

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860813

研究課題名(和文) アポトーシス誘導BCR信号制御分子G5PRとFcγRIIBの自己免疫発症への影響

研究課題名(英文) The Role of G5PR and Fc gamma RIIB in the development of autoimmune disease

研究代表者

北畠 正大 (Kitabatake, Masahiro)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：60457588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：全身性自己免疫疾患で産生される自己抗体の多くは高親和性のIgG抗体である。腹腔に存在する一部のB細胞(B-1a細胞)は自己抗原とも反応するIgM抗体を自然産生すること、自己免疫疾患を自然発症するマウスで異常増殖することから、高親和性IgG自己抗体産生細胞の前駆細胞と考えられている。本研究では、B-1a細胞は胚中心環境下でIgGへとクラススイッチして自己抗体産生細胞へ分化すること、B細胞抗原受容体(BCR)信号制御分子G5PRがその分化を促進することを明らかにした。G5PRを介したシグナル制御が自己免疫疾患における自己抗体産生抑制の標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Autoimmunity is associated with the generation of high affinity auto-antibodies (Abs) that are strongly reactive to self-antigens and class switching, typically with IgG class Abs produced by long-lived plasma cells. Peritoneal B-1a cells, which often produce the IgM class Abs cross-react with self-Ag, are thought to be the source of auto-Ab-producing long-lived plasma cells because various autoimmune-prone mice show the abnormal expansion of peritoneal B-1a cells. In this study, we demonstrated that B-1a cells could differentiate into IgG auto-Ab producing plasma cells in the germinal center like environment. In addition, abnormal expression of G5PR, which is regulatory molecule for B cell receptor signaling, enhanced the differentiation of B-1a cells into auto-Ab producing cells. Thus, the regulation of cell signaling by G5PR in B-1a cells might be a critical target to prevent auto-Ab production in autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：自己抗体 B-1細胞 胚中心

1. 研究開始当初の背景

全身性自己免疫疾患の患者では、自己抗原に対する IgG クラスの高親和性抗体を産生する自己反応性 B 細胞の増加が認められる。これは自己反応性 B 細胞が細胞死を誘導せずに、増殖・活性化し、IgM から IgG へのクラススイッチと体細胞突然変異により自己に対する高親和性を獲得するためと考えられる。B 細胞抗原受容体 (BCR) への抗原の結合は B 細胞の活性化や細胞増殖と同時に細胞死も誘導する。これらのシグナルはセリン・スレオニン脱リン酸化により制御されており、セリン・スレオニン脱リン酸化酵素 PP2A は、これらのリン酸化反応カスケードを負に制御する。G5PR は PP2A と結合して、調節サブユニットとしてその機能を制御する (**Genes Cells.**, 2002, 7:821)。G5PR は B 細胞において抗原刺激時に Btk を介したシグナルにより発現が上昇すること、G5PR の欠損は抗原刺激による JNK および Bim のリン酸化が亢進して細胞死を増加させること、逆に G5PR の過剰発現は JNK、Bim のリン酸化を抑制し、細胞死を減少させることから、抗原刺激時のアポトーシスの回避に機能する (**J.Exp.Med.**, 2005, 202:707、**BBRC.**, 2006, 340:338)。このことは、G5PR の発現レベルが BCR からの JNK-Bim を介した細胞死シグナルを調節することを示し、G5PR の発現の変化は自己反応性 B 細胞クローンの排除に影響を与えることを示唆する。

申請者は G5PR の発現異常が自己免疫疾患発症と関連する可能性を考え、自然発症型自己免疫疾患モデル New Zealand Black (NZB) マウスを解析した。腹腔に存在する B-1a 細胞は自己抗原と交叉反応性を示す低親和性の自己抗体を自然産生する細胞であり、NZB マウスで異常増殖を引き起こして、自己抗体を産生する。G5PR は NZB マウスの B-1a 細胞で高発現していたことから、C57BL/6 マウス背景で G5PR 過剰発現 (G5PR^{Tg}) マウスを作製した。雌性マウスは加齢後に、腹腔 B-1a 細胞が増加すること、この B-1a 細胞は BCR 刺激による JNK、Bim の活性化が抑制されて細胞死が減少することを示した (**J.Immunol.**, 2012, 89:1193)。また、G5PR^{Tg} マウスは自己抗体の産生と腎糸球体への免疫複合体沈着が認められ、自己免疫疾患を自然発症することを明らかにした。これらの結果から、G5PR の過剰発現は B-1a 細胞の免疫寛容の破綻を引き起こし、自己免疫疾患を発症させることを示唆する。

しかしながら、腹腔内で B-1a 細胞の活性化を誘導する機構、B-1a 細胞が実際に IgG ヘクラススイッチを起こし、高親和性を獲得するかは明らかとなっていない。申請者は腹腔微小空間における B-1a 細胞の活性化には

腹腔マクロファージが影響すると考え、Fc γ 受容体に着目した。Fc γ 受容体は IgG の Fc 部位と結合し、抗原の貪食に機能すると同時に、細胞内にシグナルを伝達し、細胞の活性化を制御する。その中で Fc γ RIIB は細胞内領域に ITIM を持ち、イノシトール脂質脱リン酸化酵素 SHIP と結合し、細胞の活性化シグナルを抑制する。全身性エリテマトーデス (SLE) 患者のゲノムワイドの解析から、Fc γ RIIB のプロモーター領域および膜貫通領域の遺伝子変異はそれぞれ発現低下および機能低下と関連し、活動性の SLE 患者に高頻度に見られることが報告されている (Su *et al.*, *J.Immunol.*, 2004、Akahoshi *et al.*, *Semin.Immunol.*, 2006)。自然発症型自己免疫疾患モデルマウスである NZB マウス、BXSB マウス、MRL マウスにおいても *fcgr2b* に遺伝子多型があり、NZB 型の *fcgr2b* は胚中心 B 細胞および腹腔マクロファージにおいて Fc γ RIIB の発現低下が示されている (Kikuchi *et al.*, *J.Immunol.*, 2006)。また、Fc γ RIIB 欠損マウスは遺伝的背景に影響を受けるが、自己免疫疾患を自然発症することが報告されている (Bolland *et al.*, *Immunity*, 2000、Sato-Hayashizaki *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 2011)。これらのことから、腹腔マクロファージにおける Fc γ RIIB の異常と B-1a 細胞における G5PR の発現異常が協奏的に働き、疾患発症を引き起こすのでは無いかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は自己免疫疾患発症に関連する遺伝子 G5PR と Fc γ RIIB に焦点を当て、これらの発現異常がどのように疾患発症へ影響するのかを明らかにすることを目的とした。具体的には B-1a 細胞の IgG 自己抗体産生細胞分化への G5PR の影響、B-1a 細胞の活性化に重要なサイトカイン産生誘導に対する Fc γ RIIB の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) B-1a 細胞の IgG 自己抗体産生細胞への分化に対する G5PR の影響

B 細胞が効率的に体細胞突然変異、クラススイッチを起こす場としては胚中心が知られている。B-1a 細胞も通常の B 細胞 (B-2 細胞)と同様に胚中心環境下で活性化、分化するか、G5PR がどのように影響するかを解析した。野生型マウス、G5PR 過剰発現マウスより腹腔 B-1a 細胞を分取し、CD40L と BAFF を発現する feeder 細胞 (東京理科大学・北村大介教授より分与)を用いて IL-4/IL-21 存在下で培養 (iGB 培養)し、B-1a 細胞の分化、IgG クラススイッチをフ

ローサイトメトリーにより、自己抗体産生を ELISA により解析した。また、遺伝子発現解析を定量的 PCR により行った。

(2) 腹腔マクロファージのサイトカイン産生に対する Fc γ RIIB の影響

野生型マウス、Fc γ RIIB 欠損マウス、自己免疫疾患自然発症モデル NZB \times New Zealand White F1 (BWF1) マウスから腹腔マクロファージを分取し、抗原抗体複合体(免疫複合体)と反応させた後、LPS で刺激し、サイトカイン産生を定量的 PCR および ELISA により解析した。

4. 研究成果

(1) B-1a 細胞の胚中心様 B 細胞への分化

腹腔 B-1a 細胞は B220+CD11b+CD5+ の表現系を持つ。この細胞分画をセルソーターにより分取し、iGB 培養を 4 日間行った。B-1a 細胞は脾臓 B-2 細胞と同様に胚中心 B 細胞の表現系 (GL-7+Fas+) を持つ細胞へと分化した。また、胚中心 B 細胞への分化に必須の転写因子 Bcl-6 の発現上昇を認めた。これらの結果は、B-1a 細胞も胚中心環境で活性化し、胚中心様 B 細胞へ分化できることを示している。

(2) B-1a 細胞の IgG クラススイッチおよび形質細胞分化

B-1a 細胞は iGB 培養により、IgG1 へのクラススイッチと CD138+ の形質細胞への分化が認められた (図)。形質細胞への分化は B-2 細胞と比較して有意に増加していた。

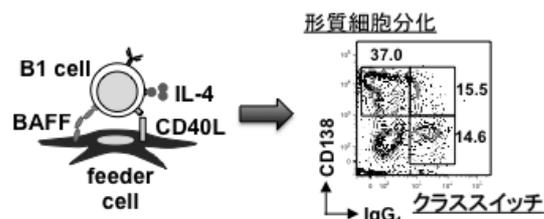


図 iGB 培養による B-1a 細胞の分化

B-2 細胞との分化傾向の違いを調べるために定量的 RT-PCR により解析した結果、B-1a 細胞は *prdm1*、*irf4*、*xbp1* といった形質細胞への分化に関連する遺伝子を高発現していた。また、自己抗体の産生を調べたところ IgM クラス、IgG クラスともに抗 DNA 抗体の産生量が有意に上昇していた。これらの結果から、B-1a 細胞は胚中心環境下で IgG へクラススイッチし、自己抗体を産生することが明らかとなった。

(3) B-1a 細胞分化に対する G5PR の影響

野生型マウスと G5PR^{Tg} マウスから B-1a 細胞を分取して iGB 培養を行った。細胞増殖は両者間で差は認められなかったが、G5PR^{Tg}

マウス由来の B-1a 細胞は IgG へのクラススイッチが低下し、形質細胞への分化が増加していた。この結果と一致して、遺伝子発現解析ではクラススイッチに必須の分子である *aicda* の発現が低下し、形質細胞分化に必須の分子である *prdm1* の発現が上昇していた。また、自己抗体産生は IgM および IgG クラス共に上昇していた。これらの結果から、G5PR の発現異常は自己反応性 B 細胞の形質細胞分化を誘導し、自己抗体産生を引き起こすことが明らかになった。

(4) 腹腔マクロファージのサイトカイン産生に与える Fc γ RIIB の影響

腹腔マクロファージを野生型マウス、Fc γ RIIB 欠損マウス、BWF1 マウスから分取し、免疫複合体を反応させた後、LPS で刺激した。野生型マクロファージは免疫複合体で前処理することにより、サイトカイン産生が有意に低下するのに対し、Fc γ RIIB 欠損マウス、BWF1 マウス由来のマクロファージでは産生抑制は認められなかった。このことから、Fc γ RIIB を介したシグナルはサイトカイン産生を負に制御しており、その制御異常はサイトカインの過剰産生に結びつき、腹腔環境下での自己反応性 B-1a 細胞の活性化のトリガーとなる可能性が示唆された。

(5) 得られた成果の国内外における位置付

本研究において、BCR シグナル調節分子 G5PR の発現異常は自己反応性 B 細胞の生存に関わるだけでなく、IgG クラスの抗体産生細胞への分化にも影響を与えることを明らかにした。この成果は自己抗体の産生誘導機構、自己免疫疾患の発症機構を理解する上で重要な結果として国内外で高く評価され、The Journal of Immunology に論文が受理された。

(6) 今後の展望

本研究において、B-1a 細胞は胚中心環境下で IgG 自己抗体産生細胞へと分化することを示した。自己免疫疾患における自己抗体産生を理解するためには B-1a 細胞が自己抗原に対する高親和性を獲得するか、その分子機構、場はどこかであるか、さらなる検証が必要である。また、Fc γ RIIB の発現異常がマクロファージのサイトカイン産生に影響することを示したが、マクロファージと B-1a 細胞が腹腔微小環境内でどのように相互作用しているかさらなる解析が必要である。これらの機構の解明は自己免疫疾患発症機構を理解し、新たな治療戦略や治療標的を探索する上で重要と考えられる。

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 3 件)

Kitabatake M, Soma M, Zhang T, Kuwahara K, Fukushima Y, Nojima T, Kitamura D, Sakaguchi N.
JNK regulatory molecule G5PR induces IgG autoantibody-producing plasmablasts from peritoneal B1a cells.
The Journal of Immunology. 194:1480-1488, (2015) 査読有り
doi: 10.4049/jimmunol.1401127.

Yasui F, Kohara M, Kitabatake M, Nishiwaki T, Fujii H, Tateno C, Yoneda M, Morita K, Matsushima K, Koyasu S, Kai C.
Phagocytic cells contribute to the antibody-mediated elimination of pulmonary-infected SARS coronavirus.
Virology. 454-455:157-168, (2014)
査読有り
doi: 10.1016/j.virol.2014.02.005

Rezano A, Kuwahara K, Yamamoto-Ibusuki M, Kitabatake M, Moolthiya P, Phimsen S, Suda T, Tone S, Yamamoto Y, Iwase H, Sakaguchi N.
Breast cancers with high DSS1 expression that potentially maintains BRCA2 stability have poor prognosis in the relapse-free survival.
BMC Cancer. 13:562, (2013) 査読有り
doi: 10.1186/1471-2407-13-562.

[学会発表](計 5 件)

Kitabatake M, Soma M, Zhang T, Nojima T, Kitamura D, Sakaguchi N.
JNK regulatory molecule G5PR induces peritoneal B1a cells into IgG autoantibody-producing plasmablasts.
第 43 回日本免疫学会, 2014 年 12 月 10-12 日, 国立京都国際会館 (京都)

Ikijiri A, Yasui F, Itoh Y, Kitabatake M, Sakaguchi N, Ogasawara K, Kohara M.
Highly pathogenic avian influenza A H5N1 virus causes severe symptoms due to insufficient induction of humoral immune response.
第 43 回日本免疫学会, 2014 年 12 月 10-12 日, 国立京都国際会館 (京都)

安井文彦、伊藤靖、池尻藍、北嶋正大、宗片圭佑、迫田 義博、喜田 宏、阪口薫雄、小笠原一誠、小原道法。
H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染に対する宿主免疫低応答性とインフルエンザ組換え生ワクチン接種による

発症防御

第 18 回日本ワクチン学会, 2014 年 12 月 6-7 日, 福岡国際会議場 (福岡)

Kitabatake M, Zhang T, Kuwahara K, Sakaguchi N.
Protein phosphatase subunit G5PR regulates the plasmablast differentiation and autoantibody production of peritoneal B-1a cells.
第 42 回日本免疫学会, 2013 年 12 月 11-13 日, 幕張メッセ (千葉)

Kuwahara K, Kitabatake M, Kitamura D, Sakaguchi N.
Mammalian Leng8 carrying a Sac3/GANP homologous region upregulated in germinal center B cells is involved in regulation of BCR-mediated proliferation.
第 42 回日本免疫学会, 2013 年 12 月 11-13 日, 幕張メッセ (千葉)

[図書](計 1 件)

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S 著
松島綱治, 山田幸宏 監訳
エルゼビア・ジャパン
分子細胞免疫学 原著第 7 版 (2014)
分担翻訳 北嶋正大
第 15 章 微生物に対する免疫. 411-434

6. 研究組織

(1)研究代表者

北嶋 正大 (Kitabatake Masahiro)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 60457588

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし