

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16700

研究課題名(和文) T細胞非依存性抗原によるB細胞活性化機構の解明と応用

研究課題名(英文) The mechanism of B cell activation in T cell-independent immune response

研究代表者

深尾 紗央里 (Fukao, Saori)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・研究員

研究者番号：20778914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞非依存性2型(TI-2)免疫応答による抗体産生は、肺炎球菌やサルモネラ菌などに対する感染防御に必要である。本研究ではB細胞においてTI-2抗原が特異的に誘導するシグナル経路に着目し、TI-2応答における抗体産生の分子機構を明らかにすることを目的とした。その結果、TI-2抗原が抗原受容体とProhibitinとの会合およびPKC $\zeta$ のリン酸化を特異的に誘導すること、またTI-2応答においてProhibitinはB細胞の増殖に関与し、PKC $\zeta$ はクラススイッチの誘導に必要であることが明らかになった。従ってこれらの分子を介したシグナル経路の活性化がTI-2抗原に対する感染防御に重要だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌やサルモネラ菌に対する感染症は、乳幼児や高齢者において罹患率が高く、髄膜炎や敗血症などの併発によって重篤化しやすい。これらの菌は細胞壁外に多糖体からなる莢膜を持つために通常の免疫応答を誘導しにくく、TI-2免疫応答によって産生される抗体が感染防御に重要である。本研究によって明らかになった抗体産生の機構は、上述の菌に対するより効率的なワクチン開発の分子基盤になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Antibody production by a T cell-independent type 2 (TI-2) immune response is necessary for the protection against infections such as *Streptococcus pneumoniae* and *Salmonella*. Here, we studied the molecular mechanism of antibody production in the TI-2 response by focusing on the signaling pathway specifically induced by the TI-2 antigen in B cells. We showed that the TI-2 antigen specifically induces the association of BCR with Prohibitin and the phosphorylation of PKC $\zeta$ . Prohibitin was involved in B cell proliferation and PKC $\zeta$  was required for a class switching to IgG. Therefore, the activation of signaling pathways mediated by these molecules would be important for protection against TI-2 antigens.

研究分野：B細胞免疫応答

キーワード：B細胞 T細胞非依存性免疫応答

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌やサルモネラ菌に対する感染症は、乳幼児や高齢者において罹患率が高く、髄膜炎や敗血症などの併発によって重篤化しやすい。これらの菌は細胞壁外に多糖体からなる莢膜を持つために免疫応答を誘導しにくい。莢膜のような、繰り返し構造を持つ多価の抗原は B 細胞抗原受容体 (BCR) を高度に架橋し、T 細胞からの補助刺激なしで B 細胞の活性化と抗体産生を誘導する。このような T 細胞非依存性 2 型 (T cell independent type 2, TI-2) 応答によって産生される莢膜多糖に対する抗体は感染防御に重要であり、莢膜多糖ワクチンに利用されている。従って TI-2 応答における抗体産生誘導機構を理解することは重要であるが、その分子機構には不明な点が多い。

TI-2 抗原は、その構造ゆえに T 細胞依存性 (T cell dependent, TD) 抗原よりも多くの BCR をクラスター化させて強力な BCR シグナルを誘導し、B 細胞を活性化すると古くから考えられている。しかしながら、TI-2 抗原と TD 抗原によるシグナル伝達および B 細胞応答が量的ないしは質的に異なるのかは解析されていない。TI-2 免疫応答には TD 免疫応答で必要とされる CD40L などの補助刺激が不要であることから、TI-2 抗原による刺激自体が補助刺激と同等の B 細胞活性化能を持つと考えられるがその本態は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では TD 抗原と TI-2 抗原によって誘導されるシグナル伝達および B 細胞応答の違いに着目して解析を行い、TI-2 抗原による B 細胞活性化機構の詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) TI-2 抗原特異的に活性化される B 細胞応答および BCR シグナル経路の解析

TD 抗原および TI-2 抗原による BCR 架橋によって誘導される B 細胞応答が異なるものであるかを明らかにするために、ハプテン NP に特異的な B1-8 IgH ノックイン (B1-8) マウスの B 細胞を、TD 抗原である NP-CGG または TI-2 抗原である NP-FicolI を用いて *in vitro* で刺激し、B 細胞の増殖、抗体産生、クラススイッチなどの応答が異なるかを比較する。また TI-2 抗原により BCR がどのようなシグナル分子と会合するかを同定する。具体的にはビオチン化した TI-2 抗原 NP-FicolI と、対照として TD 抗原 NP-CGG で  $V_H$ B1-8 マウス由来の B 細胞を刺激し、その細胞溶解物から経時的に抗原-BCR 複合体を免疫沈降して、TI-2 抗原で刺激した場合のみに会合がみられるタンパクを質量分析により同定する。また TI-2 抗原によって強くリン酸化される分子を解析することで、TI-2 抗原特異的に活性化されるシグナル経路を明らかにする。

### (2) TI-2 抗原による B 細胞活性化の鍵となるシグナル経路の同定

(1)の実験によって同定した TI-2 抗原刺激のみで BCR に会合するまたはリン酸化するシグナル分子を B 細胞においてレトロウイルスベクターを用いてノックダウンする、もしくは同分子のノックアウトマウスを入手し、TI-2 応答を解析する。これにより同定した分子の TI-2 応答における B 細胞活性化における寄与を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) TI-2 抗原特異的に活性化される B 細胞応答および BCR シグナル経路の解析

*in vitro* で B 細胞を NP-CGG、NP-FicolI で刺激したところ、NP-FicolI のみが B 細胞の増殖、抗体産生を強く誘導することが明らかになった。また抗原単独ではクラススイッチは誘導されなかったが、TLR の ligand や特定のサイトカインを添加して培養すると、NP-FicolI は AID の発現および IgG へのクラススイッチを強く誘導した。また抗原-BCR 複合体の解析から NP-FicolI で刺激した際にのみ、BCR が prohibitin と会合することが明らかになった。さらに NP-CGG、NP-FicolI で刺激した際に Syk や CD19 などのリン酸化は同程度であったが、Erk, NfκB, PKC など特定のシグナル分子のリン酸化が強く誘導されることが明らかになった。これらの結果から TI-

2 抗原による BCR 刺激は TD 抗原とは異なるシグナル経路の活性化を誘導し、B 細胞の増殖、抗体産生、クラススイッチを強く増殖することが明らかになった。またクラススイッチにおいて TI-2 抗原は特定のサイトカインと協調することが明らかになったが、その協調のメカニズムや生体内での役割について更なる研究が必要である。

#### (2)TI-2 抗原による B 細胞活性化の鍵となるシグナル経路の同定

prohibitin をノックダウンした B 細胞をマウスに移入し、同マウスを TI-2 抗原で免疫してその応答を解析したところ、prohibitin ノックダウン B 細胞はほとんど増殖しなかった。一方で PKC ノックアウト B 細胞は TI-2 免疫応答において正常に増殖し IgM 抗体を産生したが、IgG をほとんど産生しなかった。PKC ノックアウト B 細胞では TI-2 抗原による AID の発現および IgG 産生の誘導が著しく低下していた。これらの結果から prohibitin を介したシグナルは TI-2 抗原による細胞増殖に、PKC を介したシグナルは TI-2 抗原によるクラススイッチに寄与していると考えられる。また PKC ノックアウトマウスでは肺炎球菌ワクチン (PPS3) や腸内細菌に対する IgG3 の産生も低下していた。さらに PKC ノックアウトマウスに DSS を投与すると、菌血症となり、生存率が著しく低下した。これらの結果から TI-2 応答による PKC を介した IgG 産生は細菌に対する防御に重要だと考えられる。

本研究では TI-2 抗原による BCR 刺激のユニークな機能やシグナル伝達機構の一端を明らかにした。また TI-2 応答によって産生される抗体の細菌への感染防御における重要性を示唆した。本研究によって明らかになった TI-2 抗原による B 細胞活性化の機構は、より効率的なワクチン開発の分子基盤になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------