

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659225

研究課題名(和文) 構成的免疫学の方法論に基づく免疫記憶形成の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular analyses of B-cell memory development through synthetic immunology

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答の際、B細胞は増殖して胚中心を形成した後、記憶B細胞か形質細胞へと分化する。これを再現するiGB細胞培養系では、IL-4で一次培養したiGB細胞は記憶B細胞に、その後IL-21で二次培養したiGB細胞は形質細胞へとin vivoでそれぞれ分化する。この系と遺伝子改変マウスを組み合わせ用い、転写因子Bach2が胚中心の形成だけでなく記憶B細胞の分化に必要なであることを示した。他にも記憶B細胞分化に必要な遺伝子を同定した。今後、iGB細胞にこれらを段階的に再構成することにより、記憶B細胞に至る構成的分化誘導を実現する。それによりB細胞の後期分化誘導機構を包括的に理解する。

研究成果の概要(英文)：Upon immunization, B cells proliferate to form germinal centers (GC) in the lymphoid organs and differentiate into either long-lived plasma (LP) or memory B (Bmem) cells. Mechanisms for Bmem cell development remain poorly understood, partly due to the lack of an in vitro model system. Recently, we have established a culture system in which naive B cells undergo massive expansion and isotype switching, and generate GC-like B cells termed iGB cells. The iGB cells after primary IL-4 culture differentiate into functional Bmem-like (iMB) cells in mice, whereas those after the secondary IL-21 culture differentiate into LP but not iMB cells. Thus, this system will facilitate dissection of GC-B cell differentiation programs. In conjunction with knock-out mice, we demonstrated that transcription factor Bach2 and others are required not only for Bmem development. Systematic reconstitution of these factors in iGB cells will allow us to understand the mechanism for Bmem development.

研究分野：医歯薬学

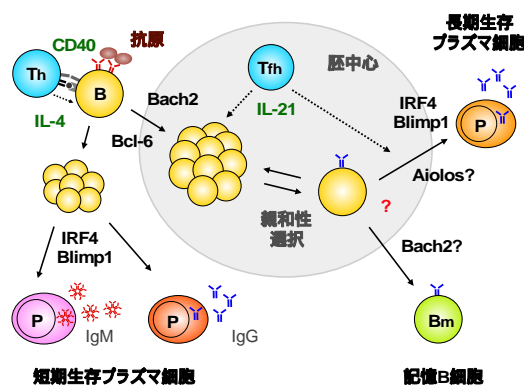
科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫応答 免疫学的記憶 胚中心 細胞分化 B細胞

1. 研究開始当初の背景

ウイルス等の病原体に対する免疫記憶の形成は獲得免疫系の最大の特徴である。抗原を認識したB細胞はMHC-II上に抗原を提示し、これを認識するヘルパーT(Th)細胞からCD40LやIL-4を介したシグナルを受けて強く増殖する。その一部は短期生存形質細胞へ分化し早期の抗体産生を担うが、別の一部は濾胞Th (Tfh)細胞の産生するIL-21によりさらに増殖し胚中心を形成する。胚中心のB細胞ではIgMからIgGへのクラススイッチと体細胞超変異が起こり、その中から抗原に高親和性のB細胞が選択される。それらは増殖の後、記憶B細胞と長期生存形質(LP)細胞という2種類のエフェクター細胞へ分化する。記憶B細胞は長期間生存し、同じ病原体に再び遭遇すると直ちに高親和性IgG型抗体を大量に産生する(記憶応答)。LP細胞は主に骨髄において高親和性抗体を長期間産生し続ける。これらの免疫記憶を担うエフェクター細胞の分化誘導機構は免疫学に残された大きな謎であり、これを解明することは有効なワクチンの開発に重要であり、また、自己免疫疾患やアレルギーの病因を解明する糸口にもなる。

胚中心B細胞から記憶B細胞あるいは長期生存プラズマ細胞への分化

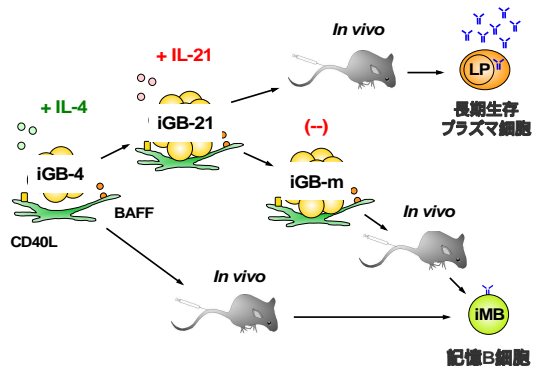


胚中心の形成には転写因子Bcl-6が不可欠であり、また、Bach2は胚中心形成、クラススイッチ、体細胞超変異に必要である。しかし、低親和性の記憶B細胞はBcl-6欠損マウスや、胚中心を形成しないその他の変異マウスでも形成される。マウスの記憶B細胞は数が少なく、特有の分化マーカーもないため、免疫後、いつどこでどのように形成されるか良くわかっておらず、その分化誘導機構はほとんど不明である。一方、すべてのプラズマ細胞はCD138という特有のマーカーで識別することが可能で、その分化には転写因子IRF4とBlimp1が不可欠であることが分かっている。しかし、胚中心B細胞が短期生存プラズマ細胞ではなくLP細胞へと分化する機構は不明である。リンパ組織の胚中心において多種多様

の細胞が非同期的に増殖・分化するなかで、少数の細胞が記憶B細胞やLP細胞へと分化する過程を*in vivo*で調べるのは困難であり、それには胚中心におけるB細胞分化を再現する*in vitro*実験系が不可欠である。

そこで私たちは、*in vitro*でナイーブB細胞から大量の胚中心B細胞様の細胞(iGB細胞)を作製するiGB細胞培養法を確立した(野嶋ら, Nature Commun. 2:465, 2011)。すなわち、CD40LとBAFFを発現する繊維芽細胞株(40LB)を作製し、これをフィーダーとしてナイーブB細胞をIL-4存在下で3-4日培養すると(1次培養)、IgG1かIgEにクラススイッチしたiGB細胞(iGB-4)が著しく増殖する。この細胞をマウスに移入すると記憶B細胞の表現型と記憶応答能を有する細胞[induced memory B (iMB)細胞]となり末梢リンパ組織で長期に維持される。1次培養の後にIL-21に替えて3-4日2次培養するとiGB細胞はさらに強く増殖し、IgG1+優位となり、その一部はCD138陽性となる(iGB-21)。この細胞をマウスに移入するとiMB細胞にはならず骨髄においてLP細胞となり長期にIgG1抗体を産生する。さらに、IL-21を除いて2日間培養したiGB-m細胞はiMB細胞への分化能を回復する。

iGB細胞培養系による胚中心B細胞分化の再現



以上より、*in vitro*でナイーブB細胞から胚中心B細胞を誘導することが可能となり、そのiGB細胞には条件により記憶B細胞あるいはLP細胞の前駆細胞が含まれることが分かった。iGB細胞は培養過程で分化可塑性を維持しており、IL-4により付与された記憶B細胞への分化能はIL-21により抑制されるがその抑制は可逆的である。この系は、胚中心B細胞における記憶B細胞あるいはLP細胞への運命決定と分化誘導に対する分子生物学的アプローチを可能にした初めての*in vitro*実験系である。

遺伝子標的法の出現以来、高等生物の研究では(逆)遺伝学的手法が中心となった。しかし、生体反応の多くは複数の遺伝子産物、複数の細胞が時空間で階層的また確率的に相互作用

用した結果であり、変異マウスの表現型を詳細に解析するだけではその遺伝子産物の作用機序や、その表現型の発現機構はよく解らないことが多い。その問題を克服する試みとして、Synthetic Biology 一個々の生体要素を組み合わせ、細胞の構成物や反応系を人工的に構成することによってその成り立ちを理解しようとする方法論<sup>1</sup>が提唱されている。端的にいうと、遺伝学は「全体-a」の結果を解釈するが、Synthetic Biologyは「a+b+c…」で生まれるものを解析して理解する。この方法論に基づく「構成的免疫学」の先駆けとして、私はB細胞の後期分化メカニズムを解明しようと試みた。

本研究による免疫記憶誘導の分子機構の理解はより確実で強力なワクチンの開発に貢献するものと期待される。また、異所性胚中心由来の自己抗体が原因となる自己免疫疾患に対する治療法の開発に有用となるだろう。

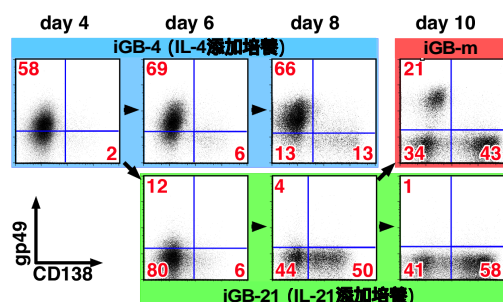
## 2. 研究の目的

本研究では、上述の iGB 細胞培養系を用いて、記憶 B 細胞あるいは LP 細胞への分化を誘導する分子群を同定し、それらの時間軸に沿った段階的発現を iGB 細胞に再構成することにより、*in vitro*において記憶 B 細胞あるいは LP 細胞への特異的分化を再現することを目指した。こうした構成的免疫応答を実現することによって、胚中心 B 細胞の分化方向決定とその後の分化誘導の分子機構を包括的に理解することができると考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) iGB細胞培養系における細胞分化の指標:

上述のように、iGB-4およびiGB-m細胞は記憶B細胞の、iGB-21細胞はLP細胞のそれぞれ前駆細胞を含んでいると考えられる。私たちは網羅的遺伝子発現解析結果から、B細胞系列では記憶B細胞に選択的に発現する遺伝子として膜蛋白gp49Bを見出し、gp49B蛋白がiMB細胞や生理的記憶B細胞に発現すること、また、iGB-4およびiGB-mにのみgp49B陽性の細胞集団が含まれることを見出した。よって、gp49Bの発現を記憶B細胞前駆細胞への分化の指標とすることができると考えた。



一方、Blimp1遺伝子はCD138陰性の細胞に限ればiGB-4および iGB-m細胞にはほとんど発現せず、iGB-21細胞には発現する。よって、CD138陰性のiGB細胞においてはBlimp1遺伝子の発現をLP細胞への分化能獲得の指標とすることができる。そこで、Blimp1遺伝子にEGFP遺伝子が挿入されたBlimp1-mEGFPマウスを用いて、iGB細胞においてGFPの発現をLP細胞への分化決定の指標とする。これらの指標を用いて、*in vitro*で記憶 B細胞およびLP細胞への分化を誘導する因子を探索する。

### (2) 記憶B細胞への分化誘導因子の同定:

Bach2はB細胞特異的に発現する転写抑制因子で、胚中心形成・クラススイッチ・体細胞超変異に必要であるが、記憶B細胞分化に必要なかどうかは知られていない。iGB細胞におけるBach2の発現はiGB-4細胞では高いがiGB-21細胞では低下した。そこで、iGB細胞にBach2を恒常的に発現させたところ、このiGB/Bach2細胞はIL-21存在下で低い増殖率で増え続け、長期培養後にはCD38陽性、CD62L陽性、Blimp1陰性という記憶B細胞の形質を発現した。よってBach2がiGB細胞内で記憶B細胞分化の誘導因子として作用する可能性がある。これを証明するために、Bach2欠損マウス由来のiGB-4細胞をマウスに移入し、iMB細胞が形成されるかどうか調べる。また、Bach2欠損マウスをT依存性抗原で免疫し、抗原特異的IgM型記憶B細胞が形成されるかどうかを確認する。Bach2が記憶B細胞分化に必要なことが明らかである場合は、正常マウスとBach2欠損マウスのB細胞から作製したiGB-4細胞における遺伝子発現をマイクロアレイにより比較し、Bach2が制御する遺伝子を同定する。

Bach2はナイーブB細胞にも発現しているので、記憶B細胞分化の誘導に必要であるとしても十分とは考えにくく、胚中心B細胞で発現する他の因子も関与すると思われる。そこで、網羅的発現解析によりiGB-4細胞に発現し、iGB-21細胞には発現しない遺伝子の中から蛋白修飾因子や転写因子を選び、iGB-4細胞にそれらのsiRNAを導入し、それらの発現を抑制する。その結果、iGB-4およびその後のiGB-m細胞におけるgp49陽性CD138陰性の細胞の頻度が低下したものについて、さらにそれらの細胞が*in vivo*でiMB細胞へと分化するかどうかを調べる。その結果iMB細胞への分化に必要であった遺伝子については、入手可能な限り、その変異マウスのB細胞を用いてsiRNA実験の結果を確認する。

#### 4. 研究成果

(1) Bach2欠損マウス由来の1次iGB-4細胞をマウスに移入したところ、iMB細胞への分化は起こらなかった。また、Bach2欠損マウスをT依存性抗原で免疫したところ、抗原特異的記憶B細胞は形成されず、2次免疫による抗体産生もなかった。Bach2はB細胞以外の一部の細胞にも発現しているため、この異常がB細胞に起因するものか確かめるために、B細胞のみBach2を欠損するような骨髄キメラマウスを作製し、同様に免疫応答を調べた。その結果、このマウスにおいても胚中心や記憶B細胞は形成されなかった。よって、B細胞に発現するBach2がこのB細胞の免疫応答に必要であることが分かった。

Bach2はクラススイッチにも必要であるが、Bach2 Blimp1 2重欠損B細胞ではクラススイッチが回復することから、Bach2によるBlimp1の発現抑制がクラススイッチ誘導に必要と思われる。そこで、交配によりB細胞でBlimp1を欠損するBach2欠損マウスを作製し同様に免疫応答を解析したところ、胚中心形成とクラススイッチは回復したが、記憶B細胞は形成されなかった。以上より、Bach2は記憶B細胞分化に必要であり、それはBlimp1を介さないことが明らかになった。

この結果を受けて、Blimp1欠損およびBach2/Blimp1二重欠損のB細胞からそれぞれ作製した1次iGB細胞における遺伝子発現をマイクロアレイにより比較し、Bach2が制御する遺伝子の同定を試みた。その結果、いくつかの遺伝子が見出されたが、その中でCdkインヒビターp16をコードするCdkn2aがBach2/Blimp1二重欠損細胞で顕著な上昇を示した。事実、Bach2欠損iGB細胞の細胞回転は低下し、増殖は培養4日目以降強く抑制された。また、Bach2/Blimp1二重欠損細胞においてCdkn2a遺伝子をノックダウンした場合は、培養5日目以降の増殖がある程度回復した。

また、Bach2/Blimp1二重欠損B細胞では免疫グロブリンのJ鎖の発現上昇とPax5の発現低下が見られた。よって、Bach2欠損によりBlimp1非依存的にプラズマ細胞への分化が進んでいると考えられた。すなわち、プラズマ細胞への分化抑制において、Bach2はBlimp1以外の遺伝子も制御していると考えられた。

(2) 網羅的発現解析により、iGB-4 およびiGB-m 細胞に発現し、iGB-21 細胞には発現しない遺伝子の中から蛋白修飾因子や転写因子を選び、記憶B細胞誘導への関与を解析している。その中にはiGB-4 細胞に導入するとin vivoでのiMB細胞の形成が促進され、また、iGB-21以降の細胞においてgp49Bの発現を増加させ、

Blimp1の発現を抑制するものが含まれていた。それらが記憶B細胞分化誘導に関与するかどうかを明らかにするために、B細胞においてそれらを欠損する遺伝子改変マウスを用いて、現在、免疫応答等の解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 7 件 )

Moutai, T., Yamana, H., Nojima, T., Kitamura, D. A novel and effective cancer immunotherapy mouse model using antigen-specific B cells selected *in vitro*. *PLoS One* 9: e92732, 2014. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0092732

Mizuta R, Araki S, Furukawa M, Furukawa Y, Ebara S, Shiokawa D, Hayashi K, Tanuma S, Kitamura D. DNase Is the Effector Endonuclease for Internucleosomal DNA Fragmentation in Necrosis. *PLoS One* 8: e80223, 2013. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0080223

Caganova, M., Carrisi, C., Varano, G., Mainoldi, F., Zanardi, F., Germain, P.L., George, L., Alberghini, F., Ferrarini, L., Talukder, A.K., Ponzoni, M., Testa, G., Nojima, T., Doglioni, C., Kitamura, D., Toellner, K.M., Su, I.H., Casola, S. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* 123: 5009-5022, 2013. 査読有 DOI: 10.1172/JCI70626

Kawano, Y., Ouchida, R., Wang, J.Y., Yoshikawa, S., Yamamoto, M., Kitamura, D., Karasuyama, H. A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosomal-associated protein transmembrane 5. *Mol. Cell. Biol.* 32: 4462-4471, 2012. 査読有 DOI: 10.1128/MCB.00531-12

Hidano, S., Kitamura, D., Kumar, L., Geha, R.S., Goitsuka, R.: SLP-76 is required for high-affinity IgE receptor- and IL-3 receptor-mediated activation of basophils. *Int. Immunol.* 24: 719-727, 2012. 査読有 DOI: 10.1093/intimm/dxs072

Ozaki, N., Suzuki, S., Ishida, M., Harada, Y., Tanaka, K., Sato, Y., Kono, T., Kubo, M., Kitamura, D., Encinas, J., Hara, H. Yoshida, H.: Syk-dependent signaling pathways in neutrophils and macrophages are indispensable in the pathogenesis of anti-collagen antibody-induced arthritis. *Int. Immunol.* 24: 539-550, 2012. 査読有 DOI: 10.1093/intimm/dxs078

Sakamoto, S., Wakae, K., Anzai, Y., Murai, K., Tamaki, N., Miyazaki, M., Miyazaki, K., Romanow, W. J., Ikawa, T., Kitamura, D., Yanagihara, I., Minato, N., Murre, C. Agata, Y.: E2A and CBP/p300 act in synergy to promote chromatin accessibility of the immunoglobulin locus. *J. Immunol.* 188: 5547-5560, 2012. 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1002346

[ 学会発表 ] ( 計 24 件 )

Daisuke Kitamura: Molecular requirements for memory B-cell development. 第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ、2013年12月13日.

Daisuke Kitamura, Kei Haniuda, Saori Fukao, Mika Inada, Shu Horiuchi, Shogo Takatsuka, Tatsuya Moutai, Takuya Nojima: Molecular mechanisms for memory B-cell development and function. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy, August 22-27, 2013.

Daisuke Kitamura: Regulatory mechanisms for memory B cell development and function. The 1st Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum. "Immunological Memory and Vaccine" 東京、2013年1月29日.

Daisuke Kitamura: A new cancer therapy using induced germinal center B cells. The 3rd Workshop of Synthetic Immunology, 京都、2012年5月18日.

[ 図書 ] ( 計 2 件 )

北村 大介、他多数: 岩波生物学辞典 第5版  
岩波書店 2013年 2192頁

北村 大介、他多数: 分子細胞生物学事典  
医学評論社 2013年 580頁 (pp306-326)

## 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