

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591645

研究課題名(和文)皮膚免疫疾患におけるB細胞抑制性受容体CD22/CD72の制御機構

研究課題名(英文)A role of CD22 and CD72 in the immune responses

研究代表者

濱口 儒人(Hamaguchi, Yasuhito)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：60420329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CD22とCD72を同時に欠損させたマウス(CD22^{-/-}/CD72^{-/-}マウス)を作成し、CD22とCD72の役割について検討した。CD22^{-/-}/CD72^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べ末梢血液中における成熟B細胞の数が有意に減少していた。B細胞のturnover、血清免疫グロブリン濃度、T細胞依存あるいは非依存抗原に対する免疫応答は、それぞれの単独欠損マウスでみられる異常を越えるものではなかった。また、CD22^{-/-}/CD72^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べ自己免疫疾患を発症しやすいことはなかった。以上より、CD22とCD72は独立してB細胞を制御していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we addressed whether CD22 and CD72 have redundant functions using CD22 and CD72 double-deficient (CD22^{-/-}/CD72^{-/-}) mice. CD22^{-/-}/CD72^{-/-} mice showed significantly decreased number of peripheral B cells compared to wild type mice. Turnover of B cells in CD22^{-/-}/CD72^{-/-} mice was significantly augmented than in wild type mice, but significantly reduced compared to CD22^{-/-} mice. CD22^{-/-} mice showed significantly increased serum IgM levels compared to wild type mice, but CD22^{-/-}/CD72^{-/-} mice did not. IgM responses against DNP-Ficoll were significantly decreased in CD22^{-/-}/CD72^{-/-} mice compared to wild type mice. In pristane-induced murine lupus model, both the incidence of ANAs and urine protein levels were similar between wild type and CD22^{-/-}/CD72^{-/-} mice. These results showed that abnormalities observed in CD22^{-/-}/CD72^{-/-} mice did not exceed the degree of those seen in each-deficient mice. Therefore, we concluded that CD22 and CD72 independently regulated B cell function.

研究分野：皮膚科学

キーワード：B細胞 CD22 CD72

1. 研究開始当初の背景

B 細胞は抗体産生以外にもサイトカイン産生や T 細胞-B 細胞相互作用など、多彩な機能を有している。B 細胞は活性化型受容体と抑制性受容体を有しており、免疫反応を促進する作用と制御する作用の相反する機能を有する。近年、B 細胞の炎症制御における役割に注目が集まっており、ブレーキ役となる抑制性受容体に注目が集まっている。

CD22 は B 細胞に特異的に発現する 140kDa の I 型膜貫通型タンパクで、Siglec family に属する分子である。CD22 の細胞内ドメインには抑制性チロシンモチーフ (ITIM) が存在する。CD22 欠損マウス (CD22^{-/-}マウス) を用いた検討では、CD22 欠損 B 細胞は抗原刺激後の Ca²⁺ 応答が亢進しており、B cell receptor (BCR) シグナルを抑制し B 細胞の活性化を抑制する。

CD72 も CD22 と同様、B 細胞に特異的に発現する表面分子であり、45kDa の II 型膜貫通型タンパクで、細胞外に C 型レクチンドメインを有する。CD72 欠損 B 細胞でも Ca²⁺ 応答の上昇がみられ、CD72 の下流に位置する Erk や p38 のリン酸が亢進している。したがって、CD72 も CD22 と同様、BCR 刺激により ITIM がリン酸化されて B 細胞の活性化を抑制している。

このように、CD22、CD72 は B 細胞を抑制する機能を有しているが、両者を同時に欠損させた場合の B 細胞機能に及ぼす影響については明らかではない。

2. 研究の目的

B 細胞の活性化を抑制する B 細胞表面分子である CD22 と CD72 の両者の欠損が B 細胞機能におよぼす影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CD22/72^{-/-}マウスの表現型の検討

CD22^{-/-}マウスと CD72^{-/-}マウス (いずれも C57BL/6) を交配させ、CD22^{-/-}/CD72^{-/-}マウスを作成した。CD22 と CD72 の両者を欠損することによる B 細胞分画 (末梢血、骨髄、脾臓、末梢 (腋窩、鼠径) リンパ節、腹腔内) への影響をフローサイトメトリーにより解析した。これらの B 細胞分画について、頻度、細胞数を野生型マウス、CD22^{-/-}マウス、CD72^{-/-}マウスと比較した。また、B 細胞に発現している B 細胞シグナル修飾分子 (CD19、CD20、CD21、CD40、PIR-B 等) の発現も検討した。

(2) CD22/72^{-/-}マウス B 細胞の機能解析

B 細胞の機能解析について、Turnover について検討した。野生型マウス、CD22^{-/-}マウス、CD72^{-/-}マウス、CD22^{-/-}/CD72^{-/-}マウスに BrdU を経口投与し、脾臓 B 細胞における turnover について検討した。

(3) 免疫応答についての検討

血中抗体価測定

野生型マウス、CD22^{-/-}マウス、CD72^{-/-}マウス、CD22^{-/-}/CD72^{-/-}マウスの血清中の IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA 抗体価について ELISA 法を用いて検討した。また、加齢により抗体価への影響を検討するため、血清の採取は生後 6M、12M、18M の時点でを行い、抗体価の推移を経時的に検討した。

各種の抗原刺激に対する免疫応答

野生型マウス、CD22^{-/-}マウス、CD72^{-/-}マウス、CD22^{-/-}/CD72^{-/-}マウスを T 細胞依存性抗原 (DNP-KLH)、T 細胞非依存性抗原-1 (TNP-LPS)、T 細胞非依存性抗原-2 (TNP-Ficoll) で免疫し、それぞれの抗原刺激に対する免疫応答を検討した。

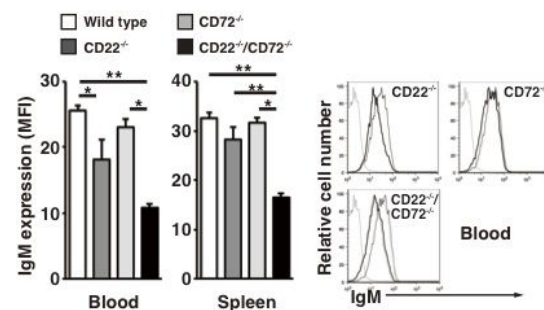
(4) 自己免疫疾患発症の検討

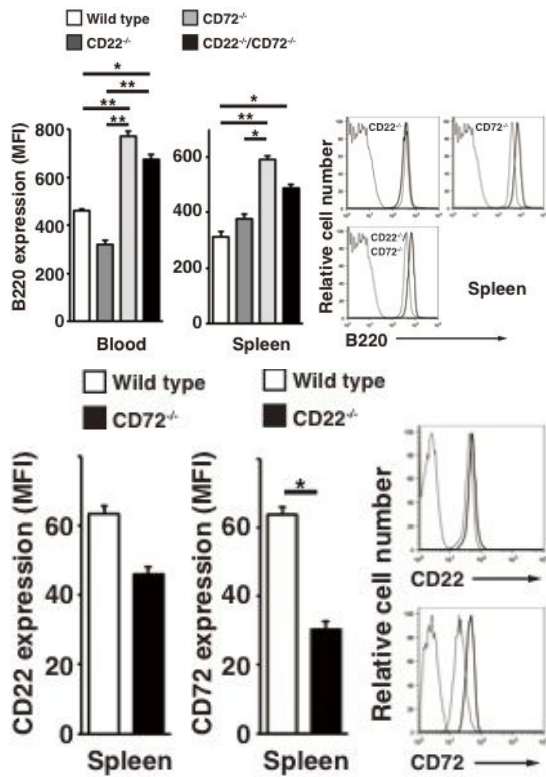
野生型マウス、CD22^{-/-}マウス、CD72^{-/-}マウス、CD22^{-/-}/CD72^{-/-}マウスにおける抗核抗体の出現率を検討した。また、マウスに Pristane を腹腔内投与してループスに類似した病態を誘導するマウスモデルを作成し、抗核抗体と血清中の抗ヒストン抗体、抗 ssDNA 抗体、抗 dsDNA 抗体を ELSIA 法等により経時的に測定した。また、腎炎の評価は尿中のアルブミン量を経時的に定性・定量的に検討した。

4. 研究成果

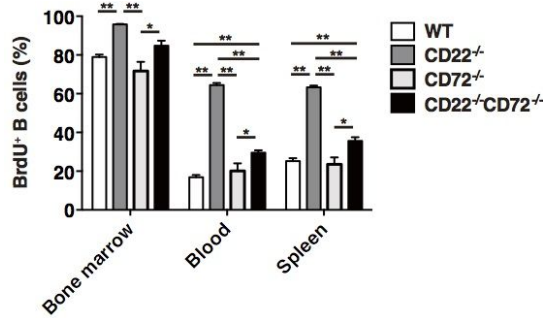
(1) CD22/72^{-/-}マウスの表現型の検討

CD22/72^{-/-}マウスでは骨髄、末梢血液中における成熟 B 細胞 (B220⁺IgM⁺) の数が有意に減少していたが、それぞれの単独欠損マウスで見られる異常を越えるものではなかった。脾臓、末梢リンパ節、末梢リンパ節、腹腔内における B 細胞数は野生型マウスと変わらなかった。末梢血と脾臓 B 細胞における IgM 発現は、CD22/72^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べ有意に低下していた。一方、B220 の発現は野生型マウスに比べ CD22/72^{-/-}マウスでは有意に上昇していた。脾臓 B 細胞における CD22 と CD72 の発現を検討したところ、CD72^{-/-}マウスでの CD22 発現は野生型マウスと差はなかったが、CD22^{-/-}マウスでの CD72 発現は野生型マウスに比べ有意に低下していた。



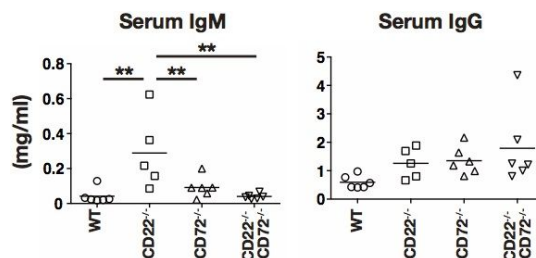


(2) CD22/72^{-/-}マウス B 細胞の機能解析
BrdU 取り込み実験による B 細胞の turnover について検討した。CD22/72^{-/-}マウスでは、CD72^{-/-}マウスと比較し骨髄、末梢血、脾臓における B 細胞の turnover は有意に亢進していたが、CD22^{-/-}マウスと比べると有意に低下していた。

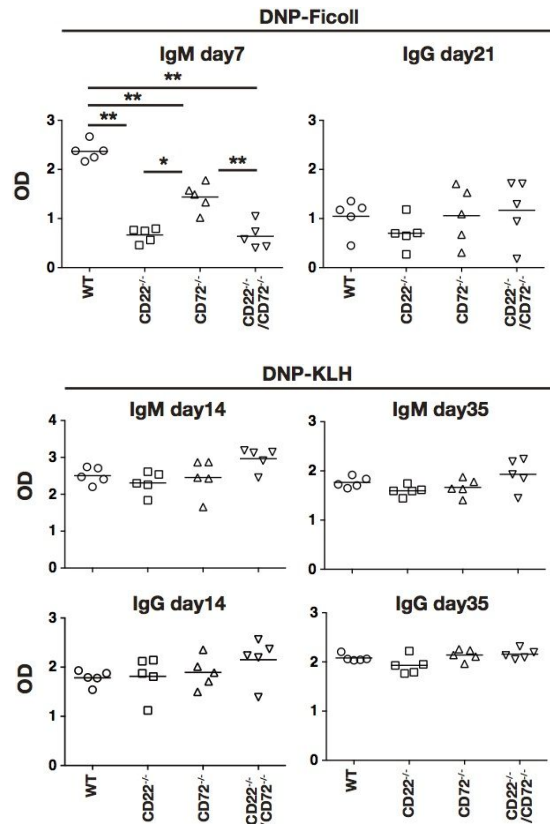


(3) 免疫応答についての検討
血中抗体価測定

血清 IgM 値は、CD22^{-/-}マウスでは野生型マウス、CD72^{-/-}マウスに比べ有意に上昇していたが、CD22^{-/-}/72^{-/-}マウスでは野生型マウスと同程度だった。一方、血清 IgG 値は野生型マウス、CD22^{-/-}マウス、CD72^{-/-}マウス、CD22^{-/-}/72^{-/-}マウスで有意差はなかった。



各種の抗原刺激に対する免疫応答
DNP-Ficoll に対する IgM の免疫応答は、野生型マウスに比べ CD22^{-/-}マウス、CD72^{-/-}マウス、CD72^{-/-}/CD22^{-/-}マウスでは有意に減弱していた。さらに、CD22^{-/-}マウス、CD72^{-/-}/CD22^{-/-}マウスでは CD72^{-/-}マウスより有意に減弱していた。IgG の免疫応答に有意差はなかった。一方、DNP-KLH に対する免疫応答は、IgM、IgG と各マウス間で有意差はなかった。



(4) 自己免疫疾患発症の検討

3~4 ヶ月週齢のマウスでは抗核抗体の出現率はいずれのマウス群間でも差は認めなかったが、1年~1年半週齢の高齢マウスでは、野生型マウスに比べ CD22^{-/-}マウスでは抗核抗体の出現率は有意に低下していた。一方、CD72^{-/-}マウスでは野生型マウスと同程度であり、CD72^{-/-}/CD22^{-/-}マウスでは CD22^{-/-}マウスと同様、抗核抗体の出現率は野生型マウスに比べ有意に低下していた。

次にマウスにプリステンを腹腔内投与してループス類似病態を誘導する実験的マウスループスモデルを作成し、抗核抗体の出現率と腎炎の重症度について検討した。CD22^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて抗核抗体の出現率は有意に低下していたが、CD72^{-/-}マウスでは CD22^{-/-}マウスに比べ抗核抗体の出現率は上昇していた。しかし、CD72^{-/-}/CD22^{-/-}マウスでは抗核抗体の出現率は野生型マウスと同程度だった。これは高齢マウスで見られた現象と類似していた。腎炎の評価のため尿タンパクを測定したところ、いずれのマウス群間でも差を認めなかった。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF, Fujimoto M: CD22 expression is required for development of pristane-induced lupus model in mice. International Investigative Dermatology 2013, Edinburgh (イギリス), 2013.5.9

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱口 儒人 (HAMAGUCHI YASUHIITO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 60420329

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし