

論文の内容の要旨

論文題目

機能的B細胞選択を担うプレB細胞受容体の標的転写因子の同定とその役割

指導教官 三宅 健介 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 生谷 尚士

【序】

B細胞は骨髄において造血幹細胞から一連の分化段階を経て成熟する。B細胞の分化段階の一つであるProB細胞で免疫グロブリン重鎖（H鎖）の再構成が開始される。この際に免疫グロブリン軽鎖（L鎖）様の代替L鎖と会合しうる機能的なH鎖を再構成したB細胞は細胞表面上にプレB細胞受容体（PreBCR）を形成するL-PreB細胞へと分化する。このPreBCRから分化シグナルが伝達され次の分化段階であるS-PreB細胞へと移行する。その後B細胞はL鎖を再構成しB細胞受容体（BCR）が形成されImmatureB細胞へと分化する。

PreBCRの細胞内シグナル伝達分子は現在までにいくつか同定されている。その一つであるブルトン型チロシンキナーゼ（Btk）はPreB細胞への分化に必須の役割が証明されている。またB細胞分化は様々な転写因子の相互作用で制御されていることが

明らかとなってきた。しかしながら PreBCR シグナルがどのような転写因子を標的として PreB 細胞分化を規定しているかは未解決である。そこで私は Btk 依存的な PreBCR シグナルによって変動する転写因子に着目し、それらの同定を試みた。そしてそれらの担う役割を遺伝子過剰発現・発現抑制実験を用いて検証した。

【方法と結果】

(1) Btk 依存的に制御される転写因子群の同定

Rag2 遺伝子欠損 (Rag2KO) マウスでは ProB 細胞で H鎖の再構成が起きず ProB 細胞段階で分化が完全に障害されている。この ProB 細胞では H鎖を含まずに PreBCR のシグナル伝達分子である Ig α /Ig β が細胞表面上に発現している。Rag2KO マウスに Ig β に対する抗体を投与すると PreB 様細胞への分化が誘導されるが、Rag2/Btk 遺伝子重複欠損 (Rag2/BtkDKO) マウスでは PreB 様の細胞は誘導されない。すなわち Btk は PreB 細胞分化に必須である。この現象を利用しマイクロアレイ解析を用い Btk 依存的に制御を受ける転写因子群の同定を試みた。Rag2KO、Rag2/BtkDKO マウスに抗 Ig β 抗体投与後任意の時間で骨髄より B 細胞を精製し遺伝子の変化を観察した。Rag2/Btk 重複欠損 B 細胞では変化がみられず、Rag2 単独欠損 B 細胞で変化がみられた遺伝子を選択した。さらに Rag2 単独欠損 B 細胞と Rag2/Btk 重複欠損 B 細胞との差が 2 倍以上で且つ転写活性のあるものを選択し、これらを候補遺伝子とした。遺伝子過剰発現実験から候補遺伝子のうち HeyL が B 細胞分化に関与していることが示された。HeyL は ProB 細胞で発現が確認され、L-PreB 細胞で一過性に減少していた。S-PreB で再び発現が増強し Immature B 細胞では発現が抑制されるというパターンを示した。

(2) HeyL による細胞増殖、PreB 細胞分化の促進

HeyL の役割を明らかにするため ProB 細胞を精製し HeyL を過剰発現させ培養した。HeyL を過剰発現している細胞は PreB 細胞で観察される細胞表面マーカーの様相を示

していた。次にHeyLを過剰発現している細胞をソーティングし、B細胞分化に関係する遺伝子の発現量をRT-PCRで解析した。その結果B細胞の増殖を制御するサイトカイン、IL-7、のレセプターの発現が増強していた。実際にHeyL強発現細胞ではIL-7への応答性が促進していた。さらにL鎖の再構成に必須の役割を担う遺伝子の転写促進も観察された。つまりHeyLはProB細胞増殖に関与する遺伝子や分化に関与する遺伝子の転写を促進させることでProB細胞の増殖、PreB細胞分化を促進させていることが示唆された。

(3) HeyL遺伝子抑制によるPreB細胞分化、細胞増殖の障害

ProB細胞においてHeyLの発現を抑制させた場合のPreB細胞分化への影響を観察した。ProB細胞を精製しHeyL遺伝子を抑制するsiRNAを発現するレトロウィルスを感染導入させた。その後PreB細胞への分化を誘導する培養系で細胞を培養した。するとHeyLが抑制されている細胞においてPreB細胞への分化、細胞増殖が抑制された。これはHeyLの重要性をさらに強調する結果である。

(4) HeyL機能ドメインの同定

HeyLにはDNA結合能を持つbHLHドメイン、Orangeドメイン、C末端の保存された部位が知られている。細胞増殖、PreB細胞分化におけるこれらのドメインの役割を同定するため、ドメイン欠損変異体を作製しProB細胞に感染導入させ培養した。bHLH欠損変異体は細胞増殖、PreB細胞への分化ともに顕著に阻害した。またC末端欠損変異体では細胞増殖は阻害されたがPreB細胞分化は促進するという興味深い知見が得られた。

(5) HeyLによるPreB細胞分化誘導におけるPreBCRとBtkの関与

PreB細胞への分化にはPreBCRシグナルが必須であることが知られているが、HeyLが誘導するPreB細胞分化にBtkとPreBCRシグナルが要求されるかは興味深い点である。そこでPreBCRを欠損するRag2KOマウス、Btkを欠損するBtkKOマウス、それら

の両方を欠損するRag2/BtkDKOマウスのProB細胞にHeyLを過剰発現させ細胞表面マーカーの変化を観察した。その結果Btk、PreBCR非依存的に変化がみられるマーカー、Btk、PreBCR両方に依存しているマーカー、PreBCRのみに依存しているマーカーが観察された。これはHeyLがそれぞれのマーカーの変動に異なったレベルで関与していることを示唆する結果である。

(6) 生体内免疫担当細胞におけるHeyLの役割

HeyLのB細胞分化での影響をB前駆細胞培養系において証明してきたが、生体内での役割や他の免疫担当細胞での役割も検討すべき点である。そこで野生型マウスの骨髄細胞から造血幹細胞を含む未熟な細胞を精製し、HeyLを感染導入し致死量の放射線を照射した野生型マウスに移入した。移入4週後、末梢血液を採取しB細胞、T細胞、その他の単核球に占めるHeyL過剰発現細胞の割合を算出した。HeyL過剰発現細胞ではB細胞の増加が観察されT細胞、単核球は減少していた。

(7) HeyLノックアウトマウスの作製

本研究よりB細胞分化にHeyLが重要な役割を担うことが示唆された。またB細胞のみならずT細胞や他の免疫担当細胞への影響も観察された。故にHeyLの機能を生体レベルで解析することはB細胞分化のみならず免疫系全体の制御の解明にもつながると考えHeyLノックアウトマウスの作製に着手した。

ES細胞にHeyLターゲティングベクターを導入し相同組換を起こしたクローンを選別した。その結果二つのクローンを得ることに成功した。そのうちの一つを胚盤胞にインジェクションしキメラマウスを作製し、キメラマウスの雄と野生型マウスの雌とを交配した。誕生してきたマウスの尻尾からゲノムDNAを抽出しPCRによってHeyL遺伝子座を検出した。結果、複数のマウスに相同組換を起こした対立遺伝子が確認された。現在は野生型マウスとの交配を進めている。

【考察】

本研究において Btk を介した PreBCR シグナルの標的転写因子 HeyL を同定した。HeyL は細胞増殖を正に制御していること、PreB 細胞への分化を促進させていることが今回示された。

HeyL は IL-7R α 鎖の転写を促進させ、IL-7 への応答性を促進させている可能性が示唆された。ProB 細胞は IL-7 に応答して増殖することから HeyL は ProB 細胞特異的に増殖を促進し、PreBCR シグナルによる HeyL の一過性の発現抑制は IL-7 依存的な増殖を停止するためと考えられる。その後の S-PreB 細胞段階での発現増強は PreB 細胞分化を完結するための因子の発現誘導に関与すると推察する。これらの HeyL の機能には DNA 結合能を有する bHLH ドメインが必須であること証明した。このドメインは HeyL ホモダイマーや他の bHLH を持つ分子とのダイマー形成にも重要であることが報告されている。HeyL の機能は会合する分子に依存するという報告もなされており細胞増殖に関与する時と PreB 細胞分化に関与する時でその会合分子が異なるために標的遺伝子が細胞分化段階によって異なる考える。本研究は HeyL が B 細胞分化における重要な役割を担うことを強く示唆している。その証明には今回作製に成功した HeyL ノックアウトマウスの解析が極めて有効である。このマウスの解析することで B 細胞のみならず免疫系全体の制御の解明に大きく貢献できると確信している。