

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790487

研究課題名(和文) Bリンパ球自己免疫寛容獲得、維持機構の解明 CIN85によるBCR制御の観点より

研究課題名(英文) Clarifying the mechanism of B cell tolerance by CIN85-mediated BCR regulation

研究代表者

米谷 耕平 (Kometani, Kohei)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：50437258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞自己免疫寛容・維持において、B細胞抗原受容体(B cell receptor: BCR)からのシグナル伝達に必要なアダプター分子CIN85が何らかの役割を担っている可能性を検証するために以下の様なマウス実験系を用意した。

B細胞特異的にCIN85遺伝子を欠損するCIN85 / mb1-Cre KO マウスを、自己免疫寛容のモデル系として実績のあるニワトリ卵白リゾチームを認識するBCRを持つトランスジェニック(Tg)マウスと、擬似的自己抗原である可溶性HELタンパク質を体内に発現するTgマウスを交配し、解析に用いるマウスを作成した。

研究成果の概要(英文)：To verify the possibility that adaptor molecule CIN85, which is required for transducing B Cell Receptor (BCR) signalling, have a role in the induction and maintenance of immune tolerance in B cells, I established a below experimental system.

First, I generated B cell specific CIN85-deficient mice using mb1-Cre knock in mice and flox-CIN85 mice. Second, CIN85 B cell specific deficient mice were crossed with mice those have a BCR recognising Hen Egg Lysozyme (HEL) and the mice expressing soluble HEL antigen.

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

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系は生体がウイルスや細菌といった病原体から自身を防御するために確立した機構である。この生体防御を担う免疫細胞の一つ B リンパ球は、病原体と結合する分子、抗体を分泌し病原体の排除にはたらいっている。そのため、抗体産生は B リンパ球の重要なはたらきの一つと言える。しかしながら、B リンパ球のもう一つの重要な特徴は、病原体の様な異物に対しては反応するが、自分自身に対しては反応しないことである。この様に非自己に対しては反応するが、自己に対しては反応しないような安全装置として「自己免疫寛容」という機構が備わっている。

自己免疫寛容は、万が一自己を認識するリンパ球が分化成熟し末梢に放出された場合でも抗原刺激に対して不応答に陥ることで、自己に対して反応しない状態を維持する仕組みである。もし免疫寛容が破綻すると、免疫系は自己に対して攻撃を始め生体を傷つけるため自己免疫疾患を発症する。そのため、B リンパ球が自己免疫寛容を獲得しその状態が維持されることは、B リンパ球にとって抗体を産生することと同様に重要なことである。

このように生体の健全性を保つ上で重要な自己免疫寛容機構であるが、その獲得、維持の仕組みには未だに不明な点が多い。それは、自己免疫疾患治療法の開発には今なお多くの課題が残されていることから伺い知れることである。自己免疫寛容の獲得、維持のためには、抗原を認識するセンサーである B 細胞抗原受容体 (B cell receptor : BCR) が重要なはたらきをする。しかしながら、この過程における BCR の動態制御機構は未だに不明な点が多く、BCR を介した B リンパ球の自己免疫寛容の誘導、維持機構の解明が待たれていた。

## 2. 研究の目的

近年研究代表者らは、成熟 B リンパ球において BCR からのシグナル伝達に重要な役割を果たす分子として、細胞内アダプタータンパク質 CIN85 (Cbl-interacting molecule of 85kDa) を同定しその機能を明らかとした (Kometani *et al.*, J. Exp. Med., (2011); 208: 1447-1457)。CIN85 は B リンパ球が抗原を認識し BCR が細胞表面で集積すると、その下流へシグナルを伝達し、NF- $\kappa$ B 活性化を誘導する。そのため、CIN85 遺伝子欠損マウス (CIN85 KO マウス) では、BCR の架橋により抗体産生を誘導する抗原 (II 型 T 細胞非依存的抗原 (TI-II 抗原)) に対し、増殖、生存能の低反応性を示し、抗体産生がほとんど誘導されない。

このように、B リンパ球の免疫応答において BCR シグナルを伝達する CIN85 であるが、同じく BCR を介した機構で引き起こされる自己免疫寛容の獲得、維持においても CIN85 が BCR の動態、シグナル伝達制御を担っている可能性が高い。また、CIN85 は免疫系以外の細胞では、上皮成長因子受容体 (EGFR) の細胞内への取り込みや、肝細胞成長因子受容体 (Met) のエンドサイトーシスを制御することが知られている (Soubeyran *et al.*, Nature, (2002); 416: 183-187, Petrelli *et al.*, Nature, (2002); 416: 187-190)。また、B リンパ球以外の免疫系細胞でも T 細胞抗原受容体 (T cell receptor: TCR) や Fc 受容体の細胞内取り込みを制御することが報告されている。これらのことより、自己免疫寛容の獲得において、CIN85 がシグナル伝達を担うのみならず、BCR の細胞内への取り込みを制御し、BCR による自己抗原のセンシング能を調節している可能性が考えられる。そこで本研究課題は、CIN85 に焦点を当て BCR を介した B リンパ球の自己免疫寛容の獲得、維持機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 「免疫寛容獲得時における CIN85 の関与」  
免疫寛容の獲得、維持に CIN85 が関与している場合、免疫寛容を引き起こす BCR 刺激により CIN85 が細胞内局在を変化させたり、下流のシグナル分子の活性化を引き起こすことが予想される。そこで、BCR に適度な強度の刺激を与え同様の挙動が観察されるかどうかを確認する。そのために、タンパク抗原であるニワトリ卵白リゾチーム (Hen Egg Lysozyme: HEL) を認識する BCR を持つトランスジェニックマウス、HEL Ig トランスジェニック (transgenic: Tg) マウスを利用する (Goodnow *et al.*, Nature (1998); 334: 676-682)。本来、野生型マウスに存在する抗原特異的 B リンパ球の頻度は非常に少ないが、この Tg マウスではほぼすべての B リンパ球で HEL タンパク質を認識する同一の BCR を発現するため解析が容易となる利点がある。また、後述する様に、この Tg マウス B リンパ球が認識する HEL タンパク質は、変異体を用いることにより BCR との親和性を変化させることが可能で、複数の局面を再現することができる。実際の実験では、本マウスのリンパ球を試験管内に取り出し、HEL タンパク質と抗 HEL 抗体を用いて刺激を加えることができる。この状態で細胞を固定し、共焦点顕微鏡にて BCR と CIN85 の局在を観察する。CIN85 を抗体による染色で確認できない場合にはあらかじめ GFP 融合 CIN85 遺伝子をレトロウイルスにて導入し、CIN85 の局在を観察することを可能にする (Kometani *et al.*, J. Exp. Med., (2011); 208: 1447-1457)。BCR の局在は刺激を加える抗 HEL 抗体を色素標識することで観察可能となる。この実験で用いる HEL Ig Tg マウスは HEL 抗原に対する親和性が  $2 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$  と非常に高く、刺激が強過ぎてしまう可能性も考えられる。そのため、より親和性が弱い ( $2 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ ) HEL 変異体 (Paus *et al.*,

J. Exp. Med. (2006); 203: 1081-1091) で実験を行う計画もしている。

(2) 「CIN85 の自己免疫寛容の獲得、維持における必要性」

本仮説を検証するために、有用性が既に報告されている自己免疫寛容誘導モデル系を用いる (Goodnow *et al.*, Nature (1998); 334: 676-682)。前述の HEL Ig Tg マウスは、単独では HEL 抗原に対して免疫応答可能な B 細胞を分化させ、血清中に抗 HEL 抗体を放出する。ところが、この Tg マウスを、全身性に可溶性 HEL 抗原を発現する sHEL Tg マウスと交配すると、体内に存在する擬似的自己抗原である HEL により免疫寛容が誘導される。実際の実験では効果的に実験を進めるために、HEL Ig Tg マウスをドナーに、sHEL Tg マウスもしくはコントロールとして野生型をレシピエントとし、HEL Ig Tg マウスの骨髄細胞を致死量照射したレシピエントに移植し、骨髄キメラマウスを作成して行う。造血系再構築後、免疫寛容が誘導されているかどうかを検証する。この時、ドナーを CIN85 KO バックグラウンドにし、コントロールマウスと比較することで免疫寛容獲得、維持における CIN85 の関与を検証できる。また、B 細胞依存的な効果であることを確認するために、CIN85 はコンディショナル KO マウスを用い、B 細胞特異的に Cre 遺伝子を発現する mb1-Cre ノックインマウスを用いる (Hobeika *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (2006); 103: 13789-13794)。

本研究は CIN85 KO マウスを用いた実験を中心に計画されている。しかしながら、CIN85 にはドメイン構造がほぼ同一の別のアダプター分子、CD2AP が存在していることが知られている。B 細胞においても CD2AP が発現していることは既に確認しており、CIN85 単独 KO マウスでは CD2AP による補償により表現型が表れない可能性もある。一方、研究代表者は CD2AP コンディショナル KO マウスも作成

している。そこで上記問題を回避するために、CIN85 と CD2AP の複合 KO マウスを用いて、前述した HEL Ig Tg マウスと sHEL Tg マウスを用いた免疫寛容誘導モデルの実験を行う。

#### 4. 研究成果

研究代表者は B 細胞特異的 CIN85 遺伝子欠損マウス (CIN85 / mb1-Cre KO マウス) を自己免疫寛容検定モデル系マウスである (HEL Ig Tg / sHEL Tg マウス) と交配したマウスを作製した。

現段階で得られた結果では CIN85 が自己免疫寛容の獲得、維持に関わることを示す決定的な結果は得られていない。しかしながら、研究方法で記した様に、CIN85 にはその遺伝子欠損を補償する可能性のある CD2AP 遺伝子が存在している。CD2AP タンパク質は正常マウス B 細胞並びに、CIN85 欠損 B 細胞においても発現していることを確認している。そこでさらに CD2AP 遺伝子欠損マウスと交配をし、CIN85 / CD2AP / mb1-Cre / HEL Ig Tg / sHEL Tg マウスの作製を試みた。現段階で得られた CIN85 / CD2AP / mb1-Cre 複合遺伝子欠損マウスの解析では、CIN85 / mb1-Cre 単独遺伝子欠損マウス同様に脾臓 B 細胞は BCR シグナルへの伝達不全を示す一方、脾臓 B 細胞発生過程に特筆すべき障害は認められず、前述の CIN85 / CD2AP / mb1-Cre / HEL Ig Tg / sHEL Tg マウスモデルマウス系においても解析が可能であることが推察される。

#### 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 1 件)

著者名: Kohei Kometani, Rinako Nakagawa,

Ryo Shinnakasu, Tomohiro Kaji, Andrei Rybouchkin, Saya Moriyama, Koji Furukawa, Haruhiko Koseki, Toshitada Takemori, Tomohiro Kurosaki.

論文標題: Repression of Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation.

雑誌名: Immunity

発行年月日: 2013 年 Jul 25

巻および頁: vol. 39(1): p136-147.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.011>

査読: 有

[学会発表](計 1 件)

発表者: 米谷 耕平

発表標題: B 細胞抗体産生を司る分子群の機能解明

発表学会: 第 42 回日本免疫学会学術集会

発表年月日: 2013 年 12 月 11 日~13 日

会場: 幕張メッセ(千葉)

[図書](計 1 件)

著者名: 米谷 耕平、黒崎 知博

出版社名: 医薬の門社

書名: 感染・炎症・免疫

発行年: 2014 年

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

米谷 耕平

(Kometani Kohei)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学

研究センター・研究員

研究者番号：50437258