

高親和性免疫グロブリン発現 B 細胞の選択・維持機構

九州大学 生体防御医学研究所 免疫ゲノム生物学分野
馬場 義裕

1. 背景と目的

我々は常に細菌やウイルスなどの病原体からの攻撃に晒されているが、B細胞の抗体産生により多くの感染症の脅威から守られている。特に、抗体産生時におけるリンパ組織の胚中心と呼ばれる部位では、B細胞が抗原刺激を受けて活発に増殖し、抗体の親和性を高めていくことから、胚中心の形成は抗体が効率良く病原体を排除するために必須のプロセスであると考えられている。よって、胚中心におけるB細胞分化と抗体親和性成熟のメカニズムを明らかにすることは極めて重要である。胚中心 B細胞はB細胞受容体 (B cell receptor: BCR) を介して濾胞性樹状細胞上の抗原に結合し、BCRシグナルを受けるが、その際、親和性の高い抗体を発現するB細胞が優先的に抗原と結合すると考えられる。その後、選択されたB細胞は抗原提示を行い、T細胞からのヘルプにより抗体産生細胞に分化する。近年、高親和性B細胞の選択は、濾胞性T細胞に対するB細胞の抗原提示量で規定される。つまり、競合的選択がT細胞との相互作用で決定されることが示された (図1)。一方、濾胞性樹状細胞上でのB細胞の抗原認識がどういう役割を果たしているのかは未解決課題として残されている。

抗原認識したB細胞の主要な反応として細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度の上昇が知られているが、胚中心B細胞における Ca^{2+} シグナルの重要性は未だ不明である。そこで、本研究では、 Ca^{2+} シグナルを基軸に「高親和性免疫グロブリンを発現する胚中心B細胞の抗原認識の重要性」を解明し、胚中心B細胞の選択的増殖・維持の仕組みを理解することを目的とする。

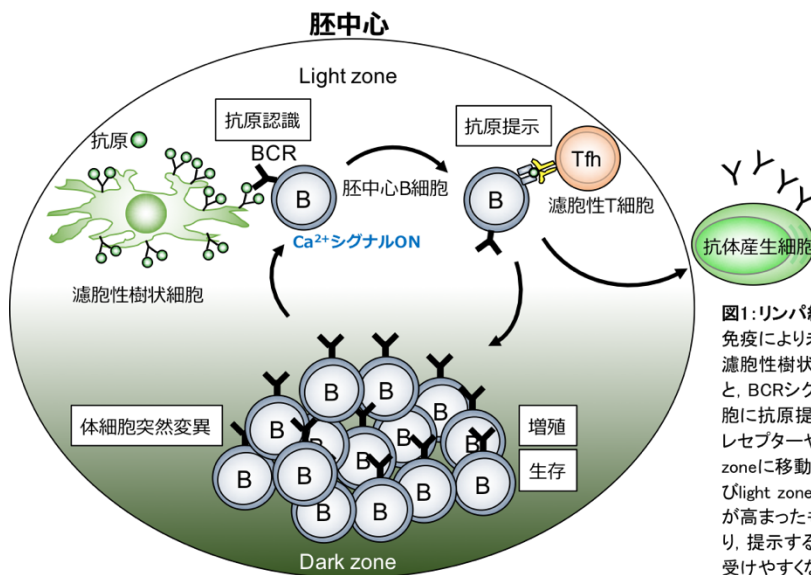


図1:リンパ組織の胚中心におけるB細胞のBCR親和性成熟免疫により未熟B細胞が胚中心を形成し、light zoneにおいて濾胞性樹状細胞上の抗原をBCRを介してB細胞が認識すると、BCRシグナルが惹起される。そして、同抗原を濾胞性T細胞に抗原提示し、相互作用することにより濾胞性T細胞からレセプターやサイトカインなどの刺激をもらい、B細胞はdark zoneに移動し増殖する。そこで、体細胞突然変異が生じ、再びlight zoneに戻る。体細胞突然変異により、BCRの親和性が高まったものは、濾胞性樹状細胞の抗原認識が優位になり、提示する抗原量も多くなり、濾胞性T細胞からのヘルプを受けやすくなる。抗原認識の際、BCRシグナルが誘導され、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると考えられているが、実証されておらず、その生理的意義も不明である。

2. 方法

- (1) B細胞特異的 Ca^{2+} レポーターマウスとニワトリ卵白リゾチーム (Hen Egg Lysozyme: HEL) 抗原特異的BCRを有するトランスジェニックマウス (Ca^{2+} -Hel-Igマウス) を交配したマウスを作成し、そのマウス由来の胚中心B細胞を2光子顕微鏡を用いてin vivo Ca^{2+} イメージングを行った。具体的には、レシピエントマウスを羊赤血球SRBCで免疫し、その後、 Ca^{2+} -Hel-Ig B細胞を移入する。24時間後に、HEL-SRBCで皮下免疫をし、5日後に所属リンパ節のライブイメージングを取得した。その際、濾胞性樹状細胞はanti-PE抗体でラベルした。

- (2) 小胞体カルシウムセンサー分子STIM1とSTIM2の胚中心特異的およびB細胞特異的ダブルノックアウトマウスを作成した(STIM GC-DKOとSTIM B-DKO)。それらマウスとコントロールマウスの混合骨髄キメラを作成し、NP-CGG/アジュバントで免疫することにより、胚中心B細胞の性状と分化および親和性成熟を検証した。
- (3) STIM B-DKOとコントロールマウスの脾臓B細胞を使った競合的移入実験により、胚中心B細胞におけるカルシウム流入の増殖、細胞死への影響を細胞、遺伝子レベルで検証した。

3. 結果

In vivoイメージングにより、抗原特異的胚中心B細胞が濾胞性樹状細胞と接触した際に、胚中心B細胞のカルシウム上昇が認められた。STIM GC-DKOとコントロールマウスの混合骨髄キメラを作成し、NP-CGGで免疫した後に、B細胞の数を検討したところ、全体、記憶B細胞の数はSTIMの欠損で影響はみられなかったが、STIM欠損胚中心B細胞はコントロールに比べて数が減少することが判明した(図2)。Light zoneとdark zoneの割合に変化はなかった。さらに、NP-CGGで免疫した際にみられる親和性成熟はVH186.2領域の体細胞突然変異で評価したところ、STIM欠損B細胞ではW33L変異が有意に減少していることがわかった。STIM B-DKOとコントロールマウスの脾臓B細胞を使った競合的移入実験により、STIM欠損胚中心B細胞は増殖に異常がなかったものの、アポトーシスが亢進していることが明らかになった。

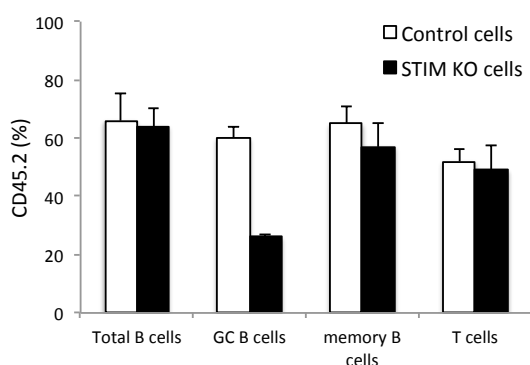


図2 STIM欠損細胞を有するマウスのB細胞分化
胚中心B細胞特異的STIM欠損マウス、あるいはそのコントロールマウス(CD45.2)と野生型マウス(CD45.1/CD45.2)の骨髄細胞を混合して作製した競合的骨髄キメラマウスをT細胞依存的抗原で免疫した。その結果、STIMを欠損した胚中心(GC)B細胞の割合は、コントロール細胞と比較して著明に減少した。

4. 考察、まとめ

胚中心B細胞が濾胞性樹状細胞上の抗原を認識する生理的意義は？という疑問は極めて重要な課題であるが、未だ明らかにされていない。本研究課題の独自のアプローチにより、B細胞内Ca²⁺レベルをリアルタイムでモニターすることで、濾胞性樹状細胞と接触した胚中心B細胞の活性化を直接可視化することに成功した。また、小胞体Ca²⁺センサーSTIMを欠損させるとBCR依存的カルシウム流入のみを阻害することができるという知見(PNAS, 2006; Immunity, 2011)を基盤に、胚中心B細胞特異的STIM欠損マウスを利用することで、STIM欠損胚中心B細胞のW33Lの変異が減少する、ならびに、アポトーシスが亢進すること明らかとなり、胚中心B細胞形成におけるCa²⁺シグナルの重要性の一端を明らかにできた。これらの成果は、これまで不明であった胚中心B細胞の親和性成熟のメカニズム解明の糸口になると期待される。

5. 発表論文、参考論文

- Kondo Y, Higa S, Iwasaki T, Matsumoto T, Maehara K, Harada A, Baba Y, Fujita M, Ohkawa Y. Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. *PLoS One*. 13(1): e0191532. (2018).
- Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Iino K, Adachi T, Baba Y, Kurosaki T, Ono K, Ito H. Stromal interaction molecule 1 haploinsufficiency causes maladaptive response to pressure overload. *PLoS One*. 12(11): e0187950. (2017)
- Hosen N, Matsunaga Y, Hasegawa K, Matsuno H, Nakamura Y, Makita M, Watanabe K, Yoshida M, Satoh K, Morimoto S, Fujiki F, Nakajima H, Nakata J, Nishida S, Tsuboi A, Oka Y, Manabe M, Ichihara H, Aoyama Y, Mugitani A, Nakao T, Hino M, Uchibori R, Ozawa K, Baba Y, Terakura S, Wada N, Morii E, Nishimura J, Takeda K, Oji Y, Sugiyama H, Takagi J, Kumanogoh A. The activated conformation of integrin $\beta 7$ as a target for multiple myeloma-specific chimeric antigen

- receptor T cell therapy. *Nat. Med.* 12:1436-1443 (2017).
4. Lim HM, Woon H, Han JW, Baba Y, Kurosaki T, Lee MG, Kim JY. UDP-Induced Phagocytosis and ATP-Stimulated Chemotactic Migration Are Impaired in STIM1^{-/-} Microglia In Vitro and In Vivo. *Mediators Inflamm.* 8158514. (2017).
 5. Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, Watarai H, Wakamori M, Numaga T, Mori Y, Iino M, Hikida M & Kurosaki T. Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16704-16709 (2006).
 6. 川上亮、馬場義裕：「制御性B細胞と疾患」炎症と免疫（先端医学社）86-91, 2018