

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08837

研究課題名(和文) 体細胞超変異による自己反応性B細胞出現モデルの構築と末梢性B細胞自己寛容の解明

研究課題名(英文) The emergence of self-reactive B cells through somatic mutation and dysfunctional immune tolerance of peripheral B cells in a BCR-knock in mouse model

研究代表者

榊原 修平 (Sakakibara, Shuhei)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門助教

研究者番号：10618838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)における病源性自己抗体は、体細胞変異によって自己反応性を増大させる。本研究では、低親和性抗DNA BCRを発現するknock-in(KI)マウスを作製し、低親和性自己反応性B細胞の性状を解析した。その結果、このKIマウスの持つ低親和性抗ssDNA B細胞は、アナジーによる機能不全に陥ることはないことが分かった。しかし、生体内で胚中心B細胞へ分化できず、抗体遺伝子に体細胞変異を蓄積することはなかった。この結果から、胚中心B細胞において、低親和性自己反応性B細胞の進化を妨げるB細胞免疫寛容チェックポイントが存在する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性エリテマトーデス(SLE)に代表される自己免疫疾患の多くは根治が困難であり、解決すべき問題は多い。本研究で示されたように、胚中心反応には弱親和性抗ssDNA B細胞を抑制する免疫寛容機構がある。その一方で、多くのSLEモデルマウスでは自発的な胚中心形成が顕著であり、それに由来する自己抗体がSLE様症状を誘引する。従って、胚中心でのB細胞免疫寛容はさほど厳格ではなく、自己反応性B細胞をとりまく環境や状況によっては機能しないことが明確となった。

研究成果の概要(英文)：In acute systemic lupus erythematosus (SLE), pathogenic autoantibodies are produced by self-reactive B cells that acquire somatic mutations to augment their reactivity. However, germline-encoded, low-affinity precursors for pathogenic autoantibody-producing cells have not been characterized. In this study, we generated site-directed knock-in mice of germline-encoded, low-affinity anti-DNA BCR and characterized the precursor B cells of pathogenic anti-DNA autoantibody-producing cells in vivo. Our analysis demonstrated that low-affinity anti-ssDNA B cells from the KI mice were not functionally anergic. Nonetheless, the KI B cells failed to differentiate into germinal center B cells, undergo somatic hypermutation and clonal expansion. Therefore, low-affinity anti-ssDNA B cells are suppressed by a tolerance checkpoint at germinal centers.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 自己抗体 B細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) は、高力価な自己抗体の産生に伴い、主に免疫複合体による補体系活性化が導く慢性炎症疾患である。SLE 患者の持つ様々な自己反応性から、SLE では抗体産生に関わる自己寛容の破綻が起こっていると考えられる。しかし、SLE における自己抗体産生が、どの段階の B 細胞自己寛容の異常に起因するかは明確にされていない。

我々は、急性期 SLE 患者末梢血から、高い抗原特異性・親和性を有する抗核抗体を単離した (図 1: 上)。その中のある抗 DNA 抗体クローンについて、次世代シーケンシング解析を行うと、このレパトアが持つごく少数の変異はランダムではなく、クローン内で高頻度に保存されていた (図 1: 中)。その変異を germline 配列へ戻すことで、自己反応性が著しく減少したことから、SLE 自己抗体は自己反応性による厳密な選択を経た抗体産生細胞から産生されていることが明らかとなった (図 1: 下)。

SLE 患者由来自己反応性レパトアでは、自己抗体の親和性成熟が示唆された。しかし、これらが、外来抗原に対する免疫反応と同様に、胚中心反応における選択を受けてきたのかは不明である。モデルマウスである *MRL<sup>lpr</sup>* や *NZM2410 (B6.Sle1. Sle2. Sle3)* では、自己反応性 B 細胞 (AM14 リウマチ因子 H 鎖トランスジェニック) の濾胞外での局在と変異の蓄積が認められている (Williams J et al. *Science* 2002; Sang A et al., *J Immunol* 2014)。一方、*Roquin<sup>san/san</sup>* などの自己免疫マウスモデルでは、胚中心形成と濾胞ヘルパー T 細胞が自己抗体産生に必要である (Linterman MA et al., *J Exp Med* 2009)。

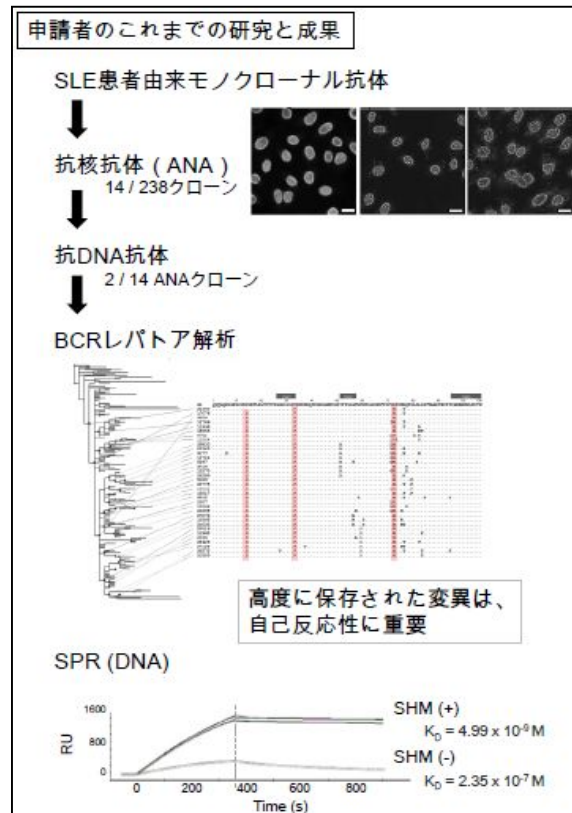
### 2. 研究の目的

本研究では、体細胞変異にて自己反応性を獲得する以前の前駆 B 細胞が、生体内において、どのような制御を受けるのかを明らかにすることを目的とした。さらに、どのような状況で前駆 B 細胞が体細胞変異を獲得し、自己反応性を増強させるのかについても明らかにすることを目指した。方法としては、SLE 患者由来の高親和性抗 dsDNA 抗体から体細胞変異を除いた germline V(D)J にコードされた BCR を発現する site-directed ノックインマウス (KI マウス) を作製し、それらの性状を解析した。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の手順で研究を進めた。

SLE 患者から得た抗 DNA 抗体クローンから体細胞変異を除いた germline 配列をマウス



**図 1. これまでの研究.** SLE 患者形質細胞よりモノクローナル抗体を作製し、抗核抗体 (ANA) を探索した。同時に、末梢血から免疫グロブリン配列を増幅させ、網羅的遺伝子配列解析を行った。代表的な抗 DNA 抗体クローン配列 (71F12) を抽出すると (図: 系統樹)、得られた配列には、保存された変異が存在した。それらは、このクローンの持つ自己反応性に大きく貢献していたことから、SLE では、自己抗体への親和性成熟が行われていることが示唆された。

遺伝子座に KI した組換えマウスを作製した。

自己反応性 BCR を発現する B 細胞は、免疫寛容機構にて除去される。得られた KI マウスの持つ B 細胞について、主に *in vitro* で性状解析を行った。

この KI マウスの B 細胞を、Foxp3-DTR マウスへ移入し、DT(ジフテリア毒素)によって制御性 T 細胞(Treg)を除去することによって胚中心反応を誘導した際に、どのような挙動をとるのかを調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) SLE 由来抗 dsDNA 抗体 germline 配列 KI マウス G9gl の作製

急性期 SLE 患者検体から分離したモノクローナル抗体クローン 121G9 は、dsDNA と ssDNA のいずれにも強く結合する抗 DNA 抗体である。この 121G9 の体細胞変異を germline 配列へ戻した抗体 121G9gl では、DNA に対する反応性が著しく低下した。即ち、このクローンの自己反応性が体細胞変異に大きく依存していることが明らかとなった。この 121G9gl を発現する B 細胞の自己反応性はごく弱いと予想され、121G9gl 配列をマウス抗体遺伝子座にノックインした場合でも、B 細胞は免疫寛容による抑制をほとんど受けないと予想した(図 2: 左下)。

マウス C57BL6 IgH 遺伝子座(第 12 染色体)と Igκ 遺伝子座(第 6 染色体)を標的とした CRISPR/Cas9 発現プラスミドを構築した。これらを ES 細胞に従来のターゲティングベクターとトランスフェクションすることで、それぞれの遺伝子座を切断するし、相同組換えを誘発させた。得られた ES クローンを導入したインジェクションキメラを作製し、B6 マウスと交配させることで G9gl KI マウスラインを樹立した(図 2)。

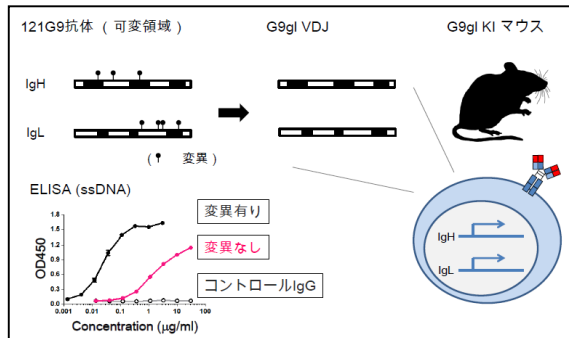


図 2. G9gl KI マウスの作製. SLE 患者から分離した 121G9 抗体の変領域から体細胞変異を除き、マウス抗体遺伝子座へ挿入した G9gl KI マウスを作製した。

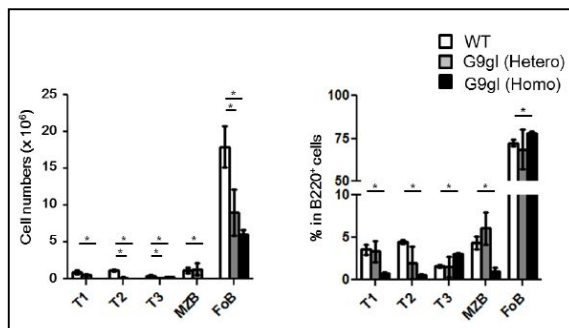


図 3. G9gl KI マウス脾臓 B 細胞. 生後 7 - 8 週令のマウス脾臓 B 細胞分画を、フローサイトメーターによって解析した。T1 T3 (transitional 1 3)、MZB (marginal zone B)、FoB (濾胞 B)。

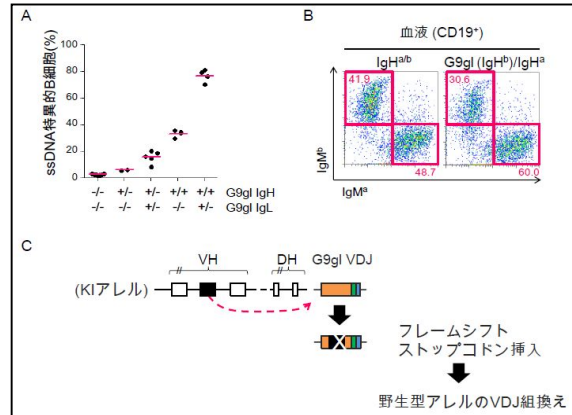
##### (2) G9gl マウスにおける低親和性抗 ssDNA B 細胞の出現

掛け合わせによって、G9gl H 鎖+L 鎖(κ鎖)のヘテロ接合体とホモ接合体を作製した。いずれも末梢 B 細胞の出現を認めたが、野生型に比べて、その数は減少していた(図 3)。脾臓では、成熟 B 細胞における Marginal zone B 細胞の割合が著しく減少していたが、濾胞性 B 細胞が十分に存在し、今後の実験に支障はないと結論付けた。

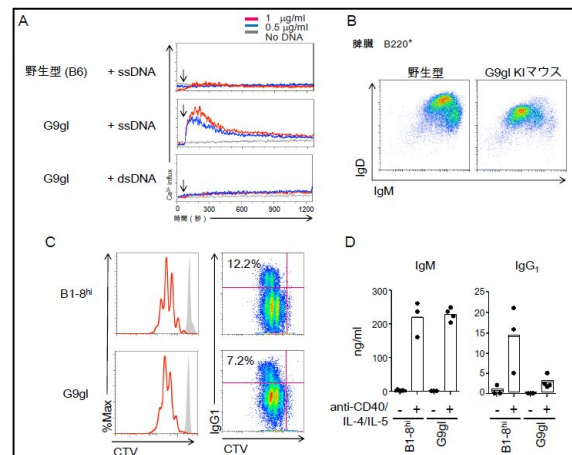
*in vitro* における結合アッセイで、ssDNA に結合する細胞は、ヘテロ接合体で脾臓 B 細胞の約 20%にとどまり、大半の B 細胞は ssDNA に反応しないことが分かった。一方、ホモ接合体では、約 80%の B 細胞が ssDNA を認識した(図 4)。

IgHa ハプロタイプとの掛け合わせで得たヘテロ接合体では、本来優位になるはずの KI アレル陽性 B 細胞 (IgH<sup>b+</sup>) が 30% に満たなかった。このマウスの IgHa アレル H 鎖を発現している B 細胞のゲノム DNA から、VH replacement の痕跡が検出された。即ち、KI G9gl VDJ が上流のマウス VH の挿入によるフレームシフトやストップコドン挿入によって不活化されていた。また、一部のクローンでは、DH の挿入も認められた。一方で、ホモ接合体由来 B 細胞では、クローニングした転写産物の 90% で G9gl KI 遺伝子が認められた。

以上の結果を受け、ホモ接合体由来 B 細胞を用いて、G9gl 発現 B 細胞の性状を解析することとした。G9gl B 細胞は予想通り ssDNA の存在下で細胞質へのカルシウム流入が誘導された(図 5A)。この結果から、G9gl B 細胞が ssDNA に反応性を有していることが明確となった。一方、dsDNA 添加時ではこの現象は見られなかった。脾臓成熟 B 細胞では BCR の発現低下が認められた(図 5B)。これは、アナジー状態にある B 細胞に共通して認められる表現型である。しかし、*in vitro* で種々のサイトカインと抗 CD40 抗体による細胞刺激すると、細胞増殖とクラススイッチと抗体産生が誘導された。従って、野生型に比べて IgG<sub>1</sub> へのクラススイッチの効率や抗体産生細胞への分化がやや劣るが、G9gl B 細胞は機能的アナジーに陥っていないことが明らかとなった (図 5C, D)。



**図 4. G9gl KI 遺伝子のレセプター編集による不活性化.**  
 A. 蛍光色素をコンジュグレートした ssDNA プロープによって抗 ssDNA B 細胞をラベルし、フローサイトメーターにより検出した。ヘテロ接合体では、20%ほどの B 細胞のみが、ssDNA 反応性を示した。B. IgH<sup>a</sup> マウスとの掛け合わせでは、本来優位になるはずの KI BCR 発現細胞が、約 30% に留まる。C. VH replacement による G9gl KI 遺伝子の不活性化。



**図 5. G9gl B 細胞は ssDNA 反応性を有するが完全な機能的アナジーには陥っていない。**  
 A 蛍光指示薬による細胞質カルシウム流入の検出。B. 脾臓成熟 B 細胞の BCR 発現 C. *in vitro* 刺激アッセイによる細胞増殖とクラススイッチ。D. *in vitro* 刺激アッセイにおける抗体産生

### (3) 胚中心における G9gl B 細胞の除去

マウスで Treg を除去すると自己反応性を伴った胚中心反応が起こり、自己抗体が産生されることが報告されている(Leonardo SM et al., *Eur J Immunol* 2012)。これは、比較的 polyclonal な免疫反応でありながら、抗原特異的な自己反応性 B 細胞が出現する急性期 SLE と類似している。本研究では、ジフテリア毒素(DT)によって制御性 T 細胞を除去することが可能な *Foxp3<sup>DT</sup>* マウスを利用した。G9gl KI マウスと *Foxp3<sup>DT</sup>* マウスを交配し、G9gl<sup>+/+</sup>-*Foxp3<sup>DT</sup>* マウスを得た。このマウスにおいて、生後 7 週令から DT を 1 週間に 3 回 (1、4、7 日目) に接種したところ、10 日から 24 日にかけてコントロールよりも高い力価の抗 dsDNA IgG が産生された(図 6A)。しかし、このマウスの脾臓胚中心 B 細胞で G9gl H 鎖を発現している B 細胞はわずか 2% ほどであった(図 6B)。ナープマウスの脾臓 B 細胞の約 20% が抗 ssDNA 反応性であったこと (図 4A) から考慮するとこの割合は非常に低く、G9gl B 細胞が選択的に胚中心反応から除去されている可能性が考えられた。

#### (4) 考察

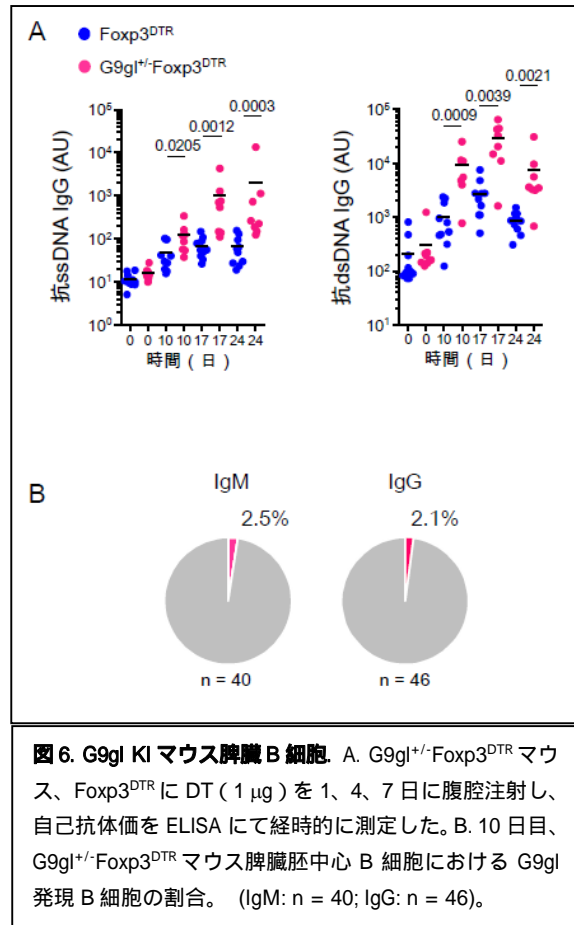
本研究では、SLE 患者 抗 dsDNA 抗体の可変領域に由来する抗体遺伝子配列を利用して、低親和性自己反応性 BCR KI マウス G9gl を作製した。この KI マウスの解析から、G9gl BCR を発現している低親和性抗 ssDNA B 細胞は骨髄での clonal deletion を受けず、成熟 B 細胞に分化することが分かった。これらの B 細胞は胚中心 B 細胞へ分化しクローン増大することができなかったことから、胚中心 B 細胞において新たな免疫寛容チェックポイントが存在することが示唆された。

G9gl KI マウスヘテロ接合体の大半の B 細胞では VH replacement により G9gl KI H 鎖が不活性化され、野生型アレルのマウス BCR を発現している B 細胞が出現した。一般に VH replacement は、RAG リコンビナーゼが既に組変わった VDJ 配列の cryptic RSS を認識することで起こる。G9gl VDJ を構成するヒト VH4-39 にもこの配列が存在していた。既報では、ハプテンに特異的な BCR やストップコドンをもつ VDJ 配列を挿入した KI マウスでも同様の現象が認められている。従って、VH replacement は抗体遺伝子の多様性に寄与するが、免疫寛容にどこまで関与しているのかは明確ではない。

G9gl BCR を発現している B 細胞は、ssDNA に対し弱い親和性を持つものの、骨髄での中枢免疫寛容チェックポイントを逃れ、大半は成熟 B 細胞へと分化していた。さらに刺激下において、G9gl B 細胞はクラススイッチや抗体産生が可能であり、機能的アナジーに陥っていない。しかし、Treg を除去することで誘導した胚中心反応には関与できなかった。抗 DNA IgH トランスジェニックマウスを用いた過去の研究では、抗 DNA クローンが胚中心反応に入るとは可能だが、抗体産生細胞へは分化できないことが示されている (Paul E et al., *Int Immunol* 2004)。本研究から、SLE 患者に由来する低親和性前駆体クローンも、既報の KI マウスと同様に胚中心 B 細胞に分化できないことが明確となった。従って、この胚中心反応における B 細胞免疫寛容が機能しないことで病原性自己抗体が産生される可能性が出てきた。

加えて、ここで疑問となるのは、Treg を除去した G9gl KI マウスで認められた強い自己抗体産生が G9gl 抗体によるものなのかという点であり、今後詳細な解析が必要である。その他の可能性としては、過去に報告された抗 DNA BCR KI マウスでの cGVHD モデルのように、VH replacement で新たに作り出された BCR レパトアに自己反応性クローンが存在する場合も考えられる (Sekiguchi DR et al., *J Exp Med* 2003)。

本研究では、弱親和性抗 ssDNA B 細胞を抑制する免疫寛容機構が胚中心反応に存在することが示唆された。一方で、多くの SLE モデルマウスでは自発的な胚中心形成が顕著であり、それに由来する自己抗体が SLE 様症状を誘引すると理解されている。このことから、胚中心での B 細胞免疫寛容はさほど厳格ではなく、自己反応性 B 細胞をとりまく環境や状況によっては機能しない。今後、胚中心 B 細胞での免疫寛容がこういった状況で破綻し、低親和性抗 ssDNA クローンが高親和性抗 dsDNA クローンへと進化するのかを明らかにしたい。



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Takeda K, Sakakiabra S et al., Allergic conversion of protective mucosal immunity against nasal bacteria in chronic rhinosinusitis with polyposis. J Allergy Clin Immunol 2019 143(3); 1163-75 (査読有)

Tsai C-Y, Sakakiabra S et al., Bystander inhibition of humoral immune responses by Epstein-Barr virus LMP1. Int Immunol 2018 30(12); 579-90 (査読有)

Sakakibara S et al., Clonal evolution and antigen recognition of anti-nuclear antibodies in acute systemic lupus erythematosus. *Scientific Reports*, 2017 7; 16428 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

Ali El Hussien, Marwa, 榊原 修平、菊谷 仁 ; " Development and activation of B cells expressing germline precursor of SLE-derived highaffinity anti-DNA antibody in knockin mice" ; 第 47 回日本免疫学会 : 2018 年 12 月 10 日 ~ 12 日 ; 福岡

榊原 修平、菊谷 仁 他 ; "Structural Basis of Antigen Recognition by Anti-dsDNA Antibodies Isolated from Systemic Lupus Erythematosus Patients" ; 第 45 回日本免疫学会 : 2016 年 12 月 5 日 ~ 7 日 ; 沖縄

榊原 修平 ; "Antigen-specific maturation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus" ; International Congress of Immunology 2016 ( 国際学会 ); 2016 年 8 月 21 日 ~ 26 日 ; 豪州メルボルン

榊原 修平 ; 「全身性エリテマトーデス由来抗 DNA 抗体の構造学的解析から見た自己反応性 B 細胞の親和性成熟」 ; 自己免疫研究会 ; 2016 年 7 月 23 日 ; 東京

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 菊谷 仁

ローマ字氏名 : ( KIKUTANI, Hitoshi )

研究協力者氏名 : 伊川 正人

ローマ字氏名 : ( IKAWA, Masato )

研究協力者氏名 : 佐藤 祐公

ローマ字氏名 : ( SATO, Yukoh )

研究協力者氏名 : ALI EL-HUSSIEN, Marwa

ローマ字氏名 : ( ALI EL-HUSSIEN, Marwa )