

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670239

研究課題名(和文) B細胞後期分化に伴う体細胞突然変異誘導能の獲得機構

研究課題名(英文) Mechanisms for the acquisition of somatic hypermutation activity during the late B cell development

研究代表者

北村 大介 (Kitamura, Daisuke)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：70204914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胚中心B細胞では体細胞突然変異(SHM)により抗体の親和性成熟が起こる。SHMにはシチジン脱アミノ化酵素AIDが必須である。In vitroで刺激されたB細胞ではAIDが高く発現するがSHMは起こらないことが知られる。私たちが確立したiGB細胞培養系では、B細胞が著しく増殖し胚中心様B細胞(iGB細胞)となり、IgG1やIgEへのCSRを高率に起こすが、SHMは起こらない。一方、iGB細胞をマウスに移入して形成される記憶B細胞様のiMB細胞を同じ系で培養すると高率にSHMが生じた。これには、抗原受容体の刺激、Blimp1の発現抑制、AIDの核内維持が重要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Activation-induced deaminase (AID) is essential for both somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR), contributing to antibody affinity maturation. Although both occurs in germinal center (GC) B cells, only CSR is induced in B cells cultured with mitogen, expressing AID. Therefore some mechanism works in germinal center B cells to induce SHM but not in cultured B cells. We utilized the system called iGB cell culture, in which naive B cells are cultured on feeder cells with IL-4 or IL-21. The cultured B cells greatly proliferate, acquire GC phenotype and undergo CSR, but not SHM. However, memory B cells cultured similarly with Ag stimulation undergo SHM. Blimp1-deficient B cells accumulated even more SHM. Introduction of Bcl6 enabled B cells to proliferate for more than 2 months with accumulating SHM, but eventually only clones with a dominant nuclear AID kept undergoing SHM.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 体細胞突然変異 胚中心 B細胞 抗体

1. 研究開始当初の背景

免疫応答の過程で胚中心B細胞において免疫グロブリン (Ig) 遺伝子 V 領域に体細胞突然変異 (somatic hypermutation: SHM) が蓄積され、その結果、抗原受容体と抗体の抗原親和性が多様化する。その中から抗原に高親和性の抗原受容体をもつ B 細胞が選択され、高親和性抗体を産生する形質細胞や記憶 B 細胞が形成される。SHM とクラススイッチ組換え (class switch recombination: CSR) の誘導にはシチジン脱アミノ化酵素 (activation-induced cytidine deaminase: AID) が必須であるが、SHM と CSR では AID の作用点が異なり、異なる制御を受けていると考えられている。実際、in vitro で活性化された B 細胞には AID が発現し、サイトカインを加えると容易に CSR が起こるが、SHM は起こらない。よって、in vivo の胚中心 B 細胞には in vitro の活性化 B 細胞にはない SHM 誘導機構が存在すると考えられた。

2. 研究の目的

私たちが確立した誘導性胚中心様 B (induced germinal center B: iGB) 細胞培養系は、CD40L と BAFF を発現する線維芽細胞株 (40LB) をフィーダーとして IL-4/IL-21 というサイトカインを順次加えて B 細胞を初代培養するものだが、この培養系では B 細胞は著しく増殖して胚中心 B 細胞様の iGB 細胞となり、IL-4 により IgG1 や IgE への CSR を高率に起こすが、SHM は起こらない。iGB 細胞に Bcl-6 を強制発現させると、フィーダー細胞と IL-21 存在下で長期に培養することが可能となるが、それでも SHM は起こらなかった。一方、iGB 細胞をマウスに移入すると、記憶 B 細胞様の iMB (induced memory B) 細胞に分化し、二次リンパ組織に維持される。この iMB 細胞を iGB 細胞と同様に Bcl-6 導入により長期培養した細胞 (これを iMGB 細胞と呼ぶ) では高率に SHM が生じることが分かった (図 1)。よって、iGB 細胞は in vivo に一定期間おかれたことによって SHM 誘導能を獲得したと考えられた。この SHM 誘導能の実態を明らかにすることを目的として、本研究を開始した。

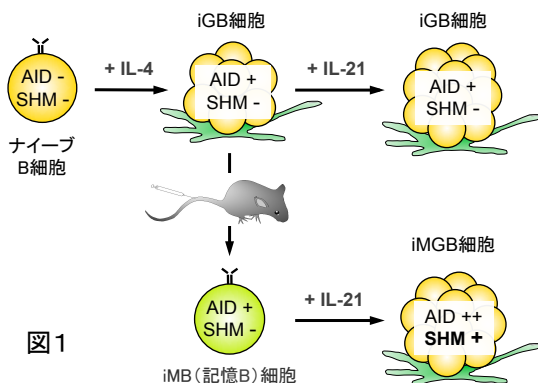


図 1

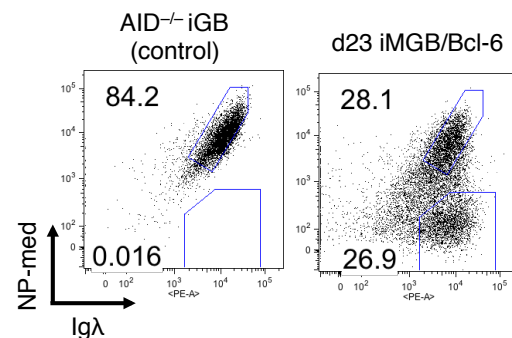
3. 研究の方法

ハプテン抗原として知られる (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl (NP) をキャリアタンパクと結合させたものを抗原として、NP 特異的抗原受容体の V_H 鎖遺伝子 B1-8^{hi} のノックインマウスをモデルとして用いる。マウス脾臓 B 細胞を単離して γ 線照射した 40LB 細胞をフィーダーとして、最初 IL-4 を加えて 4-5 日間培養する。この iGB 細胞を亜致死量の γ 線照射したマウスに移入し、2 週間以上経ったマウスの脾臓からドナー由来の iMB 細胞を単離する。この iMB 細胞をまた 40LB フィーダーと IL-21 で培養する (iMGB 細胞)。iGB 細胞および iMGB 細胞を長期培養するためには、培養 2 日目に Bcl-6 をレトロウイルスベクターにより導入する。その後、IL-21 存在下で、適宜フィーダーを交換しながら培養を続ける。

B1-8^{hi} H 鎖は λL 鎖とペアになると、NP 抗原に高い親和性で結合する抗原受容体を形成する。この抗原受容体を検出する試薬として、NP を低い価数で結合させた色素である NP^{lo}-APC を用いた。SHM の検出は、B1-8^{hi} /λL BCR の NP^{lo}-APC への結合性の低下を大まかな指標とし、詳細には B1-8^{hi} 遺伝子を PCR 法で単離し、その塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 培養中の iGB/iMGB 細胞における変異導入活性を塩基配列解読なしに容易に検出する以下の実験系を作成した。B1-8^{hi} ノックインマウスの B 細胞由来の iGB 細胞は、NP^{lo}-APC で染色されるが、培養中に B1-8^{hi} あるいは λL 鎖の V 領域にランダムな変異が起こると、多くの場合親和性は低下し NP^{lo}-APC への染色性が低下する。実際に、上述のように B1-8^{hi} マウス由来の iMB 細胞を長期培養すると NP^{lo}-APC 陰性の細胞群が出現し、それらの細胞では NP^{lo}-APC 陽性細胞と比べて V 領域の変異頻度が増加していた。



(2) iMB 細胞に発現する抗原受容体をソーティング時や培養中に抗原や抗体で刺激した場合にのみ、その iMB 細胞を培養して作成した iMGB 細胞において高率に SHM が生じることが分かった。

(3) 形質細胞分化のマスター制御因子である Blimp1 の欠損マウスの B 細胞から作成し

た iMGB 細胞は野生型マウスに比べて、2 倍以上の変異頻度を示した。

(4) iMGB 細胞における SHM 頻度の増加は長期培養中に頭打ちとなった。その原因は、変異を起こさないクローンの増加にあった。iMGB 細胞をクローン化して変異を蓄積したクローンとそうでないクローンを比較すると、前者では核内の AID タンパク量が多かった。よって、AID の核内保持を制御する機構が SHM 効率に大きな影響を与えていると考えられた。

以上の結果から、iGB 細胞は *in vivo* に移入されると、何らかの機序で変異誘導活性を獲得するが、それには Blimp1 の発現低下や AID の核内維持機構が関わっている可能性が見出された。

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 8 件)

- ① 羽生田 圭、深尾 紗央里、北村 大介、膜型 IgE の自発的シグナル伝達による B 細胞記憶形成の制御、臨床免疫・アレルギー科、査読無、65 巻、2016、329-333
- ② Kuraoka, M., Schmidt, A.G., Nojima, T., Feng, F., Watanabe, A., Kitamura, D., Harrison, S.C., Kepler, T.B. and Kelsoe, G. Complex antigens drive permissive clonal selection in germinal centers. *Immunity* 44 (3): 542-552, 2016. 査読有
doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.010.
- ③ Webb, L.M., Datta, P., Bell, S.E., Kitamura, D., Turner, M. and Butcher, G.W. GIMAP1 is essential for the survival of naive and activated B cells *in vivo*. *J. Immunol.* 196 (1): 207-216, 2016. 査読有
doi: 10.4049/jimmunol.1501582.
- ④ Purwada, A., Jaiswal, M.K., Ahn, H., Nojima, T., Kitamura, D., Gaharwar, A.K., Cerchiatti, L. and Singh, A. Ex vivo engineered immune organoids for controlled germinal center reactions. *Biomaterials* 63: 24-34, 2015. 査読有
doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.002.
- ⑤ Kitabatake, M., Soma, M., Zhang, T., Kuwahara, K., Fukushima, Y., Nojima, T., Kitamura, D. and Sakaguchi, N. JNK Regulatory Molecule G5PR Induces IgG Autoantibody-Producing Plasmablasts from Peritoneal B1a Cells. *J. Immunol.* 194(4):1480-1488, 2015. 査読有
doi: 10.4049/jimmunol.1401127.
- ⑥ Wu, L., Parekh, V.V., Hsiao, J., Kitamura, D. and Van Kaer, L. Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (43): E4638-E4647, 2014. 査読有

doi: 10.1073/pnas.1324052111.

- ⑦ Fukao, S., Haniuda, K., Nojima, T., Takai, T. and Kitamura, D. Gp49B-mediated negative regulation of antibody production by memory and marginal zone B cells. *J. Immunol.* 193 (2): 635-644, 2014. 査読有
doi: 10.4049/jimmunol.1302772.
- ⑧ Moutai, T., Yamana, H., Nojima, T. and Kitamura, D. A novel and effective cancer immunotherapy mouse model using antigen-specific B cells selected *in vitro*. *PLoS One* 9 (3): e92732, 2014. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0092732.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Saori Fukao, Kei Haniuda, Daisuke Kitamura: A new primary B cell culture system that can induce somatic hypermutation of immunoglobulin genes. 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)、2015 年 11 月 20 日
- ② Daisuke Kitamura, Shogo Takatsuka, Hiroshi Saruwatari, Hiroyuki Yamada, Saori Fukao, Kei Haniuda: Regulatory mechanisms for memory B cell generation and function. 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)、2015 年 11 月 19 日
- ③ Takuya Koike, Kei Haniuda, Shu Horiuchi, Daisuke Kitamura: CD40-regulated differentiation of memory B cell subsets is independent of isotype and affinity of B-cell antigen receptors. 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)、2015 年 11 月 18 日.
- ④ Shogo Takatsuka, Hiroyuki Yamada, Daisuke Kitamura: A role of IL-9 receptor on B cells in the T-dependent immune responses. 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)、2015 年 11 月 18 日.
- ⑤ Saori Fukao, Kei Haniuda, Daisuke Kitamura: A novel regulatory role of gp49B in TD immune response. The 3rd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum. Berlin (Germany), October 30-31, 2015.
- ⑥ Kei Haniuda, Saori Fukao, Tadahiro Kodama, Hitoshi Hasegawa, Daisuke Kitamura: Autonomous signaling from IgE B cell receptor suppresses B cell memory formation. The 3rd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum. Berlin (Germany), October 30-31, 2015.
- ⑦ Daisuke Kitamura: IL-9 as a positive regulator of memory B cells. The 3rd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum (IIMVF). Berlin (Germany), October 30 - 31, 2015.
- ⑧ Daisuke Kitamura: BLNK-knockout mice as

a model of allergic diseases. International Symposium of the Center for Animal Disease Models 2015. 学士会館(東京), July 21, 2015.

- ⑨ Masahiro Kitabatake, Miho Soma, Tianli Zhang, Takuya Nojima, Daisuke Kitamura, Nobuo Sakaguchi: JNK regulatory molecule G5PR induces peritoneal B1a cells into IgG autoantibody-producing plasmablasts. 第43回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府、京都)、2014年12月12日.
- ⑩ Hiroshi Saruwatari, Shogo Takatsuka, Daisuke Kitamura: A role of IL-9 receptor on B cells in the T-dependent immune responses. 第43回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府、京都)、2014年12月11日.
- ⑪ Kei Haniuda, Saori Fukao, Daisuke Kitamura: BLNK regulates IgE B-cell receptor signaling and B-cell memory formation. 第43回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府、京都)、2014年12月11日.
- ⑫ Takuya Koike, Shu Horiuchi, Daisuke Kitamura: CD40 signaling quantity may determine the fate of germinal center B cells. 第43回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府、京都)、2014年12月10日.
- ⑬ Daisuke Kitamura: Molecular mechanisms for the development of B-cell memory. The 2nd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum. La Jolla (USA), August 25-26, 2014.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: B細胞集団の製造方法

発明者: 北村 大介、中石 智之

権利者: 学校法人 東京理科大学、株式会社カネカ

種類: 特許

番号: 2014-136631

出願年月日: 2014年7月2日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~ribsjm/kitamura/indexj.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 大介 (KITAMURA, Daisuke)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号: 70204914