

# B 細胞が肺炎球菌などに反応して活性化する仕組みを解明

—シグナル伝達を担うアダプター分子 CIN85 の機能が明らかに—

< *The Journal of Experimental Medicine* 7 月 4 日号に掲載 >

黒崎知博(免疫学フロンティア研究センター 分化制御研究室)

米谷耕平(理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター分化制御研究グループ)

## 本研究成果のポイント

- B 細胞が病原体成分に反応して抗体を産生するためには CIN85 が必須
- CIN85 が B 細胞抗原受容体からのシグナルを転写因子 NF- $\kappa$ B へ伝達
- アレルギーや自己免疫疾患、リンパ腫の病態解明・治療への手がかり

## 1. 背景

私たちの体は、細菌やウイルスなどの異物（抗原）が侵入すると、体を防御するためにさまざまな反応を示します。B 細胞による抗体の産生はその 1 つです。B 細胞は、細胞の表面にある B 細胞抗原受容体 (BCR) <sup>※7</sup> で抗原を認識すると、細胞内に増殖、分化、活性化を引き起こすシグナルを伝達します。シグナルは多様な経路で伝わり、細胞の運命を決定する転写因子を活性化します。BCR からのシグナル伝達が欠如すると、B 細胞は活性化できず抗体を作れなくなるため、免疫不全に陥ります。逆に、過剰な活性化はアレルギーや自己免疫疾患、リンパ腫といった疾患を引き起こす原因となります。そのため、BCR からのシグナル伝達経路を解明することは、これらの疾患の原因を突き止めたり、治療法を開発したりする上でも非常に重要です。

1998 年に研究グループは、BLNK と呼ばれるアダプター分子が、BCR からのシグナルを伝達するために重要な役割を果たすことを突き止めていました。しかし、この BLNK が、その後どんな分子の修飾を受けて B 細胞を活性化させるかについては不明のままでした。そこで、BLNK と結合するタンパク質を探索し、B 細胞のシグナル伝達のメカニズム解明に挑みました。

## 2. 研究手法と成果

研究グループは酵母を用いた分子生物学の手法により、BLNK に CIN85 と呼ばれる別のアダプター分子が結合することを発見しました。そこで、この CIN85 が B 細胞のシグナル伝達において重要な機能を発揮しているのではないかと考え、B 細胞だけで CIN85 を欠損したノックアウトマウスを作製し、この CIN85 欠損マウスと野生型マウスを比較しました。

まず、野生型マウスと CIN85 欠損マウスに II 型 T 細胞非依存的抗原 (TI- II 抗原 : ティーアイトー抗原) を投与し、産生する抗体の量を測定しました。TI- II 抗原は、肺炎球菌の細胞壁の一番外側の被膜 (莢膜 : きょうまく) に存在する、細菌成分に代

表される抗原です。測定の結果、野生型では抗原を認識し、抗体を産生しましたが、CIN85 欠損マウスでは抗体を産生しませんでした (図 1)。このことは、CIN85 が抗体産生に必須であることを示しています。

次に、細胞外からのどのような刺激が CIN85 に作用するのかを突き止めるために、野生型マウスと CIN85 欠損マウスの B 細胞を精製し、B 細胞を活性化させるさまざまな活性化因子を加えて試験管内で一緒に培養しました。その結果、野生型マウスの B 細胞では、加えた全ての活性化因子に反応したのに対し、CIN85 欠損マウスの B 細胞では、BCR からの活性化因子に対して反応を示しませんでした (図 2)。このことは、CIN85 欠損マウスでは BCR からのシグナルを伝達できず、免疫反応を引き起こすことができなかつたことを示しています。

細胞内には BCR からのシグナルを多方面へ伝えるさまざまなシグナル伝達経路が存在していますが、CIN85 がどのシグナル伝達経路で働いているかを明らかにするために、詳細な生化学的解析を行ないました。その結果、CIN85 が欠損していると、転写因子の 1 つである NF- $\kappa$ B が活性化しないことが分かりました (図 3)。

さらに、CIN85 欠損マウスで認めた異常が、本当に NF- $\kappa$ B を活性化しないことが原因であると確認するために、CIN85 欠損マウスに NF- $\kappa$ B を強制的に活性化させることのできる活性化型 IKK $\beta$  という分子を導入しました。その結果、活性化型 IKK $\beta$  を導入した CIN85 欠損 B 細胞は、低下していた BCR に対する応答性を取り戻し、また、TI-II 抗原に対する抗体産生能も回復しました (図 4)。

これらの実験結果から、CIN85 欠損マウスが示した免疫応答の低下は、BCR からのシグナル伝達を CIN85 が担えなくなり、NF- $\kappa$ B を活性化させられなくなったためであると証明できました。つまり、B 細胞が TI-II 抗原に反応し抗体を作り出すためには、CIN85 が BCR からのシグナルを転写因子 NF- $\kappa$ B に伝達する必要があることが分かりました (図 5)。

### 3. 今後の期待

今回の結果から、CIN85 が正しく機能しないと、肺炎球菌などの細菌に対する免疫応答を引き起こせなくなることが判明しました。このことは、免疫不全の原因が CIN85 の機能不全にあるという可能性を示しています。逆に、もし CIN85 が過剰に働いてしまうと、B 細胞の異常な活性化を引き起こし、アレルギーや自己免疫疾患、リンパ腫などの疾患を引き起こす可能性も考えられます。特に NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路では、その関連遺伝子の異常がリンパ腫を引き起こすことが知られており、創薬の面からも非常に注目されます。今回、CIN85 による BCR から NF- $\kappa$ B へのシグナル伝達経路を明らかにしたことにより、CIN85 は免疫疾患の創薬開発における新たな標的分子となることが期待されます。

## <補足説明>

### ※1 B 細胞

免疫細胞の一種で、表面にある B 細胞抗原受容体 (BCR) と呼ばれるタンパク質で病原体などの抗原を認識し、抗体を産生する。

### ※2 抗体

B 細胞が分泌するタンパク質で、抗原に結合し生体防御に働く。抗体が結合した抗原は破壊されたり、体から排除されたりする。

### ※3 アダプター分子

細胞表面の受容体と細胞内のシグナルとを橋渡しする役割を持つ分子のこと。アダプター分子自体は酵素活性を持たないが、種々のタンパク質結合構造を持ち、この構造にシグナル伝達分子が結合することで、細胞内シグナルネットワークに情報が伝わる。

### ※4 NF- $\kappa$ B

nuclear factor kappa B の略で、核内転写因子の一種。活性化されると核内に移行し、染色体上の特異的な DNA モチーフに結合し、さまざまな遺伝子の転写を開始する。NF- $\kappa$ B は、免疫及び炎症反応、あるいは腫瘍形成の制御に重要な役割を果たす。

### ※5 転写因子

遺伝子の働きをオンにしたりオフにしたりする機能を持つタンパク質。DNA の転写を制御する領域に結合し、遺伝子発現のタイミングや量を調節する。

### ※6 II 型 T 細胞非依存的抗原 (TI-II 抗原)

多くの抗原に対しては、T 細胞が寄与して抗体産生が誘導されるが、TI-II 抗原に対しては、T 細胞の寄与がなくても B 細胞は活性化することができる。細菌の莢膜 (きょうまく) に存在する多糖に代表されるように、繰り返し配列を持つことが特徴。

### ※7 B 細胞抗原受容体 (BCR)

B 細胞が細胞表面にもつ受容体。1 つ 1 つの B 細胞の BCR はそれぞれ異なった抗原特異性を持ち、無数ともいえる抗原に反応できる。

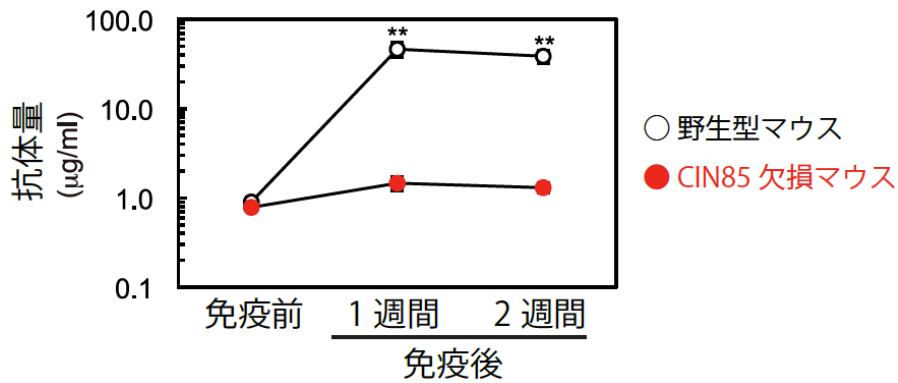


図1 CIN85 欠損マウスは TI-II 抗原に対する抗体産生が低下している

抗体産生能を測定するために、野生型マウスあるいは CIN85 欠損マウスに TI-II 抗原を投与した。免疫 1 週間後、2 週間後に血清を採取し、抗原に対する抗体量を測定した。野生型マウスは免疫により抗体の産生が認められたが、CIN85 欠損マウスでは認められなかった。この結果から、CIN85 は TI-II 抗原に反応する上で必須であることが分かった。

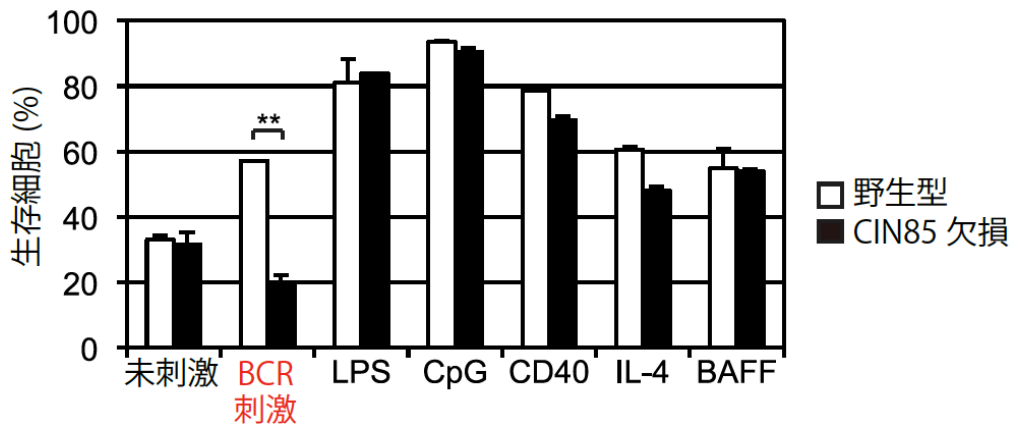


図2 CIN85 欠損マウスの B 細胞は BCR からの刺激に反応できない

細胞外からのどのような刺激に対して CIN85 が働くのかを突き止めるために、B 細胞をさまざまな活性化因子と共に試験管内で培養し、48 時間後に生き残っている細胞の割合を測定した。野生型マウスの B 細胞では、未刺激と比較して、全ての活性化因子で生存細胞数の割合が増加しているのに対し、CIN85 欠損マウスの B 細胞では、BCR 刺激に対する生存細胞数が減少していた。このことから、CIN85 は BCR からのシグナルを伝達するのに必須であることが分かった。

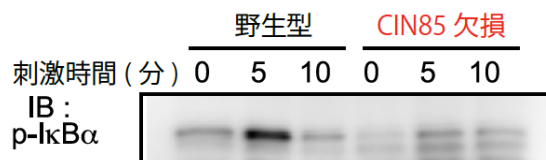


図 3 CIN85 欠損マウスの B 細胞は NF-κB の活性化が低下している

CIN85 欠損マウスが伝達するシグナル経路を同定するために、B 細胞に BCR から刺激を加え、細胞内のタンパク質の活性化を測定した。野生型は刺激 5 分後に、NF-κB の活性化を示す p-IκBα のリン酸化 (黒いバンド) を認めたが、CIN85 欠損では認められなかった。このことは、CIN85 が NF-κB を活性化させるために必須な役割を果たしていることを示している。

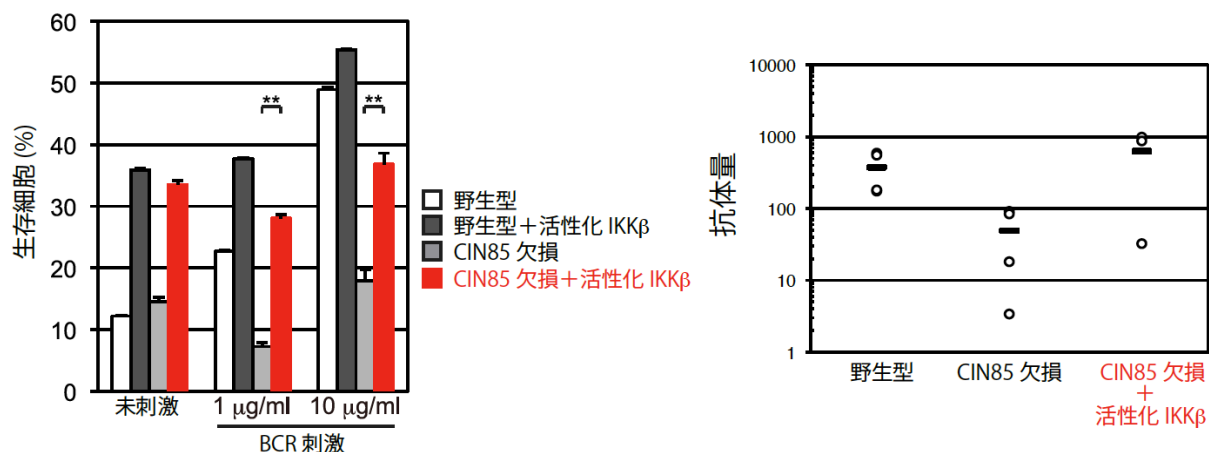


図 4 CIN85 欠損マウスで低下した免疫応答は活性化型 IKKβ で回復する

CIN85 欠損マウスの表現型が、NF-κB 経路のシグナル伝達の障害によるものであることを確認するために、直接 NF-κB を活性化させることのできる活性化型 IKKβ を CIN85 欠損マウスに導入して観察した。CIN85 欠損マウスで認めた生存細胞数と抗体量の減少は、活性化型 IKKβ により野生型と同程度にまで回復したことから、CIN85 が BCR からのシグナル伝達を NF-κB に伝えていることを示している。

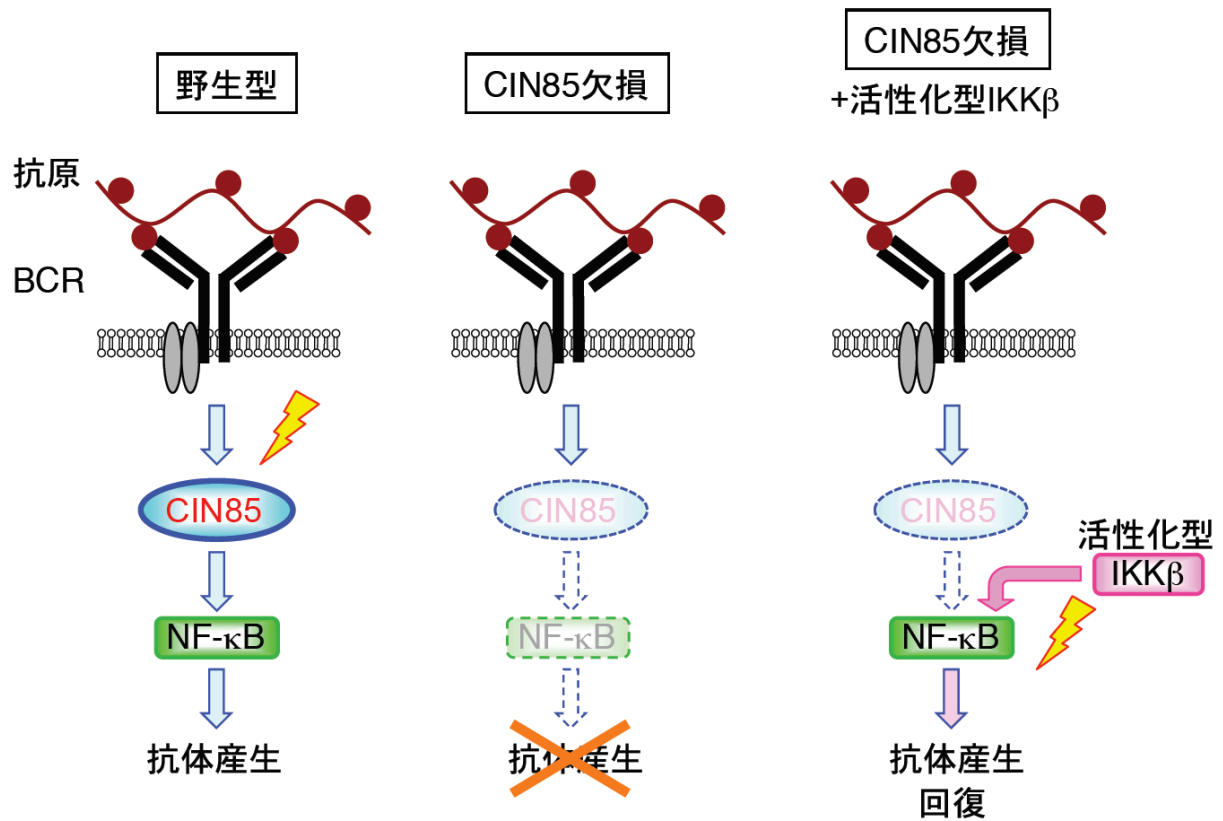


図5 CIN85はBCRからのシグナルをNF- $\kappa$ Bに伝達する

左：野生型では抗原によるBCRからのシグナルがCIN85を通じてNF- $\kappa$ Bに伝達され抗体産生を引き起こす。

中：CIN85欠損ではBCRからのシグナルがNF- $\kappa$ Bに伝達されず抗体産生が起きない。

右：CIN85欠損に活性化型IKK $\beta$ を導入すると、CIN85が存在しなくてもNF- $\kappa$ Bが活性化され、抗体産生が回復する。

CIN85の働きが活性化型IKK $\beta$ で代償できたことから、CIN85がNF- $\kappa$ Bを活性化していることが分かった。