

平成23年 5月 9日現在

機関番号： 82401  
 研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2009～2010  
 課題番号： 21790483  
 研究課題名（和文）成熟Bリンパ球の分化決定における古典的および非古典的NF-κB経路の機能解析  
 研究課題名（英文）Functional analysis of canonical and alternative NF-κB pathways in mature B lymphocyte differentiation.  
 研究代表者  
 佐々木 義輝（SASAKI YOSHITERU）  
 独立行政法人理化学研究所・幹細胞研究グループ・研究員  
 研究者番号： 80323004

研究成果の概要（和文）：転写因子NF-κBは、古典的および非古典的経路によって活性化され、その両方の経路がBリンパ球の発生に必須である。しかしこの2つの経路の関係に関しては不明な点が多い。そこで、Bリンパ球特異的にp52NF-κB2を発現するトランスジェニックマウスを作製し、NEMOを欠損するマウスと交配し解析した結果、p52NF-κB2の発現によってNEMOを欠損するB2細胞およびMZ B細胞は回復したがB1細胞の回復は認められなかった。この結果から、B2細胞およびMZ B細胞においては共通の標的遺伝子を制御することによってその発生をコントロールしているが、B1細胞の発生では古典的経路特有の機能が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：NF-κB pathway is activated mainly in two ways, canonical and alternative pathways. Gene-targeting studies show that both canonical and alternative pathways are essential for mature B cell development. However it is a little known how these pathways controls the development of mature B cells. I established conditional knock-in transgenes of p52NF-κB2 and crossed with NEMO deficient mice. The expression of p52NF-κB2 rescues the development of NEMO deficient follicular and marginal zone B cells but not B1 cells. This result shows that canonical and alternative NF-κB pathways control common target genes in resting follicular and canonical NF-κB pathway in itself is essential for the development of B1 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：転写因子、Bリンパ球、発生・維持、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

|

Bリンパ球は、外来抗原に対し抗原特異的な抗体を産生することで生体を異物から守る働きを持つ細胞である。Bリンパ球の発生過程において遺伝子再構成によりB細胞受容体(BCR)が形成されるが、異物を認識し且つ自己抗原を認識しないBCRを持つ細胞だけが成熟Bリンパ球として選択され末梢の免疫組織に到達する。成熟Bリンパ球は、古典的Bリンパ球であるB2細胞、脾臓の辺縁帯にのみ存在する辺縁帯B細胞(MZ B細胞)そして主に胸腔、腹腔内に存在するB1細胞に分類される。BCR以外でBリンパ球の分化に関わる分子としてTNF受容体スーパーファミリーの1つBAFF-Rがある。研究代表者はこれまでにBAFF-R欠損マウスの作製を行いBAFF-RがB2細胞、MZ B細胞の発生に必須の分子であり、その下流においては転写因子の一つであるNF- $\kappa$ Bの活性化が重要な役割を担っていること、そしてBAFF-R下流のNF- $\kappa$ B活性はTraf3によって負に制御されていることを報告してきた。さらにNF- $\kappa$ Bの標的遺伝子としてはB2細胞の発生においてはBcl2ファミリーの抗アポトーシス分子が重要であるが、MZ B細胞の分化に関してはBcl2ファミリー分子の発現だけでは十分ではなく、他にMZ B細胞の発生に重要なNF- $\kappa$ Bの標的分子の存在を示唆してきた。しかし、その分子本体について詳しいことは解明されていない。また研究代表者はBリンパ球特異的な古典的NF- $\kappa$ Bの活性化はMZ B細胞の数を上昇させることを報告しているが、最近さらに強いNF- $\kappa$ Bの活性化はB1細胞の数を上昇させることを見だしている。この結果は、NF- $\kappa$ B活性依存的に成熟Bリンパ球の分化方向が決定していることを示唆している。

NF- $\kappa$ Bは、p50/NF- $\kappa$ B1、p52/NF- $\kappa$ B2、RelA、c-Rel、RelB という5個の分子からなる転写因子である。静止期の細胞においてはInhibitor of  $\kappa$ B(I $\kappa$ B)ファミリーのタンパク質と結合し核内への移行が抑制されている。これまでに、NF- $\kappa$ Bを活性化するメカニズムとして古典的経路(Canonical pathway)および非古典的経路(Alternative pathway)と呼ばれる二つの経路が報告されている。古典的経路においては、二つのキナーゼ分子(IKK1/ $\alpha$ とIKK2/ $\beta$ )および一つのスカフォールド蛋白質(NEMO または IKK $\gamma$ )からなるキナーゼ複合体が、I $\kappa$ B分子のN末領域に存在する二つのセリン残基をリン酸化しプロテアソームにおける分解を誘導することでNF- $\kappa$ Bダイマーの核内への移行を可能にする。古典的経路では、p50/RelA および p50/c-Rel ヘテロダイマーが主に活性化される。一方、非古典的経路においてはNF- $\kappa$ B inducing kinase(NIK)とIKK1 からなる別のキナーゼ複合体によりp52の前駆体p100のC末領域に存在するセリン残基がリン酸化されると、p100はプロセッシングされて p52 となり核内へと移行する。

この経路では p52/RelB からなるヘテロダイマーが活性化される。Bリンパ球の発生、生存において両方のNF- $\kappa$ B経路が必須であることが、ノックアウトマウスの解析結果から明らかとなっている。しかしこれら二つの経路がどのようにBリンパ球の分化、生存において役割を分担しているかは不明である。

## 2. 研究の目的

B細胞受容体(BCR)からのシグナルの強さの違いによりどのタイプの成熟Bリンパ球に分化するかが決定されていることが報告されている。研究代表者は、これまでにBリンパ球特異的に古典的NF- $\kappa$ B経路を活性化させたトランスジェニックマウスにおいて、トランスジーンが1コピーの時はMZ B細胞の数が増えるが、2コピーの場合には、B1細胞が増えることを観察している。つまりMZ B細胞もしくはB1細胞への分化の決定にNF- $\kappa$ B活性量が重要な役割を担っていることを示唆している。そこで、辺縁帯B細胞およびB1細胞の分化決定に重要な働きをしているNF- $\kappa$ Bの標的遺伝子の同定を行い、その機能を解析する事で成熟Bリンパ球の分化を決定するメカニズムの一端を明らかにすることを第一の目的とする。先に記したように古典的NF- $\kappa$ B経路および非古典的NF- $\kappa$ B経路共に成熟Bリンパ球の分化、生存に必須であることは分かっているが、この二つの経路の関係に関しては不明な点が多い。そこで、これら二つのNF- $\kappa$ B経路がそれぞれ別の標的遺伝子の発現を調節することによってBリンパ球の分化、生存をコントロールしているのか、それとも同じ遺伝子を標的とし十分な発現量を得るために両方の活性が必要なのか、さらには古典的経路と非古典的経路との間に互いの活性をコントロールする機構が存在するのかという疑問を解明することを第二の目的とする。

## 3. 研究の方法

1) 辺縁帯Bリンパ球、B1リンパ球の分化をコントロールする古典的NF- $\kappa$ B経路の標的遺伝子の同定とその機能解析：研究代表者は、Bリンパ球特異的に活性型IKK2(IKK2ca)を発現させたトランスジェニック(TG)マウスの作製と解析を行い、そのマウスのBリンパ球では古典的NF- $\kappa$ B経路の活性化が認められ、MZ B細胞数が上昇することを報告した。最近、トランスジーンのコピー数を2倍にした場合には、MZ B細胞ではなくB1細胞数が上昇することを発見した。この結果は古典的NF- $\kappa$ B経路がBリンパ球の分化方向決定に関与していることを示唆することから、MZ B細胞およびB1細胞に於ける古典的NF- $\kappa$ Bの標的遺伝子の同定と機能解析を行う。

①辺縁系Bリンパ球、B1リンパ球における古典的NF- $\kappa$ B経路の標的遺伝子の同定

MZ B細胞における古典的NF- $\kappa$ B経路の標的遺伝

子を、IKK2caトランスジーン1コピーのTGマウスおよび野生型マウスよりMZ B細胞をセルソーターにて精製後RNAを回収しDNAアレイを用いて比較を行うことによって同定する。B1細胞における古典的NF-κB経路の標的遺伝子は、IKK2caトランスジーン2コピーのTGマウスおよび野生型マウスの腹腔内のB1a細胞の遺伝子発現を比較することで同定する。アレイによって得られた陽性クローンに関しては、さらに定量的RT-PCRによってその発現の違いを確認する。さらに、NF-κBの直接の標的遺伝子かどうかについてプロモーター領域をクローニングし、NF-κB結合配列の有無を検索する。結合配列が認められた場合、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたリポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降法にてプロモーター上のNF-κB結合配列が実際に機能しているか検討する。

② 辺縁帯Bリンパ球、B1リンパ球における古典的NF-κB経路標的遺伝子の機能解析

① で得られた古典的NF-κB経路の標的遺伝子のMZ B細胞およびB1細胞分化における機能を解析するために、個々の標的遺伝子を発現するレトロウイルスを作製し骨髄細胞に感染後移植を行う。6週後FACSにてMZ B細胞発生に与える影響を検討する。B1細胞発生における影響を見る場合には、骨髄細胞ではなく胎児肝造血幹細胞を用いる。古典的NF-κB経路の標的遺伝子によるMZ B細胞およびB1細胞への分化決定は、単独の遺伝子によるのではなく、複数の遺伝子が協調的に働いている可能性があることから、単独の遺伝子発現で影響が認められなかった場合には、複数の遺伝子の組み合わせによる実験も行う。

③ 古典的NF-κB経路標的遺伝子発現によるBAFF-R欠損マウスにおける辺縁系Bリンパ球発生の回復の検討

研究代表者はこれまでに、抗アポトーシス分子Bcl2の発現によってBAFF-R欠損マウスにおいてB2細胞の発生は回復できるがMZ B細胞の分化を回復できないこと、古典的NF-κB経路の活性化によってはB2細胞、MZ B細胞両方の発生を回復出来ることを報告している。つまり、MZ B細胞発生においてNF-κB経路は生存シグナルと分化シグナル両方を伝達していることを意味する。②の実験でMZ B細胞発生に影響を与えた古典的NF-κB経路標的遺伝子もしくは標的遺伝子の組み合わせがBAFF-R下流のMZ B細胞分化シグナルであるかどうかを、それら遺伝子をBAFF-R欠損マウス由来の細胞に発現させMZ B細胞の発生、生存を回復できるかどうか

かで調べる。MZ B細胞発生に影響を与えた遺伝子を発現するレトロウイルスをBAFF-R欠損マウス由来の骨髄細胞に感染させた後、放射線照射マウスに骨髄移植を行い、BAFF-R欠損細胞のMZ B細胞への分化を回復しているかどうかについてFACS及び免疫組織染色にて検討する。しかし野生型マウス由来の細胞を用いた場合と違い、BAFF-R欠損細胞を用いた場合には、分化決定に関わる遺伝子のみならずBリンパ球の生存に関わる遺伝子の発現が低下していることが考えられる。よって、生存シグナルをあらかじめ確保した状態を得るために、Bリンパ球特異的にBcl-2を発現するトランスジェニックマウス(Eμ-Bcl-2マウス)とBAFF-R欠損を交配したマウスより骨髄細胞を調製し同様の実験を行う。

2) Bリンパ球分化・発生における古典的NF-κB経路と非古典的NF-κB経路の相互関係の解析：古典的NF-κB経路および非古典的NF-κB経路共に成熟Bリンパ球の発生に必須であることは分かっているが、この二つの経路の関係に関しては不明な点が多い。そこで、それぞれの経路に特異的な標的遺伝子の同定を試み、それぞれ別の標的遺伝子の発現を誘導することでBリンパ球の発生をコントロールしているのか、それとも同じ遺伝子を標的とするが十分な発現を得るために両方の活性が必要なのかを明らかにする。さらに、一方の経路を欠失した状態で他方を活性化した場合どの程度、Bリンパ球の発生を回復できるのかについても検討する。また、研究代表者は非古典的NF-κB経路のコンポーネントp100とRelBの発現量がNEMO欠損Bリンパ球においてが低下し、IKK2ca TGマウスのBリンパ球では上昇していることを報告している。この事実は、古典的経路は非古典的経路を介してBリンパ球の発生を制御している可能性を示唆している。そこで、NEMO欠損Bリンパ球にp100とRelBを発現させることでNEMO欠損Bリンパ球の発生をどの程度回復するか観察することでこの可能性を検証する。

① 非古典的経路、古典的経路それぞれに特異的な標的遺伝子の検索

非古典的経路、古典的経路に共通または特異的な標的遺伝子を、非古典的経路の活性が高いNIKAT3陽性Bリンパ球、古典的経路の活性が高いIKK2ca陽性Bリンパ球そして野生型Bリンパ球よりRNAを調製しDNAアレイを用いて比較を行うことによって同定を試みる。より正確な実験を行うために、主に成熟B2細胞のみが存在するリンパ節より成熟Bリンパ球をセルソーターによって精製する。その細胞からRNAを回収しアレイを行う。アレイによって得られた陽性クローンに関しては、さら定量的RT-PCRおよびノーザンブロット法によってその発現の違いを確認する。

② 非古典的NF-κB経路活性化が古典的NF-κB経路欠損Bリンパ球発生、生存に与える影響の検討

ここではNEMO欠損Bリンパ球にNIKAT3を発現させることによって非古典的経路を活性化させた場合、NEMO欠損Bリンパ球(古典的経路を欠損)の発生、生存を回復することが出来るかどうか

か検討する。NEMO ノックアウトマウスは胎生致死であるから、ここでは NIKAT3 マウスを NEMO コンディショナルノックアウト (cKO)マウスと B リンパ球特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CD19cre マウスと交配したマウスにさらに交配を行うことで NEMO 欠損、NIKAT3 陽性の B リンパ球を得る。以下の実験において cKO を使用する場合はすべて CD19cre マウスと交配したものを意味する。B リンパ球の発生状態を FACS および免疫組織染色にて解析する。もし NEMO 欠損 B リンパ球の生存が回復した場合には、この回復が本当に非古典的経路によるものか、それぞれの NF- $\kappa$ B 経路の活性化状態を野生型および NEMO 欠損、NIKAT3 陽性の B リンパ球についてウエスタンブロット法にて検討する。コンディショナルノックアウトマウスを使用していることから、カウンターセレクトを受けずに本当に NEMO が完全に欠損した状態かどうかを、抗 NEMO 抗体を用いたウエスタンブロットによって確認する。

③古典的 NF- $\kappa$ B 経路活性化が非古典的 NF- $\kappa$ B 経路欠損 B リンパ球発生、生存に与える影響の検討

ここでは②のケースとは逆の状態、つまり非古典的経路の活性を欠く IKK1 欠損 B リンパ球に IKK2ca を発現させることによって古典的経路を活性化させた場合、IKK1 欠損 B リンパ球の発生、生存を回復することが出来るかどうか検討する。IKK1 ノックアウトマウスは生後すぐに死亡することから、ここでは IKK2ca マウスを IKK1 cKO マウスに交配を行うことで IKK1 欠損、IKK2ca 陽性の B リンパ球を得る。②と同じ方法にて B リンパ球の発生について解析をする。

④古典的 NF- $\kappa$ B 経路が非古典的 NF- $\kappa$ B 経路を介して B リンパ球の発生の制御している可能性に関する検討

研究代表者は非古典的 NF- $\kappa$ B 経路の構成分子 p100 と RelB の発現量が古典的 NF- $\kappa$ B 経路の活性を欠く NEMO 欠損 B リンパ球において低下し、古典的 NF- $\kappa$ B 経路活性の高い IKK2ca TG マウスの B リンパ球では上昇していることを報告している。古典的経路は非古典的経路の活性を調節することで B リンパ球の発生を制御している可能性を示唆する。よって、ここでは NEMO 欠損 B リンパ球に p100 と RelB を発現させることでどの程度 NEMO 欠損 B リンパ球の発生を回復させることが出来るか観察することでこの可能性を検証する。p100 および RelB を NEMO 欠損 B リンパ球に発現させるため IKK2ca および NIKAT3 マウスを作製したときと同様の方法を用いて p100 または RelB をコードする cDNA を二つの loxP 配列で挟んだ STOP カセットと共に ROSA26 領域にノックインしたトランスジェニックマウスを作製する。作製後

NEMO cKO マウスに交配を行うことで NEMO 欠損 B リンパ球に p100 および RelB を発現させる。②と同じ方法にて B リンパ球の発生について解析をする。

#### 4. 研究成果

B リンパ球発生における古典的 NF- $\kappa$ B 経路と非古典的 NF- $\kappa$ B 経路の関係について調べるために、まず初めに B リンパ球特異的に p52NF- $\kappa$ B2 を発現するトランスジェニックマウスの作製をおこなった。p52NF- $\kappa$ B2 をコードする cDNA を二つの loxP 配列で挟んだ STOP カセットと強力な転写活性を持つ CAG プロモーター共に DNMT1 領域にノックインすることで組織特異的な p52NF- $\kappa$ B2 トランスジェニックマウスを作製した。このマウスを B リンパ球に Cre リコンビナーゼを発現する CD19cre マウスと交配することで p52NF- $\kappa$ B2 を B リンパ球特異的に発現するマウスを得た。このマウスの特徴的な表現系として辺縁系 B リンパ球(MZ B 細胞)の割合の上昇を認めた。p52NF- $\kappa$ B2 の発現によって BAFF-R を欠損する成熟 B リンパ球の発生、生存が回復するかどうか検討するために BAFF-R 欠損マウスとの交配を行った。その結果、p52NF- $\kappa$ B2 の発現によって BAFF-R を欠損する B2 細胞および MZ B 細胞の発生生存の回復が認められた。次に、p52NF- $\kappa$ B2 の発現によって古典的 NF- $\kappa$ B 経路の機能がどの適度代替え可能か検討するために、B リンパ球特異的 p52NF- $\kappa$ B2 トランスジェニックマウスを古典的 NF- $\kappa$ B 経路の活性を欠く NEMO 欠損マウスと交配し解析を行った。その結果、p52NF- $\kappa$ B2 の発現によって NEMO を欠損する B2 細胞および MZ B 細胞の発生生存は回復が認められたが NEMO を欠損する B1 細胞の回復は認められなかった。この結果から、B2 細胞および MZ B 細胞においては古典的経路と非古典的経路は共通の標的遺伝子を制御することによってその分化や生存をコントロールしているが、B1 細胞の発生、生存においては古典的経路特有の標的分子が存在することが示唆された。そこで実際に、B1 細胞の発生には古典的 NF- $\kappa$ B 経路が重要であることを確かめるために、B リンパ球特異的に IKK2ca を発現するトランスジェニックマウスと NEMO を交配し解析を行ったところ、IKK2ca の発現によって NEMO を欠損した B1 細胞の発生生存が回復することが確認できた。この結果は、B1 細胞の発生生存には古典的 NF- $\kappa$ B 経路特異的な標的遺伝子の発現制御が重要であることを意味している。そこで、古典的 NF- $\kappa$ B 経路および非古典的 NF- $\kappa$ B 経路それぞれの標的遺伝子を同定する目的で以下のような実験を行った。古典的 NF- $\kappa$ B 経路が活性化されている B リンパ球特異的に IKK2ca を発現しているトランスジェニックマウス、非古典的 NF- $\kappa$ B 経路が活性化されている NIKAT3 トランスジェニックマウスそして野生型マウスより B リンパ球を精製し、そこから RNA を調整後、DNA アレイを用いて遺伝子発現の比較を行った。その結果それぞれのトランスジ

ェニックマウス由来の細胞に於いて発現の上昇している遺伝子を複数同定した。現在それら遺伝子の機能を解析中である。

#### 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 2 件)

1) Sasaki, Y., and Kurosaki, T. Movement of BCR in the plasma membrane for generating tonic signal. **Immunity** 32:143-144 (2010) (査読無)

2) 佐々木義輝 B 細胞抗原受容体 (BCR) からの成熟 B 細胞生存維持シグナル, 細胞工学 30, 60-65 (2011) (査読無)

[学会発表] (計 2 件)

1) 佐々木 義輝, Generation and analysis of B cell-specific p52NF- $\kappa$ B2 transgenic mice, 第 14 回 国際免疫学会, 2010 年 8 月 24 日, 兵庫県神戸市 神戸国際会議場

2) 佐々木 義輝, Molecular mechanism for maintenance of mature B cells mediated by BCR and NF- $\kappa$ B, 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009 年 12 月 4 日, 大阪府大阪市 大阪国際会議場 (グランキューブ大阪)

[その他]

ホームページ:

<http://www.cdb.riken.go.jp/scb/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐々木 義輝 (SASAKI YOSHITERU)

独立行政法人理化学研究所・幹細胞研究グループ・研究員

80323004