

「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確認している。

2. 研究実施内容

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。これまでに全く明らかになっていない機能が予想されるため、探索的でありながら着実に解析を進めていくことが必要であると考えている。

研究方法：

研究方法(1)から(17)までは昨年度より引き続き研究を推進している。本年度は、(18)現在もう一つの分子 MEP50/PRMT5 が GANP と結合するコンプレックスを形成することが明らかになりつつあり、そのコンプレックスの果たす機能に付いての解析を進めている。(19)遺伝子修復における GANP の機能を *in vitro* の相同組み替えベクターを用い

て解析した。同時に Ig 遺伝子の RAG による遺伝子再構成における機能も調べた。(20) ニワトリ B 細胞である DT40 細胞を用いて GANP 遺伝子発現が Ig 遺伝子の **gene conversion** に及ぼす影響を調べた。(21) Ig 遺伝子クラススイッチにおける違いを遺伝子破壊マウスの B 細胞を用いて *in vivo* と *in vitro* で測定した。(22) GANP 欠損マウスの自然発がんに関して解析した。これらを継続して行うとともに(23)さらに、その他の腫瘍における GANP 発現異常を解析し、どのようなメカニズムで GANP 発現が生じるのか、そしてそれがどのような機序によって発癌に至るのかを解明する糸口とした。

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推進している。これまでの研究成果より、GANP の発現は免疫応答では胚中心 B 細胞で上昇しその結果、高い親和性の B 細胞がより選択的に成熟する。胚中心で高親和性 B 細胞が生まれ、選別され、高親和性抗体を産生する過程は大別して 2 つのステージが必要であると考えられる。第一は V 領域遺伝子に体細胞突然変異が誘導され、高親和性の変異が効率に誘導される為の遺伝子変化のステージである。ここでは AID によるシトシンからウラシルへの変換がその第一ステップと考えられている。第二は高親和性 B 細胞クローンが胚中心で選別されるステージである。単に V 領域の変異誘導を変化させるだけで果たして高親和性抗体の産生が十分であるとはいえない。効率的に高親和性でクラススイッチした抗体産生を誘導する為にはこの第二のステージにおける **Selection** も重要であると考えられる。ことに第一のステージでの変異誘導では抗体の特異性を変換させて、自己抗原に反応するクローンも派生してくる可能性がある。自己免疫反応の回避にはこの第二のステージは正しく維持されなければならない。本研究はこのような観点から、GANP 分子の機能がどのステージを標的としているのかの確定を目指している。そこで、V 領域遺伝子の多様性獲得への直接的な機能として *in vitro* での細胞移入実験による V 領域遺伝子の **gene conversion** にたいする効果を調べた。その結果、GANP 分子を高発現させるとニワトリの DT40 細胞株で著しく **gene conversion** を誘導する効果があることを示した。GANP 分子は AID の作用の後に V 領域遺伝子の修復の際に **gene conversion** を効率的に保護し、V 領域の多様性を高める効果がある事を直接的に示す結果となった。

以上、GANP 分子は(1) V 領域遺伝子の体細胞突然変異に促進的に機能する、(2) AID によって生じたシトシンからウラシルへの変換領域の修復過程で DNA の相同組み替えに抑制的に機能する、(3) GANP はまた、ニワトリ B 細胞の多様性では **gene conversion** を促進し、その経路は GANP 固有の経路を介する事が示唆された。(4) また AID の誘導するクラススイッチにおいても S-領域への AID 攻撃の後の修復で GANP 分子が制御機能を有する事を明らかにした。これらの機能は高親和性 B 細胞産生の第

一ステージでの機能である事が明らかになった。

GANP の第二のステージにおける機能は間接的であると考えている。GANP に結合する分子として G5PR を見いだしているが、この分子はタンパク質脱リン酸化酵素である PP2A と直接結合する。G5PR は胚中心 B 細胞で発現が上昇する。その上昇は CBA/N マウスでは見られないことから、BTK 信号伝達を必要とする。末梢の B 細胞が生存する為には抗原受容体からの信号で細胞を選別する際に細胞死を抑制しておかなければならない。我々のモデルは、G5PR は抗原刺激で発現が誘導され、誘導された後は JNK の活性化を過剰に進まない様に制御する。その結果、B 細胞の細胞死を抑制し、ERK を介する増殖シグナルによって高親和性 B 細胞が選択的に増殖できる様に促しているものと考えている。

この両者の機能が胚中心 B 細胞の高親和性誘導における主要なものと考えて、現在とりまとめを行っている。

2) GANP 遺伝子導入による高親和性抗体産生技術の応用

今年度の顕著な成果として、肝癌細胞を標的とする分子解析において高親和性抗体技術が優れた高親和性抗体を生み出す可能性があることを実証したということである。肝癌細胞株に対する単クローン抗体を本研究で作製した GANP トランスジェニックマウスを用いて行ったところ、従来の方法では検出できない新たな分子標的と目される分子を検出する事が可能になった。これらは本研究の基盤成果を広く、応用展開する事の一つの先導的研究と位置づけ、次年度に向けて発展させていく。

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たす。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。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十分予想される。本研究の成果として学内に発明申請を行った。特許取得を行い、がん抑制効果の実証試験の環境を整備する。ヒトあるいはマウスにおけ

る RNA の核外輸送はこれまであまり解析が進んでいない。GANP 分子が実際に mRNA の核外輸送に関与する基本分子であることが実証されれば、がん研究のみならず多くの遺伝子病の解明にも新たな展開をもたらすものと期待できる。今年度の解析から GANP の発現異常がメラノーマなど、様々な臓器や組織の腫瘍と関連する事が示唆された。

3. 研究実施体制

(1)「阪口」グループ

①研究者名

阪口 薫雄(熊本大学 教授)

②研究項目

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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Ezaki T, Kuwahara K, Morikawa S, Shimizu K, Sakaguchi N, Matsushima K, Matsuno K. Production of two novel monoclonal antibodies that distinguish mouse lymphatic and blood vascular endothelial cells. *Anat. Embryol.* 211:379-393, 2006.
- 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.* 1082:1-10, 2006.
- 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.
- Huq Ronny FM, Igarashi H, Sakaguchi N. BCR-crosslinking induces a transcription of protein phosphatase component G5PR that is required for mature B-cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340:338-46, 2006.