

平成 24 年度 博士論文

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

東京大学大学院 医学系研究科

医学博士課程 内科学専攻 血液・腫瘍病態学

指導教員 : 東條 有伸 教授

川俣 豊隆 (学籍番号 41-097403)

目次

1. 要旨	3
2. 序文	4
3. 目的	13
4. 方法	15
5. 結果	27
6. 考察	51
7. 結論および今後の展望	62
8. 引用文献	63
9. 謝辞	73

1. 要旨

Activation-induced cytidine deaminase(AID)は、活性化 B 細胞における体細胞突然変異(SHM)や、クラススイッチ組換え(CSR)に必須の酵素である。AID の過剰発現が、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。

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 融合遺伝子の産物に対する分子標的薬である。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。

今回私は、IM が AID の抑制を介した CSR 抑制作用を有し、AID 発現調節因子の中でも特に E2A が重要な役割を果たしていることを示した。

2. 序文

各種造血細胞のうち、B細胞は、液性免疫の中心的役割を果たしており、抗体産生などの役割を担っている。B細胞は、造血幹細胞からリンパ球系幹細胞を経て、プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未熟B細胞、成熟B細胞、形質細胞へと分化していくが、その間に抗体産生の多様性をもたらすいくつかの遺伝子再構成を経ていく (Figure 1)。B細胞の初期分化は、胎生期には主に胎児肝臓で、生後は主に骨髄で起こり、この場で未熟B細胞まで分化する。この初期分化の期間に、抗体の多様性に重要な役割を果たす免疫グロブリン遺伝子再構成が起こる。まずはプロB細胞から大型プレB細胞へ分化する際に、免疫グロブリン重鎖 (Heavy chain:H鎖) に位置する、多数ある V (Variable) 領域、D (Diversity) 領域、J (Joining) 領域の遺伝子断片からそれぞれ任意の遺伝子断片が一つずつ選択され、DNA 組換え結合により、一つのエクソンが形成される (V-D-J 遺伝子再構成)。次に小型プレB細胞の段階において、H鎖の V-D-J 遺伝子再構成と同様にして、軽鎖 (Light chain:L鎖) 遺伝子 (κ/λ) の V-J 遺伝子再構成が起こる。これにより B細胞は、IgM を発現するようになり、その後、IgM と同じ抗原特異性を持つ IgD をも発現するようになる。更に、分化の場を骨髄から脾臓やリンパ節などの末梢リンパ組織へと移し、IgM よりも IgD の発現が高い成熟 B細胞へと分化する。また成熟 B細胞は、末梢リンパ組織の濾胞胚中心

において、抗原刺激により活性化され、体細胞突然変異 (Somatic hypermutation:SHM) とクラススイッチ組換え (Class switch recombination:CSR) により、より多様性に富んだ抗体産生能を獲得し、形質細胞へと分化していく。

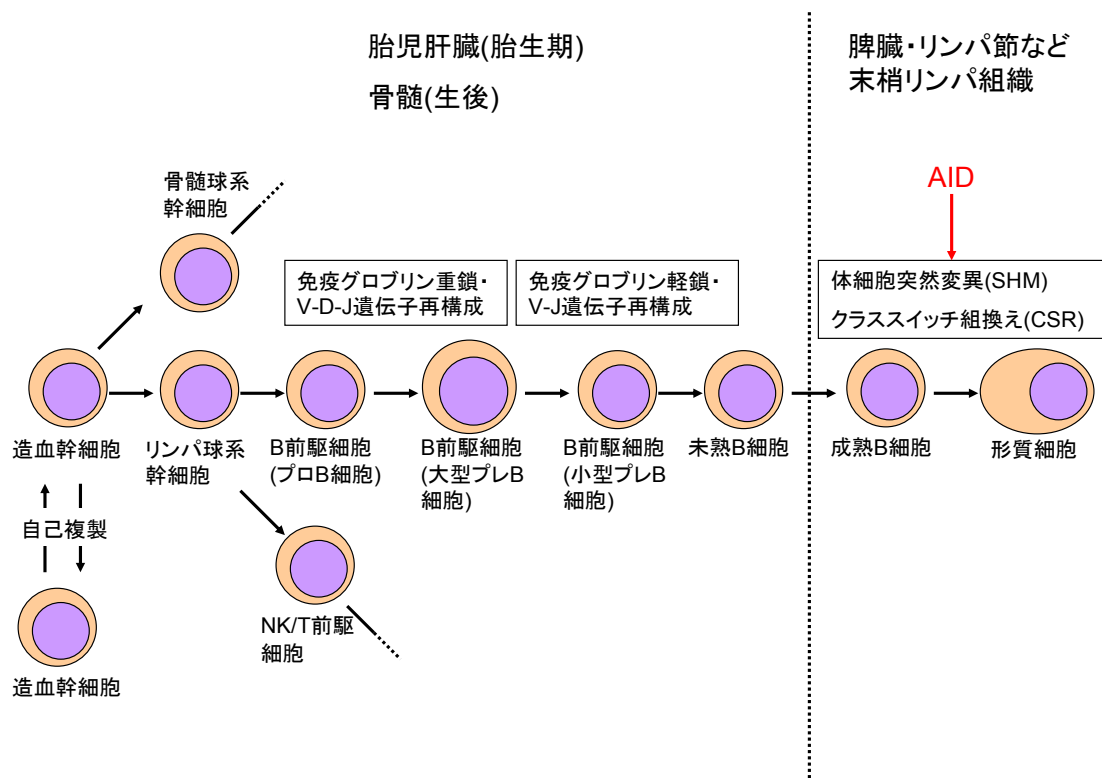
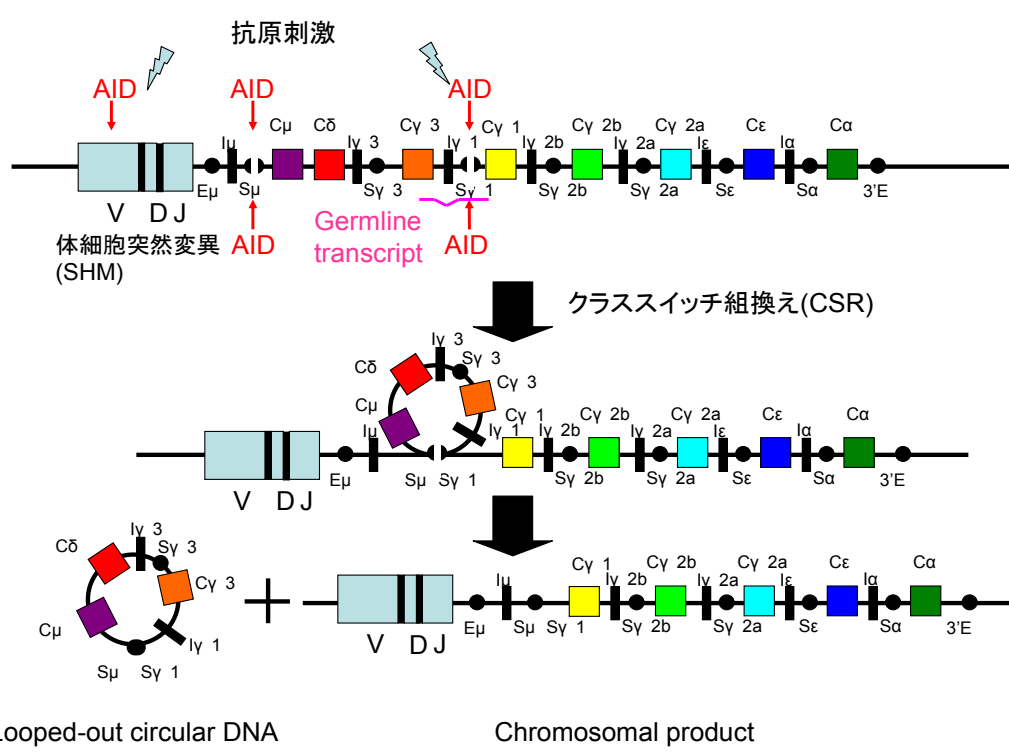


Figure 1 B細胞分化と遺伝子再構成

AID は、apolipoprotein B (apoB) の mRNA 編集酵素である apolipoprotein B mRNA-editing enzyme、catalytic polypeptide 1 (APOBEC-1) のホモログとして報告され [1]、活性化 B 細胞における免疫グロブリンの体細胞突然変異

(Somatic hypermutation:SHM) や、クラススイッチ組換え (Class switch recombination:CSR) に重要な役割を果たしている [2]。体細胞突然変異 (SHM) は、免疫グロブリン V(variable) 領域に点突然変異を導入する反応で、変異が導入された V 領域遺伝子のうち有用なものが選択される選別機構と協調して、免疫グロブリンの多様性と抗原への高親和性をもたらす親和性成熟に寄与している。また、クラススイッチ組換え (CSR) は、S (switch) 領域と各免疫グロブリンサブタイプの定常 (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 μ を欠失させて、IgG や IgA を担う定常領域 (C γ や C α など) をつなぎかえる反応である。これにより B 細胞は抗体の抗原特異性を変えることなく、IgM から IgG や IgA へと抗体のサブクラスを切り替えることが出来る [3-4] (Figure 2)。AID はこの CSR における DNA 鎖切断を誘導している [3-5] (Figure 3)。

AID 発現調節については、様々な調節因子があり、Aicda 遺伝子の 5' プロモーター領域への作用が報告されている [6]。現在までのところ、Aicda 遺伝子のプロモーター領域は 4 つ報告されているが、中でも特にファーストイントロンに位置する Region2 領域が、その発現調節に特に重要な役割を果たしている。この Region2 領域には、AID の抑制因子として働いている c-Myb や E2f、B 細胞特異的な活性化因子である Pax5 や E2A などの結合部位がある (Figure 4)。



Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;92(22):12620–12633,と*Adv Immunol.*2007;94:1–36.より抜粋・改変[3–4]

Figure 2 体細胞突然変異 (SHM) と IgG1 へのクラススイッチ組換え (CSR)

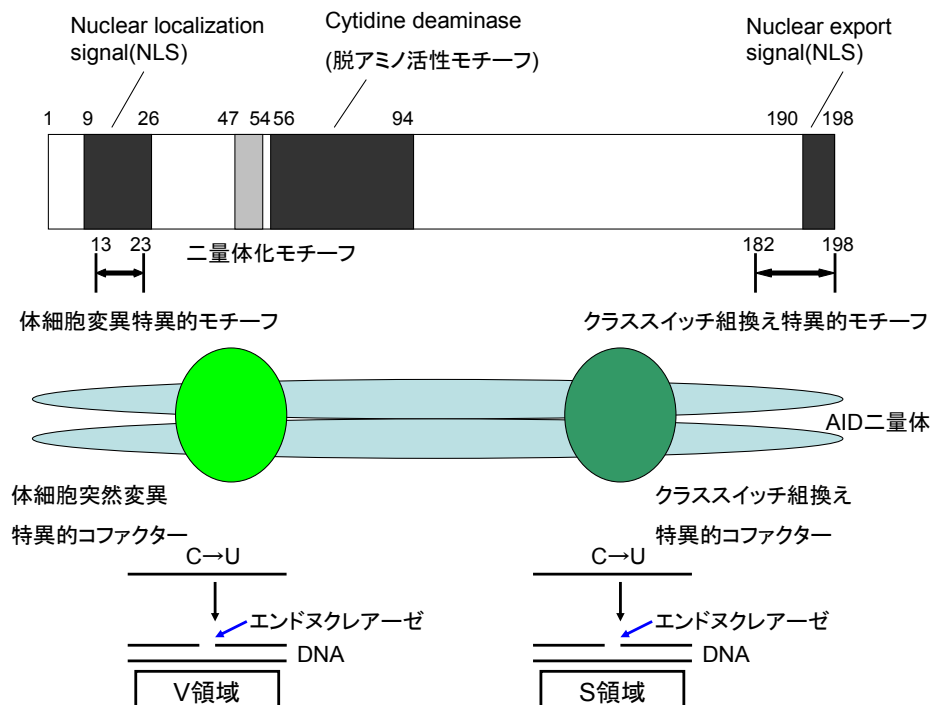


Figure 3 AID 蛋白質の構造と DNA 切断

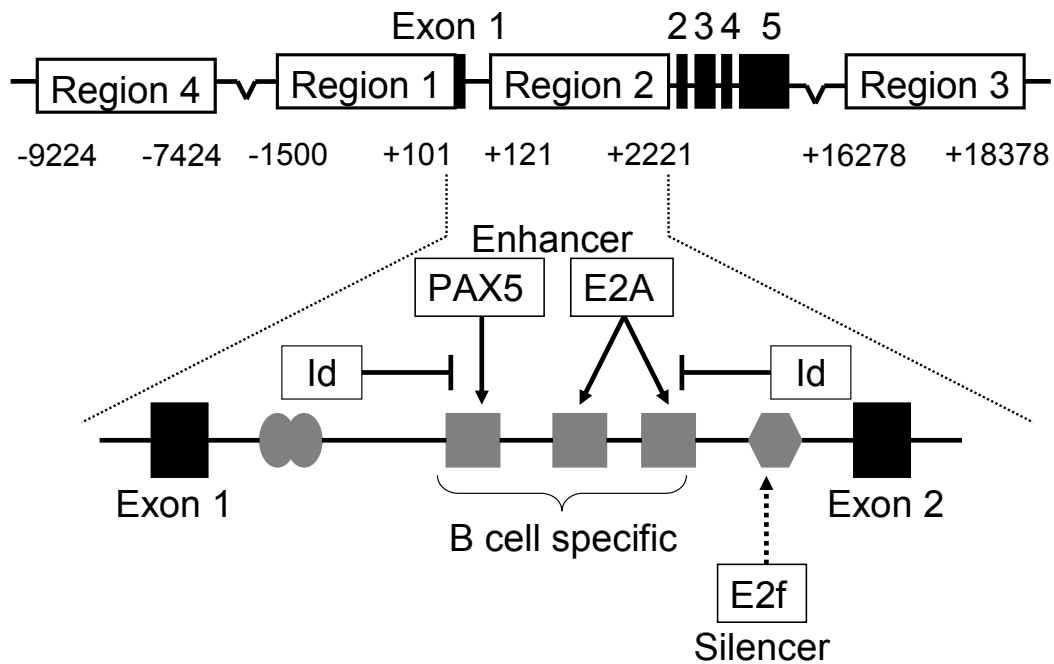


Figure 4 Aicda 遺伝子プロモーター領域、特に Region2 領域にフォーカスした
模式図

しかし、この AID の変異原性は B 細胞の免疫グロブリン遺伝子内のみに留まらず、その過剰発現により染色体転座や異常な体細胞変異を起こし、腫瘍形成への関与が指摘されている [7-9]。悪性リンパ腫や慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病などのリンパ系悪性腫瘍 [10-13] はもちろん、胃癌 [15] や乳癌 [16] においても、AID との関連が指摘されている。AID の過剰発現をコントロールすることが可能となれば、腫瘍形成を抑制できる可能性がある。

悪性腫瘍	文献
造血器腫瘍	
B細胞腫瘍	
悪性リンパ腫	Blood.2003;101(9):3574-3580 [10]
慢性リンパ性白血病	Blood.2003;102(9):3333-3339 [11]
Ph陽性急性リンパ性白血病	J Exp Med.2007;204(5):1157-1166 [12]
慢性骨髄性白血病・急性転化	Cancer Cell.2009;16:232-245 [13]
T細胞性腫瘍	
成人T細胞性白血病?	Carcinogenesis.2011;32(1):110-119 [14]
固形腫瘍	
胃癌	Nat Med.2007;13(4):470-476 [15]
乳癌	Cancer Res.2006;66(8):3996-4000 [16]
肝細胞癌	Adv Immunol.2011;111:109-141 [17]
大腸癌	Adv Immunol.2011;111:109-141 [17]
胆管細胞癌	Adv Immunol.2011;111:109-141 [17]

Table 1 AID との関係が指摘されている悪性腫瘍

慢性骨髄性白血病 (CML) は、造血幹細胞レベルにおいて染色体相互転座 $t(9;22)(q34;q11.2)$ が起こり、22 番染色体上 (22q11) の BCR 遺伝子と 9 番染色体上 (9q34) の ABL 遺伝子が結合し、BCR/ABL 融合遺伝子が形成されることで発症する。この転座により形成される 22q-染色体のことを Philadelphia (Ph) 染色体という。BCR/ABL 融合遺伝子は、CML 以外でも急性リンパ性白血病 (Acute lymphoblastic leukemia: ALL) の一部においても認められる。BCR/ABL 融合遺伝子産物は、切断点によりいくつかのアイソフォームが存在するが、CML の多くは BCR 遺伝子の切断点がエクソン 12~16 の major-break point cluster

region(M-BCR)に集中し、分子量 210kDa の p210 Bcr/Abl 蛋白が産生される。また、Philadelphia 染色体陽性急性リンパ性白血病(Ph+ALL)の多くは、BCR 遺伝子の切断点はエクソン 1~2 の minor-break point cluster region(m-BCR)に集中し、p190 Bcr/Abl 蛋白が産生される(Figure 5)。いずれのアイソフォームも BCR/ABL 融合遺伝子が形成されることにより、ABL 遺伝子のチロシンキナーゼ活性が恒常的に活性化状態となり、白血球や血小板の増殖亢進、アポトーシスの抑制などが起こり、白血病化する。

メシル酸イマチニブ(Imatinib mesylate:IM)は、この BCR/ABL 融合遺伝子の遺伝子産物を標的として開発された分子標的薬で、第1世代チロシンキナーゼ阻害剤(Tyrosine kinase inhibitor:TKI)である。IMは、Abl チロシンキナーゼ

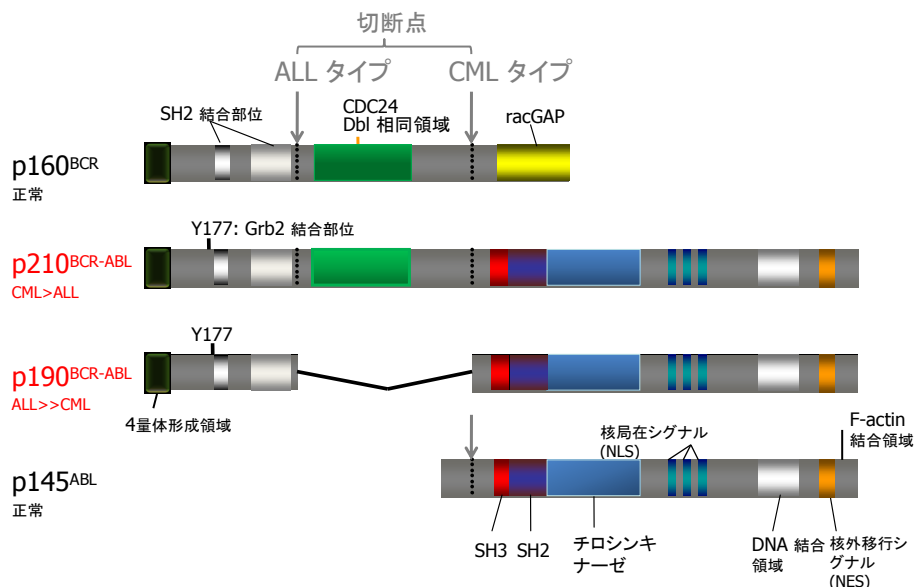


Figure 5 正常 BCR 蛋白質、ABL 蛋白質と BCR/ABL 融合蛋白質アイソフォーム

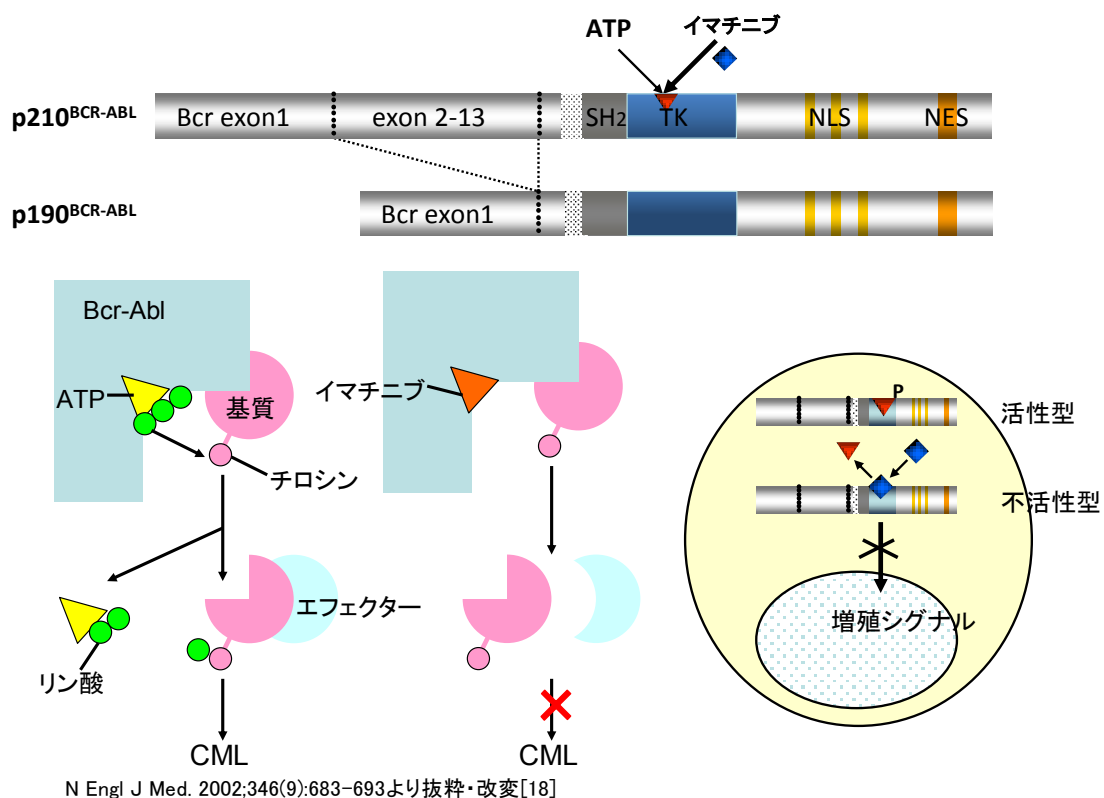


Figure 6 メシル酸イマチニブの作用点

のチロシン残基のアデノシン三リン酸(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(Figure 6)。IMはBCR/ABL融合遺伝子以外にも、ABL、ARG、KIT、PDGFR、DDR1、NQO2などの遺伝子産物も阻害することが知られている。その他にも、現在までのところ、IMはT細胞の増殖抑制やエフェクター効果阻害など様々な免疫調節作用が指摘されている[19-20]。

またIM投与中のCML患者において、低ガンマグロブリン血症の併発をしばし

ば認めるが、依然としてその機序は解明されていない。IM 投与による低ガンマグロブリン血症では、IM 投与前と比較して、投与後は IgG、IgA、IgM ともに低下を来たすとの報告がある[21-22]が、当教室において、治療中の CML 患者の免疫グロブリン値をインターフェロン(IFN) α 治療群と IM 投与群で比較したところ、IgG、IgA に関しては有意に IM 投与群の方が IFN α 治療群よりも低かったが、IgM に関しては、IM 投与群はむしろ高値であり[23]、IM により CSR が抑制されている可能性が考えられた。

今回、私は、マウスの脾臓 B 細胞を用いて *in vivo* 及び *in vitro* において IM が AID の発現を抑制し、CSR を阻害することを見出し、その作用機序を解明すべく以下の検討を行なった。

3. 目的

これまでメシル酸イマチニブ(IM)のT細胞や樹状細胞への作用については報告があるが[19-20]、B細胞への直接的な効果については詳細な検討はなされていない。IMによる低ガンマグロブリン血症など、IMの液性免疫への影響をB細胞の面から検討すべく、マウスの脾臓B細胞を用いて、今回の研究を開始した。

3-1 in vitroでのマウス脾臓B細胞を用いたIMによるCSR抑制作用の検討

マウスの脾臓B細胞をLipopolysaccharides(LPS)とInterleukin(IL)-4による共刺激を加えながら培養するとIgG1へのCSRが促進される[1]。その際にIMを加えることにより濃度依存性にCSRが阻害されることを見出した。CSRが起こる際に最低限必要とされる因子はAIDとGermline transcriptの発現であり、AIDとIgG1のgermline transcript mRNAの発現検索と、細胞増殖・アポトーシスの状態についても解析をし、CSR阻害作用がAID抑制作用によるものであるか検討した。

またCSRの解析に汎用されるマウスリンパ腫細胞株であるCH12F3-2を用いて、IL-4とTGF- β 1、CD40Lによる共刺激を加えながら培養を行ない、IMによるIgAへのCSR阻害作用についても検討を行なった。

3-2 in vivoにおけるIMによるCSR抑制作用の検討

マウスに羊赤血球(Sheep red blood cells:SRBC)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[2]。その際にIMを投与することによりin vivoにおいてもCSRが阻害されるのか、検討した。またその際のマウス脾臓を採取し、胚中心の形態とAIDの発現について、病理組織学的な検討を行なった。

3-3 in vitroにおける、外因性にAIDを強制発現させた際のIMのCSR抑制作用についての検討

レトロウイルスベクターを用いて、マウス脾臓B細胞にAIDを強制発現させることにより、IMにより抑制されたCSRが回復しうるのか、検討を行ない、その際の細胞増殖やアポトーシスの状態についても検討を行なった。

3-4 IMによるAIDを介したCSR抑制作用の作用経路の検討

in vitroの系を用いて、Aicda遺伝子のプロモーター領域へ作用し、その発現を調節しているいくつかの転写因子(PAX5、E2A、E2f7、E2f8)の発現量をリアルタイムPCRにて検討した。またマイクロアレイを用いて、網羅的な作用経路の解析を行なった。

4. 方法

4-1 実験動物

本研究には、日本 SLC (Hamamatsu, Japan) より購入した 8 週齢、メスの C57BL/6NCr マウスを使用した。

実験動物を用いた実験は、東京大学医科学研究所動物実験施設にて行ない、東京大学医科学研究所動物実験実施規則に基づいて行なった。

4-2 マウス脾臓 B 細胞の採取

C57BL/6NCr マウスの脾臓を摘出し、プランジャーを用いて脾臓細胞をホモジエナイズしたのち、40 μ m のナイロン製 Cell Strainer (BD Falcon, New Jersey, USA) を用いて不純物を取り除いた。マウス脾臓細胞は各実験に用いるまではセルバンカープラス (十慈フィールド、Tokyo, Japan) に再懸濁し、 -20°C に保存した。

4-3 マウス脾臓 B 細胞の培養

6 ウェルプレート上に、1 ウェルあたり培地 2ml にマウス脾臓細胞を 1×10^6 細胞ずつ再懸濁 (5×10^5 細胞/ml) し、 37°C 、72 時間の培養を行なった。培養の培地は 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 RPMI1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA、

USA) コンプリートメディアウムとし、Lipopolysaccharides (LPS) (SIGMA、Cat No L2630、Missouri、USA) 最終濃度 $12.5 \mu\text{g/ml}$ とリコンビナントマウス IL-4 (PEPROTECH、Cat No 214-14、NJ、USA) 最終濃度 7.5ng/ml によるサイトカイン共刺激を行なった。更にメシル酸イマチニブ (IM) (LC Laboratories、Woburn、MA、USA) を最終濃度が $0 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $2.5 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$ 、 $7.5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ となるように加えた。

IM の作用経路の推定のため、IM に替え、JAK や F1t3 のインヒビターによる同様の実験も行なった。JAK インヒビターとして Ruxolitinib (Selleck chemicals、Houston、USA) を、F1t3 インヒビターとして CEP-701 (Merck Millipore、Frankfurt、Germany) を用いた。

72 時間の培養後、細胞は全て回収し、フローサイトメトリー解析や RNA 抽出に用いた。

4-4 CH12F3-2 細胞株培養

マウス B 細胞リンパ腫由来細胞株である CH12F3-2 細胞株は、京都大学大学院医学研究科・免疫ゲノム医学・本庶佑教授より供与を受けた。24 ウェルプレート上に、培地 1ml に CH12F3-2 細胞を 1×10^4 細胞ずつ再懸濁 (1×10^4 細胞/ml) し、 37°C 、72 時間の培養を行なった。培地は RPMI1640+10% FBS+5%

NCTC-109 (Invitrogen) +0.05mM 2-Mercaptoethanol+20mM HEPES (PAA Laboratories, Cat No S11-001, Pasching, Austria) とし、リコンビナントマウス IL-4 最終濃度 7.5ng/ml、リコンビナントヒト Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 (WAKO, Cat No 202-16541, Osaka, Japan) 最終濃度 0.3ng/ml、40% CD40 ligand (本庶教授より供与) によるサイトカイン共刺激を行なった。更に IM を最終濃度が 0 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M となるように加えた。

72 時間の培養後、細胞は全て回収し、フローサイトメトリー解析に用いた。

4-5 in vivo における免疫刺激下でのマウス脾臓細胞の検討

C57BL/6NCr マウス 6 匹に羊赤血球 (Sheep red blood cells:SRBCs) (日本バイオテスト、Tokyo, Japan) 1×10^8 細胞の腹腔内投与による免疫刺激を 14 日間で 2 回 (第 1 日目と第 15 日目) 行なった。そのうちの 3 匹に、IM 50mg/kg を 21 日間 (第 1 日目から第 21 日目まで) 腹腔内投与した。

第 22 日目にマウスの脾臓を摘出し、病理組織学的解析とフローサイトメトリー解析、RNA 抽出に用いた。フローサイトメトリー解析では、前方散乱光 (Forward scatter:FSC) と側方散乱光 (Side scatter:SSC) にて、単核球 (Mononuclear cell:MNC) 分画にゲーティングし、更に IgG1 分画と IgM 分画に分け、解析を行なった。

4-6 in vitro におけるレトロウイルスによるマウス脾臓細胞への外来性 AID の導入

レトロウイルスベクターは、pMSCV-IRES/eGFP ベクターにマウス AID を組み込んだベクター：pMSCV-mAID-IRES/eGFP を用いた [24]。6 ウェルプレート上にヒト胎児腎細胞株である 293T 細胞を培養し、FuGENE 6 (Roche applied science, Mannheim, Germany) を用いて、pCL-Eco ベクターとともに、pMSCV-mAID-IRES/eGFP ベクターもしくは pMSCV-IRES/eGFP ベクターをリポフェクション法により 293T 細胞に形質移入した。マウス脾臓細胞への感染実験には第 3 日目のウイルス上清を用いた。

マウス脾臓細胞を 6 ウェルプレート上に、1 ウェルあたり培地 2ml にマウス脾臓細胞を 1×10^6 細胞ずつ再懸濁 (5×10^5 細胞/ml) し、まず 37°C、24 時間の培養を行なった。培養の培地は 10% FBS 含有 RPMI コンプリートメディウムとし、Lipopolysaccharides (LPS) 最終濃度 $12.5 \mu\text{g/ml}$ とリコンビナントマウス IL-4 最終濃度 7.5ng/ml による共刺激を行なった。その後、上記の第 3 日目のウイルス上清を用いて、形質導入を行なった。更に 37°C、48 時間の培養を行ない、計 72 時間の培養後、細胞を全て回収し、フローサイトメトリー解析や RNA 抽出を行なった。IM は、培養開始時より、最終濃度が $0 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ となるように加え

た。Ruxolitinib は、培養開始時より、最終濃度が 0nM、1nM、2.5nM、5nM、10nM、25nM、50nM、100nM、250nM、500nM、1000nM となるように加えた。CEP-701 は培養開始時より、最終濃度が 0nM、1nM、3nM、10nM、30nM、100nM、300nM となるように加えた。

4-7 フローサイトメトリー解析

回収した細胞は、以下の蛍光抗体で染色を行なった。FITC 標識抗体：抗マウス IgG1 抗体(clone RMG1-1;BioLegend、San Diego、CA、USA)、抗マウス IgA 抗体(Zymed、San Francisco、CA、USA もしくは Clone C10-3;BD Pharmingen、Franklin Lakes、NJ、USA)。PE 標識抗体：抗マウス IgM 抗体(clone II/41、eBioscience、San Diego、CA、USA)。APC 標識抗体：抗マウス IgG1 抗体(clone RMG1-1、BioLegend)。染色後の細胞は、FACS Caliber flow cytometer (BD Bioscience、Franklin Lakes、NJ、USA) にてフローサイトメトリー解析を行なった。得られたデータ解析は、Cell Quest software (BD Biosciences) と FlowJo software (version 7.5;Tree Star Inc、Ashland、OR、USA) を使用した。

4-8 免疫病理組織学的解析

羊赤血球 (SRBCs) で免疫刺激し、IM を投与したマウス 3 匹、投与しなかったマ

ウス 3 匹、コントロールマウス 2 匹の脾臓組織を解析に用いた。

ヘマトキシリン・エオジン染色 (Hematoxylin-eosin:HE 染色) には、ホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作成し、使用した。AID 免疫染色には凍結切片を作製し、使用した。AID 免疫染色は、凍結切片を 100% メタノールで固定した後、非特異的結合を防ぐ為、4% 正常ヤギ血清でブロッキングを行なった。一次抗体であるウサギ IgG AID 抗体 (H-80; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を室温で 30 分反応させた。0.3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼを抑えた後、二次抗体であるペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (ヒストファイン シンプルステインマウス MAXPO (R); ニチレイ、Tokyo, Japan) を室温で 30 分反応させた。フルオロフォア チラミド (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) にてシグナルを増強させた後、三次抗体であるウサギポリクローナル抗 FITC ホースラディッシュペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase:HRP) 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) を反応させた。その後、対比染色として、ヘマトキシリン染色を行なった。

4-9 細胞増殖、アポトーシス、細胞分裂状態の解析

①BrdU 取り込み分析 (BrdU incorporation assay)

細胞増殖の解析として、DNA 合成の状態を検討するため、BrdU Flow Kits (BD

Pharmlngen)を用いて、製造者の説明書に基づき、BrdU 取り込み分析を行なった。マウス脾臓細胞を、前述の LPS と IL-4 による共刺激下で 37°C、24 時間培養後、BrdU パルス処理と、レトロウィルスを用いた形質導入を行なった。更に 37°C、48 時間の培養を行なった後に、フローサイトメーターを用いて解析を行なった。

②アネキシン V 分析 (Annexin V assay)

アポトーシス状態の解析には、Annexin V-FITC apoptosis detection kit I (BD Pharmlngen)を用いて、製造者の説明書に基づき、アネキシン V 分析を行なった。マウス脾臓細胞は、前述のとおり LPS と IL-4 による共刺激下で 37°C、72 時間の培養を行なった後、フローサイトメーターを用いて解析を行なった。

③CFSE 解析 (CFSE assay)

細胞分裂の状態の解析には、Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Molecular Probes、Eugene、OR、USA)を用いて、CFSE (carboxy-fluorescein diacetate、succinimidyl ester) 解析を行なった。10mM CFSE ストック溶液を 1× phosphate-buffered-saline (PBS) (-) で 2.5 μM に調製し、反応溶液として用いた。1×10⁶ 細胞のマウス脾臓細胞を 1×PBS (-) で 3 回洗浄した後、2.5 μM CFSE 溶液で再懸濁し、室温で 8 分間標識した。同量の FBS を加えた後、同量の RPMI1640+10% FBS で 2 回洗浄した。マウス脾臓細胞を 37°C で 15 分インキュベーションした後に、もう一度 RPMI1640+10% FBS で洗浄した。CFSE 標識したマ

ウス脾臓細胞を前述のとおり LPS と IL-4 による共刺激下で 37°C、72 時間の培養を行なった後、フローサイトメーターを用いて解析を行なった。

4-10 リアルタイム PCR

In vitro 及び in vivo で刺激を行なったマウス脾臓細胞から、RNeasy Mini Kit(50) (Qiagen、Hilden、Germany)を用いて、製造者の説明書に基づき、RNA 抽出を行なった。0.5 μ g の RNA から SuperScript III First Strand Synthesis System(Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)を用いて、製造者の説明書に基づき、cDNA 合成を行なった。

定量的リアルタイム PCR は、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA)を用いて行なった。PCR 産物増幅中のサイバークリーン色素の蛍光は、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いて可視化し測定した。

IgG1 germline transcript のリアルタイム PCR は後述の Primer Ig1 と Cg1R (PCR 産物のサイズ:429bp)のプライマーペアを用いて行なった。

リアルタイム PCR の反応条件は、initial denaturation 95°C 10 分の後、denaturation 98°C 15 秒、extention 60°C 1 分を 40 サイクル行なった。

それぞれの相対的 mRNA 発現量は内部コントロールとして glyceraldehyde

3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]を用いて補正し、 $0\mu\text{M}$ IM を 1 とした相対値
で示した。

Primers

GAPDH-F:5' -TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

GAPDH-R:5' -CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3'

AID-F:5' -CGTGGTGAAGAGGAGAGATAGTG-3'

AID-R:5' -CAGTCTGAGATGTAGCGTAGGAA-3'

Ig1:5' -GGCCCTTCCAGATCTTTGAG-3' [2]

Cg1R:5' -GGATCCAGAGTTCCAGGTCACACT-3' [2]

Pax5-F:5' -AGTCTCCAGTGCCGAATG-3' [6]

Pax5-R:5' -TCCGTGGTGGTGAAGATG-3' [6]

E2f7-F:5' -CCTCAAGTCCACAGACC-3' [6]

E2f7-R:5' -CACTCAGAAGCAACATAGC-3' [6]

E2f8-F:5' -GAGTCGGAAGGAGAAGAGC-3' [6]

E2f8-R:5' -CCAGGCAGATGTCGTTATTC-3' [6]

E2A-F:5' -TTCCCTCCCTGACCTCTC-3' [6]

E2F-R:5' -GGCTACTGATGCGATTTC-3' [6]

RAG1-F:5' -GAAGCTTCTGGCTCAGTCTACATCT-3' [25]

RAG1-R:5' -ACCTCATAGCGCTGCAGGTT-3' [25]

RAG2-F:5' -ACAGTCTTGCCAGGAGGAATCTC-3' [25]

RAG2-R:5' -CAAGGCTGCAGACCATCCTT-3' [25]

CD40-F:5' -GCTATGGGGCTGCTTGTGA-3' [26]

CD40-R:5' -ATGGGTGGCATTGGGTCTTC-3' [26]

ID2-F:5' -CCGCTGACCACCCTGAAC-3' [25]

ID2-R:5' -ATAAGCTCAGAAGGGAATTCAGATG-3' [25]

4-11 DNA 親和性沈降分析

IM(+あるいは-)による脾臓細胞の E ボックスに結合する E2A 蛋白量の定量は、ウェスタンブロットと、DNA 親和性沈降分析を用いて行なった。蛋白の抽出には、20mM Tris (pH7.5) と 400mM NaCl、1mM DTT、1mM EDTA、0.5% NP40、10% グリセロール、コンプリートミニプロテアーゼインヒビターカクテルを含んだ溶解バッファーを用いた。蛋白抽出液は、4 コピーの野生型 (TCGAAGAACACCTGCAGCAGCTct) あるいは変異型 (TCGAAGAAttCCaaCAGCAGCTct) の高親和性 μ 5 E2A 結合サイトを含むビオチン化 DNA プローブを結合させたストレプトアビジンセファロースを用いて、DNA 親和性沈降を行なった [27]。250 μ g の

脾臓細胞抽出液を DNA 親和性レジンと混和し、20mM Tris (pH7.5)、75mM NaCl、1mM DTT、1mM EDTA、0.1% NP40、2.5% グリセロールを含んだ溶液中で 4°C、2 時間加温した。グリセロールを含まない同溶液で洗浄した後、Laemmli サンプルバッファーで抽出した。抽出液は、SDS ポリアクリルアミド勾配ゲルで分け、PVDF 膜にブロットし、精製抗ヒト E47 抗体 (Clone G127-32; 1:1000; BD Pharmingen)、もしくはモノクローナルマウス抗 β アクチン抗体 (1:10000; Sigma-Aldrich) にて検出した。一次抗体と 4°C で一晩反応させた後、二次抗体 (ヤギ HRP 抱合抗マウス IgG 抗体; 1:2500-5000; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) と 4°C、1 時間反応させて、イムノブロットを行なった。

4-12 マイクロアレイ

マウス脾臓細胞を前述のとおり LPS と IL-4 による共刺激下で 37°C、72 時間培養後、0 μ M IM と 10 μ M IM の検体より、RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen) を用いて、RNA 抽出を行なった。遺伝子発現マイクロアレイ分析は、東海大学伊勢原研究推進部 教育・研究支援センター 分子科学部門に依頼し、one-color microarray-based gene-expression analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて、製造者の説明書に基づき、行なった。走査後の遺伝子発現値は、GeneSpringGX ソフトウェアを用いて解析した。

4-13 統計処理

すべての統計処理は JMP8 ソフトウェアを用いて T 検定を行い、標準偏差を求めた。

5. 結果

5-1 in vitro におけるメシル酸イマチニブ(IM)によるマウス脾臓B細胞のクラススイッチ組換え(CSR)抑制作用についての解析

5-1-1 マウス脾臓細胞における IM による IgG1 CSR 抑制作用の解析

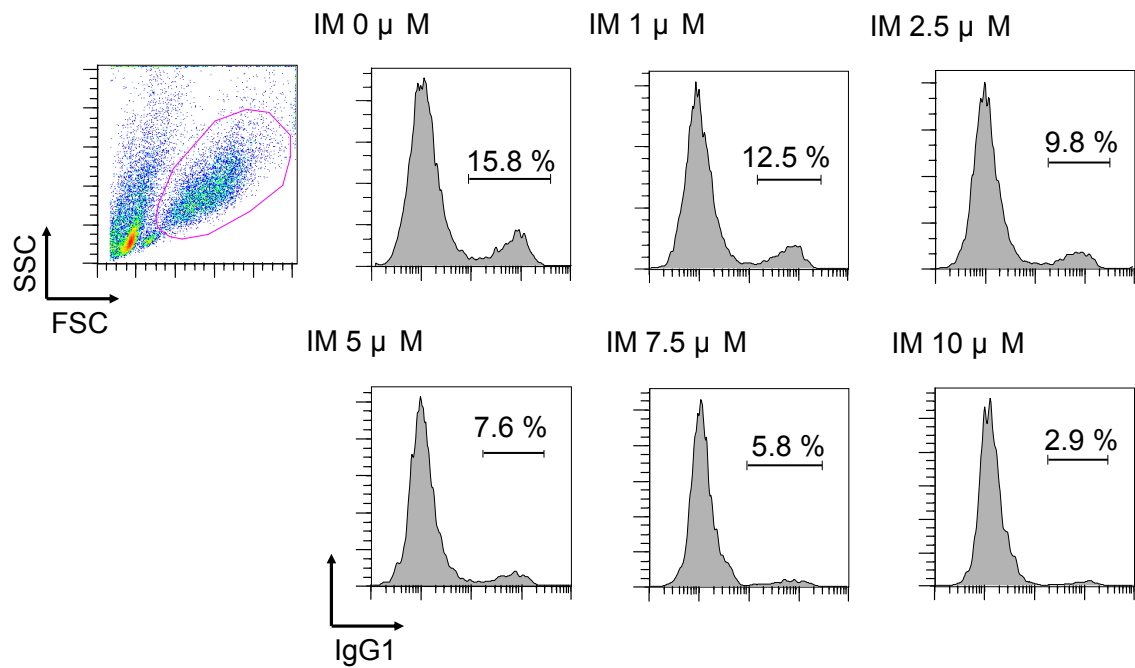


Figure 7 12.5 μg/ml LPS と 7.5ng/ml IL-4 による共刺激下で 37°C、72 時間培養時の各メシル酸イマチニブ濃度(0、1、2.5、5、7.5、10 μM)におけるマウス脾臓細胞の表面 IgG1 発現量

マウス脾臓細胞に LPS と IL-4 による共刺激を加え、37°C、72 時間培養すると、IgG1 への CSR が起こる [1]。この際に、IM を 0 μ M、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、7.5 μ M、10 μ M となるように加え、培養を行なった。72 時間培養後のマウス脾臓 B 細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて、IgG1 陽性 B 細胞の割合を検索した。0 μ M IM において表面 IgG1 陽性 B 細胞が約 16%であったのに対し、10 μ M IM では約 3%と有意に低下を認め、濃度依存性に IgG1 陽性細胞の低下を認めた (Figure 7)。

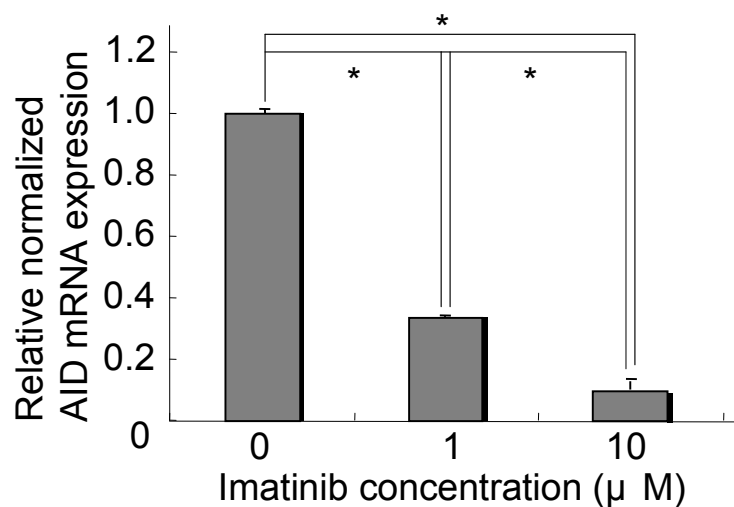


Figure 8 リアルタイム PCR 法による LPS と IL-4 による共刺激培養時の各メシ
ル酸イマチニブ濃度 (0、1、10 μ M) におけるマウス脾臓細胞の AID mRNA 発現量

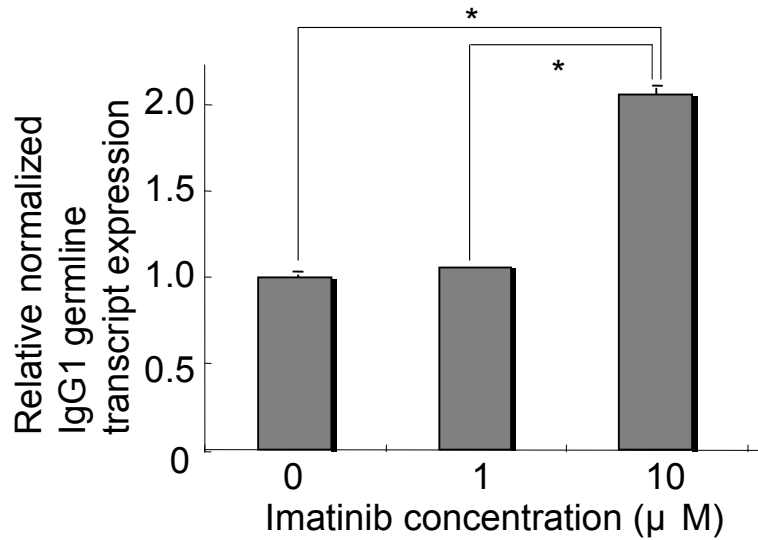


Figure 9 リアルタイム PCR 法による LPS と IL-4 による共刺激培養時の各メシル酸イマチニブ濃度 (0、1、10 μ M) におけるマウス脾臓細胞の IgG1 germline transcript 発現量

IgG1 へのクラススイッチ組換えには、IgG1 の I プロモーターによって誘導される germline transcript と AID の両者が必要であり、上記培養条件における AID と IgG1 germline transcript の mRNA 発現量の検討を行なった。AID mRNA 発現量は IM 濃度依存性に有意な低下が認められた (Figure 8) が、IgG1 germline transcript の発現レベルでは有意な低下は認められず、10 μ M IM ではむしろ上

昇を認めた (Figure 9)。

5-1-2 マウス脾臓細胞における JAK インヒビター、Flt3 インヒビター投与時の クラススイッチ組換えについての検討

IM に替え、JAK インヒビターとして Ruxolitinib を、Flt3 インヒビターとして CEP-701 を投与した際のクラススイッチ組換え作用の検討を行なった。

Ruxolitinib を投与した場合は、濃度依存性にクラススイッチ組換え作用が低下傾向であったが、IM 投与時に認められたような狭い濃度の範囲内での劇的なクラススイッチ組換え抑制作用は認められなかった (Figure 10)。CEP-701 に関しては、10nM までは低下傾向が見られたが、その後は再上昇傾向にあり、やはり IM 投与時のような劇的なクラススイッチ組換え抑制作用は認められなかった (Figure 11)。

リアルタイム PCR 法による AID mRNA 発現量の解析では、Ruxolitinib 投与時は 10nM までは濃度依存性に AID mRNA は低下傾向にあったが、それ以降は一定の傾向は認められなかった (Figure 12)。CEP-701 投与時は、クラススイッチ組換えはほとんど抑制されていなかったにもかかわらず、AID mRNA の発現は著明に抑制されていた。しかし、3nM 以降は低値ながらも AID mRNA 発現量は濃度依存性に再上昇傾向が認められた (Figure 13)。

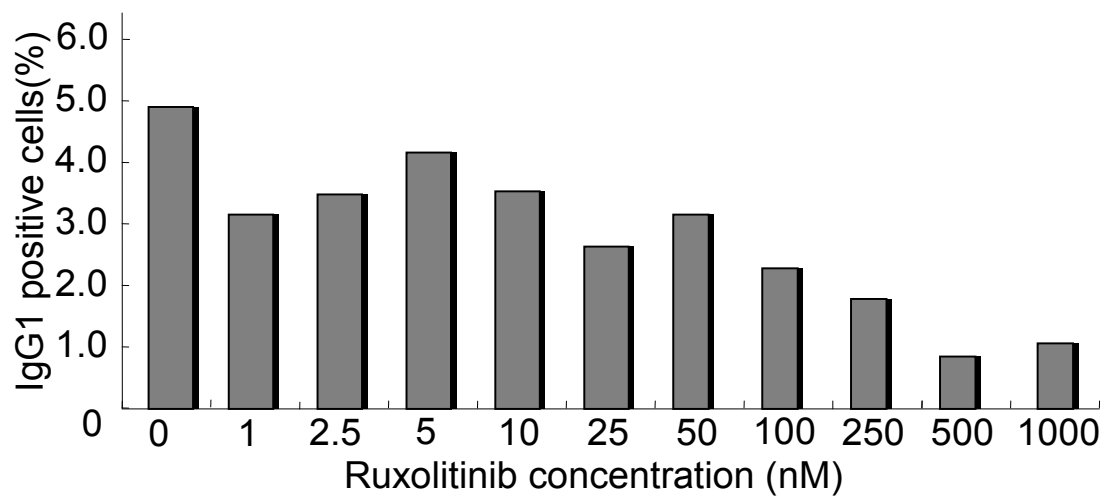


Figure 10 12.5 μ g/ml LPS と 7.5ng/ml IL-4 による共刺激下で 37°C、72 時間
 培養時の各 Ruxolitinib 濃度 (0、1、2.5、5、10、25、50、100、250、500、1000nM)
 におけるマウス脾臓細胞の表面 IgG1 発現量

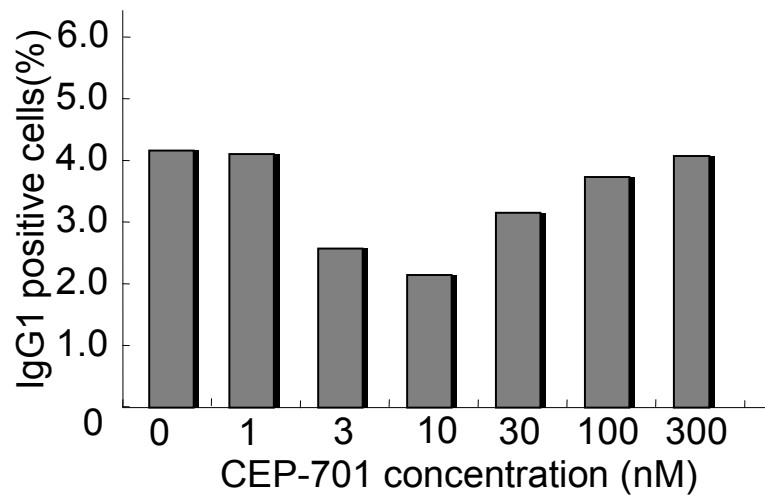


Figure 11 12.5 μ g/ml LPS と 7.5ng/ml IL-4 による共刺激下で 37°C、72 時間
培養時の各 CEP-701 濃度 (0、1、3、10、30、100、300nM) におけるマウス脾臓細
胞の表面 IgG1 発現量

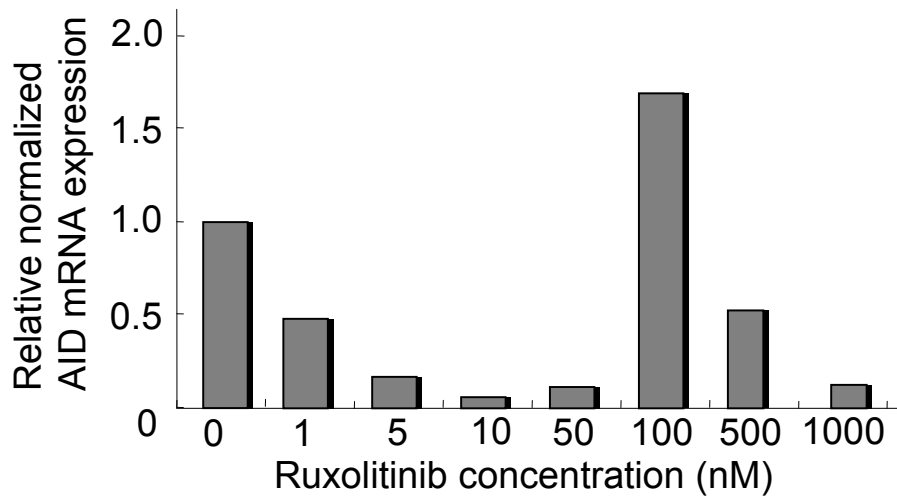


Figure 12 リアルタイム PCR 法による LPS と IL-4 による共刺激培養時の各 Ruxolitinib 濃度(0、1、5、10、50、100、500、1000nM)におけるマウス脾臓細胞の AID mRNA 発現量

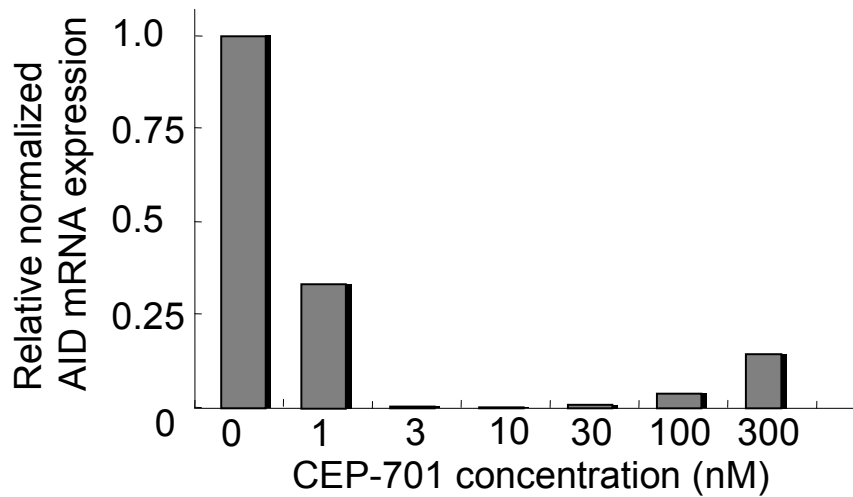


Figure 13 リアルタイム PCR 法による LPS と IL-4 による共刺激培養時の各 CEP-701 濃度(0、3、10、30、100、300nM)におけるマウス脾臓細胞の AID mRNA 発現量

5-1-3 CH12F3-2A 細胞を用いた IM による IgA CSR 抑制作用の解析

IgG1 以外の免疫グロブリンサブクラスに関しては、マウス B 細胞性リンパ腫由来細胞株であり、CSR の解析にしばしば用いられる CH12F3-2A 細胞を用いて、IgA への CSR に関して検討を行なった。マウス脾臓細胞を用いた IgG1 CSR 阻害作用と同様に、CH12F3-2A における IgA への CSR は、IM 濃度依存性に低下を認

めた (Figure 14)。CFSE 解析により IM 投与により CH12F3-2A 細胞においても細胞分裂の低下が認められた (Figure 14)。AID mRNA 発現量に関しては、IM 20 μ M 投与時には低下傾向を認めたが、10 μ M 投与時にはむしろ上昇を認めており、IM 濃度依存性の有意な変動は認められなかった (Figure 15)。

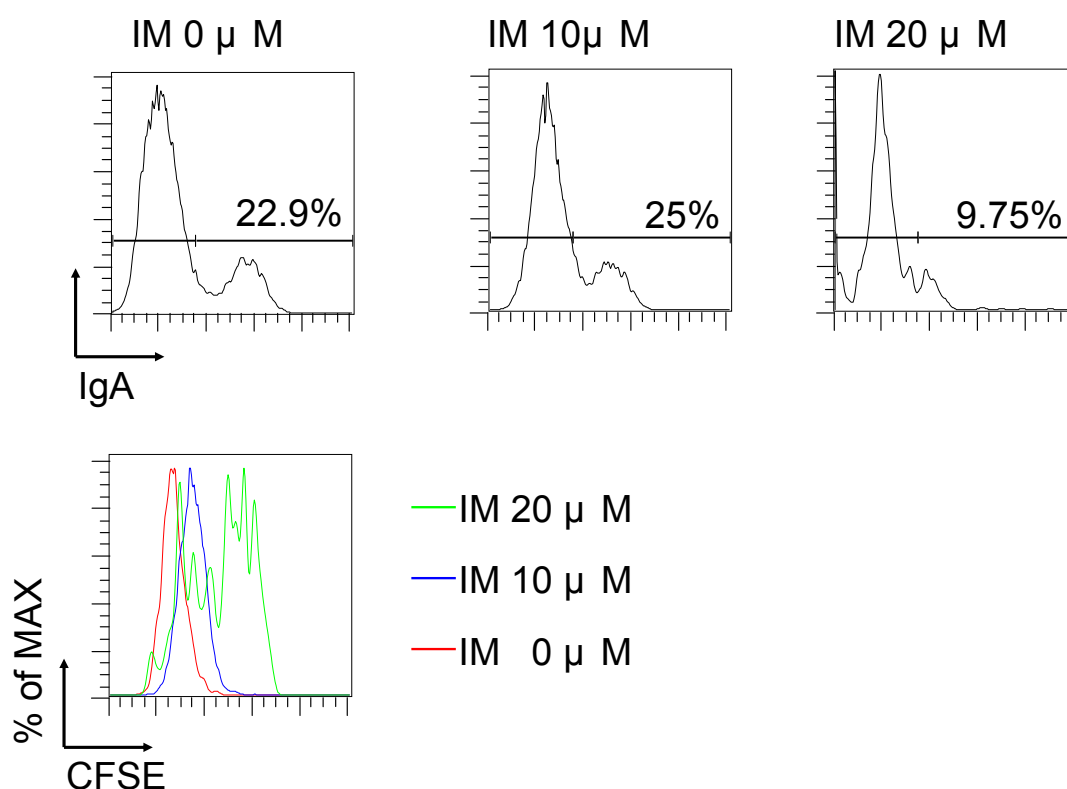


Figure 14 7.5ng/ml IL-4、0.3ng/ml TGF- β 1、40% CD40L による共刺激培養時の各メシル酸イマチニブ濃度 (0、10、20 μ M) における CH12F3-2A 細胞株の表面 IgA 発現量 (上段) と、CFSE 解析による細胞分裂の評価 (下段)

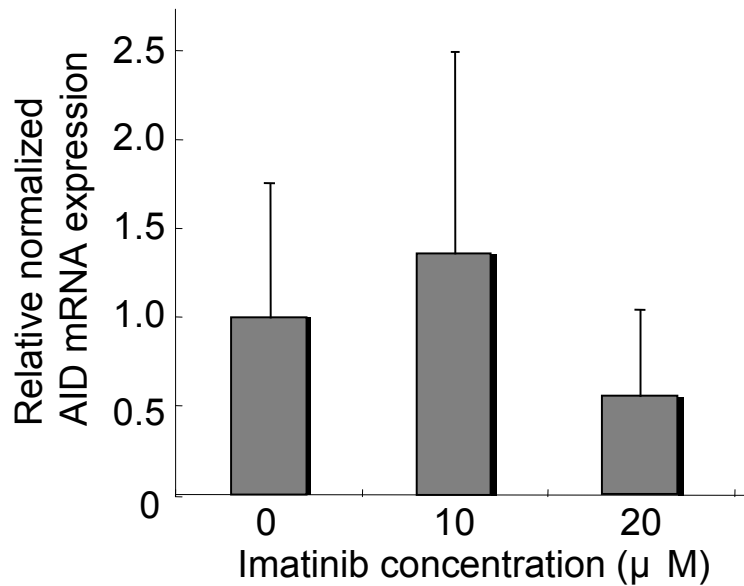


Figure 15 リアルタイム PCR 法による 7.5ng/ml IL-4、0.3ng/ml TGF-β 1、40% CD40L による共刺激培養時の各メシル酸イマチニブ濃度 (0、10、20 μ M) における CH12F3-2A 細胞株の AID mRNA 発現量

5-1-4 IM による CSR 抑制時の細胞増殖・アポトーシス・細胞分裂状態の解析

IM 投与による CSR 抑制時の細胞増殖の状態、アポトーシスの状態、細胞分裂の状態を検索するため、それぞれ、BrdU 取り込み分析、アネキシン V 分析、CFSE 解析を行なった。BrdU 取り込み分析においては、10 μ M IM では、0 μ M IM と比較して、BrdU 取り込み率の低下がみられ、DNA 合成の低下を認めた。また CFSE

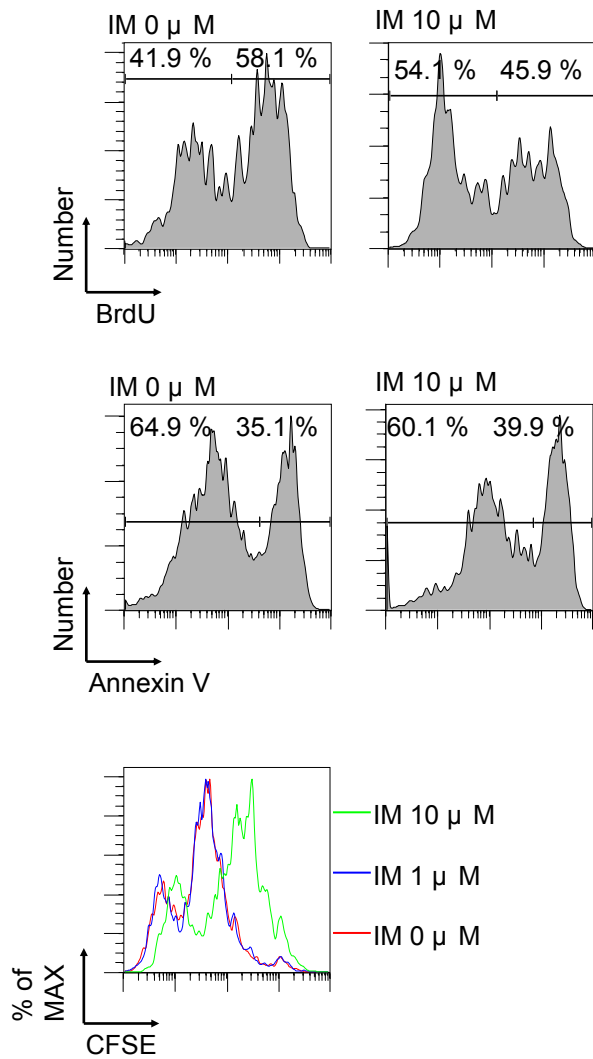


Figure 16 LPS と IL-4 による共刺激培養時の各メシル酸イマチニブ濃度におけるマウス脾臓細胞の BrdU 取り込み分析(上段)、アネキシン V 分析(中段)、CFSE 解析(下段)

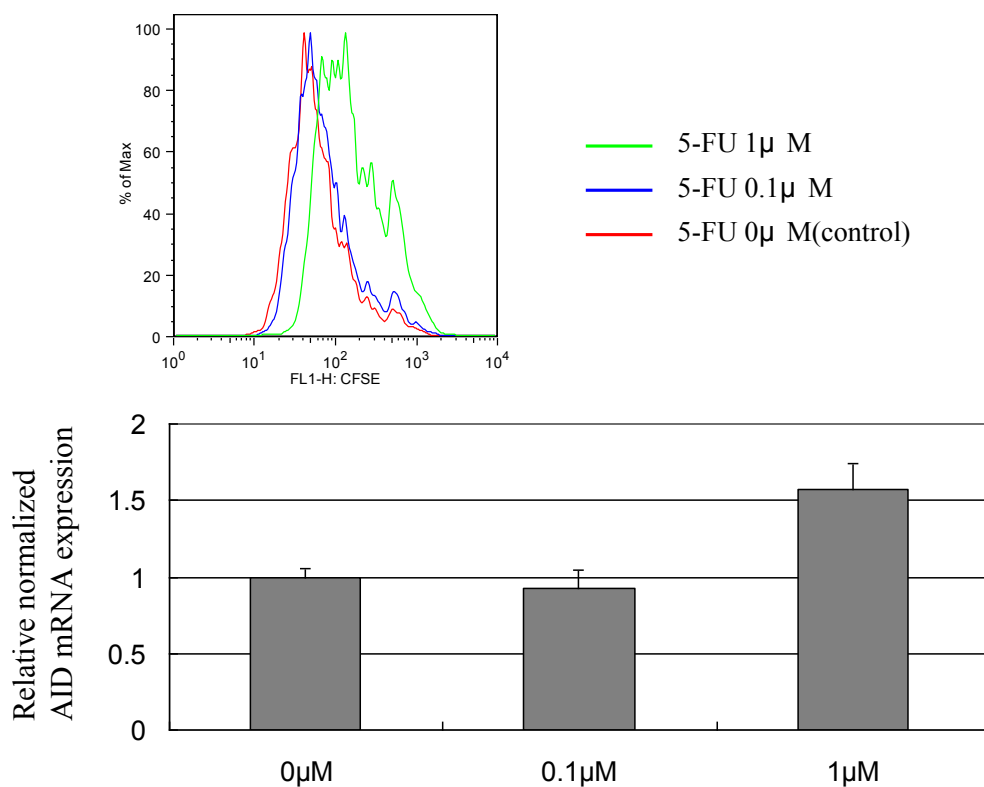


Figure 17 LPS と IL-4 による共刺激培養時の各 5-FU 濃度 (0、0.1、1 μ M) におけるマウス脾臓細胞の CFSE 解析 (上段) とリアルタイム PCR 法による AID mRNA 発現量

解析では 10 μ M IM では細胞分裂の低下を認めた。一方、アネキシン V 分析では、0 μ M IM、10 μ M IM とともに有意な差は認められなかった (Figure 16)。

CSR 抑制の原因として、細胞増殖、細胞分裂の抑制による影響も否定できないものの、1 μ M IM において、CFSE 解析では細胞分裂の低下は認めないが既に AID mRNA 発現量の抑制を認めており、また IM にかえて、5-フルオロウラシル (5-FU)

を投与したところ、細胞分裂が低下した状態でも AID mRNA 発現レベルの低下は認められなかった (Figure 17)。

5-2 in vivo における IM によるマウス脾臓 B 細胞の CSR 抑制作用についての解析

マウスに羊赤血球 (SRBCs) 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 [2]、IM 投与に伴い、その作用が抑制されるのか検討を行なった。14 日間の間隔をあけ 2 度 (第 1 日目と第 15 日目)、羊赤血球 (SRBCs) 腹腔内投与による免疫刺激を行なった。これと並行して 50mg/kg IM の腹腔内投与を 21 日間 (第 1 日目から第 21 日目まで) 行なった。

病理組織学標本の作製は、共同研究者により行なわれた。正常コントロールのマウスに比べて、羊赤血球 (SRBCs) による免疫刺激を加えたマウス (SRBCs (+) マウス) の脾臓の濾胞は、胚中心は大きく明瞭となった。しかし、IM を同時投与したマウス (SRBCs+IM (+) マウス) は、SRBCs (+) マウスと比較し、胚中心は小さく不明瞭であった。AID の免疫染色についても、SRBCs (+) マウスでは胚中心の活性化 B 細胞に一致して AID の発現増強を認めたのに対して、SRBCs+IM (+) マウスでは、AID の発現はごくわずかに認められる程度であった (Figure 18)。

これらのマウスの脾臓細胞を用いて、AID mRNA の測定を行なったところ、AID

免疫染色の結果と同様に mRNA レベルでも AID の発現低下を認めた (Figure 19

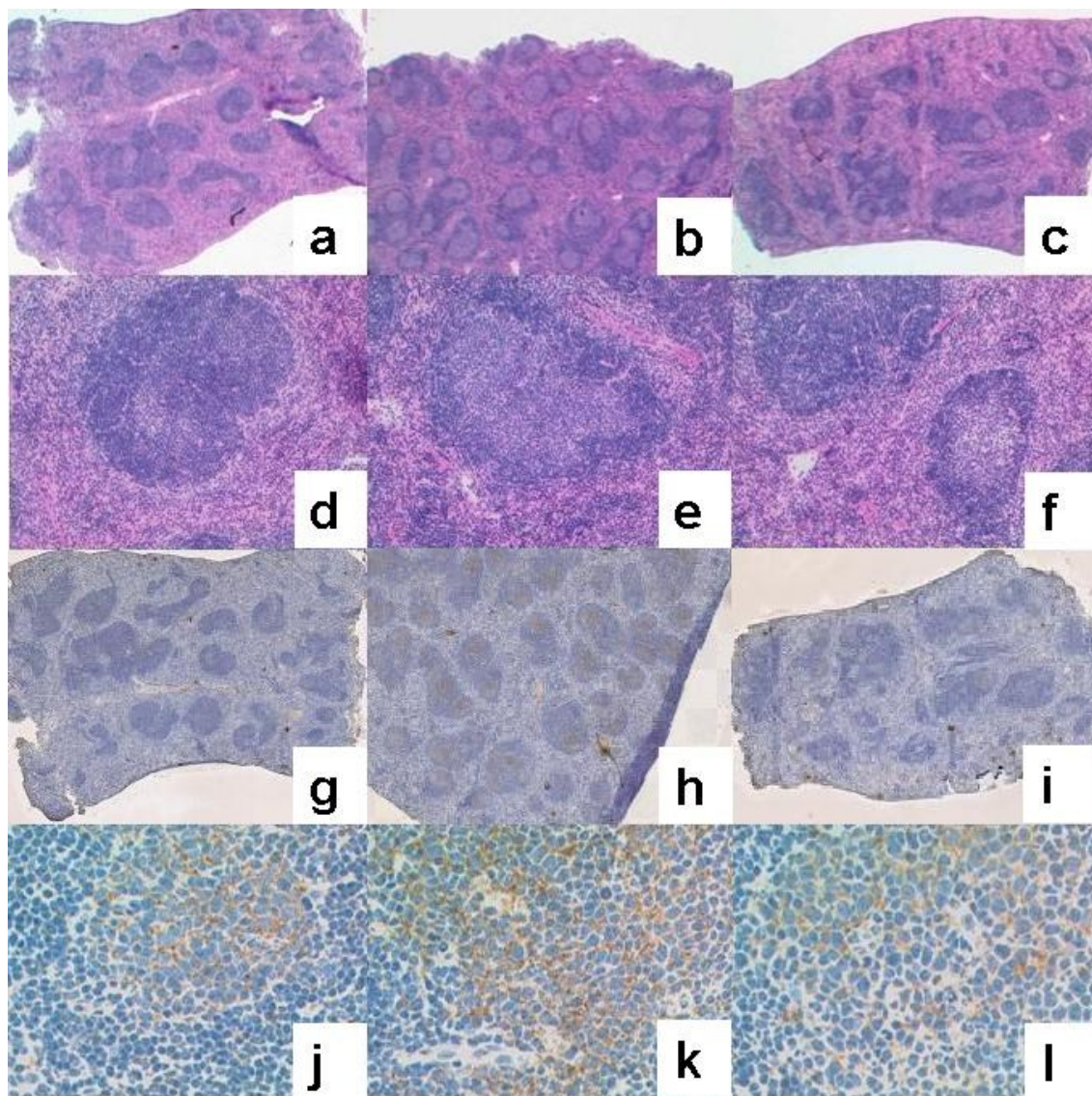


Figure 18 マウス脾臓の免疫組織化学的解析：正常コントロール(a、d、g、j)、SRBCs 免疫刺激マウス(b、e、h、k)、SRBCs 免疫刺激+メシル酸イマチニブ投与マウス(c、f、i、l)。Hematoxylin-eosin(HE)染色(a~f)、AID免疫染色(g~l)。弱拡大(a~c、g~i)、強拡大(d~f、j~l)。

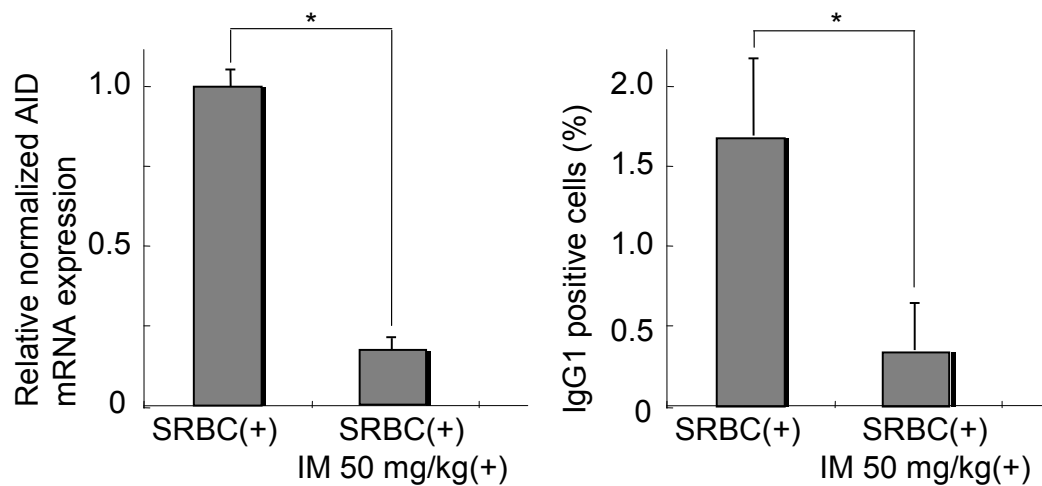


Figure 19 SRBCs による免疫刺激を加えた際のマウス脾臓細胞におけるメシル酸イマチニブ投与あり/なしそれぞれの mRNA 発現量(左パネル)、細胞表面 IgG1 発現量(右パネル)

左パネル)。また、脾臓細胞の表面 IgG1 をフローサイトメトリーにて解析したところ、SRBCs 免疫刺激に加えてメシル酸イマチニブを投与したマウスにおいて、IgG1 発現を低下認め、上記と矛盾しない結果が得られた (Figure 19 右パネル)。

5-3 レトロウイルスを用いた外因性 AID 強制発現時の IgG1 CSR 抑制作用につ

いての解析

IM 投与により AID の発現が抑制され、CSR が抑制されると考えられたため、レトロウィルスを用いて外因性に AID を発現させた際に CSR 作用が回復するか検討を行なった。

マウス脾臓細胞を LPS と IL-4 による共刺激にて 37°C、24 時間培養後、pMSCV-murine AID-IRES/eGFP ベクターとコントロールベクターである pMSCV-IRES/eGFP ベクターを感染させ、更に 48 時間の培養を行なった。eGFP の発現による感染効率の検討では、感染効率 30~50%であった (Figure 20)。

10 μ M IM の IgG1 陽性細胞率が 13.0%と低下していたのに対し、10 μ M IM に加えて外因性に AID を強制発現させた検体での IgG1 陽性細胞率は 25.1%と回復

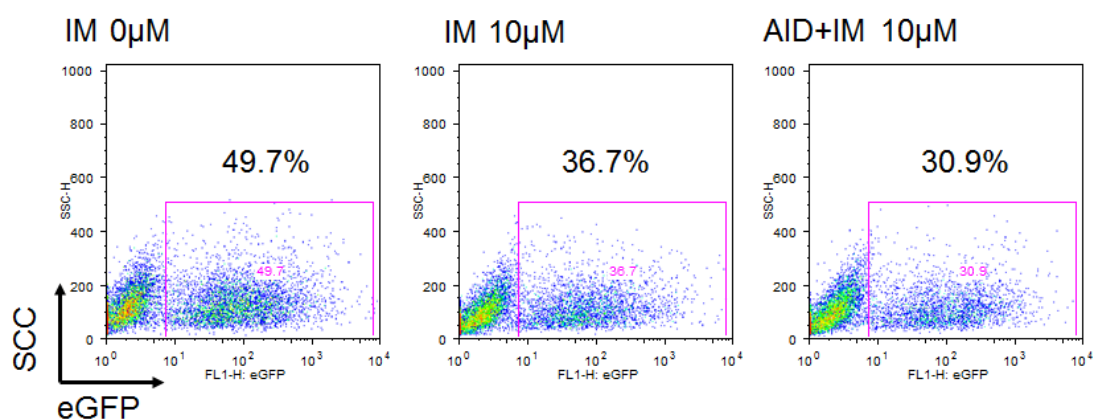


Figure 20 eGFP 発現量によるレトロウィルスによる形質導入効率の検討

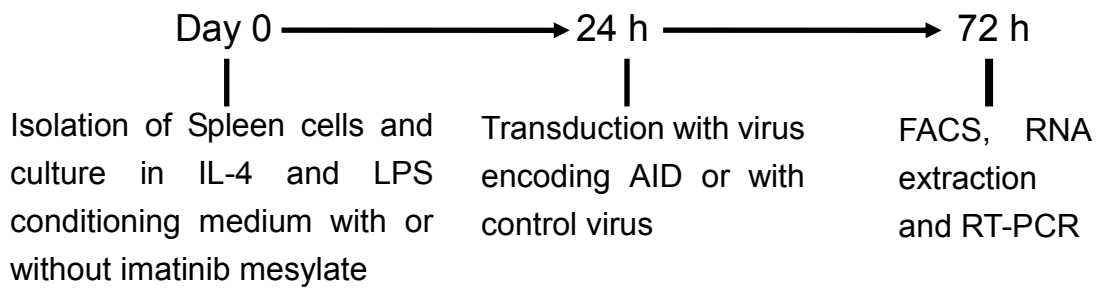
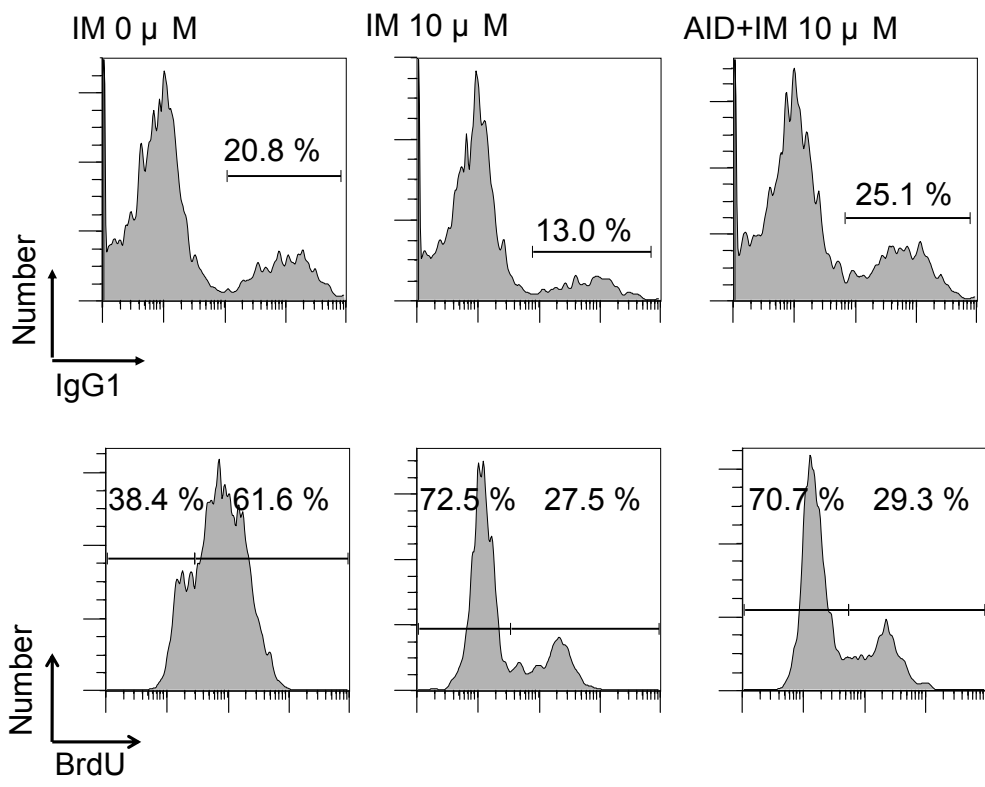


Figure 21 LPS と IL-4 による共刺激培養 24 時間後に mAID を形質導入し、外因性に強制発現させた際の各メシル酸イマチニブ濃度 (0、10 μ M) におけるマウス脾臓細胞の表面 IgG1 発現量

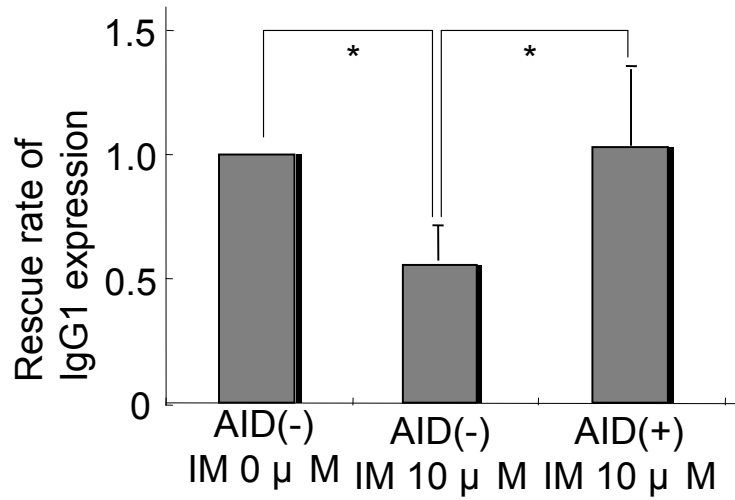


Figure 22 合計4回の外因性AID形質導入実験によるAID(-)・IM 0 μ Mを1とした場合のマウス脾臓細胞表面IgG1発現量回復率の平均値

していた(Figure 21)。0 μ M IMのIgG1陽性細胞は20.8%であり、AID強制発現により0 μ M IMと同等もしくはそれ以上のIgG1へのCSRを認めた。4回のAIDレスキュー実験でも同様の傾向を認めた(Figure 22)。

5-4 IMによるAIDを介したCSR抑制作用の経路の解析

AID 発現調節については、様々な調節因子があり、AID 遺伝子の 5' プロモーター領域への作用が報告されている [6]。プロモーター領域の中でも特にファーストイントロンに位置する Region2 領域が、AID のサイレンサーとして働いている c-Myb や E2f、B 細胞特異的な活性化因子である Pax5 や E2A などの結合部位を持っており、発現調節に特に重要な役割を果たしている (Figure 4)。

5-4-1 定量的リアルタイム PCR による Pax5、E2A、E2f7、E2f8 発現量の解析

上記の LPS と IL-4 による共培養の系において、Aicda 遺伝子の Region2 領域に作用する因子のうち、発現増強因子として Pax5、E2A を、発現抑制因子として E2f7、E2f8 の mRNA の発現量を、また、Pax5、E2A の抑制因子として ID2 を、B 細胞活性化マーカーとして、RAG1、RAG2、CD40 の発現量を、各 IM 濃度 (0 μ M、1 μ M、10 μ M) において、リアルタイム PCR 法により測定し、比較を行なった。

抑制因子である E2f7、E2f8 も含め、今回測定した 4 因子ともに、IM 濃度依存性に mRNA 発現量の低下を認めた (Figure 23)。中でも特に E2A に関しては、0 μ M IM 投与時と比較して、10 μ M IM 投与時は約 500 分の 1 と著明な低下を認めた。

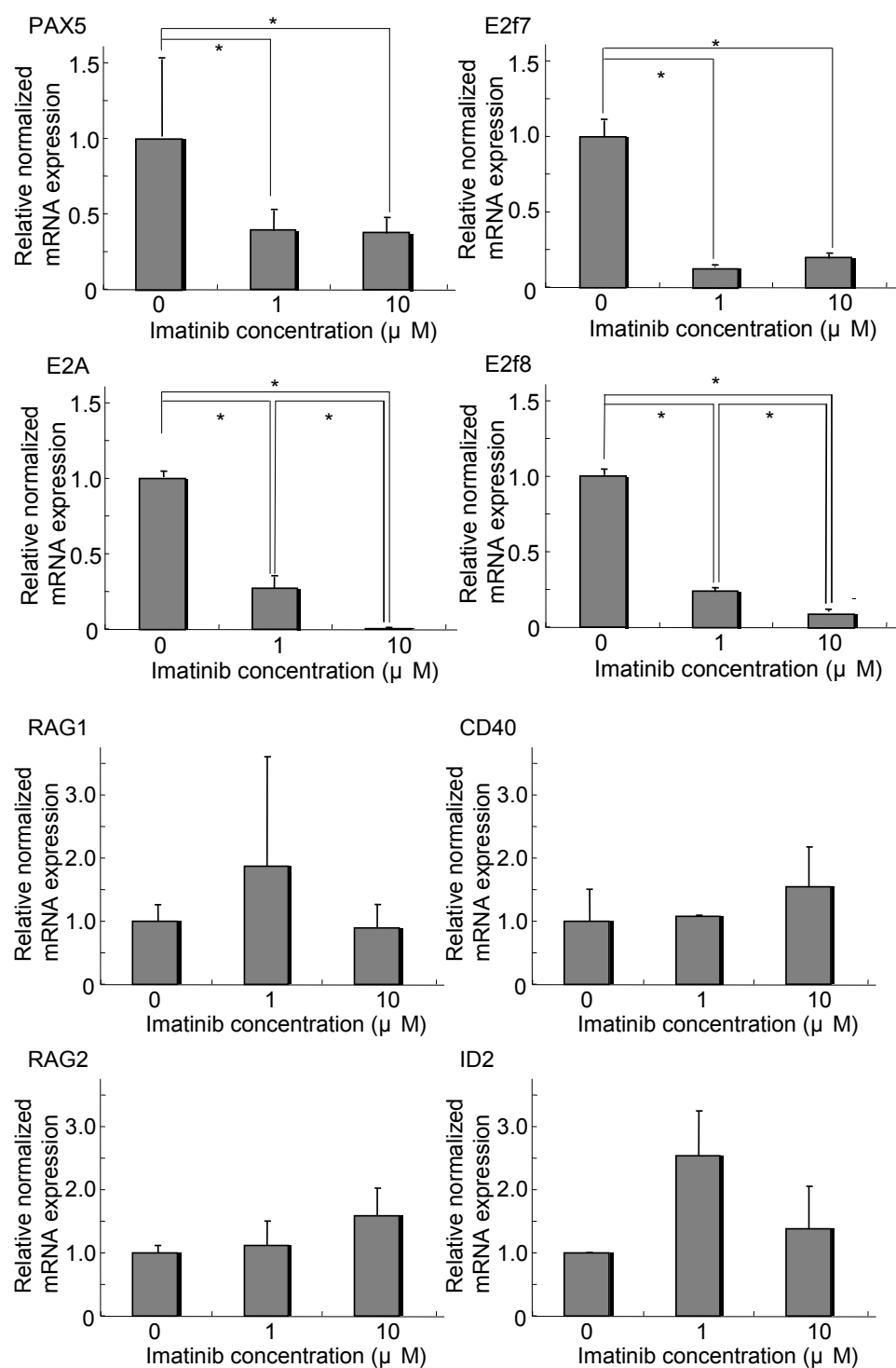


Figure 23 リアルタイム PCR 法を用いた LPS と IL-4 による共刺激培養時の各メシル酸イマチニブ濃度 (0、1、10 μ M) におけるマウス脾臓細胞の 4 転写因子 (Pax5、E2A、E2f7、E2f8) 発現量

一方、ID2 はイマチニブ投与により有意差は認められなかったが、上昇傾向を認めた。また B 細胞の活性化マーカーである RAG1、RAG2、CD40 についても、いずれもイマチニブ投与による有意な変動は認められなかったが、RAG2、CD40 に関しては、イマチニブ濃度依存性にむしろ上昇傾向であった。

5-4-2 E2A の蛋白発現と E ボックスへの DNA 結合活性の解析

以下のウェスタンブロットと DNA 親和性沈降解析は、共同研究者により行われた。

E2A 遺伝子は E12 と E47 の 2 つの転写因子をコードしており [28]、上記培養系

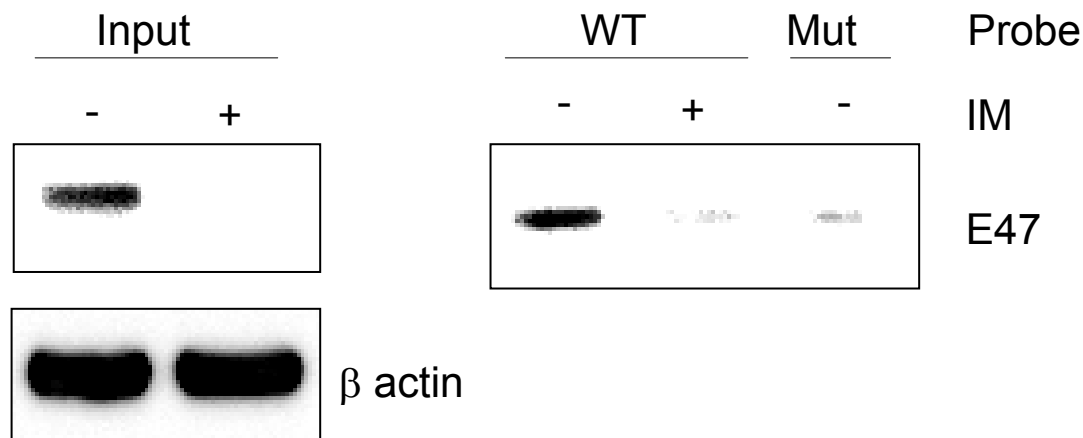


Figure 24 メシル酸イマチニブ(+/-)による E47 蛋白のウェスタンブロット解析(左パネル)と、野生型(wild type:WT)プローブを用いた際のメシル酸イマチニブ(+/-)による E ボックスへの E47 蛋白結合と変異型(mutant:Mut)プローブを用いた際の E47 蛋白結合の DNA 親和性沈降解析(右パネル)

における E47 蛋白の発現量をウェスタンブロット法にて検討した。リアルタイム PCR 法の結果と同様に、IM 投与時には E47 蛋白の発現はほとんど検出できないレベルまで低下を認めた (Figure 24 : 左パネル)。また、E ボックスへの E47 蛋白の結合活性を DNA 親和性沈降分析にて検討した。IM 投与時には E ボックスへの結合は著明な低下が認められた (Figure 24 : 右パネル)。

5-4-3 マイクロアレイを用いた IM による AID 抑制経路の網羅的解析

IM の標的分子の検討は詳細になされており、ABL、ARG、BCR-ABL、Kit、PDGFR、DDR1、NQO2 などの遺伝子産物がある [29]。これらの系と、E2A を含む今回検索した転写因子の間には、既知の経路は存在せず、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行なった。マイクロアレイ解析は東海大学伊勢原研究推進部 教育・研究支援センター 分子科学部門に依頼して行なった。

上記の LPS と IL-4 で 72 時間共刺激を行なったマウス脾臓細胞を用いて、0 μ M IM と 10 μ M IM 投与時の比較を行なった。39429 因子の検討を行ない、27567 因子が抽出され、T 検定を用いた統計学的解析を行なった。1189 因子がアップレギュレートされた因子として、257 因子がダウンレギュレートされた因子として抽出された (Table 2 : 各上位 10 位までの因子)。GFSE 解析を行なったが、IM による抑制経路として特異的な遺伝子群は認められなかった。また、IM の標的

分子のうち、成熟 B 細胞に発現している ABL1 と NQ02 に関連した遺伝子群の発現解析を行なった。標的遺伝子として、ABL1 関連遺伝子・49 遺伝子、NQ02 関連遺伝子・8 遺伝子の検索を行なったが、RNA レベルでは IM による抑制により発現を認めなかった (Figure 25)。

Top10 of up-regulation probes		Top10 of down-regulation probes	
GeneSymbol	FCAbsolute	GeneSymbol	FCAbsolute
Arg1	59.624718	Bace2	17.173008
Cyp1a1	45.53998	Enpp6	16.134525
Chi3l3	43.33048	Igh-VJ558	10.928697
AF251705	26.500282	Al314604	10.328111
Ccl7	25.985235	Gm626	10.149119
Ccl1	25.936378	Enpp6	9.464887
A_55_P2465382	25.46848	Degs2	8.455836
Gpmb	24.797152	Vmn1r186	7.7432284
Irs1	22.89544	Dkk3	7.343839
Cyp1b1	21.795193	Gm11295	7.2910595

Table 2 マイクロアレイ解析を用いた、マウス脾臓細胞を LPS と IL-4 による共刺激培養時のメシル酸イマチニブ 0 μ M と 10 μ M 投与時を比較したアップレギュレート、ダウンレギュレートそれぞれ上位 10 因子

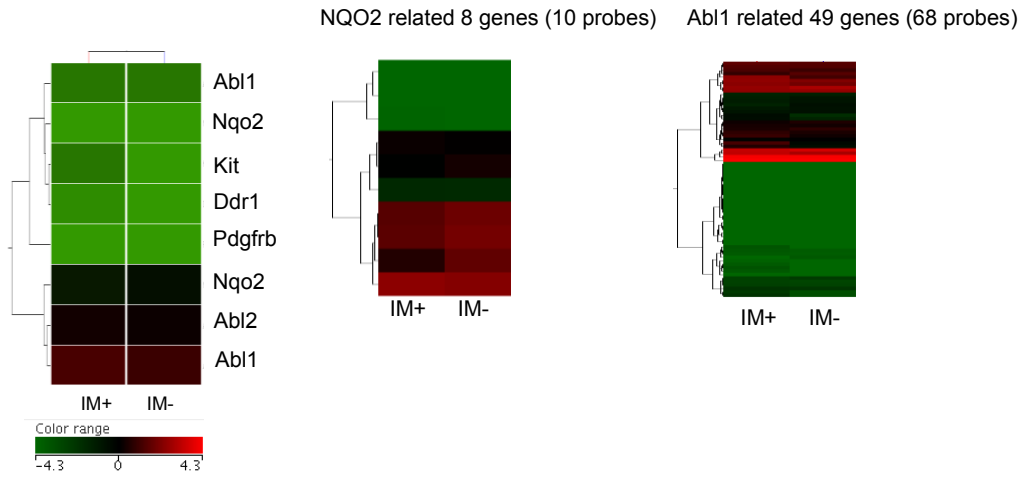


Figure 25 マイクロアレイによる ABL1 関連遺伝子・49 遺伝子(右パネル)と、NQO2 関連遺伝子・8 遺伝子(中パネル)の解析

6. 考察

6-1 in vitro における IM によるマウス脾臓細胞の CSR 抑制作用について

マウス脾臓細胞を LPS と IL-4 で 37°C、72 時間共刺激培養を行ない、細胞表面 IgG1 の発現量の検索をした。IM 濃度依存性に低下を認め (Figure 7)、IgM から IgG1 への CSR が抑制されていると考えられた。IgG1 への CSR には、IgG1 の I プロモーターによって誘導される germline transcript と AID の両者が必要である。両者の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法によって検索した結果、AID は IM 濃度依存性に低下を認めたのに対し (Figure 8)、IgG1 germline transcript は低下を認めなかった (Figure 9)。IM により AID の発現が抑制され、その結果、IgG1 へのクラススイッチ組換えが抑制されたことにより、何らかのネガティブフィードバック機構が働き、IgG1 germline transcript が上昇に転じたものと考えられた。以上より、IM による CSR 抑制作用は、AID の発現を抑制することによると考えられた。

その作用経路を検討するため、JAK2 インヒビターと、Flt3 インヒビターを用いた検討を行なった。JAK2 インヒビター、Flt3 インヒビターともにまだ単一のキナーゼ阻害作用を有する薬剤は開発されておらず、JAK2 阻害剤として臨床開発が進んでいる Ruxolitinib と CEP-701 の 2 剤を解析に用いた。Ruxolitinib は汎 JAK インヒビターであるが、JAK1、JAK2、JAK3 の IC_{50} はそれぞれ 2.7nM、4.5nM、

322nMであり、臨床投与量においては、ほぼ JAK1/2 の阻害剤である。一方、CEP-701 は JAK2、JAK3 以外にも Flt3、TrkA、Flk1、KDR、VEGFR2 などのキナーゼ阻害作用を有する。それぞれの IC₅₀ は JAK2/3 0.9nM、Flt3 3nM、TrkA 3.4nM、Flk1/KDR/VEGFR2 65nM である。この 2 剤を用いたクラススイッチ組換えの状態と AID mRNA 発現量に関しては、相関性ははっきりせず、この解析からは IM のクラススイッチ組換え抑制作用がどの経路を介したものであるのかは特定できなかった。

他の免疫グロブリンサブクラスに関しては、CSR の解析によく用いられるマウスリンパ腫細胞株である CH12F3-2A 細胞を用いた IgA への CSR 作用の検討を行なった。マウス脾臓細胞における IgG1 への CSR 抑制作用と同様に、CH12F3-2A 細胞株において、IM 濃度依存性に、IgA への CSR 抑制作用が認められた (Figure 14)。CFSE 解析による細胞分裂の状態の評価では、高容量の IM を用いたため、CH12F3-2A 細胞株においても、IM 10 μ M、20 μ M とともに細胞分裂の低下を認めた。リアルタイム PCR 法を用いた AID mRNA 発現量の検討では、IM 20 μ M 投与時には低下傾向を認めるものの、IM 10 μ M 投与時にはむしろ上昇傾向を認めており、マウス脾臓細胞を用いた時のような IM 濃度依存性の低下は認められなかった (Figure 15)。CH12F3-2A 細胞は腫瘍化した細胞株であるため、プライマリーのマウス脾臓細胞とは異なる結果が得られたものと考えられる。

IMにより AID の抑制を介して CSR が抑制されることが示されたが、AID の発現は細胞分裂の影響を受けるとの報告もあり [30]、今回の作用が IM 自体による作用であるのか、それとも IM の細胞毒性により間接的に AID の発現が抑制され CSR が抑制されるのか、検討を行なった。

BrdU 取り込み分析の結果より、 $10\ \mu\text{M}$ IM の DNA 合成は低下を認め (Figure 16 上段)、CFSE 解析の結果より細胞分裂も低下を認めた (Figure 16 下段)。アネキシン V 分析の結果からは、アポトーシスへは影響は認められなかった (Figure 16 中段)。以上より、 $10\ \mu\text{M}$ IM では、アポトーシスへの影響はないものの、DNA 合成、細胞分裂には影響があり、細胞分裂の抑制により AID の発現が抑制され、CSR に影響を与えている可能性も否定はできなかった。

しかし、 $1\ \mu\text{M}$ IM では、CFSE 解析の結果から細胞分裂の影響は認められておらず (Figure 16 下段)、その時点での AID mRNA は既に低下が認められた (Figure 8)。また、IM にかえて、5-FU を投与したところ、細胞分裂の低下がみられた時点においても、AID mRNA 発現量の低下は認められず (Figure 17)、細胞分裂は AID の発現には必ずしも必要な要素ではないと考えられた。

以上より、今回の作用は、細胞分裂による影響ではなく、IM 自体による AID 抑制作用と考えられた。

6-2 in vivoにおけるIMによるマウス脾臓細胞のCSR作用について

次に in vivo においても IM による CSR 抑制作用が認められるのか、検討を行った。

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 [2]。その際に IM の投与を併せて行ない、マウスの脾臓を解析した。病理組織学的解析 (Figure 18) では、正常コントロールと比較して、SRBCs による免疫刺激を行なったマウス (SRBCs (+) マウス) は胚中心が明瞭となっており、十分な免疫刺激が加わったと考えられるが、IM の投与を併せて行ったマウス (SRBCs+IM (+) マウス) においては、正常コントロール及び SRBCs (+) マウスよりも胚中心は小さく不明瞭となっている。AID の免疫染色では、SRBCs (+) マウスは胚中心の活性化 B 細胞と一致して AID が陽性となっており、SRBCs による免疫刺激により胚中心の活性化 B 細胞における AID の発現が亢進したと考えられた。一方、SRBCs+IM (+) マウスにおいては、胚中心における AID の発現はごくわずかであった。リアルタイム PCR 法による AID mRNA 発現量の解析でも、SRBCs+IM (+) マウスは低下を認め (Figure 19 左パネル)、またフローサイトメトリーによる脾臓細胞表面 IgG1 発現量でも SRBCs+IM (+) マウスは低下を認めた (Figure 19 右パネル)。以上より、in vivo においても IM 投与により AID 発現が抑制され、CSR が抑制されていると考えられた。

AID ノックアウトマウスを用いた脾臓の組織学的解析の報告では、IgM+PNA(peanut agglutinin)+活性化 B 細胞の増加により濾胞は拡大し、胚中心も明瞭となるとされているが[2]、SRBCs+IM(+)マウスの胚中心の形態は、AID ノックアウトマウスとは異なるものであった。その理由として、今回用いた *in vitro* の培養系においては 72 時間の培養刺激中にほぼ成熟 B 細胞のみとなるのに対し、*in vivo* の実験系においては T 細胞や樹状細胞も存在しており、IM はそれらの血球細胞にも影響を与えてしまうことや[19-20]、IM を用いた今回の実験系では、AID ノックアウトマウスほどに AID を抑制できていないことが原因である可能性が考えられた。

6-3 レトロウィルスを用いた外因性 AID 強制発現時の IgG1 CSR 抑制作用について

次にレトロウィルスを用いて外因性に AID を発現させた時に、IM により抑制されていた CSR が回復するのか検討を行なった。

LPS+IL-4 による共刺激を 24 時間行なった後に、レトロウィルスベクターを用いて、AID の形質導入を行なった。AID を含まないコントロールベクターである pMSCV-IRES/eGFP ベクターを導入した検体では、10 μ M IM の投与により IgG1 発現量の低下を認めたが、pMSCV-murin AID-IRES/eGFP ベクターにより外因性に

AID を強制発現すると、 $10\ \mu\text{M}$ IM でも IgG1 発現量は $0\ \mu\text{M}$ と同等もしくはそれ以上にまで回復を認めた (Figure 21 上段)。その際の BrdU 取り込み分析により、BrdU 取り込み率は IM 投与により変わらず抑制されたままであるにもかかわらず、AID の発現回復により CSR の回復が認められていることがわかった (Figure 21 下段)。

以上より、この実験からも IM による CSR 抑制作用は、IM の細胞毒性により細胞分裂の低下をきたしたのではなく、IM 自体による AID の抑制作用によるものであると裏付けられた。

6-4 IM による AID を介した CSR 抑制作用の経路について

AID の発現を調節しているプロモーター領域は 4 つ存在しているが、それらのプロモーターの中でも特にファーストイントロンに存在する Region2 領域が AID の発現に重要な役割を果たしている [6] (Figure 4)。今回、AID プロモーター2 領域に作用する転写因子として、Pax5、E2A、E2f7、E2f8 の発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した。4 因子ともに IM 投与により発現量低下を認めた。特に E2A に関して、 $10\ \mu\text{M}$ IM では $0\ \mu\text{M}$ IM の約 500 分の 1 と著明な低下を認め、IM による AID 抑制作用に重要な役割を果たしていると考えられた (Figure 23)。

BCR-ABL 陽性細胞株を用いた IM によるマイクロアレイ解析の報告では ID2 の発

現量に有意な差が認められたとの報告があるが[12]、今回の検討では、有意差は得られず、IM 投与により上昇を認めるものの、濃度依存性は認められなかった。また、IM の細胞毒性による影響を検討するため、B 細胞活性化マーカーとして、RAG1、RAG2、CD40 の発現量を検討したが、いずれも IM 投与による有意な変動は認められず、RAG2、CD40 に関しては IM 投与によりむしろ上昇傾向を認めており、この結果からも IM による CSR 抑制作用は、IM による細胞毒性を介した間接的なものではないと考えられた。

mRNA の発現量では E2A の著明な低下を認めたため、次にウェスタンブロット法にて蛋白発現量の検討を行なった。E2A 遺伝子は E12 と E47 の 2 つの転写因子をコードしており、実験系の確立している E47 の発現量を解析した[28]。リアルタイム PCR 法の結果と同様に、10 μ M IM では E47 蛋白の発現はほとんど検出できないレベルまで低下を認めた (Figure 24 左パネル)。また、実際に E47 蛋白の E ボックスへの結合活性が低下しているか DNA 親和性沈降分析にて検討した。IM 投与時には、変異型プローブを用いて E ボックスに結合できないようにした場合とほぼ同程度まで結合低下を認めた (Figure 24 右パネル)。

以上より、IM 投与により E2A の発現は mRNA レベルのみでなく、蛋白量、E ボックスの DNA への結合量も低下を来し、AID の発現を抑制していると考えられた。

次にマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行ない、更なる抑制経路の解析を進めた。0 μ M IM と 10 μ M IM 投与時の遺伝子発現量の差を統計学的に解析した結果、有意差を認めた因子として、1189 因子がアップレギュレートされた因子、257 因子がダウンレギュレートされた因子として検出された。GFSE 解析を行なったが、IM による抑制経路として特異的な遺伝子群は認められず、作用経路は解明出来なかった。

IM はキナーゼインヒビターであるが、このマイクロアレイの結果からはダウンレギュレートされた因子よりもアップレギュレートされた因子の方が多く検出されている。今回の解析は、IM 投与 72 時間後に行なっているが、IM による標的分子の阻害作用は数時間後には起こっており、72 時間後にはこれらのキナーゼ阻害の結果、ネガティブフィードバック機構が働き、多くの因子がアップレギュレーションに転じてしまい、結果が複雑なものとなってしまった可能性がある。

IM の標的分子には、ABL、ARG、BCR-ABL、KIT、PDGFR、DDR1、NQO2 の遺伝子産物があるが[29]、現在までのところ、これらの分子と E2A の間には既知の経路は存在しない。今回の培養系においては、72 時間の培養により B 細胞はほぼ成熟 B 細胞となっており、成熟 B 細胞には PDGFR や c-Kit の発現は認められておらず[31-32]、これらのキナーゼを介した作用とは考えにくい。

一方、ABL は B 細胞を含めたほぼすべての組織の細胞で発現しており、c-Ab1 ノックアウト (KO) マウスの解析から、B 細胞の分化に重要な役割を果たしていることがわかっている [33-36]。c-Ab1 KO マウスでは、胎生期には特に形態的異常は認められないが、生後 2~3 週のうちに発育不良で死亡してしまう。これらのマウスでは、胸腺と脾臓の著明な萎縮を認め、T 細胞、B リンパ球ともに著明な減少を認める。B 細胞に関する検討では、プロ B 細胞とプレ B 細胞は著明に減少し、プレ B 細胞は増殖が抑制されており、アポトーシスの亢進を認める。また V-(D)-J 遺伝子再構成の欠損が認められる。このように ABL は B 細胞の初期分化に非常に重要な役割を果たしている。

今回の実験系では、マウス脾臓細胞を用いており、B 細胞はほとんどが成熟 B 細胞と考えられる。c-Ab1 の成熟 B 細胞における役割については、不明な点も多いが、AID の発現を調整する直接的な経路は現在のところ知られてはいない。しかし、c-Ab1 は、様々因子と連動して 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、今回の AID を介した CSR 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 effect の可能性も考えられる。

IM に AID 抑制作用が存在することは臨床上も非常に有用である可能性がある。前述のとおり、AID の持つ変異原性は免疫グロブリン遺伝子内に留まらず、その

過剰発現により染色体転座や異常な体細胞変異を起こし、腫瘍形成への関与が指摘されている。現在、IM が治療薬として用いられている Ph+ALL や CML 急性転化においても、AID の過剰発現が認められ、点突然変異の導入による薬剤耐性獲得へ関与しているとの報告もある [12-13, 37-38]。IM 投与中にも関わらず、点突然変異を獲得してしまう機序としては、加療前より元々存在していた IM 耐性変異クローンが、IM 投与により IM 感受性の主要クローンが抑制されることにより優位性を獲得し、増殖してくる可能性と、IM の持つ AID 抑制作用が点突然変異の出現を完全に押さえられるほどは強くない可能性などが考えられる。しかし、IM による治療は、他の治療と比較して点突然変異獲得による薬剤耐性の出現を抑制している可能性もある。現在、IM 以外に、第 2 世代 TKI としてニロチニブやダサチニブが臨床応用されており、その他にも TKI の開発が盛んに行なわれている。IM 以外の TKI に AID 抑制作用があるかどうかは今後の検討課題であるが、IM 以外の TKI は、IM と比較して BCR-ABL の阻害作用は強力となっているが、ダサチニブは、その他のチロシンキナーゼ活性の多くも阻害作用を有するマルチキナーゼ阻害剤であり、その作用はより複雑化してしまう。その意味でも、比較的限られたキナーゼ阻害作用を有する IM の作用機序を解明し、AID 抑制経路の解明から AID 阻害剤の開発へとつなげることは有用なことであると考えられる。ニロチニブに関しては、IM とほぼ標的が重なっているが、よりチロシンキナー

ゼ活性を強力に阻害する。今回、ニロチニブに関する検討は行なっていないが、IM の CSR 抑制作用が c-Ab1 を介したものであれば、ニロチニブは IM よりも強力な AID 抑制作用を有する可能性がある。

7. 結論および今後の展望

AID の過剰発現は悪性疾患や自己免疫性疾患など多くの疾患に関与している [39-40]。また AID は IgM から IgE へのクラススイッチ組換えにも重要であり、AID の過剰発現はアレルギー性疾患の発症にも関与している可能性がある。メシル酸イマチニブは、10 数年来、臨床現場において比較的安全に使用されており、今回の結果を元にするると、AID の関連した様々な疾患に有用である可能性がある。実際に、慢性骨髄性白血病 (CML) に合併した慢性関節リウマチや気管支喘息がメシル酸イマチニブの投与により劇的に改善したという報告もいくつか見られる [41-42]。

AID 阻害剤は、現在のところ、国内外の製薬企業も開発には成功しておらず、開発に成功すれば上記のような様々な疾患に恩恵がもたらされる可能性がある。IM では、AID の完全阻害とまでは行かないが、抑制薬として有用である可能性がある。また今回の検討では、IM の AID 抑制作用の詳細な機序はまだブラックボックスの中であるが、機序の解明により AID 阻害剤の開発につながる可能性がある。

8. 引用文献

[1]Masamichi Muramatsu, V.S Sankaranand, Shrikant Anant, Manabu Sugai, Kazuo Kinoshita, Nicholas O. Davidson and Tasuku Honjo. Specific expression of Activation-induced cytidine deaminase(AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem.* 274(26):18470-18476. 1999.

[2]Masamichi Muramatsu, Kazuo Kinoshita, Sidonia Fagarasan, Shuichi Yamada, Yoichi Shinkai and Tasuku Honjo. Class switch recombination and hypermutation require Activation-Induced Cytidine Deaminase(AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 102:553-563. 2000.

[3]Masamichi Muramatsu, Hitoshi Nagaoka, Reiko Shinkura, Nasim A. Begum and Tasuku Honjo. Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. *Adv Immunol.* 94:1-36. 2007.

[4]Kazuo Kinoshita, Motoko Harigai, Sidonia Fagarasan, Masamichi Muramatsu, and Tasuku Honjo. A hallmark of active class switch recombination : Transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(22):12620-12633. 2001.

[5]Tasuku Honjo, Masamich Muramatsu and Sidonia Fagarasan. AID:How dose

it aid antibody diversity? *Immunity*. 20:659–668. 2004.

[6] Thinh Huy Tran, Mikiyo Nakata, Keiichiro Suzuki, Nasim A Begum, Reiko Shinkura, Sidonia Fagarasan, Tasuku Honjo and Hitoshi Nagaoka. B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress *Aicda* by overcoming the effectors of silencers. *Nat Immunol*. 11(2):148–154. 2010.

[7] Il-mi Okazaki, Hiroshi Hiai, Naoki Kakazu, Shuichi Yamada, Masamichi Muramatsu, Kazuo Kinoshita and Tasuku Honjo. Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med*. 197(9):1173–1181. 2003.

[8] Ai Kotani, Il-mi Okazaki, Masamichi Muramatsu, Kazuo Kinoshita, Nasim A. Begum, Toshiharu Nakajima, Hirohisa Saito and Tasuku Honjo. A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(12):4506–4511. 2005.

[9] Ai Kotani, Naoki Kakazu, Tatsuaki Tsuruyama, Il-mi Okazaki, Masamichi Muramatsu, Kazuo Kinoshita, Hitoshi Nagaoka, Daisuke Yabe and Tasuku Honjo. Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(5):1616–1620. 2007.

[10]Jobst Greeve, Antje Philipsen, Kristina Krause, Wolfram Klapper, Klaus Heidorn, Brian E.Castle, Joe Janda, Kenneth B.Marcu and Reza Parwaresch. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 101(9):3574-3580. 2003.

[11]Emilia Albesiano, Bradley T.Messmar, Rajendra N.Damle, Steven L.Allen, Kanti R.Rai and Nicholas Chiorazzi. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: Expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood*. 102(9):3333-3339. 2003.

[12]Niklas Feldhahn, Nadine Henke, Kai Melchior, Cihangir Duy, Bonaventure Ndikung Soh, Florian Klein, Gregor von Levetzow, Bernd Giebel, Aihong Li, Wolf-Karsten Hofmann, Hassan Jumaa and Markus Müschen. Activation-induced cytidine deaminase acts as a mutator in BCR-ABL1-transformed acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med*. 204(5):1157-1166. 2007.

[13]Lars Klemm, Cihangir Duy, Ilaria Iacobucci, Stefan Kuchen, Gregor von Levetzow, Niklas Feldhahn, Nadine Henke, Zhiyu Li, Thomas K.Hoffmann, Yong-mi Kim, Wolf-Karsten Hofmann, Hassan Jumaa, John Groffen, Nora Heisterkamp, Giovanni Martinelli, Michael R.Lieber, Rafael Casellas and

Markus Müschen. The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 16:232-245. 2009.

[14] Chie Ishikawa, Sawako Nakachi, Masachika Senba, Manabu Sugai and Naoki Mori. Activation of AID by human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein and the possible role of its constitutive expression in ATL genesis. *Carcinogenesis*. 32(1):110-119. 2011.

[15]Yuko Matsumoto, Hiroyuki Marusawa, Kazuo Kinoshita, Yoko Endo, Tadayuki Kou, Toshiyuki Morisawa, Takeshi Azuma, Il-mi Okazaki, Tasuku Honjo and Tsutomu Chiba. *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med*. 13(4):470-476. 2007.

[16]Gavin Babbage, Christian H.Ottensmeier, Jeremy Blaydes, Freda K.Stevenson and Surinder S.Sahota. Immunoglobulin Heavy chain locus events and expression of activation-induced cytidine deaminase in epithelial breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 66(8):3996-4000. 2006.

[17]Hiroyuki Marusawa, Atsushi Takai and Tsutomu Chiba. Role of Activation-Induced Cytidine Deaminase in Inflammation-Associated Cancer

Development. *Adv Immunol.* 111:109–141. 2011.

[18] David G. Savage and Karen H. Antman. Imatinib mesylate—A new oral targeted therapy. *N Engl J Med.* 346(9):683–693. 2002.

[19] H Gao, B-N Lee, M Talpaz, NJ Donato, JE Cortes, HM Kantarjian and JM Reuben. Imatinib mesylate suppresses cytokine synthesis by activated CD4 T cells of patients of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia.* 19(11):1905–1911. 2005.

[20] Mohamad Mohty, Eric Jourdan, Naira Ben Mami, Norbert Vey, Ghandi Damaj, Didier Blaise, Daniel Isnardon, Daniel Olive and Beatrice Gaugler. Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 103(12):4666–4668. 2004.

[21] Rita Santachiara, Rossana Mafferi, Silvia Martinelli, Annalisa Arcari, Federico Piacentini, Elena Trabacchi, Pierluigi Alfieri, Angera Ferrari, Giovanna Leonardi, Gabriele Luppi, Giuseppe Longo, Daniele Vallisa, Roberto Marasca and Giuseppe Torelli. Development of hypogammaglobulinemia in patients treated with imatinib for chronic myeloid leukemia or gastrointestinal stromal tumor. *Haematologica.* 93(8):1252–1255. 2008.

[22] Juan Luis Steegmann, Gemma Moreno, Concepcion Alaez, Santiago Osorio,

Asuncion Granda, Rafael De La Camara, Eva Arranz, Fernando Gomez Reino, Francisco Rodriguez Salvarez, Jose Maria Fernandez-Ranada and Cecilia Munoz. Chronic myeloid leukemia patients resistant to or intolerant of interferon α and subsequently treated with imatinib show reduced immunoglobulin levels and hypogammaglobulinemia. *Haematologica*. 88(7):762-768. 2003.

[23]Shin Nakayama, Tokiko Nagamura-Inoue, Kazuaki Yokoyama, Nobuhiro Ohno, Jun Ooi, Satoshi Takahashi, Kaoru Uchamaru, Toru Iseki and Arinobu Tojo. Cytogenetic remissions induced by interferon α and Imatinib mesylate are immunologically distinct in chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 86(3):208-211. 2007.

[24]Reiko Shinkura, Satomi Ito, Nasim A Begum, Hitoshi Nagaoka, Masamichi Muramatsu, Kazuo Kinoshita, Yoshimasa Sakakibara, Hiroko Hijikata and Tasuku Honjo. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol*. 5(7):707-712. 2004.

[25]Michele K. Anderson, Gabriela Hernandez-Hoyos, Christopher J. Dionne, Alexandra M. Arias, Dan Chen and Ellen V. Rothenberg. Definition of

regulatory network elements for T cell development by perturbation analysis with PU.1 and GATA-3. *Developmental Biology*. 246:103–121. 2002.

[26] Guilin Liu, Bo Wang, Jidong Zhang, Hong Jiang and Fenye Liu. Total panax notoginsenosides prevent atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice : Role of downregulation of CD40 and MMP-9 expression. *J Ethnopharmacol*. 126:350–354. 2009.

[27]Melanie E. Quong, David P. Harris, Susan L. Swain and Cornelis Murre. E2A activity is induced during B-cell activation to promote immunoglobulin class switch recombination. *EMBO J*. 18(22):6307–6318. 1999.

[28]Camil Elie Sayegh, Melanie W Quong, Yasutoshi Agata and Cornelis Murre. E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat Immunol*. 4(6):586–593. 2003.

[29]Oliver Hantschel, Uwe Rix and Giulio Superti-Furga. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuke Lymphoma*. 49(4):615–619. 2008.

[30]James S. Rush, Man Liu, Valerie H. Odegard, Shyam Unniraman and David G. Schatz. Expression of activation-induced cytidine deaminase is required by cell division, providing a mechanistic basis for division-linked class

switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(37):13242–13247. 2005.

[31]B. Trink, G. Wang, W. Shahar, N. Meydan and C.M. Roifman. Functional platelet-derived growth factor-beta(PDGF- β) receptor expressed on early B-lineage precursor cells. *Clin Exp Immunol*. 102(2):417–424. 1995.

[32]Meinrad Busslinger. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol*. 22:55–79. 2004.

[33]Victor L. J. Tybulewicz, Camilla E. Crawford, Peter K. Jackson, Roderick T. Bronson and Richard C. Mulligan. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*. 65:1153–1163. 1991.

[34]Pamela L. Schwartzberg, Alan M. Stall, Jeff D. Hardin, Katherine S. Bowdish, Teresa Humaran, Sharon Boast, Margaret L. Harbison, Elizabeth J. Robertson and Stephen P. Goff. Mice homozygous for the abl^{m1} mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell*. 65:1165–1175. 1991.

[35]Rachel A. Liberatore and Stephen P. Goff. c-Abl-deficient mice exhibit reduced numbers of peritoneal B-1 cells and defects in BCR-induced B cell activation. *Int Immunol*. 21(4):403–414. 2009.

[36]Hans Brightbill and Mark S.Schlissel. The effects of c-Abl mutation on developing B cell differentiation and survival. *Int Immunol.* 21(5):575–585. 2009.

[37]Matthew P.Strout and David G.Schatz. Imatinib resistance and progression of CML to blast crisis: Somatic hypermutation AIDing the way. *Cancer Cell.* 16:174–176. 2009.

[38]Tanja Andrea Gruber, Mi Sook Chang, Richard Sposto and Markus Müschen. Activation-induced cytidine deaminase accelerates clonal evolution in BCR-ABL1-driven B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 70(19):7411–7420. 2010.

[39]Laura Pasqualucci, Govind Bhagat, Mila Jankovic, Mara Compagno, Paula smith, Masamichi Muramatsu, Tasuku Honjo, Herbert C Morse III, Michel C Nussenzweig and Riccardo Dalla-Fabera. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet.* 40(1):108–112. 2008.

[40]Hui-Chen Hsu, Yalei Wu, PingAr Yang, Qi Wu, Godwin Job, Jian Chen, John Wang, Marry Ann V.Accavitti-Loper, William E.Grizzle, Robert H.Carter and John D.Mountz. Overexpression of activation-induced cytidine deaminase in B cells is associated with production of highly pathogenic autoantibodies.

J Immunol. 178(8):5357–5365. 2007.

[41]Kari K Eklund and Heikki Joensuu. Treatment of rheumatoid arthritis with imatinib mesylate: clinical improvement in three refractory cases.

Ann Med. 35(5):362–367. 2003.

[42]Deivasikamani Ramanujam, Feargal McNicholl, Darshayani Furby, Deborah Richardoson, Robert J. G. Cuthbert and Marry F. McMullin. Dramatic resolution of respiratory symptoms with imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia presenting with lower airway symptoms resembling asthma.

Leuk Lymphoma. 50(10):1721–1722. 2009.

9. 謝辞

本研究にあたり、東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野 東條有伸教授には、指導教官としてご指導およびご鞭撻を頂きました。

ここに改めて心より感謝の意を表明いたします。

また東海大学 創造科学技術研究機構 幸谷愛准教授には、医科学研究所異動後も変わらぬご指導およびご鞭撻を賜り、心より感謝の意を表します。

なお、本論文の内容が掲載されました Blood 119(13):3123-3127 の共著者として多大なるお力添えを頂きました東海大学 創造科学技術研究機構 呂軍先生、豊嶋孝恵さま、同大学伊勢原 教育・研究推進センター 分子科学部門 佐藤忠之さま、同大学医学部分子生命科学 田中正史教授、同病理診断学 中村直哉教授、同血液・腫瘍内科学 安藤潔教授、岐阜大学大学院医学系研究科 分子病態学 長岡仁教授、京都大学大学院医学研究科 免疫細胞生物学 縣保年准教授、東京大学医科学研究所 分子療法分野 横山和明先生(現・東海大学医学部生体防御学)、同付属病院 検査部 小柳津直樹准教授にも、ここに深く感謝の意を表します。

京都大学大学院医学研究科 免疫ゲノム医学 本庶佑教授、大阪大学医学部医学系研究科 病理学 幹細胞病理学 仲野徹教授、東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野 Bidisha Chanda さま、高橋圭介さま、

同付属病院 検査部 小野田春男さまには貴重なご意見やテクニカルサポートを頂きました。ここに感謝の意を表します。

本研究は文部科学省グローバル COE プログラム「ゲノム情報に基づく先端医療の教育研究拠点 - オーダーメイド医療の実現と感染症克服を目指して -」の支援を受け、行なわれました。ここに感謝の意を表します。