シンポジウム II-1: 追加発言

ノックアウトマウスを用いた BCL6 の機能解析

福田 哲也¹⁾, 徳久 剛史²⁾

1) 東京医科歯科大学医学部第一内科

2) 千葉大学医学部高次機能制御研究センター生体情報分野

Functional analysis of Bcl 6

Tetsuya Fukuda¹⁾, Takeshi Tokuhisa²⁾

1) First Department of Internal Medicine, Tokyo Medical and Dental University

2) Division of Developmental Genetics, Center for Biomedical Science, Chiba University School of Medicine

はじめに

ヒト悪性リンパ腫の多くに、様々な染色体異常、特に染色体の転座が認められる。この染色体転座の切断点の解析により多くの癌遺伝子がクローニングされている。これらの癌遺伝子の中には c-myc や bcl 2 などのようにリンパ球に限らず正常細胞の分化増殖や細胞死に重要な役割を果たしているものも多い。B 細胞リンパ腫、特にび慢性大細胞型リンパ腫において、染色体 3q27 を含む染色体転座が多く認められていた¹⁾²⁾。最近、この染色体転座切断領域より BCL6 遺伝子がクローニングされた^{3)~5)}。リンパ腫における転座点は 5' 非翻訳領域に集中しているため⁶⁾、この転座により BCL6 蛋白の構造は影響を受けない。しかし、この転座により BCL6 遺伝子は転座の相手遺伝子の転写調節領域の支配を受けるようになるため、その発現量に変化することにより細胞癌化に寄与すると考えられている。

マウス Bcl 6 の構造と発現

BCL6 蛋白はヒトでは706、マウスでは707アミノ酸から成り、両者では95%のアミノ酸配列の相同性

を持ち、非常に良く保存された遺伝子である⁷⁾。特に、1) C 末端にある、特異的塩基配列の DNA と結合する krüppel タイプの zinc finger motif, 2) リン酸化を受けるとされるその上流のセリン、プロリンに富んだ領域⁸⁾, 3) N 末端の蛋白-蛋白結合に関与するといわれる BTB もしくは POZ ドメイン⁹⁾¹⁰⁾と呼ばれる領域の3つの機能ドメインでは特に相同性が高く、zinc finger ドメインは100%保存されている。最近 BCL6 が遺伝子の転写を負に制御するリプレッサーとして機能するとの報告がいくつかのグループからあった^{11)~13)}。それらの報告によれば、転写抑制活性は BTB/POZ ドメインや zinc finger ドメインの上流領域にあるとされている。

BCL6 の発現は各臓器に ubiquitous に認められるが、特に骨格筋において強い発現がある⁷⁾。また、表皮、精子、骨髄単球系細胞において、その終末分化段階に BCL6 の誘導がみられている¹⁴⁾¹⁵⁾。これらの結果から、BCL6 は増殖反応の停止した終末分化時の細胞においても、転写因子として何らかの役割をはたしていることが示唆されている。ヒトリンパ系組織においては、胚中心 B 細胞に特に強い発現が認められる¹⁶⁾¹⁷⁾。我々が作製したマウス Bcl 6 特異

図1 4週齢の Bcl 6ノックアウトマウス（右）と、同胞のワイルドタイプ（左）を示す。ノックアウトマウスでは著明な成長障害が見られる。

図2 死亡したノックアウトマウスは、心拡大が著明で、心筋内には細胞浸潤が著しくその約半数が好酸球であった。

図3 抗原刺激後の Bcl 6 ノックアウトマウス由米の骨髓キメラマウス脾臓における胚中心の形成 (文献18より)

DNP-OVA で免疫後10日目の脾臓を摘出し anti-B220 (抗 B 細胞) 抗体とピーナツアグルチニン (PNA) で FACS 解析 (A, B) 及び免疫組織染色した (C, D: PNA, E, F: anti-B220)。右側の Bcl 6-/-RM (B, D, F) では, anti-B220陽性の一次濾胞は見られるが, PNA 陽性の胚中心の形成が全く見られない。G: 胚中心, F: 一次濾胞, T: 細動脈周囲リンパ球鞘 (T 細胞領域), M: 辺縁帯

抗体を用いて T 細胞依存型抗原免疫後のマウス脾臓を免疫組織染色すると, ヒトと同様に胚中心での強い発現が認められた¹⁸⁾。

ノックアウトマウスの作製

我々は, Bcl 6 の生理的機能の解析のためノックア

ウトマウスの作製を行った (投稿中)。Bcl 6 ノックアウトマウス (Bcl 6-/-) は, 生後発育遅延を来した (図 1), 3 ~ 7 週齢にて, 多くが死亡した。死亡したマウスの剖検では心拡大が顕著であり, 組織像では心筋内への好酸球を主体とした細胞浸潤が著明であった (図 2)。米国の 2 つのグループより我々

図4 A: Bcl 6^{-/-}RM 由来の脾臓 T 細胞と Bcl 6^{+/+}RM 由来の脾臓 B 細胞, B: Bcl 6^{-/-}RM 由来の B 細胞と Bcl 6^{+/+}由来の T 細胞を, RAG^{-/-}に移植後, 免疫し, 胚中心形成を PNA による染色にて解析した。(文献17より)

と同様なノックアウトマウスの報告が認められた¹⁹⁾²⁰⁾。彼らの *in vitro* の結果によれば, Bcl 6 が, STAT6 の DNA 結合配列と競合的に結合し, IL-4 からのシグナルを抑制するように働いており, Bcl 6^{-/-}ではこの抑制がなくなるため, IL-5等を産生する Th2の反応が優位となり, 好酸球浸潤等が起こると説明されている。しかしながら, IL-5のトランスジェニックマウスや Bcl 6^{-/-}の骨髄細胞を移植したマウスでは心筋炎が認められなかったことよ

り, Th2 の優位性以外の要素がこの心筋炎に関与している可能性がある。我々が, 好酸球の細胞浸潤が見られない3-4週齢のノックアウトマウス由来の心筋細胞を電子顕微鏡を用いて解析したところ, すでにミトコンドリアの異形性などの変性所見が観察されたことから, BCL6 は終末分化した心筋細胞がその機能を維持するのにも重要な遺伝子であることが示唆された (投稿中)。

Bcl 6のリンパ球における機能

このノックアウトマウスは、生後著しい成長障害を示し、ほぼ全例が生後しばらくして死亡してしまう。そこで、Bcl 6のリンパ球における機能を解析するため、元来成熟リンパ球を持たない RAG1 ノックアウトマウス (RAG^{-/-}) に Bcl 6^{-/-}の骨髄を移植し、そのマウス (Bcl 6^{-/-}RM) のリンパ球の機能を解析した。(RAG^{-/-}においては成熟リンパ球分化が起こらないため、Bcl 6^{-/-}RM で認められる成熟リンパ球は、全てドナーの Bcl 6^{-/-}由来と考えられる)。骨髄移植後3ヵ月後の Bcl 6^{-/-}RM において、フローサイトメトリーによる解析では、胸線における T 細胞分画、骨髄における B 細胞分画には異常を認めず、1 次リンパ組織での初期リンパ球分化には Bcl 6 は必須でないと考えられた。

成熟リンパ球の機能解析のため、Bcl 6^{-/-}RM を T 細胞依存型抗原を用いて免疫したところ、抗原特異的 IgM (免疫1週間後) 及び、IgG1 (2週間後) 抗体の産生は Bcl 6^{+/+}RM とほぼ同程度に認められた。しかしながら、組織学的検索の結果、Bcl 6^{-/-}RM において B 細胞領域である一次濾胞の形成は認められるものの、胚中心 (2次濾胞) の形成は全く認められず (図3) Bcl 6 が胚中心形成に必須であることが明らかとなった。

次に、Bcl 6 の発現は、成熟 T 細胞においても認められるため、この胚中心形成不全の原因が B 細胞の異常によるものか、T 細胞の異常に起因するかを確かめた。Bcl 6^{-/-}RM, Bcl 6^{+/+}RM より各々脾臓 T, B 細胞を単離し、それらを組み合わせて RAG^{-/-} に移植し、T 細胞依存型抗原で免疫後、胚中心形成能を検討した。その結果、Bcl 6^{+/+}RM 由来の B 細胞と Bcl 6^{-/-}RM 由来の T 細胞を移植したもの

では、胚中心の形成が認められたが、Bcl 6^{-/-}RM 由来の B 細胞と Bcl 6^{+/+}RM 由来の T 細胞の組み合わせでは、胚中心の形成は認められなかった (図4)。このことより、B 細胞における Bcl 6 の発現が胚中心形成に必須であることが明らかとなった。*in vitro* において、Bcl 6^{-/-}RM の脾臓 B 細胞を、抗 IgM 抗体、lipopolysaccharide、インターロイキン 4, CD40 リガンド等で刺激した後の増殖反応を解析したところ、Bcl 6^{-/-}RM はこれらの刺激に Bcl 6^{+/+}RM と同様に反応した。

結 語

以上より、Bcl 6 は T 細胞依存型免疫反応において、成熟 B 細胞の増殖及び、抗体産生細胞への分化には必須ではなく、胚中心 B 細胞の分化に必須な転写因子であると考えられた。

胚中心は B 細胞の著明な増殖、免疫グロブリン遺伝子の体細胞超変異、クラススイッチ、その後の記憶 B 細胞への分化が起こる液性免疫、特に免疫学的記憶形成に重要な場である。従って、これらの機構解析は予防医学の面からも重要と考えられる。しかし、胚中心の形成及び様々な反応の分子学的機構についてはいまだ不明な点が多い。B 細胞レセプターと CD40 からのシグナルが胚中心形成に必須と考えられるが、Bcl 6 はこれらの刺激だけでは持続的な誘導がかからず (未発表)、Bcl 6 を強発現させる何らかの付加的なシグナルが胚中心形成に必要と考えられる。Bcl 6 は胚中心 B 細胞特異的に誘導され、転写因子として胚中心反応の制御をしていると考えられ、胚中心における標的遺伝子の解明が胚中心形成、そして悪性リンパ腫の発症の機構解明に結びつくと考えられる。

文

- 1) Lo Coco F, Ye BH, Lista F, et al: Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. Blood 83: 1757-1759 1994
- 2) Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, et al: LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. Blood 83: 2423-2427 1994
- 3) Ye BH, Lista F, Lo Coco, et al: Alterations of

献

- a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. Science 262: 747-750 1993
- 4) Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, et al: LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. Nat Genet 5: 66-70 1993
- 5) Miki T, Kawamata N, Hirose S, et al: Gene involved in the 3q27 translocation associated with B-cell lymphoma, BCL5, encodes a

- Kruppel-like zinc-finger protein. *Blood* 83:26-32 1994
- 6) Kawamata N, Miki T, Fukuda T, et al: The organization of the BCL6. *Leukemia* 8:1327-1330 1994
 - 7) Fukuda T, Miki T, Yoshida T, et al: The murine BCL6 gene is induced in activated lymphocytes as an immediate early gene. *Oncogene* 11:1657-1633 1995
 - 8) Moriyama M, Yamochi T, Semba K, et al: BCL-6 is phosphorylated at multiple sites in its serine- and proline-clustered region by mitogen-activated protein kinase (MAPK) in vivo. *Oncogene* 22:2465-2474 1997
 - 9) Zollman S, Godt D, Prive GG. et al: The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10717-10721 1994
 - 10) Bardwell VJ & Treisman R: The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes & Dev* 8:1664-1677 1994
 - 11) Deweindt C, Albagli O, Bernardin F et al: The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: a novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain. *Cell Growth Differ Dec* 6:1495-1503 1995
 - 12) Seyfert VL, Allman D, He Y, et al: Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. *Oncogene* 12:2331-2342 1996
 - 13) Chang C-C, Ye BH, Chaganti RSK, et al: BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6947-6952 1996
 - 14) Yoshida T, Fukuda T, Hatano M, et al: The BCL6 gene is predominantly expressed in keratinocytes at terminal differentiation stage. *Biochem Biophys Res Commun* 228:216-220 1996
 - 15) Yamochi T, Kitabayashi A, Hirokawa M et al: Regulation of BCL-6 gene expression in human myeloid/monocytoid leukemic cells. *Leukemia* 11:694-700 1997
 - 16) Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, et al: BCL-6 gene product, a 92-to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood* 86:28-37 1995
 - 17) Cattoretti G, Chang C-C, Cechova K, et al: BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86:45-53 1995
 - 18) Fukuda T, Yoshida T, Okada S et al: Disruption of the bcl 6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med* 186:439-448 1997
 - 19) Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D et al: Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276:589-592 1997
 - 20) Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J et al: The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Gene* 16:161-170 1997