

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390139

研究課題名（和文） メモリーB細胞の長期生存メカニズム

研究課題名（英文） Survival mechanism of memory B cells

研究代表者

徳久 剛史（TOKUHISA TAKESHI）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20134364

研究成果の概要（和文）：生体内で長期生存するメモリーB細胞やLong-lived Plasma細胞の分化メカニズムを明らかにするために、胚中心B細胞を誘導する培養系を確立した。その系を用いて、胚中心B細胞上のCXCR4の発現がBCL6によるCD63の発現抑制により維持されていることや、胚中心B細胞がPlasmablastsへ分化した時点でIL-21刺激を受けることによりLong-lived Plasma細胞へ分化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To elucidate differentiation mechanisms of memory B cells and long-lived plasma cells, we established the culture system to generate germinal center B cells. Using the system, we demonstrated that Bcl6 represses CD63 which recruits CXCR4 to late endosome to express CXCR4 on centroblasts and that the stimulation of plasmablasts with IL-21 generates long-lived plasma cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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：免疫記憶・Bリンパ球・胚中心・サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

免疫記憶の成立がワクチン療法の原動力であり、ヒトの感染予防の根幹をなすといっても過言ではない。すでに成熟B細胞がメモリーB細胞やLong-lived Plasma細胞へ分化する場が、脾臓やリンパ節内の胚中心であることが明らかにされた。

脾臓内で抗原により活性化された成熟B細胞は、PALS（T細胞領域）においてヘルパーT（Th）細胞からのヘルプを受けて活性化B細胞となり、その一部はBCL6の強発現を伴ってFollicle（B細胞領域）に移動して、再度濾胞ヘルパーT（Tfh）細胞からのサイトカイン刺激や濾胞樹状細胞（FDC）上の抗原刺激を受けて胚中心B細胞として増殖・分化する。胚中心では、増殖の盛んなCentroblastsにおい

胞は、PALS（T細胞領域）においてヘルパーT（Th）細胞からのヘルプを受けて活性化B細胞となり、その一部はBCL6の強発現を伴ってFollicle（B細胞領域）に移動して、再度濾胞ヘルパーT（Tfh）細胞からのサイトカイン刺激や濾胞樹状細胞（FDC）上の抗原刺激を受けて胚中心B細胞として増殖・分化する。胚中心では、増殖の盛んなCentroblastsにおい

て転写抑制因子である BCL6 を強発現させて、かつ細胞表面に CXCR4 を発現させて、その Ig 遺伝子において高率に体細胞突然変異をおこす。その後 Centroblasts は、BCL6 と CXCR4 の発現を低下させて、かつ細胞増殖を低下させ Ig 遺伝子のクラススイッチを起こして IgG 陽性の Centrocytes に分化する。

Centrocytes では、抗原親和性がより高い B 細胞クローンが選択的に生存増殖し、高親和性の IgG 抗体を持つメモリー B 細胞へと分化する。また、Ig 遺伝子における体細胞突然変異により抗原親和性の低下したクローンや自己反応性となったクローンはアポトーシスにより除去される。

さらに、胚中心で分化した高親和性 IgG B 細胞の一部は、BCL6 の発現を低下させ、かつ BCL6 の標的遺伝子である Blimp-1 の発現誘導を介して Plasma 細胞へ分化する。この胚中心 B 細胞から分化した Plasma 細胞は骨髄へ移動した後、Long-lived Plasma 細胞として長期間にわたり高親和性 IgG 抗体を産生し続ける。

しかし、成熟 B 細胞から胚中心 B 細胞 (Centroblasts や Centrocytes) を経て、メモリー B 細胞や Long-lived Plasma 細胞へ分化する分子機構などは未だ明らかにされていない。

すでに私たちは、胚中心で強発現している BCL6 の欠損 (BCL6-KO) マウスを作製し、活性化 B 細胞における BCL6 の発現が胚中心形成に必須であることを明らかにした。さらに BCL6-KO マウス由来の成熟 B 細胞を用いた解析から、胚中心が欠損しても IgG ヘクラススイッチした低親和性のメモリー B 細胞が分化できることや、BCL6-KO マウス由来の IgG メモリー B 細胞では抗体 V 領域遺伝子に体細胞突然変異が全くみられないことを見出した。

これらの結果から、胚中心は高親和性の IgG メモリー B 細胞が分化する場であり、活性化 B 細胞がメモリー B 細胞として長期生存能力を獲得する場ではないことが示唆された。また、BCL6-KO マウス由来の Plasma 細胞は Long-lived Plasma 細胞に分化出来ないことも明らかとなった。

最近になって私たちは、胚中心の Tfh 細胞から産生される主要なサイトカインである IL-21 が、胚中心 B 細胞における主要な BCL6 の発現誘導因子であることや活性化 B 細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた。また BCL6-KO マウスや BCL6 トランスジェニック (BCL6-Tg) マウスを用いて、活性化 B 細胞における BCL6 の発現量が IL-21 による

アポトーシス誘導を阻害する効果と相関することを見出している。また、IL-21 は Tfh 細胞ばかりでなく FDC からも産生されることも明らかとなっていることから、胚中心 B 細胞の分化には従来から知られている Th 細胞から産生される IL-4 の他に、Tfh 細胞や FDC から産生される IL-21 の刺激が重要であることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、生体内で長期生存するメモリー B 細胞や Long-lived Plasma 細胞の形成に関するこれまでの BCL6 に関する研究成果を踏まえて、胚中心 B 細胞 (Centroblasts や Centrocytes) から高親和性 IgG メモリー B 細胞や Long-lived Plasma 細胞への分化のメカニズムを分子レベルで明らかにする。そのために、In vitro 系において胚中心 B 細胞を分化誘導する系を開発する。また胚中心 B 細胞から分化した Plasma 細胞が Long-lived Plasma 細胞に分化する機序を明らかにする。そのために以下のように研究を進める。

(1) In vitro 系において胚中心 B 細胞を分化誘導する系を開発する。

その培養系を用いて、

(2) 胚中心 B 細胞 (Centroblasts や Centrocytes) における CXCR4 の発現調節機構を明らかにする。

(3) 胚中心 B 細胞 (Centrocytes) から Long-lived Plasma 細胞が分化する機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) In vitro 系において胚中心 B 細胞を分化誘導する細胞培養系の開発

正常マウス、BCL6-KO マウスや BCL6-Tg マウス由来の成熟 B 細胞を抗 IgM 抗体と抗 CD40 抗体と IL-4 で刺激した後、IL-4 や IL-21 で再刺激した。その後、経時的に培養細胞を胚中心 B 細胞 (Centroblasts や Centrocytes) に特異的な細胞表面抗原に対する抗体で染色して、胚中心 B 細胞の分化を FACS で解析した。

(2) 胚中心 B 細胞 (Centroblasts や Centrocytes) における CXCR4 の発現調節機構の解析

CXCR4 は、Centroblasts では強発現しているが Centrocytes に分化すると、その発現が低下する。これら 2 種類の胚中心 B 細胞における CXCR4 mRNA の発現量を Real-time RT-PCR 法で解析した。さらに、CXCR4 タンパクのエンドソームへのソーティングを行なう CD63

の発現を BCL6 の発現と比較検討した。CD63 と BCL6 の両者間で逆相関がみられたので、BCL6 による CD63 発現調節機能をプロモーターアッセイ法を用いて解析した。

(3) 胚中心 B 細胞 (Centrocytes) から Long-lived Plasma 細胞が分化する機序の解析

上記培養系 (6 日間培養) の様々な時期に IL-4 や IL-21 で再刺激した。この培養で分化した CD138 (Syndecan-1) 陽性の Plasma 細胞を CFSE でラベルした後に、正常マウスへ移植して 2-3 ヶ月後の骨髄における CFSE 陽性の Long-lived Plasma 細胞の存在を FACS で解析した。Long-lived Plasma 細胞の分化が確認された培養系において、培養 6 日目の Plasma 細胞の表面抗原型を IL-4 や IL-21 で再刺激していない系で分化した Plasma 細胞のそれと比較することにより、Long-lived Plasma 細胞に特異的な細胞表面型を解析した。

4. 研究成果

(1) In vitro 系において胚中心 B 細胞を分化誘導する細胞培養系の開発

正常マウスの脾臓由来の成熟 B 細胞を、抗 IgM 抗体、抗 CD40 抗体と IL-4 で刺激する。その後、経時的に IL-4 や IL-21 で再刺激して細胞増殖と IgG1 陽性細胞数を FACS で解析した。その結果、始めの刺激から 48 時間後に IL-21 刺激を加えることにより、培養開始後 4 日目をピークとする細胞増殖反応の増強と IgG1 陽性細胞数の著大な増加がみられた。この IL-21 での再刺激により増殖してくる IgG1 陽性細胞は、Centrocytes (GL7+, CXCR4-) であることも見出した。また、培養 48 時間後に IL-4 の再刺激により Centroblasts

(GL7+, CXCR4+) が増殖することも明らかにした。この結果から、IL-4 の再刺激が胚中心 B 細胞の Centroblasts の増殖に重要であることや、IL-21 の再刺激が Centroblasts から Centrocytes への分化に重要であることが示唆された。

つぎに、胚中心 B 細胞の分化がみられない BCL6-KO マウスの脾臓由来の成熟 B 細胞や BCL6-Tg マウス由来の成熟 B 細胞を上記の方法で刺激して、細胞増殖能と IgG1 陽性細胞数を経時的に FACS で解析した。その結果、BCL6-KO マウス由来の成熟 B 細胞では、細胞増殖能や IgG1 陽性細胞数が正常マウスの約半分に低下していた。逆に、BCL6-Tg マウス由来の成熟 B 細胞では、IgG1 陽性細胞数が正常マウスの倍近くに増加していた。さらに、

正常 B 細胞で IL-21 の再刺激により培養後 5 日目以降にアポトーシス誘導がみられるのに、BCL6-Tg マウスの成熟 B 細胞では、IL-21 の再刺激をしても培養 7 日目以降でもアポトーシスに陥ることなく生存し続けていた。

これらの結果から、この細胞培養系で Centroblasts から Centrocytes などの胚中心 B 細胞が分化誘導できることや IL-4 の再刺激が Centroblasts の増殖に、また IL-21 の再刺激が Centroblasts から Centrocytes の分化に重要であることが支持された。

(2) 胚中心 B 細胞 (Centroblasts や Centrocytes) における CXCR4 の発現調節機構の解析

Centroblasts から Centrocytes への分化過程で CXCR4 の発現が低下する機序に関して、上記の培養系を用いて解析した。BCL6-KO マウスの脾臓由来の成熟 B 細胞を上記の方法で培養し再刺激しても CXCR4 の発現が見られないことから、BCL6 が CXCR4 の発現に必須であることが示唆された。

さらに、正常マウス由来の成熟 B 細胞から分化誘導させた Centroblasts (GL7+, CXCR4+) や Centrocytes (GL7+, CXCR4-) を FACS で分取した後、これら 2 種類の胚中心 B 細胞における CXCR4 mRNA の発現量を Real-time RT-PCR 法で解析した。その結果、これらの胚中心 B 細胞における CXCR4 mRNA の発現量はほぼ同じであった。このことから、Centrocytes における CXCR4 の細胞表面における発現低下は、CXCR4 タンパクのエンドサイトーシスの亢進か細胞内分解に向けたエンドソームへのソーティングであることが示唆された。

そこで、BCL6 が転写抑制因子であることや、BCL6-KO マウスの活性化 B 細胞表面では CXCR4 の発現が見られないことから、BCL6 の欠損により発現増強して CXCR4 の細胞表面での発現を抑制している分子を調べた。その結果、CXCR4 タンパクのエンドソームへのソーティングをする CD63 の遺伝子発現が BCL6-KO マウス由来の活性化 B 細胞において発現増強していることを見出した。

つぎに、CD63 遺伝子が BCL6 の標的遺伝子である可能性を明らかにする目的で、CD63 遺伝子のプロモーター領域における BCL6 の結合サイトなどを解析した。その結果、CD63 遺伝子の三箇所 BCL6 の結合サイトを見出し、ChIP 法により成熟 B 細胞のそれらサイトに BCL6 が結合していることを明らかにした。これらの結果から、CD63 遺伝子が BCL6 の標的遺伝子であり、Centroblasts では Bcl6 の強

発現により CD63 の発現が抑制されて CXCR4 のエンドソームへのソーティングが阻害されることにより、その細胞表面における発現を維持していることを明らかにした。

また、正常マウス由来の成熟 B 細胞の培養系に CD63 に対する siRNA を投与して CD63 の発現を抑制することにより、Centrocytes に分化しても CXCR4 の発現が持続したことから、Bcl6 の発現が低下し始める Centrocytes では BCL6 の機能低下から逆に CD63 の発現誘導が見られ、その CD63 が CXCR4 をエンドソームへソーティングすることにより Centrocytes 上の CXCR4 の細胞表面への発現を抑制してことを明らかにした。

(3) 胚中心 B 細胞 (Centrocytes) から Long-lived Plasma 細胞が分化する機序の解析

胚中心 B 細胞 (Centrocytes) から Long-lived Plasma 細胞への分化における IL-21 の関与に関して、上記の培養系を用いて解析した。始めの刺激から 48 時間後に IL-21 で再刺激をすることにより、培養開始後 4 日目をピークとする細胞増殖と IgG1 陽性細胞数の著大な増加がみられた。しかし、この培養系では、Long-lived Plasma 細胞への分化は見られなかった。そこで、上記活性化 B 細胞を IL-21 で再刺激する時期の検討を行い、活性化 B 細胞が IgG へのクラススイッチを経て Plasmablasts から Plasma 細胞へ分化する培養 3 日目以降に IL-21 を添加することにより、CD138 (Syndecan-1) 陽性の Plasma 細胞への分化が促進され、かつ培養上清中の IgG1 抗体の産生量が著しく上昇することを見出した。

この培養 3 日目以降に IL-21 で再刺激することにより分化誘導された Plasma 細胞を CFSE でラベルした後に、正常マウスへ移植して 2 ヶ月後の骨髄における CFSE 陽性の Long-lived Plasma 細胞の存在を FACS で解析した。その結果、Long-lived Plasma 細胞が分化していることを明らかにした。しかし、培養 3 日目以降における IL-4 の再刺激では、Long-lived Plasma 細胞の分化は見られなかった。

さらに、培養 3 日目以降に IL-21 で再刺激した後の培養後 6 日目における Plasma 細胞の表面抗原型を FACS で詳細に解析した。その結果、Ki62 陰性 (細胞増殖を完全に止めた細胞) でかつ CD38 陽性の Plasma 細胞が分化していることを見出した。この Ki62 陰性 CD38 陽性の Plasma 細胞は、IL-4 で再刺激した場合や再刺激をしない培養系では一切その分化誘導

がみられないことから、この Ki62 陰性 CD38 陽性の Plasma 細胞が骨髄に移動して Long-lived Plasma 細胞として長期生存していることが強く示唆された。

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 17 件)

1. Yoshida N, Kitayama D, Arima M, Sakamoto A, Inamine A, Takano H, Hatano M, Koike T, and Tokuhisa T. CXCR4 expression on activated B cells is down-regulated by CD63 and IL-21. *J. Immunol.* 186:2800-2808, 2011. 査読有
2. Ohtsuka H, Sakamoto A, Pan J, Inage S, Horigome S, Ichii H, Arima M, Hatano M, Okada S, and Tokuhisa T. Bcl6 is required for the development of mouse CD4⁺ and CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 186:255-263, 2011. 査読有
3. Shimada T, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Watanabe E, Abe R, Nakada TA, Tateishi Y, Otani S, Hirasawa H, Tokuhisa T, and Uno H. Outcome prediction in sepsis combined use of genetic polymorphisms- A study in Japanese population. *Cytokine* 54:79-84, 2011. 査読有
4. Kishi Y, Aiba Y, Higuchi T, Furukawa K, Tokuhisa T, Takemori T, and Tsubata T. Augmented antibody response with premature germinal center regression in CD40L-transgenic mice. *J. Immunol.* 185:211-219, 2010. 査読有
5. Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, Miyamoto K, Hao W, Yoshida S, Morioka H, Chiba K, Kato S, Tokuhisa T, Saitou M, Toyama Y, Suda T, and Miyamoto T. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. *J. Exp. Med.* 207:751-762, 2010. 査読有
6. Otaki JM, Hatano M, Matayoshi R, Tokuhisa T, and Yamamoto H. The proto-oncogene BCL6 promotes survival of olfactory sensory neurons. *Dev. Neurobiol.* 70:424-435, 2010. 査読有
7. Suenaga Y, Ozaki T, Tanaka Y, Bu Y, Kamiyo T, Tokuhisa T, Nakagawara A, and

- Tamura TA. TBP (TATA-binding protein)-like protein (TLP) is engaged in etoposide-induced apoptosis through transcriptional activation of humanTap63 Gene. *J. Biol. Chem.* 284:35433-35440, 2009. 査読有
8. Ohta Y, Fujimura L, Nishio S, Arima M, Sakamoto A, Shimada H, Ochiai T, Tokuhisa T, and Hatano M. A kelch family protein Ndl-L functions as a metastasis suppressor in cancer cells via Rho family proteins mediated mechanism. *Int. J. Oncology* 36:427-434, 2009. 査読有
 9. Fujimura L, Takano H, Sato Y, Tokuhisa T, and Hatano M. Prickle promotes neurite outgrowth via the Dishevelled dependent pathway in C1300 cells. *Neuroscience Letters* 467:6-10, 2009. 査読有
 10. Otani S, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Watanabe E, Abe R, Tokuhisa T, and Hirasawa H. Clinical application of cytokine-related gene polymorphism analysis using a newly developed DNA chip in critically ill patients. *Clin. Biochem.* 42:1387-1393, 2009. 査読有
 11. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami, S-I, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, and Nakajima H. IL-23 and Th17 cells enhance Th2 cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 178:1023-1032, 2008. 査読有
 12. Hirata H, Arima M, Fukushima Y, Ishii Y, Tokuhisa T, and Fukuda T. Effects of Th2 pulmonary inflammation in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respirology* 13:788-798, 2008. 査読有
 13. Arima M, Fukuda T, and Tokuhisa T. Role of the transcriptional repressor BCL6 in allergic response and inflammation. *WAO Journal* 115-122, 2008. 査読有
 14. Ouchida R, Ukai A, Mori H, Kawamura K, Dolle MET, Tagawa M, Sakamoto A, Tokuhisa T, Yokosuka T, Saito T, Yokoi M, Hanaoka F, Vijg J, and Wang Ji-Y. Genetic analysis reveals an intrinsic property of the germinal center B cells to generate A:T mutations. *DNA Repair* 7:1392-1398, 2008. 査読有
 15. Ouchida R, Yamasaki S, Hikida M, Masuda K, Kawamura K, Wada A, Mochizuki S, Tagawa, M, Sakamoto A, Hatano M, Tokuhisa T, Koseki H, Saito T, Kurosaki T, and Wang Ji-Y. A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3 ζ degradation. *Immunity* 29:33-43, 2008. 査読有
 16. Saito T, Kitayama D, Sakamoto A, Tsuruoka N, Arima M, Hatano M, Miyazaki M, and Tokuhisa T. A distinct role for IL-4 and IL-21 in their collaboration on proliferation and differentiation of activated B cells. *Immunobiol.* 213:545-555, 2008. 査読有
 17. Kitayama D, Sakamoto A, Arima M, Hatano M, Miyazaki M, and Tokuhisa T. A role for Bcl6 in sequential class switch recombination to IgE in B cells stimulated with IL-4 and IL-21. *Mol. Immunol.* 45:1337-1345, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 13 件)
1. Tokuhisa T. 「Role for Bcl6 in Differentiation of High Affinity IgE B Cells」 5th G-COE symposium. December 4, 2010 (Tokyo)
 2. 徳久剛史「高親和性 IgE 抗体産生細胞の分化とヘルパーT細胞の多様性」第60回日本アレルギー学会 特別講演 平成22年11月26日(東京)
 3. 徳久剛史「アレルギーは治せるか」千葉大経済人クラブ 平成22年10月4日(浦安)
 4. 徳久剛史「研究指導者に望まれる資質」G-COE リトリート 平成22年9月5日(千葉)
 5. Tokuhisa T. 「Roles for Bcl6 in differentiation of germinal center B cells」 4th G-COE symposium. August 20, 2010 (Chiba)
 6. 徳久剛史「部局の活性化にむけて」創立60周年記念大学改革シンポジウム 平成22年1月25日(千葉)
 7. Tokuhisa T. 「Role for Bcl6 in development and maintenance of germinal center B cells」 LAH 50th Symposium Nov 6, 2009 (Stanford, USA)
 8. Tokuhisa T. 「Role for Bcl6 in development and maintenance of germinal center B cells」 RISP2009 Lecture July 6, 2009

(Yokohama)

9. 徳久剛史 「抗体の威力」免疫ふしぎ未来
2009 免疫シンポジウム 平成 21 年 5 月 2
日 (東京)
10. 徳久剛史 「IgE 抗体の産生機」第 17 回関
東アレルギークラブ 特別講演 March 7,
2009 (東京)
11. Tokuhisa T. 「Possible roles for Bcl6 in
differentiation of Germinal Center B
cells」1st G-COE symposium. January 6,
2009 (Tokyo)
12. Tokuhisa T. 「Self-Tolerance in Germinal
Center B cells」Immunological
Self-Recognition and Its Disorders. July
3, 2008 (Kyoto)
13. 徳久剛史 「医学部における寄生虫学教育」
第 77 回日本寄生虫学会 シンポジウム
April 3, 2008 (長崎)

[その他]

ホームページ等

分化制御学教室のホームページの URL は、以
下の通りである。

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devgen>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳久 剛史 (TOKUHISA TAKESHI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20134364

(2) 研究分担者

幡野 雅彦 (HATANO MASAHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20208523
有馬 雅史 (ARIMA MASAFUMI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：00202763
坂本 明美 (SAKAMOTO AKEMI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：90359597
藤村 理紗 (FUJIMURA RIZA)
千葉大学・バイオメディカル研究センタ
ー・助教
研究者番号：30376363

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：