

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590568

研究課題名(和文) 胚中心での新規なシグナル分子群発現調節による B 細胞選択の解析

研究課題名(英文) Analysis on regulatory mechanism of B cell selection by novel signaling molecule in germinal center

研究代表者

疋田 正喜(Hikida, Masaki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60228715

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

研究成果の概要(和文)：これまで、T細胞でしか発現していないと考えられていたシグナル伝達分子であるCD3eが胚中心B細胞の一部の集団で発現していることを見出した。この集団は胚中心B細胞の中でも激しく増殖している細胞であり、CD3eは、これらの細胞のアポトーシスに関与していることが明らかとなった。これらの結果は、これまで知られていなかったシグナル伝達分子が胚中心B細胞の正の選択・負の選択に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。また、ある種の自己免疫疾患モデルマウスで当該細胞集団が増加していることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have found that a subset of germinal center B cells is expressing CD3e, which have been widely known as a T cell-specific signaling molecule. The germinal center B cells we have observed were proliferating cells and we have also observed that CD3e is involved in apoptosis of these B cells. These results suggest that still unknown molecules are playing essential roles in positive and/or negative selection in the germinal center B cells. Also, we have found that this cell number of this population was increased in a autoimmune-prone model mice strain compared to the wild type mice. This may suggest the involvement of this population in autoimmune diseases.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：胚中心 B細胞 分化 シグナル

1. 研究開始当初の背景

種々の免疫疾患や感染症の治療には、個体レベルで免疫機能を調節することが必須である。しかし、実際には、種々の自己免疫疾患において、どのような機構で自己に対する寛容が破綻するのか、また、どのような分子機構で侵入抗原に対して、より効果的な抗体産生細胞が選択されているのかという点に関しては不明な点が多く残されている。抗体産生細胞へと分化するB細胞の抗原特異性は、その抗原受容体(BCR)の構造で決定づけられていることは明らかであり、RAG やAID といった分子が関与する特異性獲得機構は、分子レベルに至るまで詳細

な解析が行われている(*Nat. Rev. Immunol.* 6, p573, 2006)。また、特定の抗原特異性を獲得したB細胞前駆体のうち、自己反応性細胞除去のための骨髄での負の選択をくぐり抜けた細胞が分化・成熟過程を経て末梢リンパ組織に移動し外来性の抗原に対する防御を担っていることも知られている。しかし、これらの細胞のうち、抗原に反応して胚中心でBCRに体細胞突然変異を受け、より高い親和性を獲得したクローンが効率良く選択される分子機構については必ずしも明らかとなっていない(*Immunity* 27, p190, 2007)。また、ごく最近、体細胞突然変異によって胚中心B細胞が自己反応性を獲得する場合があることも明らかになっているが(*J. Exp. Med.* 207, p2225, 2010)、これらの細胞がどのように効率良く取り除かれているのかという点についても明らかになっていない。すなわち、従来は、抗原に対してより高親和性を獲得したクローンが抗原によるBCRの架橋を受けると、より強いシグナルが伝達されるため活発に増殖を行い正の選択を受けると考えられている。一方で、架橋度が一定のレベルを超える場合は、自己応答性を獲得したと見なされ逆に負の選択を受けると言われている。このような選択の過程にBCRからのシグナルを伝える分

子群が重要な役割を果たしていることは明らかであるが、正の選択と負の選択を決定づける閾値を決めている分子実体については未知のまま残されている。したがって、BCR架橋というまったく同一の現象であるにも関わらず、抗原の種類によって増殖と死という正反対の選択を受ける分子機構がシグナル強度の閾値にのみ依存するのか、それとも他の分子機構が存在するのかについては詳細な検討は行われていない。

2. 研究の目的

獲得免疫の機能発現に必須な特異抗体を産生する細胞や記憶細胞を生成する場である胚中心においては、B細胞は正の選択と負の選択を受け適切な抗原特異性を持つ細胞のみが分化・増殖することが知られている。一方、胚中心におけるB細胞選択に異常をきたした場合に、種々の自己抗体を産生する細胞が除去されず、ある種の自己免疫疾患発症の引き金になると考えられている。しかしながら、まったく正反対の反応である正の選択・負の選択をB細胞の抗原特異性によって決定づける分子機構は明らかになっていない。そこで、本研究においては、この点に焦点を当てて詳細に解析することで自己免疫疾患の治療法開発の端緒となる知見を得ることを目標とする

3. 研究の方法

本研究は、従来B細胞では発現していない、または非常に低レベルでしか発現しないとされているT細胞抗原受容体に関連したシグナル分子群が胚中心B細胞で選択的に発現しているという予備検討の結果に基づいて計画されている。この結果自体が非常に新規性の高いものであることから、これらの分子の詳細な発現量・発現様式を明らかにすることが非常に重要である。したがって、初年度は特にこの点に焦点を絞って確実なものとするこ

とに主眼を置いた。一方で、このような新規な発現が確認された場合に、実際にそれらの分子が生理的に重要な役割を果たしていることを明らかにすることも必須であることから、ノックアウトマウス的手法を用いてこの点についても解析を加えた。

4. 研究成果

広範な細胞表面マーカーについて、検討を行った結果、一部の増殖している胚中心B細胞やアポトーシスに陥っている胚中心B細胞で、一般的にはT細胞でのみ強い発現が認められているCD3 ϵ やIck といったシグナル伝達分子が発現していることを見出した。また、Ick がリンパ球系細胞のアポトーシスに必須な場合があるという報告があることから

(*J. Immunol.* **172**, p79, 2004)、Ick 欠損B細胞と正常T細胞をRAG 欠損マウスに移植して免疫する系において検討した結果、Ick が胚中心B細胞のアポトーシス誘導に必須であることを示唆するデータが得られた。加えてIck の発現と同じ様式でYFP が発現するマウス(Ick-cre/R26-STOP-YFP)の解析により胚中心B細胞のうち、アポトーシスに陥りつつある細胞集団の有意な割合がYFP 陽性となっていることを明らかにした。これらのデータは、胚中心B細胞においては、未だに知られていないシグナル伝達機構が存在しており、その新規な経路が胚中心における正の選択と負の選択に必須の役割を果たしていることを示唆している。

そこで、このようなCD3 ϵ 依存性のアポトーシスがどのような分子機構で誘導されているのかについても検討を加えることにした。これまでに、胚中心B細胞のアポトーシスは proapoptotic な、いわゆるBH3-only protein の一つであるBimに依存していることが明らかとされている(Fischer et al., *Blood*, **110**(12), 3978-, 2007)。そこで、CD3 ϵ からのシグナルによって、Bimのリン酸化の状態が変動

するか否かを検討することにした。しかしながら、胚中心B細胞は極めて少数であり、またin vitroでは、刺激の有無に関わらずアポトーシスに陥ることが知られている。そのため、シグナル伝達の分子機構等の解析は困難である。そこで、胚中心B細胞由来のパーキットリンパ腫であるRamos細胞から、CD3 ϵ を恒常的に発現しているsublineを樹立し解析を加えることにした。

当該細胞は、野生型と比較して、未刺激の状態でもアポトーシスに陥る細胞の割合が多く、何らかのアポトーシス活性化シグナルが働いていることが示唆された。そこで、当該Ramos細胞株におけるアポトーシスへのCD3 ϵ の関与の有無を明らかにすることを試みた。すなわち、当該細胞株に種々の刺激を加え、その刺激に応答してBimの活性化が誘導されるか否かをBimのリン酸化を指標に検討した。その結果、抗原受容体を強架橋し、同時にCD3 ϵ 架橋を行った場合に、明らかにBimのリン酸化が亢進されることが示された。

胚中心においては、抗体可変部をコードする遺伝子に体細胞突然変異が起こり、B細胞が細胞表面に発現している抗原受容体の抗原に対する親和性が高められることが知られている。一方、体細胞突然変異はランダムに導入されるため、ごく一部の細胞は自己抗原に対する特異性を獲得してしまう場合があると考えられている。

今回、CD3 ϵ 陽性Ramos細胞の刺激に用いた抗原受容体の強架橋の条件は、生体内において自己抗原獲得した場合を模倣していることが知られている。したがって、そのような刺激に応じてアポトーシスが惹起される機構は自己応答性を除去するという観点から生理的に非常に重要な仕組みであることが強く示唆される。そこで、自己免疫疾患を自然発症するモデルマウスにおいて、今回、見出したアポトーシスの活性化経路に何らかの異常があるのか否かを検討することにした。

その結果、自己免疫疾患モデルマウスである、BXS_B/Yaa系統において、加齢に伴って脾臓中に形成される胚中心B細胞中の、CD3_εを発現している細胞集団の割合が野生型のマウスと比べて上昇していることが明らかとなった。

自己免疫疾患モデルマウスにおいては、アポトーシスが惹起される過程のいずれかのステップに異常をきたしており、本来はアポトーシスによって胚中心から除去されるべきCD3_ε陽性細胞が蓄積していると考えられる。このことは、本研究で見出した胚中心B細胞集団がある種の自己免疫疾患の発症と関連していることを強く示唆しており重要な成果であると考えられる。

これまで多くの研究では、自己免疫疾患の発症とアポトーシス異常については詳細な検討が行われてきた。しかし、正常な状態でのような分子機構でアポトーシスが誘導されているのかという点については、不明な点が多く残されてきた。本研究は、従来知られていなかった、CD3_εの胚中心B細胞での発現に焦点を当てて、この問題点にアプローチした重要な研究であると考えられる。

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 1 件)

Todo K, Koga O, Nishikawa M, Hikida M., IgG1 cytoplasmic tail is essential for cell surface expression in Ig β down-regulated cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**(3): 572-577.

〔学会発表〕(計 2 件)

Todo Kagefumi and Masaki Hikida, Roles of Ig β in the generation of autoreactive B cells in BXS_B-Yaa autoimmune prone mouse. 日本免疫学会 (2012)

Masaki Hikida and Todo Kagefumi, Roles of Ig β in the generation of autoreactive B cells in BXS_B-Yaa autoimmune prone mice. 日本免疫学会 (2013)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足田 正喜 (HIKIDA, Masaki)
京都大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号：60228715

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし