

B 細胞初期分化において自己免疫寛容を獲得する 分子基盤の検索

研究代表者：林 達成（医学部・特命助教）
共同研究者：菅井 学（医学部・教授）、服部 満（医学部・助教）
南部 由希子（医学部・学術研究員）

概 要
B 細胞はその初期分化過程で多様な抗原受容体（BCR、後の抗体）を作り出し、それぞれの細胞が異なる抗原特異性を有している。その中には自己に反応する細胞もあるが、このような細胞が成熟できない仕組みが備わっている。我々のこれまでの解析から、転写因子 SIP1 は BCR 共受容体 CD19 とともに V(D)J 組換え酵素 RAG1、RAG2 を抑制する機能があること、SIP1 や CD19 による RAG 遺伝子の発現抑制が B 細胞分化における "BCR 品質チェック" の過程で自己抗体の産生を抑制していることを見出した。また本研究において SIP1 や CD19 を欠損した B 細胞の解析をさらに進めた結果、RAG 遺伝子制御の実態を捉えるまでは至らなかったものの、SIP1 と CD19 はそれぞれ異なる制御様式を持つことが示唆された。
関連キーワード
SIP1、B 細胞、RAG1/RAG2、miRNA、自己寛容

研究の背景および目的

B 細胞による抗原認識の特徴は、それぞれの細胞が異なる抗原特異性（多様性）を示すことと、自己には反応しない性質（自己寛容性）を示すことである。B 細胞がこれらの性質を獲得するには、初期分化過程で "BCR 品質チェック" が正常に機能しなければならない。この品質チェックは大型 pre-B 細胞や未熟 B 細胞の段階で起こることが分かっているが、分子機構については不明な点が多い。これまでの解析で我々は、転写因子 SIP1 が未熟 B 細胞での BCR 品質チェックにおいて、V(D)J 組換え酵素 RAG1、RAG2 を負に制御に制御していることを見出した。一方、BCR 共受容体である CD19 の欠損は、BCR シグナルを適切に伝達することができなくなるため、BCR 品質チェック過程で起こるレセプター編集により正常な BCR

機能が失われてしまう。加えて、我々の解析から、SIP1 と CD19 を二重欠損すると、RAG 遺伝子の顕著な発現上昇、B 細胞の大幅な減少、そして自己抗体の産生をもたらすことを見出された（以上投稿準備中）。これらのことから、未熟 B 細胞における RAG 遺伝子の発現抑制は、成熟 B 細胞へと正常に分化する上で重要な機構であると示唆される。

以上を踏まえ、本研究では以下の点を明らかにするための実験を行った。

- 1) 未熟 B 細胞から成熟 B 細胞への分化に対する SIP1 欠損と CD19 欠損の影響を評価する。
- 2) SIP1 や CD19 による RAG 遺伝子の制御機構を明らかにする。

研究の内容および成果

1. SIP1 欠損と CD19 欠損では異なった分化抑制機序を示す。
骨髄細胞を IL-7 存在下で培養すると、未熟 B 細胞が豊富に生じる。さらに IL-7 非存在下で anti- μ や BAFF で刺激を行うと、未熟 B 細胞が分化して、CD21などを発現する。今回、この *in vitro* 分化誘導の系を用いて SIP1 や CD19 の欠損による影響を評価した。図 1 は、SIP1 コンディショナルノックアウトマウスの骨髄細胞を用いた解析結果である。このマウスは、SIP1-flox と Cre 応答性 EGFP

transgene を持っているため、CD19-Cre ノックインマウスとの交配により B 細胞で SIP1 遺伝子が欠損し、その細胞を EGFP でモニターすることができる。また、CD19-Cre ホモ接合体は CD19 遺伝子を欠損する。解析の結果、SIP1 の欠損によって EGFP⁺細胞の減少が見られたのに対し、CD19 を欠損した場合には EGFP⁺細胞が増加していた（図 1a）。一方、SIP1 を欠損した場合には anti- μ や BAFF の刺激で誘導される CD21⁺細胞の EGFP⁺細胞に対する割合に大きな変化は見られな

かったが、CD19 を欠損すると半分以下に減少し、SIP1 と CD19 の二重欠損では CD21⁺細胞がほとんど見られなかった (図 2b)。これらの結果は、SIP1 を欠損すると未熟 B 細胞の減少を引き起こすのに対し、CD19 を欠損した場合には未熟 B 細胞の成熟が抑制されることを示唆している。

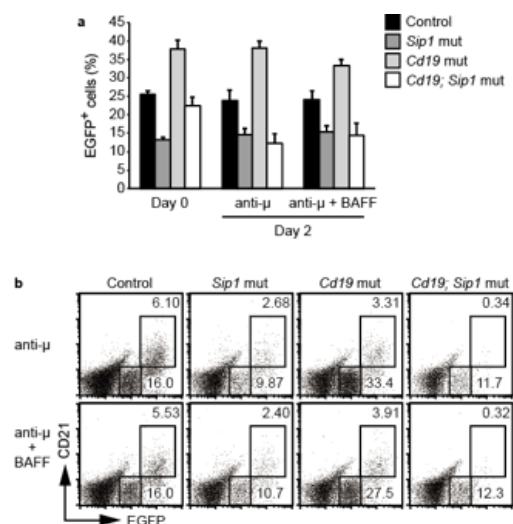


図 1. 未熟 B 細胞の *in vitro* 分化誘導

(a) 各遺伝子欠損マウス由来骨髄細胞における EGFP⁺細胞の割合。(b) FACS による CD21⁺細胞の検出。

2. SIP1 と CD19 は互いに異なる様式で RAG 遺伝子の発現を制御する。

次に我々は、*in vivo*における各遺伝子欠損未熟 B 細胞の特徴について解析した。自己に反応する未熟 B 細胞は、BCR 品質チェックにおいて RAG 遺伝子の発現が誘導され、レセプター編集と呼ばれる BCR 遺伝子の組換えが起こることで自己に反応しない細胞へと変化する。そこで、各遺伝子欠損マウスの未熟 B 細胞におけるレセプター編集を FACS にて解析した。SIP1 欠損マウスでは、Igλ⁺細胞の割合に大きな変化は見られなかったのに対し、CD19 を欠損したマウスでは、これまでの知見と同様にコントロールに対して 2 倍以上の増加が

見られた (図 2a)。

BCR チェックポイントにおける RAG 遺伝子の抑制は、正常な B 細胞分化に重要であることはこれまでの我々の解析結果から強く示唆されるが、その制御メカニズムはまだ明らかになっていない。以前の我々の解析で、SIP1 が欠損すると、CD19 を欠損した場合と同様に未熟 B 細胞において RAG 遺伝子の発現が上昇することから、CD19 からのシグナル伝達を受けて発現誘導された SIP1 が RAG 遺伝子の転写を負に制御している可能性が考えられた。しかしながら、CD19 欠損未熟 B 細胞における SIP1 遺伝子の発現量に変化は見られなかった (図 2b)。また、SIP1 欠損 B 細胞における CD19 遺伝子の発現量にも変化は見られなかったことから、SIP1 による RAG 遺伝子抑制は、CD19 を介したのではないことが分かった (図 2c)。つまり、SIP1 と CD19 は互いに異なる様式で RAG 遺伝子の発現を制御していることが示唆される。

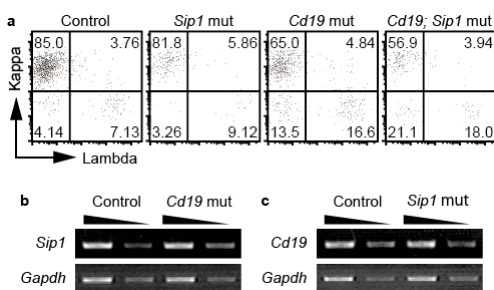


図 2. 未熟 B 細胞の *in vivo* 解析

(a) 各遺伝子欠損マウスにおけるレセプター編集。レセプター編集が起こった細胞は Igλ を発現する。(b) CD19 欠損未熟 B 細胞における SIP1 遺伝子の発現。(c) SIP1 欠損未熟 B 細胞における CD19 遺伝子の発現。

3. 今後の展望

今回、SIP1 や CD19 による RAG 遺伝子抑制メカニズムについての解析には至らなかった。今後はクロマチン免疫沈降やレポーターアッセイなどを用いて、SIP1 による RAG 遺伝子転写活性の制御の解析や CD19 の下流で RAG 遺伝子を制御する分子の探索を行っていく予定である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

本助成による成果は現在投稿準備中

「学会発表」

Transcription factor Sip1 functions to prevent autoimmunity in the BCR checkpoint of immature B cell stage・林 達成、南部 由希子、ジャン キョンジン、眞野 浩人、東 雄二郎、Kristin Verschueren、Danny Huylebroeck、清水 章、萱井 学・2016年9月 日本生化学会 (仙台)

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・H29年度 学術研究助成基金助成金・若手(B)・転写因子 SIP1 による血球系細胞分化制御機構の解析・代表・申請・500万円