

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 4 月 2 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19790360

研究課題名 (和文) 新規に樹立した濾胞樹状細胞株を用いる胚中心 B 細胞応答の解析

研究課題名 (英文) Analysis of germinal-center reaction using a novel established Follicular dendritic cell line.

研究代表者 西川 裕美子 (NISHIKAWA Yumiko)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号：60448214

研究成果の概要： 生体において外来抗原の排除に深く関る抗体の親和性成熟機構を詳細に解明するために、新規な FDC 様細胞株を用い、親和性成熟の際にリンパ組織の胚中心で誘導される体細胞突然変異や抗原特異的 B 細胞の選択を *in vitro* で再現できる培養系を確立し、抗体親和性成熟機構の詳細を解明することを目的とした。

リンパ節由来 B 細胞、FDC 様細胞株の共培養系に胚中心内の T 細胞が産生する IL-21 を抗 CD40 抗体と共に添加するとクラススイッチなど、胚中心応答に特徴的な応答が誘導された。しかし、FDC 様細胞株、B 細胞共培養系に IL-21 を単独で添加した場合、FDC 様細胞株の共存下においてのみ B 細胞のアポトーシスが誘導された。このアポトーシスの誘導は抗 CD40 抗体架橋刺激によって抑制されることが確認できた。このことから、FDC は胚中心 B 細胞に対し、CSR や AID 発現を促進する一方で、低親和性の B 細胞や自己応答性の B 細胞を、胚中心 T 細胞が産生する IL-21 と FDC が産生する因子の働きによって除去する仕組みが備わっていると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	0	2,600,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	180,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：細胞、親和性成熟

## 1. 研究開始当初の背景

生体には抗体を産生する B 細胞が、特異的抗原に遭遇した後に、B 細胞濾胞中の胚中心内において、抗体の特異性を体細胞突然変異により改変し、更に高親和性の抗体を産生する細胞を選択する、抗体親和性成熟機構が備わっている。この選択機構の際に、濾胞樹状細胞 (FDC) は重要な役割を果たしており、親和性成熟機構の解明のためには、FDC 共存下における抗原特異的な B 細胞応答の解析が必要となる。しかし、FDC は組織中にごく少数しか存在しないため、機能的な FDC を純粋に分離することが非常に困難である。また、FDC の前駆細胞や分化成熟機構については不明な点が多く、今日までマウス由来 FDC 株は樹立されていなかった。しかし、私はリンパ節断片のコラーゲンゲルによる三次元培養を用いて、マウス由来 FDC 様細胞株の樹立に初めて成功した (Nishikawa, Y. et al.: J Immunol., 177:5204, 2006)。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規な FDC 様細胞株と特定の抗原に特異的な VHT カセットをノックインしたマウスの B 細胞、抗原特異的な Th2 クローン、FDC を含む培養系を用いることで、体細胞突然変異や抗原に対して高い親和性を獲得した B 細胞の選択過程を *in vitro* で再現できる培養系を確立し、抗体親和性成熟機構の詳細を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 点について解析を行なうことを目的とした。

(1) FDC による抗原特異的な B 細胞の選択に、抗原の特異性や FDC 上における免疫複合体の形成がどのように関わって

るのかについて、特定の抗原に特異的な VHT カセットをノックインしたマウスの B 細胞、抗原特異的な Th2 クローン、FDC を含む培養系を用いて検討する。

(2) AID によって誘導される、抗原特異的な B 細胞の抗体遺伝子座における体細胞突然変異が、FDC 近傍の微小環境において、どのような生理的条件下で誘導されるのか、FDC が共存し、胚中心環境を模倣した *in vitro* の培養系で誘導が可能なのかどうかについて検討した。

(3) 当研究室で樹立したマウス由来細胞株が *in vitro* で FDC 様の性質を示すことは確認したが、*in vivo* でも FDC に特徴的な性質を示すのか、特に胚中心構造の形成に関与できるのかについて検討した。これは、FDC 様細胞株を移入した FDC 欠損マウスリンパ組織における胚中心構造の構築や、FDC 様細胞株の移植による腎皮膜下異所性リンパ節の再構築が可能かという点から評価した。

## 4. 研究成果

① FDC における抗原特異的な B 細胞の選択過程の解析：pFL、リンパ節由来 B 細胞共培養系に胚中心 T 細胞が産生する IL-21 を抗 CD40 抗体と共に添加すると細胞増殖、CSR、抗体産生、AID 発現が促進された。しかし、pFL、B 細胞共培養系に IL-21 を単独で添加した場合、pFL の共存下においてのみ B 細胞のアポトーシスが誘導された。このアポトーシスの誘導は抗 CD40 抗体架橋刺激によって抑制されることが確認できた。

FDC が CSR に及ぼす影響：pFL と B 細胞を抗 CD40 抗体共存下において誘導される胚中心応答には、pFL から産生される BAFF が関与していた。以上より、FDC は胚中心 B 細

胞に対し、CSR や AID 発現を促進する一方で、低親和性の B 細胞や自己応答性の B 細胞を、胚中心 T 細胞が産生する IL-21 と FDC が産生する因子の働きによって除去する仕組みが備わっていることが示唆された。

②、③は更に培養系を検討することにより、解析が可能になると考えられる。

FDC の前駆細胞や発達段階など、FDC の詳細な実態についてはほとんど未解明なままである。胚中心内における、抗原に依存しない B 細胞支持機能についても、ごく最近明らかになってきたばかりである。FDC の株化が、胚中心反応の詳細の解明に大いに寄与することは言うまでもない。更に、この目的以外にも FDC の発達の解明に関する研究や、自己免疫疾患など様々な疾患の発症機序の解明、近年報告のある人工二次リンパ組織構築の研究にも十分に貢献できると考えられる。

更に、FDC は抗原特異的な B 細胞の生存維持に重要な働きを持つが、自己応答性の B 細胞の維持による自己免疫疾患の発症や、B リンパ腫の発達にも関与が示唆されている。また、FDC は伝染性海綿状脳症の原因とされるプリオンや、後天性免疫不全症候群の原因である HIV ウイルスを蓄積し、これらの疾患との関連が示唆されている。FDC の免疫系における役割の詳細な解析は、未だ発症機序が不明な疾患の治療法の開発にも貢献できる可能性がある。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1) 発表者 : Masaki Magari, Hiroki Sano, Yasumasa Fujii, Miki Asakura, Yumiko Nishikawa, Naoki Kanayama, Hitoshi Ohmori  
発表標題 : Analysis of germinal center (GC) reaction using an FDC cell line: role for a new class of FDC-dependent myeloid cells in inducing B cells with GC markers

発表学会名 : 第 38 回日本免疫学会総会学術集会

発表年月日 : 2008 年 12 月 2 日

発表場所 : 国立京都国際会館 (京都)

2) 発表者名 : 曲正樹、西川裕美子、佐野裕樹、藤井康正、金山直樹、大森齋

発表標題 : 濾胞樹状細胞株 FL-Y による in vitro での抗原特異的 B 細胞の効率的活性化

発表学会名 : 第 60 回 日本生物工学会大会

発表年月日 : 2008 年 8 月 29 日

発表場所 : 仙台国際ホテル (宮城)

3) 発表者名 : Yumiko Nishikawa, Masaki Magari, Naoki Kanayama, Hitoshi Ohmori.

発表標題 : Analysis of differentiation mechanism of germinal center B cells in the coculture of B cells with murine follicular dendritic cell (FDC) line.

発表年月日 : 2007 年 11 月 22 日

発表学会名 : 第 37 回日本免疫学会総会学術集会

発表場所 : グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

4) 発表者名 : 朝倉三貴、西川裕美子、曲正樹、金山直樹、大森齋

発表標題 : 濾胞樹状細胞 (FDC) の DC 系細胞の分化増殖を支持する新規な役割

発表年月日 : 2007 年 11 月 21 日

発表学会名：第37回日本免疫学会総会学  
術集会

発表場所：グランドプリンスホテル新高輪  
(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 裕美子 (NISHIKAWA YUMIKO)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター  
・助教  
研究者番号：60448214