

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 26日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360405

研究課題名（和文） 新規な濾胞樹状細胞株を用いる抗体の親和性成熟機構の解明とその応用

研究課題名（英文） Analysis of affinity maturation process of antibodies using a novel FDC line and its application.

研究代表者

大森 齊（OMORI HITOSHI）

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：70116440

研究成果の概要（和文）：

新規に樹立したマウスの濾胞樹状細胞の細胞株 FL-Y を用いて、抗体の親和性成熟過程を胚中心における B 細胞の選択機構に焦点を当てて解析した。FL-Y 細胞は、ヘルパー T 細胞由来のサイトカイン IL-21 存在下で、B 細胞死を誘導した。この細胞死には、FL-Y の産生する PGE2 が関与することを明らかにした。IL-21 と PGE2 による B 細胞死は胚中心における B 細胞の新規な負の選択機構を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

Using a novel murine follicular dendritic cell line, FL-Y, I analyzed affinity maturation process of antibodies focusing on B cell selection in germinal centers (GCs). I found that FL-Y cells induced B cell death in the presence of a helper T cell cytokine, IL-21. The B cell death was shown to be dependent on PGE2 produced from FL-Y cells, The IL-21/PGE2-induced B cell death implicates a new negative selection mechanism of B cells in GCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：細胞工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：モノクローナル抗体、リンパ球、突然変異、アポトーシス、生体防御、胚中心、抗体医薬、濾胞樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

抗原刺激された B 細胞はリンパ組織中に形成された胚中心に移行し、活発に増殖する過程で抗体遺伝子に高頻度に変異が導入される。変異により多様化した B 細胞は濾胞樹状細胞 (FDC) ネットワーク上に捕捉された抗原と相互作用し、抗原と強く結合する高親和性 B 細胞のみが生存でき、大部分の低親和性 B 細胞は死滅する。この結果、抗体の親和性成熟が進行するとされているが、高頻度突然変異の誘導に必要な B 細胞への刺激や、FDC との相互作用を介する B 細胞の生存あるいは死を決定する機構については不明な点が多い。これは、主として中心的役割を担う FDC の単離と維持が困難であり、*in vitro* での機能解析が進んでいないためである。この難点を克服するために我々はリンパ節を断片化しコラーゲンゲル中で 3 次元培養し、抗原刺激を長期間繰り返すという独自に開発した手法によりマウスの FDC 細胞株 FL-Y を樹立することに世界で初めて成功した。得られた FL-Y は、これまでで最も忠実に DC の表現型を保持しており、これを用いて、親和性成熟の機構を詳細に解析することを計画した。

2. 研究の目的

(1) FDC 上での高親和性 B cell の選択機構の解明：抗原特異性の明確な抗体可変部遺伝子ノックインマウスの B 細胞を用い、FL-Y 細胞との共培養系で、胚中心で進行している高親和性 B 細胞の選択過程を *in vitro* で再現できる実験系の構築を行う。このような培養系で低親和性 B 細胞が優先的に死滅する条件が存在することを明らかにしたい。

(2) B 細胞の抗体遺伝子への高頻度変異導入の誘導機構の解明：

胚中心 B 細胞において、抗体遺伝子は可変部へ変異導入を受けるが、この過程は AID に依存している。しかし変異を誘導する因子は未

解明である。FDC 近傍で centroblast 型に分化した B 細胞に変異が起こるとされているが、FL-Y 細胞と B 細胞の共培養系では、B 細胞が centroblast の表現型を獲得する条件を解析する。

(3) 親和性成熟機構の抗体作製システムへの応用：我々は AID 依存性に抗体遺伝子を変異させる能力を保持したニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いて、個体への免疫を行うことなく培養細胞ライブラリーから効率的に抗体を取得できる *in vitro* 抗体作製システムを開発している。(1)、(2) の検討により得られた成果をこの系に適用し、変異頻度の向上や目的抗体産生クローンの効率的選抜法の開発などに応用し、より実用性の高い抗体作製システムへ進化させる。

3. 研究の方法

(1) FDC 上での B cell の抗原親和性の強さに基づく選択機構の解析：我々は、FL-Y 細胞と B 細胞の共培養系で、FL-Y や胚中心内のヘルパー T (Th) 細胞が産生する IL-21 の刺激を受けると低親和性 B 細胞は死滅すること、高親和性 B 細胞は Th からの CD40 シグナルを受けとって生存、増殖するという、*in vivo* で予想されているのと同様のプロセスを *in vitro* で再現できることを示す結果を得ている。これを更に確認するために、抗原特異性の明確な抗体可変部遺伝子ノックインマウス由来の B 細胞を用い、FL-Y 細胞、Th 細胞、親和性の異なる抗原などの存在下で培養する実験系を構築する。これを用いて、抗原に対する親和性の強さに応じて、B 細胞の生死を分けるのに関与する因子について、特に IL-21 を中心にその役割を解明する。

(2) B 細胞の抗体遺伝子への高頻度変異導入の誘導機構の解析：B 細胞を *in vitro* で培養し、AID 発現を上昇させて再現性よく変異

を誘導できる条件は確立されていない。In vivo では FDC 近傍の centroblast 型に分化した B 細胞に変異が起こるとされているが、我々の FL-Y 細胞と B 細胞の共培養系に、CD40L, 抗原、サイトカインなど種々の刺激を付加することにより、変異導入を誘導するために必要な刺激因子を同定する。

(3) 親和性成熟機構の抗体作製システムへの応用: 我々は AID を発現し、その発現を可逆的にスイッチ出来るように遺伝子操作したニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いる in vitro 抗体作製システムを開発している。(研究業績 12, 13)。上記 1)、2) の検討により得られた成果に基づいて DT40-SW 細胞を改変し、変異頻度の向上や目的抗体産生クローンの選択の効率化などを実現し、進化分子工学系としてより高性能なものに改良する。

4. 研究成果

濾胞樹状細胞 (FDC) の細胞株 FL-Y を用いて in vitro B 細胞選択系を構築し、親和性成熟の基本的機構である胚中心 B 細胞の変異と選択の機構を解析した。さらにニワトリ B 細胞株 DT40 を用いて AID による変異導入機能について以下の重要な新事実を発見した。

(1) FDC、T 細胞、B 細胞の相互作用による B 細胞の選択機構;

T 細胞由来の IL-21 単独では B 細胞の生存は促進されるが、FL-Y 由来の低分子可溶性因子プロスタグランジン E₂ が B 細胞に IL-21 と同時に作用すると細胞死が誘導されることを見いだした。この細胞死 (アポトーシス) には Bim とその誘導に関する転写因子 Foxo1 の発現促進が重要であることを明らかにした。

(2) IL-34 依存性新規単球系細胞 FDMC による、B 細胞の増殖促進とセントロブラストへの分化誘導機構の発見;

我々は、FL-Y 細胞と共培養により脾臓中の c-kit 陽性前駆細胞から分化する新規な骨髄系細胞 FDMC が、B 細胞のセントロブラストへの分化、増殖を促進することを見いだした。また、FDMC の分化には FL-Y 由来のサイトカイン IL-34 が必須であることを見いだした。

(3) DT40 細胞を用いる抗体遺伝子への変異導入機構の解析;

DT40 の変異株 DT40-ASF では AID に依存する高頻度突然変異が全く入らないことを見出し、この変異株で欠損している遺伝子の解析から、splicing factor SRSF1 の splice variant である SRSF1-3 が、AID の機能発現に必要であることを発見した。

以上の結果は、抗体の親和性成熟機構における新規な B 細胞選択機構を明らかにしたものとして重要である。また AID が変異導入に関与するために必要な特異的補助因子を世界で初めて同定することに成功した。これらの成果は、免疫生物学領域の進歩に大きく貢献するものであり、権威ある学術誌に論文が受理された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kanehiro, Y., Ohmori, H., Kanayama, N., et al. (10 名中 9 番目) Activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation requires a splice isoform of the serine/arginine-rich (SR) protein SRSF1. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*. (査読有) 109, 1216-1271 (2012)
- ② Magari, M., Ohmori, H., et al. (7 名中 7 番目) IL-21-dependent B cell death driven by prostaglandin E₂, a product secreted from follicular dendritic cells. *Journal of Immunology* (査読有) 187, 4210-4218 (2011).
- ③ Mabbott, N., Ohmori, H., et al. (8 名中 6 番目) Expression of mesenchyme-specific gene signatures by follicular dendritic cells: insights

from the meta-analysis of microarray data from multiple mouse cell populations. *Immunology* (査読有) 133, 482-498 (2011).

- ④ Magari, M., Kanehiro, Y., Ohmori, H. et al. (6名中6番目) Enhancement of hypermutation frequency in the chicken B cell line DT40 for Efficient diversification of antibody repertoire. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 396, 353-358 (2010).
- ⑤ Kajita, M., Kanayama, N., Ohmori, H. et al. (7名中7番目) Efficient affinity maturation of antibodies in an engineered chicken B cell line DT40-SW by increasing point mutation. *J. Biosci. Bioeng.* (査読有) 351, 351-358 (2010).

[学会発表] (計 10件)

- ① 松井一恵他5名、IL-34依存性の新規な単球系細胞の機能解析。日本免疫学会総会 2011年11月28日 幕張メッセ (千葉)
- ② 金山直樹他2名、DT40を用いる in vitro 抗体作製・改良システムの開発。日本分子生物学会大会 2011年12月13日 パシフィコ横浜 (横浜)
- ③ 金山直樹他5名、変異導入能力を有する培養B細胞株を用いた in vitro 抗体作製システムの高機能化。日本分子生物学会、日本生化学会合同大会 2010年12月9日 神戸ポートアイランド (神戸)
- ④ 藤井康正他4名、FDCとIL-21の関与する胚中心B細胞の新規な負の選択機構。日本免疫学会総会 2009年12月3日 大阪国際会議場 (大阪)
- ⑤ 大森 齊、抗体の親和性成熟機構の解析とそれに基づく効率的 in vitro 抗体作製システムの開発。蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 2009年9月11日 唐津シーサイドホテル (佐賀)

[図書] (計 1件)

永井和夫、大森 齊、金山直樹、町田千代子 講談社サイエンティフィック 「改訂 細胞工学」 2010年 (230ページ)

[産業財産権]

○出願 (計 1件)

名称：ヒト型抗体を産出するB細胞の作製方法

発明者：金山直樹、大森 齊

権利者：岡山大学

種類：特願

番号：2010-258404

出願年月日：2010年11月18日

国内外の別：国内

○取得 (計 1件)

名称：細胞の遺伝子変異機能の制御による変異タンパク質の作製方法

発明者：金山直樹、大森 齊

権利者：岡山大学

種類：特許

番号：4487068号

取得年月日：2011年4月9日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 齊 (OMORI HITOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：70116440

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

曲 正樹 (MAGARI MASAKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：