

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460590

研究課題名(和文)濾胞樹状細胞に依存して発生する新規な単球系細胞による胚中心B細胞活性化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating the activation mechanisms of germinal center B cell induced by monocytic cells depending on follicular dendritic cells.

研究代表者

曲 正樹 (Magari, Masaki)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：50359882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞樹状細胞(FDC)は、胚中心反応において重要な役割を担う。我々は、マウスFDC株が新規な単球系細胞(FDMC)の分化を誘導することを発見した。本課題では、FDMCの分化機構および免疫学的役割について検討した。まず、FDMCの分化にはFL-Yが産生するIL-34がCSF-1Rに作用することが重要であった。さらに、FDMCは、抗CD40抗体で刺激したB細胞の増殖および胚中心マーカーの発現を著しく促進し、抗体遺伝子への高頻度突然変異を誘発した。最後に、生体内において、FDMC様の単球系細胞を同定した。これらの結果は、FDCから産生されるIL-34とFDMCが胚中心反応に関与する可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Follicular dendritic cells (FDCs) play a critical role for germinal center (GC) reactions. We found that a novel class of monocytic cells, named as FDMC, during the analysis of a mouse FDC line, FL-Y. In this study, we examined the mechanisms underlying FDMC differentiation and its immunological functions. As a result, I found that CSF-1R signaling was necessary to FDMC differentiation, which was triggered by IL-34 produced from FL-Y. In immunological functions of FDMC, FDMC significantly enhanced the cell division and the expression of GC-markers on anti-CD40-stimulated B cells in vitro. Furthermore, FDMC induced somatic hypermutation at immunoglobulin variable gene in anti-CD40-stimulated B cells. Finally, I detected FDMC-like cells in the spleen of immunized mice. These results suggest that IL-34 and FDMC might be involved in GC reactions in vivo.

研究分野：細胞工学、免疫学

キーワード：濾胞樹状細胞 胚中心 IL-34 CSF-1

1. 研究開始当初の背景

生体内に病原体（抗原）が侵入した際、リンパ球の一種であるB細胞より産生される抗体は、病原体の排除において重要な役割を果たす。抗原により刺激を受けたB細胞は最終的に抗体産生細胞へと分化するが、その過程で一部のB細胞はリンパ節内で活発に増殖し、胚中心と呼ばれる微小環境を構築する。胚中心は、主にB細胞、濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)そして濾胞樹状細胞(FDC)により構成される。胚中心では、その三者の細胞間相互作用により、B細胞の抗体分子の多様化と、抗体の抗原に対する親和性に基づくクローン選択により、抗体の親和性成熟が進行すると考えられている。しかし、B細胞の抗体の多様化の誘導や高親和性クローンの選択に関する機構など、胚中心での反応には不明な点が多く存在する。その原因の一つとして、胚中心の形成およびクローン選択に重要であるとされるFDCが体内に少数しか存在せず、さらにはFDCの安定な単離、維持が困難であり、*in vitro*での解析が不可能であったことが挙げられる。これらの問題を解決すべく、申請者らは独自の手法を用いてマウスFDC株(FL-Y)を樹立した。

さらに、FL-Yを用いた研究成果として、FL-Yが、脾臓中の非リンパ球系細胞にも作用し、胚中心B細胞の表現系をもつ細胞の分化と細胞分裂を著しく促進する能力をもつ新規な単球系細胞(FDMC: FDC-induced monocytic cell)を誘導することを発見した。

2. 研究の目的

本研究では、FDCにより誘導される単球系細胞(FDMC)のB細胞に与える作用を明らかにし、胚中心の形成および親和性成熟機構への関与について解明する。そのため、主に以下の3点について検討する。

(1) *in vitro* 培養系を用いる FDMC の胚中心 B 細胞の分化促進についての解析

FDMCにより活性化された胚中心B細胞の性質について検討する。特に、胚中心B細胞で誘発される抗体遺伝子への高頻度突然変異の誘発能力について検討する。

(2) FDMC 分化誘導因子の解析

FL-Yにより誘導されるFDMCの分化機構を明らかとする。そのため、*in vitro*のFDMC誘導系を利用し、誘導因子の同定およびその作用メカニズムの解明を行う。

(3) *in vivo* における FDMC の同定と機能解析

*in vivo*において、FDMCの存在および胚中心反応への関与について検討する。FDMCの細胞表面マーカーを指標とし、*in vivo*での免疫に伴うFDMC様細胞の細胞数の変化および免疫学的機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 培養系を用いる FDMC の胚中心 B 細胞の分化促進についての解析

FDMCにより活性化されたB細胞の細胞内の変化を詳細に検討するため、FDMCによって活性化されたB細胞での転写因子等の遺伝子発現パターンを解析した。

T細胞とB細胞を除去した脾臓細胞をFL-Y上で9日間培養しFDMCを誘導する。誘導したCD11b陽性FDMCをセルソーターを用いて単離した。本研究課題で用いるFDMCは、すべてこのスケジュールにより調整した。FDMCのB細胞への作用を検討するため、非免疫マウスの脾臓より調整したB細胞をCFSEで標識し、単離したFDMCと4日間共培養した。その後、活性化B細胞からmRNAを抽出し、胚中心で高発現することが知られている転写因子(BCL6, IRF4, IRF8)および胚中心反応に関わる因子(AID)の発現をRT-PCR法を用いて評価した。また、抗体可変部遺伝子配列をクローニングし、シーケンス解析により変異導入の有無について検討した。

(2) FDMC 分化誘導因子の解析

FDMC誘導因子を同定するため、単球の増殖因子およびその受容体に対する中和抗体を用いて、FDMC誘導効率を比較した。さらに、中和抗体で効果の見られたIL-34およびCSF-1に対するノックダウンベクターをFL-Yにトランスフェクションし、各ノックダウン株を作製した。作製したFL-Yノックダウン株を用いて、FDMCの誘導効率を比較した。

(3) *in vivo* における FDMC の同定と機能解析

BALB/cマウスにTNP-KLHを免疫し、12日後に脾臓を摘出し、細胞懸濁液を調整した。その後、FDMCに特徴的な表面抗原に対する抗体を用いて多重染色し、フローサイトメーターを用いて、免疫に伴うFDMCの出現について検討した。さらに、FDMCの表面マーカーを持つ細胞集団をセルソーターを用いて単離し、*in vitro*の培養系を用いて胚中心B細胞への分化誘導能力について検討した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 培養系を用いる FDMC の胚中心 B 細胞の分化促進についての解析

抗CD40抗体で刺激したB細胞をFDMCと共培養すると、GL-7/Fas陽性胚中心B細胞の割合が増加していた。さらに、FDMCとの共培養により、細胞分裂の指標であるCFSE^{low}の細胞集団が増加していた。また、FDMCにより活性化したB細胞において胚中心で発現がみられるAIDやBCL6の発現が見られた。さらに、FDMCとの共培養条件下において、B細胞の抗体遺伝子への変

異が認められ、この変異導入頻度は、抗原刺激条件を加えることにより増加していた。

(2) FDMC 分化誘導因子の解析

FDMC の誘導系に抗 CSF-1R 抗体を添加すると FDMC 誘導効率が有意に減少した。一方で CSF-1R のリガンドである CSF-1 に対する中和抗体は FDMC の誘導効率に影響しなかったが、他のリガンド IL-34 に対する中和抗体の添加により FDMC の誘導が抑制された。さらに、IL-34 ノックダウン FL-Y 株を作製し、FDMC の誘導効率を検討した結果、IL-34 ノックダウン FL-Y において、FDMC 誘導能力が低下していた。これらの結果は、FDMC 誘導には FL-Y の産生する IL-34 が FDMC 前駆細胞上に発現する CSF-1R に作用することが重要であることを示す。

(3) *in vivo* における FDMC の同定と機能解析

TNP-KLH を免疫した BALB/c マウスから脾臓細胞懸濁液を調整し、FDMC に特徴的な表面抗原に対する抗体を用いて多重染色し、FDMC の出現について検討した。その結果、FDMC の表面マーカーを持つ細胞集団 (CD11b⁺CXCR4⁺CD11b⁺MHCII⁺) が免疫に伴い増加していた。次に、FDMC 様細胞をセルソーターを用いて単離し、*in vitro* の培養系を用いて胚中心 B 細胞への分化誘導能力について検討したところ、*in vitro* において FL-Y 上で誘導された FDMC と同様に、B 細胞の活性化能力を保持していた。これらの結果は、FDMC の胚中心反応への関与を示唆する。

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3件)

金山直樹、曲正樹

AID による免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異誘導と関連分子

臨床免疫・アレルギー科 61: 467-471 (2014) (査読無)

曲正樹、金山直樹

免疫グロブリン突然変異と serine/arginine-rich protein splicing factor (SRSF)

臨床免疫・アレルギー科 61: 489-495 (2014) (査読無)

Yamane, F., Nishikawa, Y., Matsui, K., Asakura, M., Iwasaki, E., Watanabe, K., Tanimoto, H., Sano, H., Fujiwara, Y., Stanley, ER., Kanayama, N., Mabbott, NA., Magari, M., Ohmori, H.,

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., 95: 19-31 (2014) doi:

10.1189/jlb.0613311. (査読有)

[学会発表](計10件)

小川紗也香、山根文寛、松井一恵、稗田健太郎、西川裕美子、金山直樹、徳光浩、大森 斉、曲正樹、濾胞樹状細胞依存的な発生する新規単球系細胞の分化機構の解明; CSF-1R に作用する IL-34 特異的作用の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.2. (神戸)

曲正樹、鳥家雄二、長尾峻久、小川紗也香、稗田健太郎、岩崎映理子、西川裕美子、金山直樹、徳光浩、大森 斉、濾胞樹状細胞依存的に誘導される単球系細胞により活性化された B 細胞の機能解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.2. (神戸)

成木弘明、川口祐加、宮崎誠士、河本奈緒子、横山和輝、徳光浩、曲正樹、金山直樹、ニワトリ SRSF1-3 の抗体遺伝子変異における機能部位の探索、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.2. (神戸) 横山和輝、川口祐加、松山雄磨、河本奈緒子、成木弘明、徳光浩、曲正樹、金山直樹、過剰発現させた RNaseH1 は核外へ隔離される、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.2. (神戸)

KAWAGUCHI Yuka, KAWAMOTO Naoko, MIYAZAKI Satoshi, NARIKI Hiroaki, YOKOYAMA Kazuki, TOKUMITSU Hiroshi, MAGARI Masaki, KANAYAMA Naoki, SRSF1-3 promotes nuclear localization of AID by inhibiting nuclear export of AID. 第 44 回日本免疫学会、2015.11.20. (札幌)

MAGARI Masaki, OGAWA Sayaka, TOYA Yuji, HIEDA Kentaro, YAMANE Fumihiko, MATSUI Kazue, NISHIKAWA Yumiko, KANAYAMA Naoki, TOKUMITSU Hiroshi, OHMORI Hitoshi, IL-34/CSF-1R-dependent generation of a novel class of monocytic cells with unique B cell-stimulating activities. 第 44 回日本免疫学会、2015.11.20. (札幌)

小川紗也香、山根文寛、松井一恵、鳥家雄二、西川裕美子、徳光浩、金山直樹、大森 斉、曲正樹、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年会、2014.11.25. (横浜)

鳥家雄二、長尾峻久、小川紗也香、岩崎映理子、松井一恵、西川裕美子、金山直樹、徳光浩、大森 斉、曲正樹、濾胞樹状細胞依存的に発生する新規単球系細胞による胚中心 B 細胞の活性化第 37 回日本分子生物学会年会、2014.11.26. (横浜) Yamane, F., Matsui, K., Tanimoto, H., Iwasaki, E., Asakura, M., Tokumitsu, H., Nishikawa, Y., Kanayama, N., Magari, M.,

Ohmori, H., Follicular dendritic cells induce a new class of myeloid cells with B cell stimulating activities: specific dependence on IL-34/CSF-1R signaling pathway. The 15th International Congress of Immunology. 2013. 8 (Milano, Italy)

Kanayama, N., Kanehiro, Y., Todo, K., Kawaguchi, Y., Miyazaki, S., Watanabe, K., Tokumitsu, H., Manley, J.L., Magari, M., Ohmori, H., AID-dependent IgV hypermutation requires a splice isoform of the SR protein SRSF1. The 15th International Congress of Immunology. 2013. 8 (Milano, Italy)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：50359882

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：