

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590575

研究課題名(和文) BCRとBAFF-RからのB細胞生存シグナルによる成熟B細胞分化決定機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of mature B cell differentiation controlled by survival signals from BCR and BAFF-R

研究代表者

佐々木 義輝 (SASAKI, YOSHITERU)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80323004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：BCRとBAFF-Rからのシグナルは成熟B細胞の生存だけでなく分化も制御している。BCRとBAFF-Rからのシグナルが成熟B細胞の分化における役割を解析し、BCRからの生存シグナルであるPI3キナーゼ下流の分子の1つAktがB1細胞の発生に重要である事、古典的NF- $\kappa$ B経路は非古典的経路の活性を調節することでB2、MZ B細胞の発生を制御していることを明らかにした。さらに、新規ユビキチンリガーゼLUBACがB1細胞の発生、抗体反応に必須の機能を持つ事、CD40やTACI刺激による古典的NF- $\kappa$ Bの活性化には必要であるが、BCR刺激による古典的NF- $\kappa$ Bの活性化には必要ない事も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Signals from BCR and BAFF-R control the differentiation of mature B cells as well as their survival. In this research I investigated the roles of signals from BCR and BAFF-R in the differentiation of mature B cells and found that Akt, one of the target molecule of PI3 kinase, which transmits the survival signal from BCR plays an important role in B1 cell development and that the main function of the canonical NF-kappaB pathway in the generation of mature B2 and MZ B cells is the control of the strength of BAFF-R mediated alternative NF-kappaB signaling. I also examined the function of a novel ubiquitin ligase complex, LUBAC in B cells and discovered that LUBAC plays important roles in the development of B1 cells and the antibody responses and is required for the activation of the canonical NF-kappaB pathway by CD40 and TACI but not by BCR.

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：B細胞 シグナル伝達 遺伝子改変マウス

### 1. 研究開始当初の背景

B細胞の発生過程において遺伝子再構成により B 細胞抗原受容体(BCR)が形成されるが、機能的な BCR を持つ細胞だけが成熟 B 細胞として選択される。成熟 B 細胞は、B2 細胞、辺縁帯 B 細胞(MZ B cell)そして B1 細胞に分けられる。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 細胞に分化するのかが決定されている (Casola et al. Nat Immunol 2004)。少なくとも B2 細胞と MZ B 細胞の生存には、2 種類の受容体 BCR と BAFF-R からのシグナルが必須である。B 細胞は抗原刺激後、胚中心を形成しそこで抗体遺伝子に 2 種類の遺伝子改編(クラススイッチと体細胞突然変異)が誘導される。体細胞突然変異によって抗体遺伝子にストップコドンが出現し、結果機能的な BCR を細胞表面に発現出来なくなる可能性がある。このような BCR を失った B 細胞はアポトーシスによって末梢組織から排除されること知られている (Lam et al. Cell 1997)。このように BCR からの生存シグナルによって B 細胞の生存がコントロールされていることは、非常に理にかなった制御機構と言える。BAFF-R からの生存シグナルについては、転写因子 NF- $\kappa$ B が重要な役割を担っていることが証明されていたが、BCR からは多種多様なシグナル経路が活性化されるので、この BCR からの生存シグナルの本体は長い間不明であったが、研究代表者を含むグループによって PI3 キナーゼ経路が生存シグナルの本体であることが発見された (Srinivasan et al. Cell 2009)。この発見により成熟 B 細胞の生存は BCR と BAFF-R という二つの異なった受容体より、PI3 キナーゼと NF- $\kappa$ B という二つの異なったシグナル経路を介してコントロールされていることが明らかとなった。しかしこれらの経路は成熟 B 細胞の生存を制御しているだけではなく、B2, B1, MZ B 細胞という 3 種類の成熟 B 細胞のどのタイプへ分化するか決定とその維持においても重要な役割を担っている。

### 2. 研究の目的

BCR と BAFF-R はそれぞれ PI3 キナーゼ経路と NF- $\kappa$ B 経路を介して成熟 B 細胞の生存を制御している。しかしこれらの経路は成熟 B 細胞の分化決定にも関与している事が示唆されている。そこで本研究課題には NF- $\kappa$ B 経路と PI3 キナーゼ経路の成熟 B 細胞の分化決定とその維持における役割を解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) BCR下流におけるPI3キナーゼ経路がB細胞分化決定における役割の解析

PI3 キナーゼは BCR からの生存シグナルを担っている。PI3 キナーゼの下流においては PH ドメインなどの PIP3 結合領域を持つ様々な分子が活性化される。研究代表者は成熟 B 細胞の維持においては、PI3 キナーゼの下流の分子の一つセリンスレオニンキナー

ゼ Akt によって制御される FOXO ファミリーの転写因子を抑制することが重要であることを発表した。しかし、PI3 キナーゼの活性化によっては BCR 陰性の B2 細胞、MZ B 細胞両方ともに生存がレスキューされるが、FOXO1 を欠損した場合には B2 細胞のみの回復が認められる。このことは MZ B 細胞の維持には FOXO 以外の経路も関与していることを意味する。そこで、PI3 キナーゼ下流に於いて活性化される分子の活性化型変異体を誘導的に発現可能なトランスジェニックマウスを作製し、FOXO1 の欠損と組み合わせることで、MZ B 細胞を回復可能な分子を同定する。BCR 生存シグナルの発見に用いた実験系では、抗体重鎖遺伝子を抗 NP 抗体である B1-8 抗体由来のものに固定している。B1-8 ノックインマウスにおいては B1 細胞を欠損しているために、B1 細胞に於ける生存シグナルの解析は出来ない。しかし PI3 キナーゼ分子や CD19 や BCAP 等 PI3 キナーゼの活性化に関わる分子のノックアウトマウスは B1 細胞を欠損することから、PI3 キナーゼが B1 細胞の維持においても重要な役割を持つことが示唆されている。そこで B1 細胞においても B2, MZ B 細胞と同様の機構が存在することを示すために、B1-8 flox マウスの代わりに BCR の情報伝達分子である Ig $\alpha$  鎖を誘導的に欠失可能な Ig $\alpha$  flox マウスを用いて実験を行う。PI3 キナーゼ経路の活性化によって B1 細胞の生存が維持できた場合には、MZ B 細胞の時と同じように PI3 キナーゼ経路下流の分子で B1 細胞の維持に必要な経路を同定する。逆に、B2 細胞、MZ B 細胞とは異なり PI3 キナーゼ経路の活性化のみでは B1 細胞の生存が回復出来ない場合には、NF- $\kappa$ B 等の他の BCR 下流の経路の活性化と組み合わせることで回復が可能かどうか検討することで B1 細胞の維持に必要な BCR からの生存シグナルを解明する。

#### 2) 辺縁系B細胞、B1細胞の分化をコントロールするNF- $\kappa$ B経路の標的遺伝子の同定とその機能解析

BAFF-R は B2 細胞と MZ B 細胞の発生、維持に必須の受容体であり、その下流においては主に非古典的 NF- $\kappa$ B 経路を活性化する。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 の標的分子の存在が必要である。しかし、その分子本体については分かっていない。また古典的 NF- $\kappa$ B 経路を欠損させた場合には、すべての成熟 B 細胞の発生が障害を受ける。これまでに研究代表者は B リンパ球特異的 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いだしている。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。そこで、B細胞特異的に p52/NF- $\kappa$ B2 もしくは活性化型 RelA を発現するトランスジェニックマウスを作製し、これらのマウスを用いて MZ B細胞および B1細胞における NF- $\kappa$ B 経路の標的遺伝子の同定を行う。標的遺伝子群の MZ B細胞および B1細胞の発生における役割を解析することで、これら成熟 B細胞の分化決定に重要な働きをしている分子の同定を行う。

#### 4. 研究成果

成熟B細胞の生存はBAFF-RとBCRという2種類の受容体からNF- $\kappa$ B経路とPI3キナーゼ経路という異なった2種類の経路によって制御されている。しかしこれらの経路は、B2、B1、MZ B細胞という3種類存在する成熟B細胞への分化の方向決定にも重要な役割を担っている。そこで本研究課題ではBCRとBAFF-Rからの生存シグナルの成熟B細胞の分化決定における役割を解析した。PI3キナーゼ下流のどの分子がB細胞の分化決定に重要な役割を担っているか明らかにするために、活性化型PI3キナーゼ及びPI3キナーゼの下流において活性化される分子Akt、MEK1の活性化型変異体を誘導的に発現可能なトランスジェニックマウスの作製を行った。CD19はBCR刺激によるPI3キナーゼの活性化に関与するBCRの共受容体であり、そのノックアウトマウスにおいてはMZ B細胞、B1細胞共に欠損している。そこでこれらのトランスジェニックマウスをCD19ノックアウトマウスと交配し、どのPI3キナーゼ下流分子の活性化がCD19欠損マウスにおいてMZ B細胞やB1細胞発生を回復できるか検討を行った。予想通り、CD19欠損B細胞においてPI3キナーゼそのものを活性化させた場合にはMZ B細胞、B1細胞両方ともその発生の回復が認められた。一方PI3キナーゼ下流分子については、MEK1の活性化ではCD19を欠損するMZ B細胞、B1細胞共に回復が認められなかったが、Akt1の活性化ではCD19を欠損するB1細胞のみ回復が認められた。これらの結果はPI3キナーゼの下流においてB1細胞の発生にはAkt1の活性化が重要であり、MZ B細胞の発生にはAkt1では無い他の経路が重要であるかもしくはAkt1に加えて別の分子の活性化も必要である可能性を意味している。

NF- $\kappa$ B経路は古典的もしくは非古典的経路によって活性化される。BAFF-Rの下流においては非古典的経路が重要な機能を持っている。古典的NF- $\kappa$ B経路も成熟B細胞の発生・生存に重要な役割を担っていることが報告されているが、この2つの経路の関係については不明な点が多い。そこで、この2つのNF- $\kappa$ B活性化経路の成熟B細胞の発生・生存における関係について解析をした。非古典的経路では、主にp52/RelBからなるヘテロダイマーが活性化される。p52はその前駆体p100のプロセシングによって生成される。p100が古典的NF- $\kappa$ B経路の標的遺伝子であることが報告さ

れていたことから、B細胞特異的にp100を発現するトランスジェニックマウスを作製し、B細胞特異的にNEMOを欠損させることでB細胞特異的に古典的NF- $\kappa$ B経路を欠失させたマウスと交配を行いB細胞の発生・生存に与える影響について検討した。B細胞特異的にNEMOを欠損させたマウスではすべての成熟B細胞の数が減少しているが、p100を発現させることによってB2、MZ B細胞の数が野生型マウスとほぼ同程度まで回復されるがB1細胞数は回復しないことが明らかとなった。同様の結果はp52の発現によっても得られたことから、古典的経路は非古典的経路の活性化量を調節することでB2、MZ B細胞の発生・生存を制御していることが明らかとなった。

さらに、最近古典的NF- $\kappa$ B経路の活性化に関与する事が報告された新規ユビキチンリガーゼLUBACのB細胞における役割について解析を行った。その結果、LUBACがB1細胞の発生、TD、TI-II抗原両方に対する抗体反応に必須の機能を持つ事、CD40やTACI等のTNFRスーパーファミリーに属する分子の下流における古典的NF- $\kappa$ B経路の活性化には必要であるが、BCRの下流における古典的NF- $\kappa$ B経路の活性化には必要ない事を明らかにした。

#### 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 1 件)

- 1) Sasaki, Y., Sano, S., Nakahara, M., Murata, S., Kometani, K., Aiba, Y., Sakamoto, S., Watanabe, Y., Tanaka, K., Kurosaki, T. and Iwai, K. Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells. **EMBO J.** 32, 2463-2476 (2013) (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 佐々木義輝, Canonical NF- $\kappa$ B pathway controls the strength of BAFF-R signaling through the induction of p100NF- $\kappa$ B2, 第40回日本免疫学会総会・学術集会, 2011年11月28日, 千葉県千葉市 (幕張メッセ)
- 2) 佐々木義輝, 岩井一宏, LUBAC controls B lymphocyte development and function, IEIIS2012, 2012年10月25日, 東京都 (学術総合センター)
- 3) 佐々木義輝, Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells, 第42回日本免疫学会総会・学術集会, 2013年12月12日, 千葉県千葉市 (幕張メッセ)
- 4) 佐々木義輝, B細胞の発生・機能における直鎖状ポリユビキチン鎖の機能解析, 第86回日本生化学会大会, 2013年9月12日, 神奈川県横浜市 (パシフィコ横浜)
- 5) 佐々木義輝, Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear

ubiquitination in B cells, Keystone  
Symposia, The NF- $\kappa$ B System in Health  
and Disease, 2014年2月26日, Keystone  
Colorado USA (Keystone Resort)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mcp.med.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木義輝 (SASAKI YOSHITERU)

京都大学大学院・医学研究科・細胞機能制

御学・准教授

研究者番号：80323004

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し