

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成 14 年度採択研究代表者

阪口 薫雄

(熊本大学大学院医学薬学研究部感染免疫学講座免疫学分野 教授)

「獲得免疫における高親和性抗体の産生機構と感染症防御への応用」

1. 研究実施の概要

研究目的は獲得免疫応答における抗体の親和性亢進誘導の分子機構を明らかにし、その破綻が引き起こす免疫難病の病態と発症原因を解明することにある。末梢のリンパ組織で盛んに増殖する胚中心 B 細胞に選択的に発現上昇する分子 GANP の機能を遺伝子破壊マウス、過剰発現マウスを用いて解析している。その結果、GANP 分子は抗体の親和性亢進に必要不可欠であること、それは遺伝子の変異誘導と高親和性抗体の選別の 2 つのポイントで機能することを見いだした。また GANP 分子の発現異常がホジキン病の原因となることを初めて確認した。

2. 研究実施内容

- ① 研究目的：本研究では「抗原に特異的な抗体の親和性の亢進による免疫効果の向上」に焦点をあて、その機構を明らかにするとともに、リンパ細胞の高親和性抗体産生機能の飛躍的な上昇を企図した新しい分子治療戦略への基礎研究を行う。本研究の対象は我々の研究室で発見した胚中心 B 細胞関連蛋白質で分子量 210-kDa の核内蛋白質である。この分子は RNA プライマーゼドメインと DNA ヘリカーゼコンプレックスである MCM 複合体と直接結合する活性を有している。この新規分子の機能を解析することによって免疫応答の分子解析に新しいパラダイムを切り開くことが出来る。
- ② 研究方法：(1)GANP 遺伝子欠損マウスの作製を conventional 遺伝子欠損と(2) conditional gene-targeting の両法を並行して進めた。また遺伝子発現の局在を明示する(3)ganp 遺伝子座への GFP 遺伝子ノックインマウスを作製した。(4)ganp 遺伝子欠損マウスで、分子の redundancy が存在するのか、それとも固有の機能を有するのかを明らかにすることとした。(5)遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスではどうかということを並行して解析した。(6)T 細胞依存性抗原 nitrophenyl-chicken γ -globulin (NP-CG) をアジュバントと共に注入し、NP-CG 免疫の場合には成熟胚

中心 B 細胞を純化して VH186.2 の H 鎖と λ 鎖を用いて解析した。(7)抗体の親和性は血清の抗体価を ELISA 法で測定し、VH186.2 の 33WL の点突然変異を測定して指標とした。また、単クローン抗体を産生する(8)ハイブリドーマを樹立してそれぞれ高親和性クローンの抗体を精製し、Biacore による NP 特異的抗体の親和性を K_D 値として測定した。GANP トランスジェニックマウスの高親和性抗体産生の能力は(9)HIV ウイルスの V3 エピトープをモデルとして単クローン抗体を作製して調べた。GANP 欠損による V 領域遺伝子変異導入の差異に関して(10)V 領域遺伝子の DNA double strand breaks (DSBs)を Ligation mediated PCR 法によって解析した。B 細胞は抗原で免疫後、胚中心 B 細胞の成熟分画を純化して行っている。(11)ganp 遺伝子の中央部分に酵母の Sac3 相同な領域が存在する。この部分の機能としてもう一つの Sac3 相同分子 SHD1 を見つけ、その遺伝子の導入による機能増強と、siRNA による遺伝子抑制によって解析し、centrosome の複製に関連するかどうか電子顕微鏡解析によって調べた。(12)GANP トランスジェニックマウスのホジキンリンパ腫の遺伝子解析、V 領域遺伝子の点突然変異、腫瘍細胞型の確定を行った。(13)ヒトの臨床検体における解析は共同研究として行った。(14)その他の臨床検体に関しても共同研究で行った。(16)GANP機能を解析するために細胞内で結合する分子を yeast two-hybrid スクリーニングと TAP ベクターを用いた蛋白質結合分子の MALDI-TOF-MAS によるプロテオミクス解析をおこなった。(17)蛋白質脱リン酸化酵素 PP2A と結合する分子 G5PR に関して conditional targeting による遺伝子破壊マウスを作製した。

③ 研究結果：

1) 「抗原に特異的な抗体の親和性の亢進による免疫効果の向上」に焦点をあて、リンパ細胞の高親和性抗体産生機能の飛躍的な上昇を企図した新しい分子治療戦略への基礎研究を行った。胚中心 B 細胞で選択的に発現が上昇する分子 GANP が T 細胞依存性抗体産生における抗体の親和性亢進に及ぼす機能を明らかにした。GANP は RNA-プライマーゼ活性を有し、MCM 複合体と結合する事から DNA 複製に関わる新規の遺伝子修復機能分子である事が示唆された。(1) GANP 欠損によって高親和性抗体の産生が著しく低下すること (Kuwahara et al., 2004)、(2) GANP 過剰発現によるトランスジェニックマウスでは高親和性抗体の産生が著しく増加することを示した (Sakaguchi et al., 2005)。また、免疫応答において V 領域遺伝子の Double strand DNA breaks が高親和性抗体産生に必要な V 領域体細胞突然変異誘導と密接に関連する事を明らかにした (Kawatani et al., 2005)。(3) この機構での作用標的として i) V 領域突然変異誘導に positive に機能する、ii) V 領域突然変異誘導に補助的に作用する、iii) V 領域突然変異の際の遺伝子障害を防ぐ、iv) 高親和性 BCR 発現 B 細胞を選別する際に関与する、v) 高親和性 BCR を発現する B 細胞の生存、及び長期維持に必要である、等が考えられる。GANP に特異的に結合する

分子の探索を yeast two-hybrid 法によって行い、蛋白質脱リン酸化酵素 G5PR サブユニットを見いだした (Kouno et al.2003)。遺伝子欠損マウスを作製したところ胎生期に致死であった。B 細胞での conditional targeting を行い、B 細胞の BCR 特異的な生存シグナルに重大な欠陥を示していること、BCR 選択的な生存信号を調節していることを明らかにした (Xing et al., 2005)。

2) GANP 遺伝子導入による高親和性抗体産生技術の応用

親和性の高い単クローン抗体を樹立する技術は世界でも類のないものである。この技術を国際的な研究、医療技術、治療薬の開発等に向けて活用するべく基礎研究を展開している。さらに新興、再興感染症に対する診断や予防薬としても活用可能であると期待できるので、その例を示すために国際共同研究を行って高親和性抗体作製を行い有望なクローンを樹立している。

3) GANP 遺伝子欠損による発ガンの分子機構の解析

GANP の機能の異常はその構造上の特徴から遺伝子の障害や修復に大きく影響する事が予想された。GANP 遺伝子のヘテロ欠損や異常な持続発現亢進が様々な遺伝子異常を惹起した。GANP トランスジェニックマウスで B 細胞に過剰発現させると、B 細胞の腫瘍化を来した。マウスのホジキンリンパ腫モデルと診断された。ヒトのホジキンリンパ腫においても GANP の異常な活性化が見られた (Fujimura et al., 2005)。GANP 分子の中央部分が酵母の Sac3 分子と相同性が高い。Sac3 分子は RNA の核外輸送に関わる分子であることが示唆され、この発現異常が遺伝子の相同組み換えに異常を来す。この遺伝子の組み換えの多発が遺伝子の不安定化につながり、癌化に至る可能性が高いと考えられる。そこで、GANP のヘテロ欠損マウスから作製した MEF 細胞の長期培養細胞を樹立した。この細胞は染色体転座の頻度が上昇し、腫瘍化形質を獲得した。同時にマウスのもうひとつの Sac3 相同分子として SHD1 をクローニングし、その機能を明らかにした。細胞分裂の際の centrosome 複製に関与することを見出した (Sefat et al., 2004)。これらから GANP 分子の機能ががん抑制効果を発揮することが明らかになった。

3. 研究実施体制

「阪口」グループ

①研究分担グループ長：阪口 薫雄（熊本大学、教授）

②研究項目：

- (1)GANP 分子による高親和性抗体産生の分子機構の解析
- (2)GANP 遺伝子欠損による発ガンの分子機構の解析
- (3)GANP 遺伝子導入による高親和性抗体産生技術の応用

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文 (原著論文) 発表

- Kageshita T, Kuwahara K, Oka M, Ma D, Ono T, Sakaguchi N. Increased expression of germinal center-associated nuclear protein (GANP) is associated with malignant transformation of melanocytes. *J Dermatol Sci.* 42:55-63, 2006.
- Faisal Mahmudul Huq Ronny, Hideya Igarashi and Nobuo Sakaguchi. BCR-crosslinking induces a transcription of protein phosphatase component G5PR that is required for mature B-cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340:338-346, 2005.
- Yamashita T, Inui S, Maeda K, Hua DR, Takagi K, Fukunaga K, Sakaguchi N. Regulation of CaMKII by alpha4/PP2Ac contributes to learning and memory. *Brain Res.* In press.
- Yousuke Kawatani, Hideya Igarashi, Takeshi Matsui, Kazuhiko Kuwahara, Satoru Fujimura, Nobukazu Okamoto, Katsumasa Takagi, and Nobuo Sakaguchi. Double-stranded DNA breaks in the *immunoglobulin V-region* gene were detected at lower frequency in affinity-maturation impeded GANP^{-/-} mice. *J. Immunol. Cutting Edge*, 175: 5615-5618, 2005.
- Xing, Yan, Hideya Igarashi, Xiaodan Wang, and Nobuo Sakaguchi. Protein phosphatase subunit G5PR is needed for inhibition of BCR-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, 202:707-719, 2005.
- Kazuhiko Maeda, Yoshihiro Baba, Yoshinori Nagai, Kozo Miyazaki, Alexander Malykhin, Koji Nakamura, Paul W Kincade, Nobuo Sakaguchi, and Mark K. Coggeshall. IL-6 blocks a discrete early step in lymphopoiesis. *Blood*, 106: 879-885, 2005.
- Takeshi Yamashita, Seiji Inui, Kazuhiko Maeda, Rong Hua Ding, Katsumasa Takagi, and Nobuo Sakaguchi. The heterodimer of a4 and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330:439-445, 2005.
- Satoru Fujimura, Yan Xing, Motohiro Takeya, Yasuyuki Yamashita, Koichi Ohshima, Kazuhiko Kuwahara, and Nobuo Sakaguchi. Increased Expression of GANP RNA-Primase Is Associated with Lymphomagenesis. *Cancer Res.*, 65: 5925-5934, 2005.
- Hideya Igarashi, Kay L. Medina1, Takafumi Yokota, Isabel D. Rossi, Nobuo Sakaguchi, Philip C. Comp and Paul W. Kincade. Early Lymphoid Progenitors in Mouse and Man are Highly Sensitive to Glucocorticoids. *Int. Immunol.* 17:501-511, 2005.
- Nobuo Sakaguchi, Tetsuya Kimura, Shuzo Matsushita, Satoru Fujimura, Junji Shibata, Masatake Araki, Tamami Sakamoto, Chiemi Minoda, and Kazuhiko Kuwahara. Generation of High-Affinity Antibody against T Cell-Dependent Antigen in *Ganp* Gene-Transgenic Mouse. *J. Immunol.*, 174: 4485-4494, 2005.