

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570169

研究課題名(和文) 免疫応答の成熟に伴う抗体の構造・機能変化とそのメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of structural and functional changes in immunoglobulins during the maturation of the immune response

研究代表者

清水 健之 (Shimizu, Takeyuki)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：10339137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：形質細胞が産生している抗体遺伝子解析を解析することにより、T細胞依存性免疫応答におけるIgM型抗体のレパートリーを明らかにした。IgM型後期抗体レパートリーには初期抗体やIgG型後期抗体とは異なる配列的特徴を持つものが多く含まれていた。このタイプのIgMは非常に低い抗原親和性を示すが補体活性化やB細胞受容体としての機能は有しており、高親和性IgGと共に生体防御に重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：By analyzing sequences of the IgM genes expressed in plasma cells which were isolated from secondary immunized mice, we found many VH genes which were rarely found in IgM repertoire of the primary immune response or in IgG repertoire. These IgM antibodies showed very low affinity to antigen, although they activated complement pathway and signaling pathway when they recognized antigens. These findings indicated that in the secondary immune response to T cell-dependent antigen, not only high affinity IgG antibodies but also low affinity IgM antibodies are produced.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：免疫学 抗体 免疫応答成熟 抗原親和性 免疫記憶 体細胞突然変異

1. 研究開始当初の背景

T細胞依存性免疫応答の過程では、産生される抗体レパートリーが変化する。このことが、一次免疫応答に比較して二次免疫応答ではより効率的な抗原排除が出来るという、獲得免疫応答の重要な特長の基盤となっている。従来は、二次免疫応答時に産生される後期抗体の特徴はIgGなどにスイッチした抗原親和性の高いものであるとされてきた。しかし近年、二次免疫応答で活性化するB細胞はより多様であり、クラスや抗原親和性の異なる抗体が産生されることがわかってきた。我々は、C57BL/6マウスを用いて、ハプテン(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP)に対する免疫応答をモデルに用いて、抗体レパートリー変化と抗原親和性向上について研究している。これまでに、抗原親和性の非常に低いIgM型抗体を産生する多くのハイブリドマを二次免疫後のマウスから得ている。しかし、実際に生体内で産生されるIgM型抗体のレパートリーや機能については未知であった。

2. 研究の目的

本研究では、IgG型後期抗体と比較してこれまで研究が進んでいないIgM型後期抗体に注目し、免疫応答の成熟に伴う抗体の構造上の特徴や機能の変化とそのメカニズムを解明することを目的とする。具体的には、生体内で実際に抗体を産生している形質細胞の抗体遺伝子を解析することで、IgM型後期抗体の一次構造を決定し、その特徴を初期抗体やIgG型抗体と比較する。次に、IgM型後期抗体の抗原親和性や機能活性を測定し、初期抗体と比較してどのように変化するかを明らかにし、生体防御反応との関係を探る。さらに、IgM型後期抗体の選択メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Affinity matrix 法を用いた抗原特異的抗体産生細胞の検出

抗NP抗体産生細胞株は、NP特異的IgMもしくはIgG1の重鎖遺伝子を、軽鎖を発現しているJ558L細胞株に電気穿孔法で導入して作製した。ネガティブコントロールには、EL-4もしくはJ558L細胞株を用いた。

細胞をPBSで洗浄し、NP-スクシンイミドエステルを反応させることにより、NP標識した。もしくは、NHS-biotinを反応させた後、NP化ストレプトアビジンを用いて標識した。

標識した抗体産生細胞株を37℃で30分間培養した後、分泌され細胞表面の抗原に結合した抗体を蛍光標識した抗Ig抗体によって染色し、フローサイトメトリーで解析した。

NP-CGG/alumで免疫したマウスの脾細胞からB220⁺細胞を磁気ビーズで除去した後、細胞表面のB細胞受容体(BCR)を抗鎖抗体で染色した。細胞をNHS-biotinとNP-ストレプトアビジンで標識した後37℃で30分間培

養し、分泌されて細胞表面の抗原に結合した抗体を抗鎖抗体で検出した。同時に、形質細胞のマーカであるCD138に対する抗体で染色した。セルソーターで抗NP抗体を産生している形質細胞を分離した。

ソートした細胞をスライドグラスに貼付けて固定し、抗鎖抗体で細胞内染色して蛍光顕微鏡で観察した。また、ソートした細胞をNP-BSAでコートしたELISPOTプレートに播種し、抗NP抗体産生細胞数をELISPOTで計測した。

(2) 形質細胞に見られる抗NP抗体の遺伝子配列決定

マウスをNP-CGG/alumで免疫し、7日目に脾細胞を採取した。また、8週目にNP-CGG/PBSで追加免疫し、3および5日目に脾細胞を摘出した。

脾細胞から形質細胞を磁気ビーズで分離した。さらに抗IgM抗体と抗鎖抗体で細胞内染色し、IgM⁺Igλ⁺細胞(IgM産生形質細胞)とIgM⁺Igλ⁺細胞(クラススイッチした形質細胞)をセルソーターで分離した。

分離した細胞をプロテアーゼ処理後、V_H186.2を用いている抗体重鎖遺伝子をPCRで増幅し、プラスミドベクターにクローニングして遺伝子配列を決定した。

(3) 組換え抗体の作製と機能解析

形質細胞由来のV_H領域遺伝子をC_μ領域遺伝子と組み合わせて発現ベクターにクローニングし、J558L細胞株に導入した。G418で選択し、抗NP IgM抗体を産生する安定細胞株を作製した。細胞上清を調製し、含まれているIgMの濃度をELISAで測定した。

NP_{1.6}-BSAとNP₂₃-BSAを抗体としてELISAプレートをコートし、それぞれの抗原に対する結合を、抗IgM抗体を用いたELISA法で測定した。抗原親和性を吸光度の比で計算した。

ヒツジ赤血球をNP-スクシンイミドエステルを反応させることによりNP標識し、抗NP IgM抗体とウサギ補体を添加することにより溶血反応を起こした。反応液上清の吸光度を測定し、水による完全溶血と比較して溶血度を求めた。

(4) 免疫後に見られる抗NP B細胞の検出

NP-CGG/alum免疫したマウスの脾細胞や骨髄細胞を、蛍光標識したNPとB細胞サブセットを識別するマーカー分子に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

NP-CGG/alumで免疫したマウスから記憶B細胞を含むB細胞集団(CD19⁺CD38⁺GL-7⁻)、辺縁帯B細胞(CD19⁺CD21⁺CD23⁻)、B-1細胞(B220⁺CD5⁺)をセルソーターで分離し、CGG/alumで免疫したマウスに移植した。NP-CGG/PBSで追加免疫し、産生される抗体をELISAで解析した。

(5) 低親和性 IgM BCR 発現細胞の作製と BCR シグナルの解析

J558L 細胞株に、IgM 型 BCR の発現に必要な CD79a 遺伝子の cDNA を発現ベクターに組み込み導入した。

形質細胞から得られた V_H 領域遺伝子と膜結合型 C_μ 領域遺伝子を組み合わせて発現ベクターにクローニングし、上記 CD79a 発現 J558L 細胞株に導入した。

抗 NP BCR 発現細胞株を NP-CGG を抗原として刺激し、CD79a と CD79b のリン酸化をウェスタンブロットで解析した。

4. 研究成果

(1) Affinity matrix 法により抗原特異的形質細胞を検出できる。

EL-4 細胞株を NP 標識し、抗 NP 抗体を外から加えたところ、結合した抗 NP 抗体をフローサイトメトリーで検出できた。細胞を直接 NP 化するよりも、ビオチン化して NP 化ストレプトアビジンで標識する方がより強いシグナルを得られた。

抗 NP 抗体産生細胞を NP 標識した後、37 で 30 分間培養すると、分泌された抗 NP 抗体が細胞表面の NP に結合する。これを抗 Ig 抗体で検出することが出来た。さらに、抗 NP 抗体産生細胞と非産生細胞を混合した時は、抗体産生細胞がより強く染色され、フローサイトメトリーで分離することが出来た。

NP-CGG/alum で免疫したマウスの脾細胞を NP 標識後、37 で 30 分間培養すると、分泌された抗体を結合している細胞がフローサイトメトリーで検出できた。さらに抗 NP 抗体産生細胞の純度を上げるため、以下の3点の改良を行った。すなわち、あらかじめ B220⁺ 細胞を磁気ビーズにより除いておくこと、残っている細胞表面 BCR 発現細胞を抗鎖抗体により標識しておくこと、形質細胞のマーカーである CD138 に対する抗体で染色しておくことである。表面 Ig α ⁻ CD138⁺ 分泌 Ig α ⁺ 細胞をセルソーターで回収した。

得られた細胞を抗鎖抗体によって細胞内染色すると非常に強いシグナルが得られ、多量の抗体を産生している細胞であることがわかった。また ELISPOT によって、抗 NP 抗体産生細胞が得られていることを確認した。全脾細胞中に含まれる形質細胞は 1% 以下であるが、この方法で抗 NP 抗体産生細胞を最大 90% 程度に濃縮できた。

以上の結果から、この方法は形質細胞をその抗原特異性を指標にして分離する手段となりうることを示されたが、純度についてはさらに改良が必要である。

(2) 二次免疫後に見られる IgM 型抗体産生細胞のレパートリーは、一次免疫や二次免疫の IgG のレパートリーとは異なる。

NP-CGG 免疫マウスの脾細胞から、形質細胞を分離した。磁気ビーズとセルソーターにより、IgM 産生形質細胞とクラススイッチし

た形質細胞を分離した。鎖と共に抗 NP 抗体を構成すると予想される V_H186.2 遺伝子を PCR で増幅して配列を比較した。

一次免疫後 7 日目の形質細胞から得られた配列は、IgM 産生細胞とクラススイッチした細胞いずれにおいても重鎖 95 番目のアミノ酸が Tyr である Tyr95 型で突然変異はほとんど見られなかった。二次免疫後のクラススイッチした形質細胞から得られた配列は、突然変異が多く、高親和性抗体に特徴的な W33L 変異を含む Tyr95 型や、Gly95 型の配列が多く見られた。二次免疫後 3 日目の IgM 産生形質細胞から得られた配列には、突然変異が少なく 95 番のアミノ酸が Tyr でも Gly でもない X95 型が多かった。これは IgG や初期型 IgM ではほとんど見られない配列である。二次免疫後 5 日目になると IgM 産生形質細胞にも IgG と同様の高親和性型の配列も認められた (図 1、図 2)。

以上の結果は、ハイブリドーマのレパートリー解析で見られた変化と同様であった。すなわち、初期抗体は IgM と IgG とともに突然変異のほとんど無い Tyr95 型が多い。後期抗体の IgG には W33L 変異を持つ Tyr95 型や Gly95 型のような、抗原親和性の向上したものが多く見られる。一方、後期抗体の IgM には突然変異の無い X95 型が多く見られる。すなわち、二次免疫応答の IgM では一次免疫応答の IgM や二次免疫応答の IgG とは違うレパートリーが選択されていることがわかった。

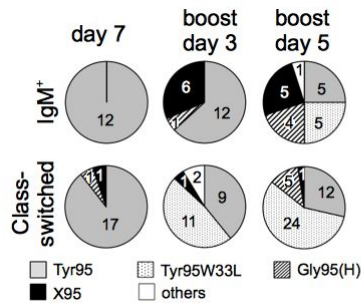


図 1 抗NP抗体のレパートリー変化 (特徴的のアミノ酸残基による分類)

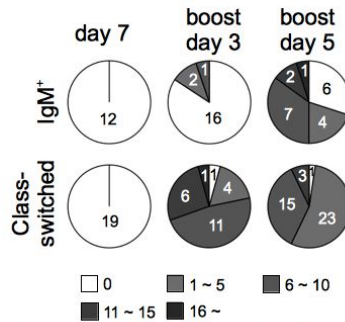


図 2 抗NP抗体のレパートリー変化 (突然変異数による分類)

(3) 二次免疫後の IgM レパートリーに特徴的な抗体は、抗原親和性が低い。

形質細胞から得られた IgM の配列のうち、突然変異を含まないものを選び、C_μ 遺伝子と組み合わせて発現ベクターにクローニング

し、J558L 細胞株に導入した。培養上清に分泌される IgM 抗体は NP に結合できることが確認された。

得られた IgM の抗原親和性を ELISA 法で解析したところ、二次免疫後の IgM の配列、特に X95 型は非常に低い抗原親和性を示す傾向があった(図 3)。これは、二次免疫後には抗原親和性が向上する IgG 型抗体とは対照的である。

各 IgM の補体活性化を、NP 化ヒツジ赤血球を用いた溶血反応で測定した。抗原親和性が低い IgM でも補体活性化能を示した。

以上の結果から、二次免疫応答に特徴的な X95 型 IgM は、非常に低い抗原親和性を示すが活性のある IgM として機能しうることがわかった。

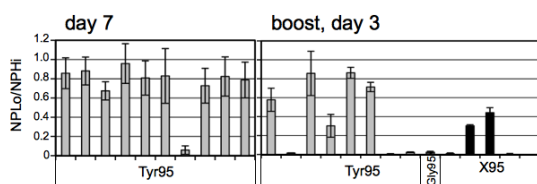


図 3 タイプ別 IgM の抗原親和性の比較

(4) 二次免疫後の IgM レパートリーは、記憶 B 細胞が産生している可能性がある。

免疫マウスの脾細胞や骨髄細胞中の抗 NP BCR 産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。辺縁帯 B 細胞や B-1 細胞に抗 NP BCR を発現している細胞は検出できなかった。

免疫マウスから辺縁帯 B 細胞や B-1 細胞をセルソーターで分離し、キャリア免疫マウスに移植して追加免疫を行ったが、二次免疫に特徴的な IgM の産生は確認できなかった。

最近 IgM 型 BCR を発現する記憶 B 細胞には高親和性 BCR を発現しているものの他に低親和性の X95 型配列を持つものが存在していることが示され、これが二次免疫応答時に低親和性 IgM の産生に関与している可能性が考えられる。

(5) 低親和性 IgM 型 BCR は、抗原を認識してリン酸化される。

CD79a 遺伝子を導入した J558L 細胞株にさらに膜結合型抗 NP IgM 遺伝子を導入することで、BCR 発現細胞株を樹立できた。これらの細胞は、NP を結合できることが確認された。

抗 NP IgM BCR 発現細胞株を NP-CGG で刺激したところ、低親和性の IgM でも高親和性のものよりも低い CD79a と CD79b のリン酸化が観察された。このことから、低親和性であっても BCR として機能しうることが明らかとなった。

以上の結果から、低親和性 IgM であっても機能的 BCR としてシグナル伝達が出来ると考えられる。

今回の研究によって、形質細胞の抗体遺伝子解析により、IgM 型後期抗体レパートリーには初期抗体や IgG 型後期抗体とは異なる特徴的配列を持つものが多く含まれることが

明らかとなった。このタイプの IgM 型抗体は非常に低い抗原親和性を示すが補体活性化の機能は有している。このタイプの IgM 型後期抗体は低親和性 IgM 型 BCR を発現している記憶 B 細胞に由来する可能性を考え、低親和性 IgM 型 BCR でもシグナル伝達機能があることが示された。本研究によって明らかとなった新たな IgM レパートリーが高親和性 IgG と共に後期抗体として選択されていることは、その生体防御における重要性を示唆している。

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 3 件)

Akikazu Murakami, Hayato Moriyama, Mina Osako-Kabasawa, Kanako Endo, Miyuki Nishimura, Keiko Uda, Masamichi Muramatsu, Tasuku Honjo, Takachika Azuma, and Takeyuki Shimizu. 'Low affinity IgM antibodies lacking somatic hypermutations are produced in the secondary response of C57BL/6 mice to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl hapten' *Int. Immunol.*, 2014. vol. 26, pp. 195-208, DOI: 10.1093/intimm/dxt057. 査読有

Motoko Takahashi, Satoshi Miyata, Junichi Fujii, Yoko Inai, Shigemitsu Ueyama, Motoko Araki, Tomoyoshi Soga, Riko Fujinawa, Chiaki Nishitani, Shigeru Ariki, Takeyuki Shimizu, Tomomi Abe, Yoshito Ihara, Morimitsu Nishikimi, Yasunori Kozutsumi, Naoyuki Taniguchi, and Yoshio Kuroki. 'In vivo role of aldehyde reductase' *Biochim. Biophys. Acta.*, 2012. vol. 1820, pp. 1787-1796, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.07.003. 査読有

Shigeru Ariki, Takashi Kojima, Shinsei Gasa, Atsushi Saito, Chiaki Nishitani, Motoko Takahashi, Takeyuki Shimizu, Yuichiro Kurimura, Norimasa Sawada, Nobuhiro Fujii, and Yoshio Kuroki. 'Pulmonary Collectins Play Distinct Roles in Host Defense against Mycobacterium avium' *J. Immunol.*, 2011. vol. 187, pp. 2586-2594, doi: 10.4049/jimmunol.1100024. 査読有

(学会発表)(計 12 件)

田代泰之、原泰史、村上明一、清水健之、東隆親 「Germinal center reaction actively induces somatic hypermutation in IgM but down-regulates class switch recombination」 第 42 回日本免疫学会学術集会、2013 年 12 月 12 日、幕張メッセ(千葉県)

清水健之、宇高恵子、東隆親 「Detecti

on of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl antibody secreting cells by cellular affinity matrix technology」第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月12日、幕張メッセ(千葉県)
船越 舟一、清水健之、大西一夫 「B Lymphocyte Cadherin, BILLcadherin/ cadherin-17, Contributes to the Survival of Memory B Cells」第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月12日、幕張メッセ(千葉県)
清水健之、宇高恵子、片岡佐誉、東隆親 「Repertoire analysis of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl IgM antibodies produced in plasma cells」第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月6日、神戸国際展示場(兵庫県)
藤本理加、清水健之、片岡佐誉、宇高恵子 「Flow cytometric identification of antigen-stimulated T cells by a metabolic fluorescent probe」第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月6日、神戸国際展示場(兵庫県)
宇高恵子、清水健之、永福正和、井ノ口仁一 「A minimal influence of glycosylation of ganglioside on the in vivo Th1-dominant responses in mouse」第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月6日、神戸国際展示場(兵庫県)
傅舟一、清水健之、大西一夫 「Regulation of Late Stages of B Cell Differentiation by BILL-cadherin/cadherin-17」第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月7日、神戸国際展示場(兵庫県)
佐野ほずみ、清水健之、福田絵美、田中健一、宇高恵子 「Ganglioside 合成酵素欠損マウスにおけるCD8, CD4 T細胞のin vivo機能の解析」第11回四国免疫フォーラム、2012年6月9日、高知大学(高知県)
傅舟一、清水健之、大西一夫 「Bリンパ球に発現するBILL-cadherin/ cadherin-17は抗体の親和性維持に寄与する」第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月28日、幕張メッセ(千葉県)
原泰史、村上明一、西村深雪、清水健之、東隆親 「T細胞依存性免疫応答に關与するIgM+記憶B細胞の解析」第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月28日、幕張メッセ(千葉県)
清水健之 「マンノース結合レクチンとIgMの相互作用の多様性」第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月28日、幕張メッセ(千葉県)
清水健之、高橋素子、西谷千明、有木茂、黒木由夫 「マンノース結合レクチンとIgMの相互作用の解析」第10回四国免疫フォーラム、2011年6月4日、徳島大学(徳島県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 健之 (SHIMIZU TAKEYUKI)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：10339137