

## 論文の内容の要旨

論文題目 Activation-induced cytidine deaminase (AID) を介する

メシル酸イマチニブの B 細胞分化抑制作用の解析

氏名 川 俣 豊 隆

Activation-induced cytidine deaminase (AID) は、活性化 B 細胞における免疫グロブリン遺伝子の V (Variable) 領域に点突然変異を導入する体細胞突然変異 (SHM) や、S (switch) 領域と各免疫グロブリンサブクラスの定常 (constant: C) 領域の上流に位置する S 領域の DNA 鎖に切断を入れ、IgM を担う C 領域である  $C\mu$  を欠失させて、IgG や IgA などを持つ定常領域 ( $C\gamma$  や  $C\alpha$  など) とつなぎかえるクラススイッチ組換え (CSR) に必須の酵素である。SHM により免疫グロブリンの抗原に対する多様性や高親和性がもたらされ、CSR により抗原に対する特異性を損なうことなく IgM から IgG や IgA などのサブクラスへ切り替えることが出来る。この AID の変異原性が免疫の多様性をもたらす一方で、B 細胞に限らず、AID が過剰発現することにより、異常な体細胞突然変異や染色体転座を惹起し、腫瘍形成へ関与することが指摘されている。

メシル酸イマチニブ (IM) は、慢性骨髄性白血病の原因遺伝子である BCR-ABL 融合遺伝子の遺伝子産物を標的とした分子標的薬である。慢性骨髄性白血病は、BCR-ABL 融合遺伝子が形成されることにより、ABL チロシンキナーゼが恒常的に活性化され、細胞増殖やアポトーシスを抑制する

すことにより発症する。IMはABLチロシンキナーゼのアデノシン3リン酸(ATP)結合ポケットへのATPの結合を競合的に阻害することにより抗腫瘍効果を発揮する。臨床現場において、IM投与中に免疫グロブリン値の低下をしばしば認めるが、その機序は明らかではない。以前に行なった当研究室での検討では、IM治療中の患者では、インターフェロン(IFN)投与患者と比較して血清IgG、IgA値は低値であったが、血清IgM値に関してはむしろやや高い傾向が認められた。この知見より、IMによりCSRが抑制されている可能性が考えられ、以下の研究を開始した。

マウス脾臓細胞をLipopolysaccharides(LPS)とインターロイキン(IL)-4による共刺激下で37°C、72時間、*in vitro*にて培養を行なうと、IgG1へのCSRが促進される。その際にIMを0、1、2.5、5、7.5、10 $\mu$ M投与したところ、IM濃度依存性にマウス脾臓細胞の表面IgG1発現量の低下が認められ、CSRが抑制されていた。IgG1のCSRには、AIDとIgG1のgermline transcriptの存在が必要不可欠である。リアルタイムPCR法によりこれらのmRNA発現量を検索したところ、AID mRNA発現量はIM濃度依存性に低下が認められたが、IgG1 germline transcriptの低下は認められず、この作用はAIDの発現抑制を介したCSR抑制作用であると考えられた。

次に、*in vivo*において、どのようにIMがCSRを阻害するのか検討を行なった。マウスに羊赤血球(SRBCs)の腹腔内投与による免疫刺激を加えるとCSRが促進されるが、この際にIM 50mg/kgの投与も併せて行なった。SRBCsによる免疫刺激を14日間隔で2回行ない、IM腹腔内投与は21日間継続して行なった。マウスの脾臓を採取して病理組織学的解析を行なった。IMを投与したマウスは投与しなかったマウスと比較して脾臓胚中心が小さく不明瞭であった。また

AID の免疫染色では、IM を投与しなかったマウスでは胚中心の活性化 B 細胞に一致して染色が認められたのに対し、IM を投与したマウスでは染色はわずかにしか認められなかった。リアルタイム PCR 法による脾臓細胞の AID mRNA 発現量は IM 投与により低下を認め、フローサイトメトリーによる脾臓細胞の表面 IgG1 発現量も低下を認めた。以上より、in vivo においても IM による AID 発現抑制を介した CSR 抑制作用が認められた。

次に、レトロウィルスを用いてマウス脾臓細胞に AID を強制発現させたときに IM により抑制された CSR が回復するのか検討を行なった。前述の通り、マウス脾臓細胞を LPS と IL-4 にて 37°C、72 時間、in vitro で培養した際に 10  $\mu$  M IM を投与すると表面 IgG1 発現量の低下を認める。しかし、レトロウィルスを用いて、外因性に AID を強制発現させると 10  $\mu$  M IM 投与時も、0  $\mu$  M IM と同等もしくはそれ以上に IgG1 の CSR が回復を認めた。以上の結果からも、IM による CSR 抑制作用は AID の発現を抑制することにより起こっていると考えられた。

この IM による AID 発現抑制の作用機序を解明するため、AID の発現を調節しているプロモーター領域のうち、特に重要とされる Region2 領域に作用する Pax5、E2A、E2f7、E2f8 の 4 転写因子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した。いずれの 4 因子ともに IM の投与により発現量の低下を認めたが、中でも特に E2A の著明な発現低下を認め、特に重要な役割を果たしていると考えられた。E2A 遺伝子は、E12 と E47 の 2 つの蛋白をコードしているが、ウェスタンブロット法による E47 蛋白発現量を検索したところ、IM 投与により著明な発現低下を認めた。また DNA 親和性沈降解析にて E ボックスに結合している E47 蛋白の発現量の検索も行なったが、こち

らも IM 投与により E47 蛋白の著明な低下を認めた。最後にマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ない、更なる作用経路の解明を行なった。統計学的に有意差の認められた因子はアップレギュレーション 1189 因子、ダウンレギュレーション 257 因子抽出されたが、その中からは抑制経路として特異的な遺伝子群は明らかとはならなかった。C-Ab1 は、様々な因子と連動して B 細胞の分化に重要な役割を果たしており、c-Ab1 から様々な経路を介して、AID の発現に影響している可能性が考えられるが、この IM による AID 抑制作用は、多くのキナーゼ抑制を介した非特異的な経路により誘導された off-target 効果の可能性も考えられる。

AID の過剰発現は、前述の通り腫瘍形成への関与が指摘されているが、その他にも自己免疫性疾患やアレルギー疾患などへの関与も指摘されている。IM は比較的安全な薬剤として日常臨床に用いられており、IM は AID 抑制薬として様々な AID 関連疾患に有用である可能性がある。また IM では AID の完全阻害とまでは行かないが、その作用機序が解明できれば AID 阻害剤の開発へとつながる可能性がある。