

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560961

研究課題名(和文)抗体の親和性成熟を促進する新規骨髓系細胞の同定とそのB細胞活性化機構の解明

研究課題名(英文) Identification of a new type of monocytic cell that promotes affinity maturation and characterization of its B cell-activation mechanism

研究代表者

大森 齊(OHMORI, HITOSHI)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：70116440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞は、胚中心で高頻度突然変異と選択によって、高親和性抗体産生細胞へ分化する。この過程で濾胞樹状細胞(FDCs)は中心的役割を担っている。FDC細胞株FL-Yを樹立し機能解析を行ったところ、FL-Yが脾臓の前駆細胞から新規な単球系細胞(FDMC)の分化を誘導することを発見した。FDMCはB細胞の増殖を強く促進し、その分化はCSF-1受容体(R)を介するIL-34シグナルに特異的に依存することを発見した。これは、IL-34選択的CSF-1Rシグナル経路の初めての報告である。

研究成果の概要(英文)：B cells differentiate into high-affinity antibody producers as the consequence of hypermutation immunoglobulin genes followed by selection of mutated clones. Follicular dendritic cells (FDCs) have been shown to play a pivotal role in these processes. To investigate immunologic functions of FDCs, we established an FDC line, FL-Y, which was shown to induce a new class of monocytic cells named FDMCs with a unique B cell stimulating activity. We found FDMC differentiation was strictly dependent on CSF-1 receptor (R) and the ligand, IL-34. This is the first report describing IL-34-selective CSF-1R signaling pathway.

研究分野：細胞工学・免疫学

キーワード：濾胞樹状細胞 単球系細胞分化 CSF-1受容体 IL-34 CSF-1 細胞情報伝達 胚中心B細胞 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

抗原投与後に産生される抗体は、時間経過と共に抗原に対する親和性が増大する（親和性成熟と呼ばれる過程）。抗体の親和性成熟はリンパ組織中に形成される胚中心の中で進行する（図1）。抗原刺激されたB細胞は胚中心に移行し活発に増殖するが、この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 (**follicular dendritic cell** (FDC))の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少数の高親和性B細胞のみが生存し、大部分を占める低親和性B細胞は死滅する。この結果、親和性成熟が進行するとされているが、胚中心のB細胞を活発に増殖させ、高頻度変異を誘発する刺激の本体は分かっていない。FDCがB細胞に何らかのシグナルを送っていることが示唆されているが、不明な点が多い。これは、中心的役割を担うFDCの単離と維持が困難であるため、*in vitro*での機能解析は進んでいなかった。

FDCの機能を*in vitro*で詳細に解析するために、我々はリンパ節を断片化し、抗原刺激を繰り返しつつコラーゲンゲル中で3次元培養するという独自の手法により、世界で初めてマウスのリンパ節からFDC細胞株FL-Yを樹立することに成功した (*Journal of Immunology* 177:5201(2006))。FL-Y細胞は、その生存と増殖がTNF- $\alpha$ とlymphotoxin  $\beta$ レセプターシグナルに依存し、遺伝子発現レベルでFDCの特性を良く保持していた。また、*in vitro*でB細胞を胚中心B細胞特有の表現型に分化させ、抗体産生能力を長期間維持する機能も有することを明らかにした。

FL-Y細胞をFDCのモデルとして用いる実験の過程で、FDCが低親和性のB細胞を能動的に死滅させる作用を持つこと、このB細胞死はヘルパーT細胞由来のサイトカインIL-21とFDCの分泌するプロスタグランジンE<sub>2</sub>の協同作用によって誘導されること、を見いだした。これらの結果はFL-YがFDC細胞株として、胚中心反応におけるFDCの機能的役割を解析するために、極めて有用なツールとなることを示している。

## 2. 研究の目的

医薬や診断薬として利用価値の高い高親和性抗体を効率よく作製する方法は、医療技術の進歩にとって重要である。生体内で高親和性抗体を生み出す親和性成熟という過程は、B細胞の抗体遺伝子の高頻度突然変異と高親和抗体産生能力を獲得したB細胞の選択からなる。しかし、抗原刺激されたB細胞の過発な増殖と高頻度変異を誘導する刺激の本体は不明である。我々はマウス脾臓中の前駆細胞から新規な骨髓系細胞 (FDC-induced monocytic cell (FDMC))が分化する条件を発見し、FDMC由来の可溶性因子がB細胞の活発な増殖と抗体の親和性成熟を促進する特異な性質を持つことを見いだした。これは、FDMCが胚中心におけるB細胞分化を制御する新規な役割を担う可能性を示唆している。本研究では、FDMCの更なる機能解析と、FL-YによるFDMC誘導メカニズムの解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) FDMCの誘導と解析：EGFPを発現す

る FL-Y 細胞を TNF- 存在下で増殖させた。FL-Y 細胞と BALB/c マウスの脾臓細胞から T 細胞、B 細胞、接着性細胞を除去した CD11b 陰性細胞群 (TBA-SC) を 7 ~ 9 日間共培養した。FACS を用いるフローサイトメトリーにより、CD11b 陽性、EGFP 陰性の細胞を検出することにより、FDMC の分化を評価した。FDMC における他の表面マーカーの発現を同様に FACS により解析した。

(2) FDMC の B 細胞刺激活性の検討 : FL-Y と脾臓由来前駆細胞の共培養によって誘導された FDMC (CD11b+EGFP-) を FACS Aria を用いる sorting によって単離した。蛍光色素 CFSE 標識したマウスの脾臓 B 細胞を抗 CD40 抗体で刺激して活性化し、FDMC の存在下、非存在下で 3 ~ 5 日間培養した。B 細胞の増殖は CFSE の蛍光強度の減衰を FACS で測定することにより評価した。

### (3) FL-Y による FDMC の誘導機構の解析

#### 中和抗体の影響 :

FL-Y 由来の FDMC 分化誘導に関与する因子として想定される CSF-1, その受容体 CSF-1R, IL-34 などの中和抗体を用いて、FDMC の誘導に対する阻害効果を調べた。

RNAi による遺伝子ノックダウン : FL-Y 細胞における CSF-1 や IL-34 の発現を、それらに対応する shRNA を導入することによって阻害し、FDMC 誘導活性に対する影響を調べた。

CSF-1R ノックアウトマウスによる解析 : FDMC の誘導に、前駆細胞上に発現している CSF-1R が関与することを証明するために、CSF-1R ノックアウトマウスから単離した脾臓由来の前駆細胞を FL-Y 細胞と共培養し、FDMC の誘導が起こるかどうかを検討した。

IL-34 ノックアウトマウスによる解析 : In vivo で FDMC が果たしている機能を解析するために、最近作成された IL-34 ノックアウトマウスを導入し、FDMC 様 CD11b+細胞の挙動を解析する。

## 4 . 研究成果

(1) FL-Y による新規単球系細胞 FDMC の分化 : CD11b を発現していない脾臓由来の非 T , 非 B 細胞群 (TBA-SC) を FL-Y 細胞存在下で 9 日間培養すると、6 日目から CD11b 陽性 EGFP 陰性の細胞数が増加し、8 ~ 9 日で最大値に達した (図 1)。

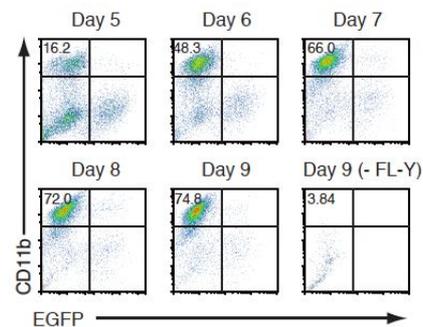


図 1 . FL-Y との共培養による TBA-SC からの CD11b 陽性細胞の分化誘導。

この CD11b 陽性細胞を単離し、表面マーカーを FACS により解析したところ、F4/80+, Gr-1-, MHC II-, CD11c-, CD115+, CCR2+, CX3CR1- という特徴的な表現型をもつ新規単球系細胞であることが分かったので、これを FDMC と名付け、その性質と生理的役割を解析した。

### (2) FDMC による活性化 B 細胞の分裂促進 :

FDMC は、T 細胞の増殖応答はやや抑制し、樹状細胞やマクロファージとは異なり、MHC 抗原クラス II を持たないため提示能は示さ

なかった。B細胞増殖応答に対する影響を調べたところ、興味深いことに anti-CD40 抗体で活性化したB細胞の増殖を FL-Y はさらに強く促進することを見出した(図2)。また、FL-Y 存在下で増殖促進を受けたB細胞では、胚中心B細胞に特有の表面マーカー (GL-7, Fas) の発現が亢進していた。B細胞の増殖を促進する単球系細胞はこれまで報告がなく、FDMC は新規な単球系細胞として興味深い。FDMC は胚中心B細胞の急速な分裂と体細胞高頻度突然変異の誘導などに、重要な役割を担う可能性が考えられるため、更なる検討が必要である。

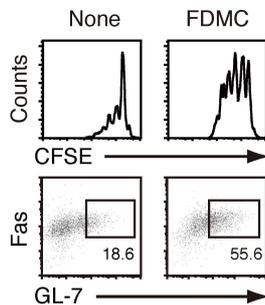


図2 .FDMC による anti-CD40 刺激を受けた B 細胞の増殖促進と胚中心 B 細胞マーカーの発現増強。

(3)FDMC の分化誘導に關与する FL-Y 由来因子の解析 :

FDMC は単球系細胞と考えられるため、その分化誘導には、これまでの報告を考慮すると、CSF-1(M-CSF) が關与する可能性が高いを思われた。そこで、FDMC の FL-Y による誘導系に、CSF-1 の中和抗体を加えたところ、全く阻害効果は見られなかった。しかし、CSF-1 の受容体 CSF-1R を遮断する抗体を添加すると、FDMC の分化は完全に抑制された。最近、CSF-1R の第二のリガンドとして IL-34 が同定されている。FL-Y 細胞は、CSF-1 だけでなく、IL-34 も発現していた。そこで、IL-34 に対する中和抗体を用いると、FDMC の誘導が阻害

されることを確認した。FDMC の分化誘導が CSF-1 ではなく、IL-34 に依存することを更に確認するために、FL-Y 細胞における shRNA による CSF-1 と IL-34 のノックダウン実験を行った(図3)。

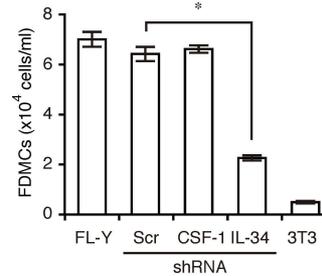


図3 . FL-Y における IL-34 の shRNA によるノックダウンの結果、FDMC の誘導が抑制される。

図3 . に示すように、CSF-1 ではなく、IL-34 をノックダウンした場合にのみ、FDMC の誘導は阻害された。また、CSF-1 は作るが、IL-34 は産生しない NIH3T3 細胞では FDMC は誘導されなかった。したがって、FDMC の誘導は IL-34 特異的に起こることが証明された。また、図4 . に示すように、CSF-1R ノックアウトマウスの駆細胞からは、FDMC は誘導されなかった。これまで、CSF-1R は CSF-1 と IL-34 のシグナルをほぼ同等に伝達するとされている。我々の実験は、FDMC の誘導に必要な CSF-1R は IL-34 選択的に作動することを示した。CSF-1 に応答せず、IL-34 シグナルを選択的に伝達する CSF-1R はこれまで報告されておらず、

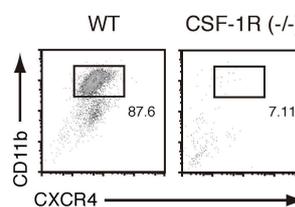


図4 .FDMC の誘導には CSF-1R が必須である。

新規なシグナル伝達系として重要であり、その分子機構の解明が待たれる。

(4)研究成果の意義：

本研究は、我々独自に樹立した FDC 株 FL-Y 細胞の特性の解析が契機となって開始された。本研究で明らかとなった重要な知見とその意義は、以下の通りである。

FDC により分化が誘導される単球系細胞 FDMC が存在し、これは B 細胞の増殖促進という特異な機能を有する。これまで、胚中心において B 細胞が活発に分裂増殖し、抗体遺伝子に高頻度変異が導入される機構は解明されていない。FDMC はこの重要なプロセスを駆動する可能性のある新しい細胞として重要である。

CSF-1 と IL-34 は単球系細胞の分化を制御する重要なサイトカインであるが、そのシグナル伝達系の全容は未解明である。これらのサイトカインの共通の受容体である CSF-1R はこれまで、両サイトカインのシグナルを程度の差はあるが、同等に伝達するとされてきた。しかし、近年、ランゲルハンス細胞とミクログリア細胞の分化は IL-34 に特異的に依存することが報告されている。我々の研究は、IL-34 に特異的に応答する CSF-1R 経路が存在することを示した。これは、新規な CSF-1R 経路の発見であり、今後 IL-34, CSF-1 のシグナル経路の多様性を解明していく上で重要な知見である。

今回得られた結果は極めて新規性の高いものとして評価され、Journal of Leukocyte Biology 誌に highlighted article として受理され、データが掲載号の表紙を飾ると共に、解説記事つきで出版された。IL-34, CSF-1 のシグナル伝達経路の更なる解明は、癌や自己免疫疾

患の病因解明や治療法の開発につながることを期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Aungier, S. R., Ohmori, H., Clinton, M., Mabbott, N.A. MicroRNA-100-5p indirectly modulates the expression of Il6, Ptgs1/2 and Tlr4 mRNA in the mouse follicular dendritic cell-like cell line, FL-Y. Immunology 査読有 Vol. 144 (2014) pp. 33-44. DOI:10.1111/imm.12342.

Yamane, F., Nishikawa, Y., Magari, M., Ohmori, H. 他 11 名 CSF-1 receptor-mediated differentiation of a new type of monocytic cell with B cell-stimulating activity: its selective dependence on IL-34. J. Leukoc. Biol. 査読有 Vol. 95 (2014) pp.19-31. DOI:10.1189/jlb.0613311

曲 正樹、金山直樹、大森 齊 胚中心における B 細胞の negative selection と濾胞樹状細胞、臨床免疫・アレルギー科 査読無、Vol. 58 (2012) pp.259-265.

金山直樹、大森 齊 抗体遺伝子への突然変異機能を有するニワトリ B 細胞株の機能拡張による in vitro モノクローナル抗体作製・改良システム、細胞工学 査読無 Vol.31 (2012) pp.1159-1165.

〔学会発表〕(計3件)

小川紗也香, 大森 齊, 曲正樹 他 6 名、  
IL-34依存的に発生する新規単球系細胞  
の分化機構; 濾胞樹状細胞によるIL-34特  
異的作用の解析。第37回日本分子生物学  
会、2014年12月1日~4日、 神奈川県横  
浜市。

Yamane, F., Magari, M., Ohmori, H. 他11  
名、Follicular dendritic cells induce a new  
class of myeloid cells with unique B cell  
stimulating activities: specific  
dependence on IL-34/CSF-1R signaling  
pathway. 15th International Congress of  
Immunology 2013年8月23~27日、ミラノ(イ  
タリア)。

曲 正樹、大森 齊 他 9 名、  
IL-34-dependent monocytic cells that  
promote centroblast-associated phenotype  
expression in mouse activated B  
cells. 日本免疫学会総会 2012 年 12 月 5  
日~7 日 兵庫県神戸市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大森 齊 (OHMORI HITOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：7 0 1 1 6 4 4 0

(2)研究分担者

(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：5 0 3 5 9 8 8 2