

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15272

研究課題名（和文）B細胞成熟に伴うリン脂質プロファイルの変容とその生理的意義の解明

研究課題名（英文）Pathophysiological importance of phospholipid alterations in B cell development

研究代表者

近江 純平（Omi, Jumpei）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特別研究員

研究者番号：60846666

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、リンパ腫を含むB細胞のバイオロジー（成熟・生存増殖・機能）におけるホスファチジルセリン（PS）の意義を明らかにすることを目的として解析を実施した。その結果、PS合成の不全によって、マウスB細胞の分化成熟に若干の異常が生じること、また顕著な表現型として、B細胞リンパ腫の生存増殖が損なわれることを明らかにした。詳細なメカニズム解析の結果、B細胞系列において特異的に機能するB細胞受容体（BCR）がB細胞の強いPS依存性を規定することを明らかにしており、PS合成不全時にはBCRシグナルが異常亢進することでB細胞リンパ腫の細胞死を誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、「生体を構成する細胞種には適切なリン脂質組成がある」との概念が提唱されている。本研究では、B細胞リンパ腫が強いPS依存性を示すことを現に明らかにするとともに、その阻害によってB細胞リンパ腫の生存増殖を制御できることを詳細なメカニズムと共に明らかにした。本成果によって、特定のリン脂質代謝系を標的とする新しいがん創薬コンセプトの創出へとつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We examined the pathophysiological role of phosphatidylserine (PS) in B cell biology including B cell malignancies and found that deficiency in PS synthesis caused slight developmental abnormalities in murine B cell. In particular, the survivability of B cell lymphoma cell lines was greatly dependent on PS synthesis. We identified B cell receptor (BCR) as a critical determinant for high PS-dependency in B cell lymphomas. Inhibition of PS synthesis causes hyper-activation of BCR-derived Ca²⁺ signaling, leading to massive cell death in B cell lymphoma.

研究分野：脂質生物学

キーワード：ホスファチジルセリン B細胞 B細胞リンパ腫 脂質輸送 オルガネラコンタクト

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、「細胞はその機能や特性に応じて独自のリン脂質組成を有する」との概念が提唱されていた。申請者はそれまでの研究過程において、マウス B 細胞が骨髄・脾臓内で分化成熟する各ステージにおいてホスファチジルセリン (PS) の脂肪酸分子種組成が変容すること、また、ヒト B 細胞リンパ腫由来培養細胞を用いた解析から PS 合成系が B 細胞受容体 (BCR) シグナルを負に制御することを予備的に見出していた。BCR はマウス B 細胞の各成熟ステージにおいて様々に活性を制御されることが知られていたため、「B 細胞分化成熟の各ステージにおける PS 合成系の活性変化を介した BCR シグナルの制御」を想定した。

2. 研究の目的

そこで、2 種の PS 合成酵素 (PTDSS1 ならびに PTDSS2) の欠損マウスをツールとして、表現型解析ならびにリポドミクス解析を実施することにより、B 細胞分化における PS 合成系の意義を明らかにすることを本研究課題の当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各細胞ステージにおけるリン脂質プロファイリング

マウスの骨髄、ならびに脾臓を細胞源としてセルソーターにより様々な分化段階にある B 細胞 (前駆体) を単離し、LC-MS/MS を用いて PS の脂肪酸分子種を測定した。また、ヒツジ赤血球を腹腔内投与することによって脾臓における免疫応答を誘導したマウスから活性化段階にある B 細胞サブセットについても単離し、脂質測定を実施した。

(2) B 細胞、ならびに B 細胞リンパ腫における PS 合成系の機能解析

マウス B 細胞、ならびにヒト B 細胞リンパ腫細胞株 (Ramos 細胞、SU-DHL-6 細胞) について PTDSS1 欠損時、あるいは PTDSS2 欠損時における表現型解析を実施した。マウス生体内における B 細胞、B 細胞前駆細胞のポピュレーションについてはフローサイトメトリーにより解析を行った。ヒト B 細胞リンパ腫細胞株の表現型解析では国内製薬企業 (第一三共株式会社) が創製した PTDSS1 阻害剤もまた PTDSS1 の機能解析ツールとして使用し、生存・増殖解析、ならびに BCR シグナルにフォーカスした解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 各細胞ステージにおけるリン脂質プロファイリング

B 細胞は血球系共通祖先細胞 (HSC/MPP) から PrePro-B 細胞、Pro-B 細胞、Pre-B 細胞を経て未成熟 B 細胞として脾臓へ移行し、その後 Transitional B 細胞 (T1/T2) を経て辺縁帯 B 細胞 (MZB) と濾胞 B 細胞 (FOB) へと成熟する。また、T 細胞依存性抗原に対する免疫応答時には、主としてナイーブな FOB 細胞 (IgD+) が活性化し、胚中心 B 細胞として胚中心内の暗領域 (DZ) と明領域 (LZ) における親和性成熟を経て形質細胞前駆細胞 (PB)、形質細胞 (PC)、ならびに一部は記憶 B 細胞 (MBC) へと分化する。図 1 は各 B 細胞サブセットの PS 脂肪酸分子種組成を示しており、B 細胞に固有の組成は B 細胞系列へと運命決定を終えた PrePro-B 細胞、ProB 細胞において順次形成されてゆくことを示している。また、胚中心 B 細胞 (DZ/LZ) 以降の活性化 B 細胞サブセットでは C32:0 や C34:1 をはじめとする短鎖かつ不飽和度の小さい PS 脂肪酸分子種が一過的に増加することを見出した。

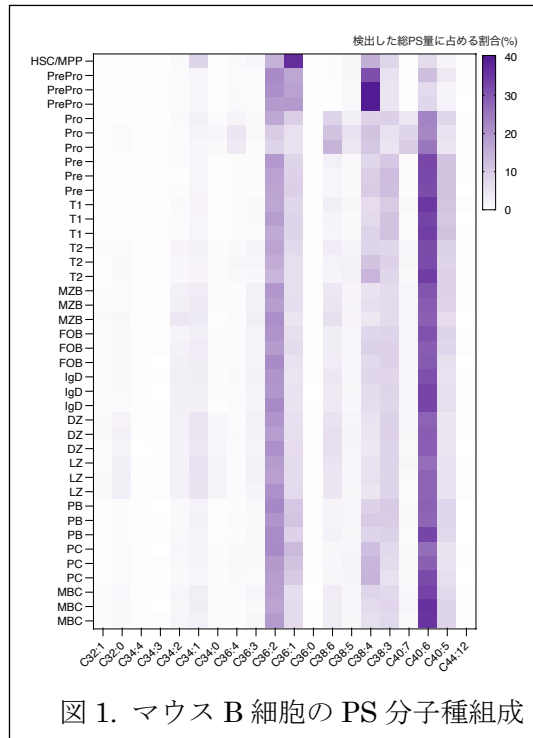


図 1. マウス B 細胞の PS 分子種組成

(2-1) マウス B 細胞における PS 合成系の機能解析

当初、各種 B 細胞サブセットにおける BCR シグナルの強度と PS 合成活性との間に関連を見出すことを計画していたが、マウス生体骨髄内より単離できる B 細胞前駆細胞数が Ca²⁺レベルをアウトプットとする BCR シグナル強度測定、ならびにセリン同位体標識 PS をアウトプットとする PS 合成活性測定を行う上で不十分であった。そこで、別角度より PS 合成系とマウス B 細胞の分化成熟の関連を見出すべく、PS 合成酵素の欠損マウスにおける各種 B 細胞サブセットのポピュレーション解析を実施した。その結果、PTDSS1 欠損マウスにおいて、骨髄内の Pro-B 細胞

割合の増加と Pre-B 細胞割合の減少、ならびに脾臓内の新生 B 細胞 (NFB) の増加と FOB 細胞の減少傾向を示すことを見出した (図 2)。したがって、マウス B 細胞の成熟分化過程における PS 合成系の重要性が現に示唆された。

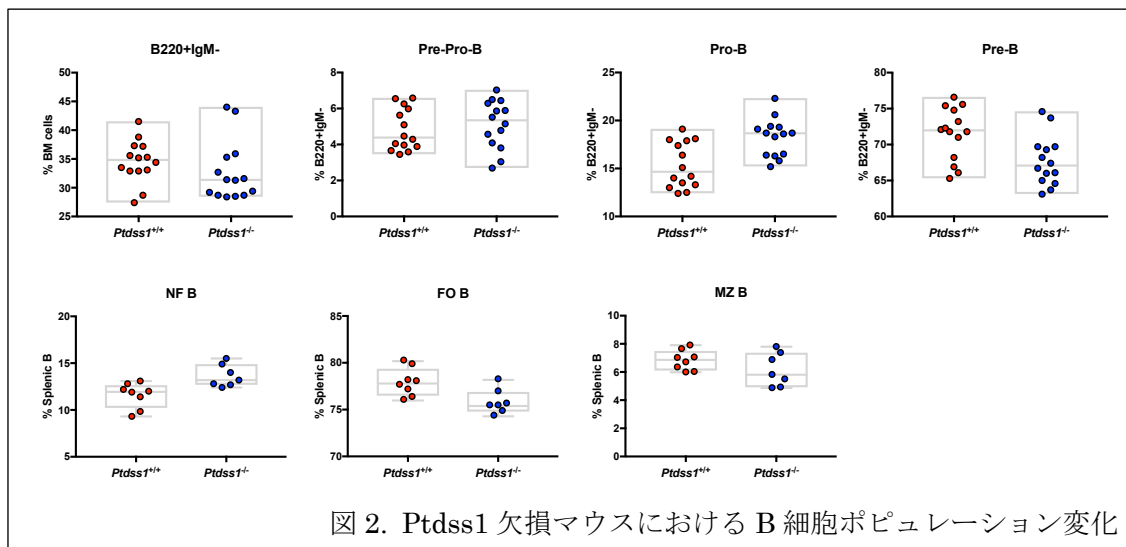


図 2. Ptdss1 欠損マウスにおける B 細胞ポピュレーション変化

他方、マウス生体由来 B 細胞では PTSS1 の欠損によって PS 脂肪酸分子種組成が変化するものの、PTSS2 が十分に補完的に機能することによって PS 量自体は大きく減少しないことを見出した。本研究課題でフォーカスした「B 細胞のバイオロジーにおける PS 合成活性 (量)」の意義へとアプローチすべく、以降の解析ではヒト B 細胞リンパ腫を対象として研究を遂行した。

(2-2) ヒト B 細胞リンパ腫における PS 合成系の機能解析

計画段階において、PTSS1 を阻害することで、ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 (Ramos 細胞) の生存増殖が著しく損なわれること、本作用は他の様々な固形がん細胞株では見られないことを明らかにしていた。また、このような B 細胞リンパ腫の高い依存性を規定する分子が BCR であることを明らかにしていた。そこで、どのように PS 合成系が BCR シグナルを制御しているのかを明らかにするためその詳細な分子メカニズム解析を実施した。PS 合成の抑制下では、BCR の構成因子の形質膜発現量等は変化しない一方で、活性化に伴って産生される細胞内セカンドメッセンジャーであるイノシトール 3 リン酸が著増することを見出した。そこで、その前駆体となるイノシトールリン脂質 PI(4,5)P₂、ならびにさらにその前駆体である PI4P および PI を測定したところ、PTSS1 抑制下ではこれらのホスホイノシタイド (PIPs) の増加していることを見出した。形質膜における PIPs 量の制御には各種 PI/PIPs キナーゼやホスファターゼが関与するほか、オルガネラコンタクトを介した脂質輸送も深く関与することが知られている。例えば、膜接触分子である ORP5/8 は PS との交換輸送によって PI4P を小胞体膜へと輸送して代謝分解を促す負の制御機構として機能する。そこで、ORP5/8 を二重欠損する Ramos 細胞を作成したところ、確かに PIPs 量の増加、ならびに BCR 依存的な Ca²⁺強度の増加が観察された。しかしながら、PTSS1 抑制時における表現型を完全には模倣できていない (程度が弱い) ことから、別の機構もまた PTSS1 抑制時における PIPs の増加に寄与すると考えた。そこで、別の膜接触分子であるまた Nir2/3 に着目した。Nir2/3 は形質膜の PIPs 代謝によって生じた PA を小胞体膜へと輸送するとともに、再合成された PI を形質膜へと輸送することで形質膜の PIPs プールを維持するための正の制御機構として機能するが、これまでに PS との機能連関は報告されていない。実際に Nir2/3 を二重欠損する Ramos 細胞を作成したところ、二重欠損細胞では PTSS1 抑制時における PIPs 量の増加、ならびに BCR 依存的な Ca²⁺上昇がキャンセルされることを見出した。したがって、PTSS1 の抑制時には「ORP5/8 輸送系が停止することによる形質膜 PIPs の蓄積」ならびに「Nir2/3 輸送系が亢進することによる形質膜 PIPs リサイクリングの増大」が同時に起こること、PIP_s 量の増加、ならびに BCR 依存的な Ca²⁺の増大が起こると結論し、本研究課題で見出した成果として学術誌へと報告した (J Cell Biol., 2024)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takagi Yugo, Nishikado Shun, Omi Jumpei, Aoki Junken	4. 巻 45
2. 論文標題 The Many Roles of Lysophospholipid Mediators and Japanese Contributions to This Field	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1008 ~ 1021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00304	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawanabe-Matsuda Hiroataka, Takeda Kazuyoshi, Nakamura Marie, Makino Seiya, Karasaki Takahiro, Kakimi Kazuhiro, Nishimukai Megumi, Ohno Tatsukuni, Omi Jumpei, Kano Kuniyuki, Uwamizu Akiharu, Yagita Hideo, Boneca Ivo Gomperts, Eberl Gerard, Aoki Junken, Smyth Mark J., Okumura Ko	4. 巻 12
2. 論文標題 Dietary<i>Lactobacillus</i>-Derived Exopolysaccharide Enhances Immune-Checkpoint Blockade Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 1336 ~ 1355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-21-0929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yaginuma Shun, Omi Jumpei, Uwamizu Akiharu, Aoki Junken	4. 巻 -
2. 論文標題 Emerging roles of lysophosphatidylserine as an immune modulator	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.13204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yaginuma Shun, Omi Jumpei, Kano Kuniyuki, Aoki Junken	4. 巻 246
2. 論文標題 Lysophospholipids and their producing enzymes: Their pathological roles and potential as pathological biomarkers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108415 ~ 108415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2023.108415	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omi Jumpei, Kato Taiga, Yoshihama Yohei, Sawada Koki, Kono Nozomu, Aoki Junken	4. 巻 223
2. 論文標題 Phosphatidylserine synthesis controls oncogenic B cell receptor signaling in B cell lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202212074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202212074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 近江 純平、青木 淳賢
2. 発表標題 ロバストなホスファチジルセリン合成はB細胞リンパ腫の生存シグナルを適切に制御する
3. 学会等名 第95回生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近江 純平、青木 淳賢
2. 発表標題 B細胞リンパ腫の生存能はホスファチジルセリンの合成に強く依存する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------