Pre-BCR is a constitutively active receptor, transiently expressed on only pre-B cells, and its aberrant expression cause pre-B acute lymphoblastic lymphoma. We study the regulation mechanism of the pre-BCR expression, and identified a molecule localized in lysosome that is involved in the degradation of pre-BCR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
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：基礎医学・免疫学

キーワード：プレB細胞、pre-BCR

1. 研究開始当初の背景

近年、日本は少子高齢化が大きな社会問題となっており、さらに産科、小児科医の不足がそれに拍車をかけている。その不足の迅速な補充だけでなく、小児疾患

に対する新規治療法の開発など、小児医療のさらなる充実化による小児生存率の向上も重要な少子化対策として必要である。小児死亡率で高いのは小児悪性腫瘍であり、そのうち最も多いのは急性リン

パ性白血病(ALL)である。中でもB前駆細胞型とよばれる、正常に分化することのできなくなった未分化のB細胞に由来するものが大部分を占めている。このことから正常なB前駆細胞の増殖メカニズムを知ることがこのタイプのがんの理解とその治療にむけての有力な手がかりとなる。こうした意味でB細胞初期分化の中で増殖と最も関わりの深いものとしてプレB細胞レセプター(preBCR)があげられる。preBCRは μ H鎖、VpreB/ λ 5(SL鎖)、Ig α /Ig β から構成され、骨髄中のB前駆細胞(プレB細胞)表面に一過性に発現している。近年、preBCRは恒常的な活性化レセプターであることが明らかとなり、プレB細胞の増殖をコントロールすることでB細胞のホメオスタシスを維持していると考えられている。実際、preBCR欠損マウスにおいては顕著なB細胞分化障害がみられているだけでなく、これまでに同定されたB細胞欠損型のヒト先天性免疫不全症の原因遺伝子のすべてがpreBCRに関連したものであることからその重要性が明らかとなっている。

2. 研究の目的

最近、preBCR下流のシグナル伝達分子であるBLNKの欠損マウスではB前駆細胞型のALLを発症することが報告されており、preBCRがその細胞表面から消失することができず、恒常的にpreBCRシグナルが入り続けていることが白血病化のリスク要因のひとつとして考えられている。実際、約50%ものヒト小児ALLにおいてBLNKの発現消失および低下が報告これまでプレB細胞の増殖におけるpreBCRを介した正のシグナル伝達機構については多くの報告があるが、負に調節するメ

カニズムはほとんど研究されておらず、ここにきてその重要性が指摘されている。したがってpreBCRの発現終焉メカニズムを解明することは学術的研究価値の高いものであるだけでなく、臨床的観点からも大変意義のあるものである。

3. 研究の方法

我々は遺伝子ノックダウン法を用いてpreBCRダウンレギュレーションに関わる分子のスクリーニング系を独自に開発することに成功している。この方法を用いてpreBCRダウンレギュレーションに関わる分子の同定を行った。分子生物学的手法を用いてこの候補分子の変異体を作製することでpreBCRダウンレギュレーションに重要な部位を同定した。また、共焦点顕微鏡やウエスタンブロット法など生化学的手法を利用し、ノックダウン細胞やリソソーム阻害剤などの薬剤を組み合わせることでpreBCRのリソソーム分解とこの分子との関係を調べた。その他いくつかのプレB細胞株を用いることで、preBCRダウンレギュレーションにおけるこの分子の役割を調べた。候補分子の遺伝子欠損マウスのプレB細胞においてpreBCRの発現あるいは増殖、分化に異常があるかどうかを調べた。またpreBCR欠損マウスと交配させることにより作製したマウスのプロB細胞にpreBCRを再構築させた*in vitro*分化システムを用いてpreBCRの発現あるいは増殖、分化を調べた。

4. 研究成果

この方法によりpre-BCRダウンレギュレーションに機能未知のある分子が関与すること

がわかったので、この分子の野生型および変異体を作製し、どの部位が pre-BCR ダウンレギュレーションに重要かを調べたところ、C 末端部分および N 末端部分ともに大事であることがわかった。また共焦点顕微鏡を用いてこの分子の細胞内局在を調べるとリソソームにあり、あるプレ B 細胞株内では pre-BCR の一部がリソソームにみられ、この分子と共局在していることがわかった。そこでこの分子を shRNA を用いてノックダウンしたところ、プレ B 細胞表面上の pre-BCR の発現量が増加した。同様に、リソソーム活性の阻害剤である BafilomycinA1 を加えるとプレ B 細胞表面上の pre-BCR の発現量が増加した。初代培養細胞においてもこの分子をノックダウンするとプレ B 細胞表面上の pre-BCR の発現量が増加した。このことからこの分子は pre-BCR のリソソームでの分解に関与していることが考えられる。

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 件)

1. Ugajin T, Kojima T, Mukai K, Obata K, Kawano Y, Minegishi Y, Eishi Y, Yokozeki H, Karasuyama H. Basophils preferentially express mouse Mast Cell Protease 11 among the mast cell tryptase family in contrast to mast cells. *J Leukoc Biol.* 86(6):1417-25, 2009
2. Wada T, Ishiwata K, Koseki H, Ishikura T, Ugajin T, Ohnuma N, Obata K, Ishikawa R, Yoshikawa S, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Yokozeki H, Watanabe N, Karasuyama H. Selective ablation of basophils in mice reveals

their nonredundant role in acquired immunity against ticks. *J Clin Invest.* 120(8):2867-75, 2010

3. Ishikawa R, Tsujimura Y, Obata K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. IgG-mediated systemic anaphylaxis to protein antigen can be induced even under conditions of limited amounts of antibody and antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* 402(4):742-6, 2010

[学会発表] (計 2 件)

1. Kawano Y., Ouchida R, O-Wang Jiyang, Yoshikawa S, Yamamoto M., Kitamura D. and Karasuyama H.; A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression through BLNK-mediated induction of LAPTM5. The 39th JSI annual meeting. 2009.12.2-4, Osaka
2. Kawano Y., Ouchida R, O-Wang Jiyang, Yoshikawa S, Yamamoto M., Kitamura D. and Karasuyama H.; A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression through BLNK-mediated induction of LAPTM5. International Congress of Immunology 2010. 2010.8.24, Kobe

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 洋平 (KAWANO YOHEI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号 : 20401383

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：