

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790481

研究課題名(和文)ホメオドメイン転写因子 pKnox1 による B 細胞活性化制御機構の解明

研究課題名(英文)The control mechanism of B cells activation due to pKnox1 homeodomain transcription factor

研究代表者

西村 深雪 (Nishimura, Miyuki)

札幌医科大学・分子標的探索講座・助教

研究者番号：50609401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 円

研究成果の概要(和文)：Hox共役転写因子であるpKnox1のB細胞特異的欠損マウスは、加齢に伴う自己免疫症状を呈する。このマウスのB細胞分化や免疫応答性を詳細に解析し、自己免疫病モデルの分子基盤解明を目指した。その結果、辺縁帯B細胞の分化異常、IgG産生の減少、体細胞超突然変異の減少による親和性成熟の遅延、胚中心形成の遅延が認められた。それらに共通する分子であるAID遺伝子およびその発現制御因子であるHoxC4の発現量も低下していた。HoxC4プロモータ領域にはpKnox1-Pbx複合体結合配列に類似した配列が存在することからも、pKnox1欠損によるAID発現制御機構の異常が自己免疫症状に起因すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Conditional B cell-specific knockout of pKnox1, a homeodomain transcription factor, in mice leads to age-associated development of autoimmune phenotypes. In order to understand the molecular basis, we analyzed B cell development and immune responses. The mice showed abnormal marginal zone B cell development, decreased IgG level, delayed affinity maturation caused by decreased frequency of somatic hypermutation and delayed germinal center formation. The expression level of AID (Activation-induced cytidine deaminase) was decreased in the mice compared with control mice. The expression level of HoxC4 that directly regulates AID expression also decreased. We found the sequence that is similar to pKnox1-Pbx1 complex binding domain in HoxC4 promoter, too. These findings indicate that the autoimmune phenotypes in B cell-specific knockout of pKnox1 mice might be related to the failure of AID expression regulatory mechanisms.

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：免疫寛容 自己免疫 抗体

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

末梢リンパ組織におけるB細胞のホメオスタシスは、B細胞抗原受容体(BCR)やToll-like受容体などの様々な細胞表面受容体を介したシグナルによって制御されていることが明らかにされてきており、これらのシグナルの異常がB細胞の選択や寛容の破綻を引き起こし、その結果として、自己抗体の産生、免疫複合体の形成、それによる腎炎などの組織障害を伴った自己免疫病が発症する。現在までに、80を超える異なった自己免疫疾患が報告されており、その多くで自己抗体の産生が認められている。通常の抗体は外来抗原に対するT細胞依存的な免疫反応を経て、つまり、胚中心での体細胞突然変異(Somatic hypermutation: SHM)、親和性成熟、クラススイッチ(Class switch recombination: CSR)の結果として、B細胞から最終分化した長期生存(Long-lived)プラズマ細胞によって産生されるが、自己抗体もそれと類似した過程を経て産生される可能性が示唆されている。すなわち、自己免疫疾患に関係するほとんどの自己抗体は高親和性のIgGであり、体細胞突然変異を有しており、これらの特徴は、自己抗体が胚中心(Germinal center: GC)での親和性成熟を経て分化した長期生存プラズマ細胞から産生されているものであることを示唆している。

我々が注目した pKnox1 は TALE (three amino acid loop extension) ファミリー (Meis, Pbx, pKnox) に属するホメオドメインを有する転写因子であり、Pbx とヘテロダイマーを形成することで、発生において体節や体軸形成に重要な役割を果たすホメオボックス遺伝子スーパーファミリーの Hox 転写因子群と三量体 (Meis/pKnox-Pbx-Hox) を形成することにより、Hox の DNA 結合特異性や転写活性化を制御する共役因子として機能することが明らかになっている。pKnox1 欠損マウスは胎齢 8.5 日で胎生致死となるために (Fernandez L.C, Jenkins N, Copeland NG and Blasi F, in preparation)、造血系や免疫系における pKnox1 の機能については解析が行われていないが、転写制御領域へのレトロウイルス配列の挿入による pKnox1-hypomorphic マウス (野生型の 3-10% の pKnox1 を発現している) を用いて機能解析が進められてきており、胎仔肝 (胎齢 14.5 日) における造血幹細胞や B 前駆細胞数の減少が報告されている (Di Rosa et al., 2007)、成体の免疫系における機能については明らかになっていない。

2. 研究の目的

B細胞の活性化ならびに抗体産生細胞であるプラズマ細胞への最終分化は様々な転写因子により厳密に制御されており、その破綻は自己反応性B細胞の出現を伴う自己免疫病

や免疫不全の発症につながる。pKnox1 は TALE ファミリーホメオドメイン転写因子であり、B細胞特異的 pKnox1 欠損マウス (pKnox1-BKO マウス) においては IgG の沈着に伴う糸球体腎炎、血中での抗核抗体の出現ならびに脾臓における自発的胚中心形成などの自己免疫病が認められることから、本転写因子はB細胞活性化の抑制に関与していると考えられる。本申請研究では、pKnox1-BKO マウスに認められる自己免疫反応を、自己抗体のレパートアならびに胚中心反応・プラズマ細胞分化に関与する転写因子カスケードとの関連などについて解析し、pKnox1 によるB細胞活性化抑制機構を明らかにすることで、自己免疫病モデルとしての分子基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) pKnox1 欠損による B 細胞の分化異常
B細胞系列特異的に pKnox1 を欠損させることによる脾臓におけるB細胞分化への影響を調べるために、2ヶ月齢の pKnox1-BKO マウスおよびコントロールマウスの脾臓B細胞をフローサイトメトリーにより解析した。

(2) B細胞系列特異的 pKnox1 欠損マウスにおける免疫応答

B細胞の主要な役割である抗体産生について解析するため、pKnox1-BKO マウスの血中に存在する免疫グロブリン濃度をアイソタイプごとに定量的 ELISA により測定した。また、このマウスの免疫応答への影響を調べるため、T細胞依存性抗原である NP-CGG を免疫することにより、抗原特異的抗体の産生量をアイソタイプごとに定量した。

(3) B細胞系列特異的 pKnox1 欠損マウスの BCR シグナル伝達系に関与する分子の発現解析

自己抗体の産生は、自己抗原と反応する B cell receptor(BCR)を発現する B細胞の除去が阻害されている可能性が考えられる。また、Marginal Zone B細胞(以下、MZ-B細胞)の分化には、自己成分とわずかながらに反応する BCR シグナルの強度が重要であることが示されている (Pillai et al., 2005)。さらに抗体のクラススイッチや免疫後の体細胞超突然変異の低下においても、pKnox1-BKO マウスにおける BCR シグナルの異常が考えられた。そこで、BCR シグナル伝達系で働く分子である、BTK、Bcl-2、Bcl-XL、Aiolos に注目した。転写因子である pKnox1 を欠損することにより、これらの分子の発現に異常をきたしている可能性を調べるために、Semi-quantitative RT-PCR を行った。

(4) B細胞系列特異的 pKnox1 欠損マウスの

AID 遺伝子発現解析

Activation-induced cytidine deaminase(AID)は抗体のクラススイッチや体細胞突然変異の導入に必須の酵素である。さらに、AIDがB細胞の分化に関与していることが報告され(Giltiay et al., 2012)、AID欠損マウスにおいて自己抗体が増加することも報告されている(Kuraoka et al., 2011)。そこで、pKnox1-BKOマウスの全脾臓細胞、脾臓B細胞、脾臓由来胚中心(Germinal center : GC)B細胞、骨髄細胞を単離し、RT-PCRによってAID遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

(1) pKnox1欠損によるB細胞の分化異常

pKnox1-BKOマウスにおいて、脾臓B細胞(B220⁺)、T1およびT2B細胞、Follicular B細胞、プラズマ前駆細胞の割合はコントロールと比較して変化は認められなかったが、MZ-B細胞(IgM^{high}, IgD^{low}, CD21^{high}, CD23^{low}, CD1d^{high})の割合が約半分に減少していた。2ヶ月齢のpKnox1-BKOマウスおよびコントロールマウスの脾臓を免疫組織化学的に解析したところ、脾臓の大きさに変化は認められなかったが、コントロールマウスと比較してpKnox1-BKOマウス脾臓におけるMZ-B細胞(IgM⁺ IgD⁻)領域の厚みが顕著に減少していた。これらの結果から、pKnox1は適切なMZ-B細胞の分布や維持に関与していることが示唆された。

(2) B細胞系列特異的pKnox1欠損マウスにおける免疫応答

Specific pathogen free環境下で飼育しているpKnox1-BKOマウスの血中抗体量を測定したところ、IgM量はコントロールマウスと同等であったが、IgG1、IgG2c、IgA量はpKnox1-BKOマウスで有意に減少しており、特にIgG1量は顕著に減少していた(図1)。

減少していたものはいずれもクラススイッチ後のアイソタイプであったことから、pKnox1-BKOマウスのB細胞におけるクラススイッチの低下が示唆された。

より詳細に免疫応答を解析するために、T-dependentな抗原であるNP-CGGを免疫して調べた。8週齢のpKnox1-BKOマウスおよびコントロールマウスに、一次免疫として100μgのNP40-CGGを100μlのAIK(SO4)2に吸着させることでAlum化し、腹腔内注射により投与した。一次免疫2週間後および4週間後の血清を採取した。さらに、7週間後にNP40-CGG/PBSで二次免疫し、9週間後にNP40-CGG/PBSで三次免疫した。採取した血清中の抗NP抗体価(抗NP-IgG1、抗NP-IgM)をELISAにより測定した。この際、高価数抗原(NP17-BSA)と低価数抗原(NP1.5-BSA)を固

層に用いることで、血中の全抗NP抗体価と高親和性抗NP抗体価を測定した(図2)。

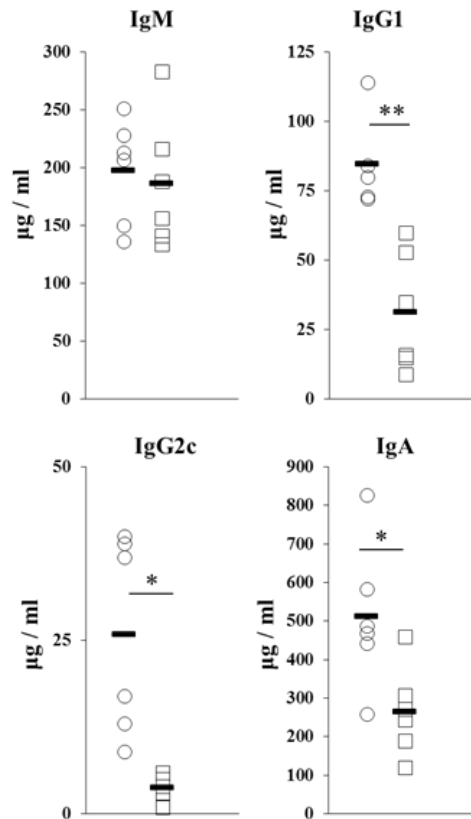


図1：非免疫マウスにおける血清中免疫グロブリン濃度

2ヶ月齢のコントロールCD19-Cre, pKnox1^{+/+}マウス(○)、およびpKnox1-BKOマウス(□)の血清中に存在する各アイソタイプの抗体量を定量的ELISAによって測定した。縦軸は抗体濃度、図中の横線は平均値を示す。* : p < 0.05、** : p < 0.01

その結果、pKnox1-BKOマウスにおける抗NP-IgMの産生は2週間後でも4週間後でもコントロールマウスと比較して有意な差は見られなかった。一方、抗NP-IgG1の産生は2週後のpKnox1-BKOマウスで明らかに低下していた。低価数のNP抗原に結合可能な、高親和性抗NP-IgG抗体の産生も、コントロールマウスと比較して明らかに低下していた。これらのマウスが産生する抗NP抗体の相対的な親和性を、低価数抗原への抗体結合量を高価数抗原への抗体結合量で除算して求めた(図3)。

pKnox1-BKOマウスでも親和性成熟が起こっているが、野生型マウスやコントロールマウスと比較して、遅延が認められた。さらに詳しく親和性成熟を解析するため、抗体遺伝子に導入される体細胞超突然変異の解析

を行った。

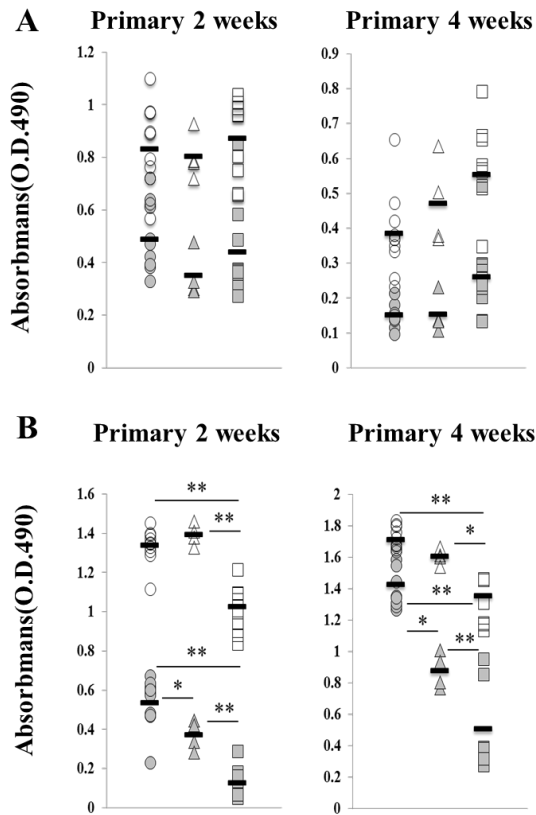


図 2：免疫後の血清中抗 NP 抗体価

NP-CGG 免疫 2 週後および 4 週後 Wild type マウス(○)、コントロール CD19-Cre, pKnox1+/+マウス(●)、pKnox1-BKO マウス(△)の血清中抗 NP 抗体量を ELISA によって測定した。高価数抗原(NP17-BSA:白色)を固層した際には全ての抗 NP 抗体が結合可能であり、低価数抗原(NP1.5-BSA:灰色)を固層した際には高親和性の抗 NP 抗体のみが結合できる。A は抗 NP-IgM 量、B は抗 NP-IgG1 量の測定結果を示す。

図中の横線は平均値、* : p<0.05、** : p<0.01。

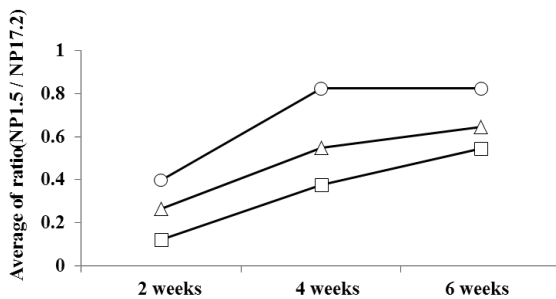


図 3 NP-CGG 免疫後の抗体親和性成熟

NP-CGG 免疫 2 週後、4 週後および 6 週後の Wild type マウス(○)、CD19-Cre, pKnox1+/+マウス(●)、pKnox1-BKO マウス(△)の血清中抗 NP 抗体量を ELISA によって測定した。高価数抗原(NP17-BSA:白色)を固層した際には全ての抗 NP 抗体が結合可能であり、低価数抗原(NP1.5-BSA:灰色)を固層した際には高親和性の抗 NP 抗体のみが結合できる。A は抗 NP-IgM 量、B は抗 NP-IgG1 量の測定結果を示す。

ウス(○)、pKnox1-BKO マウス(△)の血清中に存在する抗 NP-IgG1 量を ELISA によって測定し、相対的な親和性を、低価数抗原への結合量を高価数抗原への結合量を ELISA で測定した値で除算して求め、その平均値を示した。

免疫 2 週後および三次免疫 1 週後のマウス脾臓中に存在する NP 結合性 B 細胞 (1+B220+ NPhi-APC) をフローサイトメトリーで回収し、それらの細胞が発現する VH186.2 遺伝子の塩基配列を解析した。得られた塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、胚細胞型 VH186.2 のアミノ酸配列を比較したところ、2 週目のコントロールマウスの SHM は平均 3.8 残基であり、pKnox1-BKO マウスは平均 1.25 残基であり、約 1/3 に減少していた。しかし、三次免疫では両マウスでほぼ等しい数の体細胞突然変異が導入されていた。この結果は、血中に存在する抗 NP 抗体の親和性成熟と関連しているものと考えられる。

(3) B 細胞系列特異的 pKnox1 欠損マウスの BCR シグナル伝達系に関する分子の発現解析

pKnox1-BKO マウスとコントロールマウスの脾臓由来 B 細胞および骨髄細胞を単離し、各遺伝子の発現を解析したところ、BCR シグナル関連分子 BTK、Bcl-2、Bcl-XL、Aiolos の発現は正常であった(図 4)。BCR シグナル伝達系では、タンパク質レベルでの解析も重要であるが、B 細胞系列特異的な pKnox1 の欠損により、BCR シグナル伝達系で重要な働きをするこれらの分子の遺伝子発現には影響しないことが判明した。

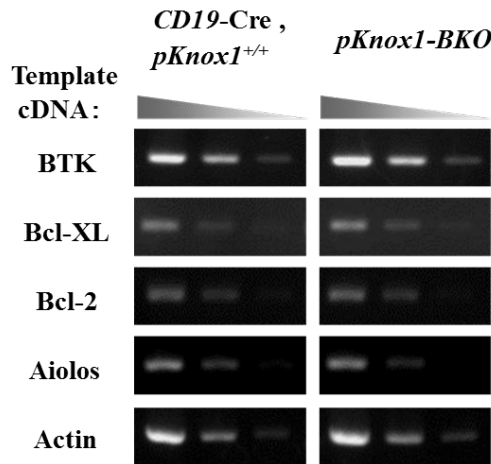
(4) B 細胞系列特異的 pKnox1 欠損マウスの AID 遺伝子発現解析

AID はクラススイッチや体細胞超突然変異の導入に必須の酵素である。さらに、AID が B 細胞の分化に関与していることが報告され (Giltiay et al., 2012)、AID 欠損マウスにおいて自己抗体が増加することも報告されている (Kuraoka et al., 2011)。そこで、pKnox1-BKO マウスの AID 遺伝子発現を解析した。非免疫の pKnox1-BKO マウスおよびコントロールマウスから、全脾臓細胞、脾臓 B 細胞、脾臓由来 GC B 細胞、骨髄細胞を単離し、RT-PCR を行った。その結果、pKnox1-BKO マウスで AID の発現低下が認められた(図 5、6)。

しかしながら、免疫 2 週後の GC-B 細胞における AID の発現はコントロールマウスと同等であった。このことから、活性化されていない basal な AID の発現の低下が認められた。AID の減少の原因として、AID の発現を制御している HoxC4 の減少が想定されたの

で、骨髄細胞、B細胞における HoxC4 の発現を解析したところ、pKnox1-BKO マウスで HoxC4 の発現低下が認められた(図 6)。以上の結果から、pKnox1 が AID や HoxC4 の発現に關与している可能性が示唆された。

Spleen B cells (CD19⁺ IgM⁺)



Whole bone marrow cells

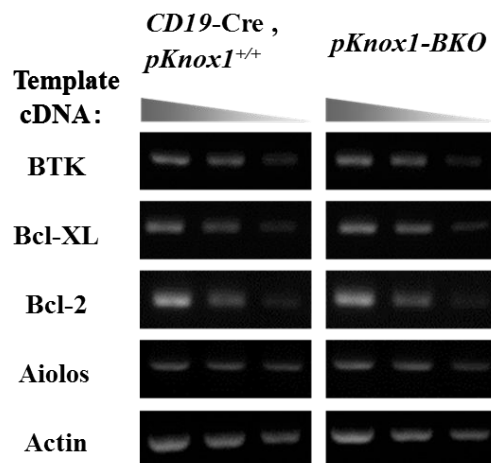


図 4 BCR シグナル系列関連分子の遺伝子発現

CD19-Cre, pKnox1^{+/+} マウスおよび pKnox1-BKO マウスの脾臓由来 B 細胞(IgM⁺, CD19⁺)および骨髄細胞における BTK、Bcl-XL、Bcl-2、Aiolos の発現量を Semi-quantitative RT-PCR によって解析した。

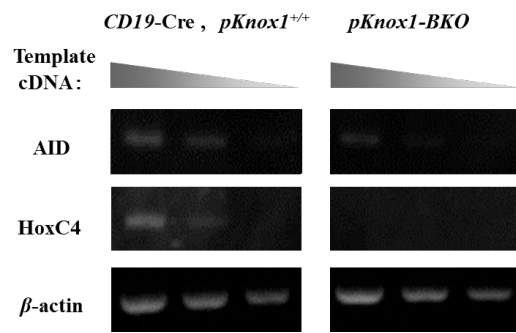


図 5 : AID 遺伝子の発現解析

コントロール CD19-Cre, pKnox1^{+/+}マウスおよび pKnox1-BKO マウスの脾臓細胞における AID 発現量を Semi-quantitative RT-PCR によって解析した。

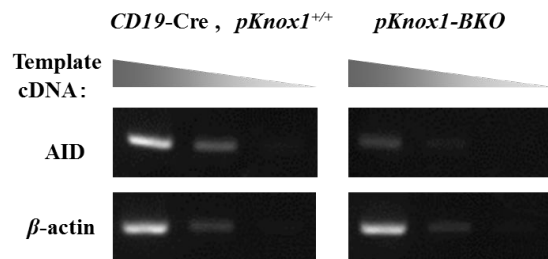


図 6 : AID 遺伝子および HoxC4 遺伝子の発現解析

コントロール CD19-Cre, pKnox1^{+/+}マウスおよび pKnox1-BKO マウスの脾臓細胞における AID 遺伝子発現量および HoxC4 遺伝子発現量を Semi-quantitative RT-PCR によって解析した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) Murakami A, Moriyama H, Osako-Kabasawa M, Endo K, Nishimura M, Udaka K, Muramatsu M, Honjo T, Azuma T and Shimizu T., Low-affinity IgM antibodies lacking somatic hypermutations are produced in the secondary response of C57BL/6 mice to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl hapten. International Immunology. (2014) 26(4):195-208, Doi: 10.1093/intimm/dxt057 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) 中山 光子, 村上 明一, 西村 深雪, 岸本 英博, 内海 文彰, 東 隆親. ファージライブラリー方を用いた抗体進化能力の in vitro での解析. 第 36 回 分子生物学会 (神戸、2013 年 12 月 5 日)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西村 深雪(NISHIMURA, Miyuki)
札幌医科大学・分子標的探索講座・助教
研究者番号:5 0 6 0 9 4 0 1

(2) 研究協力者

後飯塚 僚(GOITSUKA, Ryo)
東京理科大学・生命医科学研究所・教授
研究者番号:5 0 3 0 1 5 5 2

東 隆親 (AZUMA, Takachika)
東京理科大学・生命医科学研究所・教授
研究者番号:0 0 0 2 8 2 3 4

村上 明一(MURAKAMI, Akikazu)
琉球大学大学院・医学研究科・助教
研究者番号:0 0 7 3 3 6 3 5