

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07238

研究課題名(和文) B細胞における抗体産生バランス制御機構

研究課題名(英文) The regulatory mechanism of antibody production

研究代表者

深尾 紗央里 (Fukao, Saori)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・研究員

研究者番号：20778914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答において濾胞ヘルパーT (Tfh) 細胞は様々なサイトカインを産生することで、B細胞によるIgGやIgEなどの抗体産生の種類を決定する。一方でTfh細胞の適切な分化にはB細胞との相互作用による様々な刺激が必須であることが明らかになっているが、IFN、IL-4、TGF、IL-21など、特有のサイトカインを産生するTfh細胞サブセットの決定にB細胞がどのような寄与をするかは十分に理解されていない。本申請では“B細胞とTfh細胞の相互作用の質が、Tfh細胞のサブセットを制御し、抗体産生のバランスを制御する”という仮説に基づき、B細胞によるTfh細胞の制御機構を解析した。

研究成果の概要(英文)：Follicular helper T (Tfh) cells produce various cytokines and regulate the isotype of antibody produced by B cells in the immune response. It is well known that various stimuli provided from B cells during T and B cells interaction are necessary for optimal Tfh cells differentiation. However, the mechanisms that control the subset of Tfh cell producing specific cytokine, IFN, IL-4 or IL-21 have not been fully understood.

In this study, we hypothesized that the quality of T and B cells interaction regulates the differentiation of each Tfh cell subsets and control the isotype of antibody, and then analyzed the role of B cells in the regulation of T cells differentiation.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞

1. 研究開始当初の背景

〔Tfh 細胞による抗体産生の制御〕

Tfh 細胞は PD-1 や CXCR5 を高発現し、B 細胞の活性化に特化した機能を持つ T 細胞として、近年精力的に研究されている。免疫応答の様々な過程において、B 細胞は主に Tfh 細胞と相互作用することで CD40L や様々なサイトカイン刺激を受け取り、IgG や IgE へのクラススイッチを起こしたり、胚中心を形成して抗体遺伝子の親和性成熟をさせたり、形質細胞へと分化して抗体を産生したりする。Tfh 細胞の中には IFN γ 、IL-4、IL-17 を産生する Th1、Th2、Th17 タイプのものがあり、それぞれ異なるアイソタイプの抗体産生に寄与している (Science 2013, 341:1205)。また Tfh 細胞には IL-21 を産生するものもあり、IL-21 は種々の IgG サブクラス (特に高親和性の IgG1 など) の産生を促進するが、IgE 産生に関しては抑制的に制御する (Science 2002, 298:1630; JEM 2010, 207:365)。一方で IL-4 や IL-5、IL-13 の産生が低下する IRF3 欠損マウスでは IgG1 の産生量は変わらないが、IgE の産生のみが減少する (Nat. Med, 2011, 17:996)。従って Tfh 細胞サブセットの組成が B 細胞の抗体産生のアイソタイプの決定や抗原親和性の成熟に重要である。

〔Tfh 細胞の分化および機能における B 細胞の役割〕

免疫応答において naïve T 細胞は樹状細胞から抗原提示を受けて活性化し、pre-Tfh 細胞へと分化する。pre-Tfh 細胞は CXCR5 を発現することで、T 細胞領域と B 細胞領域の境界に移動し、B 細胞と相互作用することで転写因子 Bcl6 を高発現して、Tfh 細胞へと分化する。こうしてできた Tfh 細胞は胚中心内の明領域において胚中心 B 細胞と相互作用し、胚中心における B 細胞の増殖維持および抗体遺伝子の親和性成熟、形質細胞や記憶 B 細胞への分化を誘導する。一方で、抗原の二次免疫時においては、記憶 T 細胞は樹状細胞ではなく、主に記憶 B 細胞から刺激を受けることで Tfh 細胞へと分化して、記憶 B 細胞の抗体産生を促進させる (PNAS 2014, 111:11792)。従って naïve T 細胞の活性化には樹状細胞が必須だが、その後の胚中心応答や記憶応答における Tfh 細胞の分化・活性化には B 細胞との相互作用が主要な役割を果たすことが明らかになっている。

Tfh 細胞分化には B 細胞による抗原提示を介した TCR 刺激や SLAM、ICOS などの刺激が重要である。一方で SLAM-SAP signal は IL-4 や IL-13 産生を促進する機能を持つこと (Immunity 2007, 27:698) や、ICOS は c-Maf を介して IL-21 の産生を誘導すること (Nat Immunol 2009, 10:167) が報告されている。また B 細胞も IL-4 や IL-6 などのサイトカインを産生する能力を持つ (J Immunol 2005, 175:7103; JEM 2012, 209:1001)。従ってこれら

の知見から、胚中心や記憶応答における Tfh 細胞サブセットの組成を B 細胞が制御する可能性は十分に考えられるが、過去の報告においてこのような可能性は検討されていない。

〔B 細胞による免疫応答制御機構〕

申請者らはプロテインキナーゼ C δ (PKC δ) を B 細胞特異的に欠失させたマウスにおいて、T 細胞依存性免疫応答における IgG1 (特に高親和性のもの) および IgG3 の産生が亢進し、IgE 産生が著しく低下することを見出した。さらに野生型 B 細胞と PKC δ 欠損 B 細胞を混ぜて別のマウスに移入して免疫すると、PKC δ 欠損 B 細胞だけでなく、野生型 B 細胞においても IgE 型の細胞が減少することが明らかになった。一方、*in vitro* では PKC δ 欠損 B 細胞は野生型と同程度に IgG と IgE を産生した。従って PKC δ 欠損 B 細胞は IgG や IgE 産生を正常に産生する能力を持つが、生体内では他の細胞に影響を与えることで、IgG の産生を促進し、IgE の産生を抑制していると考えられる。過去の報告において PKC δ 欠損 B 細胞は anti-IgM および anti-CD40 で刺激すると IL-6 を多く産生することが示されており (Nature 2002, 416:865)、IL-6 は T 細胞の IL-21 産生を促進する機能をもつ (JEM 2009, 206:69)。このことから、申請者は、PKC δ を介したシグナルが B 細胞の活性化時に共刺激分子やサイトカインの発現変化を誘導し、その発現変化が、Tfh 細胞との相互作用の際に Tfh 細胞の Th2 サイトカイン産生の促進および Th1 サイトカイン・IL-21 産生の抑制を誘導し、その結果 IgE 産生の誘導や IgG1・IgG3 産生を抑制する、と予想した。

2. 研究の目的

本申請では“B 細胞と Tfh 細胞の相互作用の質が、Tfh 細胞サブセットの分化を制御し、その結果として抗体産生のバランスに影響を与える”という仮説に基づき、PKC δ 欠損マウスを利用して、B 細胞がどのような刺激によって、どのような分子の発現を変化させることで、Tfh 細胞の Th1/Th2 サイトカインや IL-21 産生バランスを制御するかを明らかにしたい。さらにアレルギー性気道炎や SLE のモデルを用いて、T 細胞の Th1/Th2 バランスの変化に伴う病態形成において、B 細胞がどのような寄与をするかを示したい。

3. 研究の方法

〔Tfh 細胞のサブセット制御における B 細胞の役割〕

B 細胞特異的に PKC δ を欠損するマウスでは Tfh 細胞における Th1 サイトカインや IL-21 産生細胞の割合が増加し、Th2 サイトカイン産生細胞の割合が減少していると予想される。野生型および PKC δ 欠損 B 細胞が Tfh 細胞サブセットの組成をどのように変化させるかを明らかにするために、B 細胞のみで

PKC δ を欠損する骨髓キメラマウスと対照マウスに OVA 特異的な TCR を持つ OT-II トランスジェニック (Tg) マウスの CD4 T 細胞を移入して NP-OVA で免疫し、donor 由来の抗原特異的な Tfh 細胞 (CXCR5⁺ PD1⁺) における IFN γ 、IL-4、IL-21 などのサイトカイン産生を Real time PCR 法によって比較する。

〔B 細胞における Tfh 細胞サブセット制御因子の同定〕

B 細胞がどのような分子を介して Tfh 細胞における IFN γ 、IL-4、IL-21 産生サブセットの分化制御をするか明らかにしたい。PKC δ 欠損マウスの B 細胞では、IFN γ 、IL-21 産生を促進する分子の発現が亢進し、IL-4 産生を促進する分子の発現が低下していると予想される。そこで野生型および PKC δ 欠損マウスの抗原特異的な胚中心 B 細胞と記憶 B 細胞を単離し、RNA シーケンスによって遺伝子発現を比較する。前述したように B 細胞は SLAM や ICOS などの共刺激分子やサイトカインの産生を介して Tfh 細胞を制御すると予想される。そこで RNA シーケンスの結果から、野生型と PKC δ 欠損 B 細胞で発現差のある膜分子やサイトカインを抽出し、Tfh 細胞サブセット制御因子の候補とする。

次に各候補因子をレトロウイルスを用いて B 細胞に過剰発現させ、マウスに移入して免疫し、Tfh 細胞サブセット分化への影響を解析する。PKC δ 欠損 B 細胞で発現低下していた分子のうち、PKC δ 欠損 B 細胞に導入した際に IL-4 を増加させる分子、および PKC δ 欠損 B 細胞で発現上昇していた分子のうち、野生型 B 細胞に発現させた際に IFN γ や IL-21 産生細胞が増加させる分子を同定する。さらに同定した分子を野生型 B 細胞でノックダウンして同様の解析を行い、IFN γ 、IL-4、IL-21 産生を低下させるかどうか確認する。

〔B 細胞において Tfh 細胞サブセット制御因子の発現を誘導するシグナル経路の同定〕

上記で同定した各 Tfh 細胞サブセット制御因子の発現が、B 細胞においてどのような刺激によって PKC δ を介したどのようなシグナル経路によって制御されるのかを明らかにしたい。そこで *in vitro* で B 細胞に PMA や anti-IgM、anti-CD40 などの様々な刺激を加えて培養し、上記で同定した Tfh 細胞制御因子の発現を誘導する刺激を明らかにする。さらに同定した刺激条件で、野生型および PKC δ 欠損 B 細胞を培養した際に、どのようなシグナル経路の活性に差があるかを明らかにする。これによって差が見られたシグナル経路の阻害剤を添加して野生型 B 細胞を培養し、上記で同定した Tfh 細胞制御因子の発現が抑制されるかどうか解析する。

4. 研究成果

〔PKC δ 欠損マウスにおける制御性 B 細胞の

解析〕

過去の報告において IL-10 が IgE 産生を抑制することが明らかになっている。また制御性 B 細胞の一部が IL-10 を産生することが報告されている。そこで申請者は PKC δ 欠損 B 細胞が IL-10 産生性の制御性 B 細胞に分化しやすいために IgE 産生が抑制されているのではないかと予想した。そこで PKC δ 欠損 B 細胞を PMA およびイオノマイシンで刺激し、フローサイトメトリーによって解析したところ、PKC δ 欠損 B 細胞中には野生型 B 細胞と比較して多くの IL-10 産生細胞が含まれていることが明らかになった。さらに NP 特異的な V 重鎖可変領域をノックインした PKC δ 欠損マウス (PKC δ 欠損 B1-8 ノックインマウス) において IL-10 産生細胞の割合が減少したことから、PKC δ 欠損マウスでは何らかの抗原特異的に IL-10 産生細胞が誘導されている可能性が示唆された。

〔Tfh 細胞のサブセット制御における B 細胞の役割〕

B 細胞のみで PKC δ を欠損する骨髓キメラマウスと対照マウスに OT-II Tg マウスの CD4 T 細胞を移入して NP-OVA で免疫し、donor 由来の抗原特異的な Tfh 細胞の割合を解析したところ、B 細胞特異的に PKC δ を欠失するマウスでは Tfh 細胞の割合が少し増加していた。さらに donor 由来の Tfh 細胞を単離して Real time PCR 法によって遺伝子発現を比較した。予想に反して PKC δ 欠損キメラマウスから単離した Tfh 細胞では IL-4 および IL-21 の発現が亢進していた。以上の結果から PKC δ 欠損 B 細胞は Tfh 細胞のサブセットではなく、T 細胞の活性化を広く制御する可能性が示唆された。

〔制御性 T 細胞の解析〕

当初の予想に反して Tfh 細胞のサブセットに変化が見られなかったことから、申請者らは次に制御性 T 細胞に着目した。制御性 T 細胞が欠損するマウスでは IgE 産生が亢進することが知られている。そこで申請者らは B 細胞のみで PKC δ を欠損するマウスにおける制御性 T 細胞の数および活性化をフローサイトメトリーによって解析した。その結果、申請者らは PKC δ 欠損マウスにおいて制御性 T 細胞の割合は同程度であるものの、活性化マーカーの発現が亢進していることが明らかになった。従って B 細胞によって制御性 T 細胞の活性化が制御される可能性が示唆された。

〔PKC δ 欠損マウスにおける T 細胞非依存性免疫応答〕

PKC δ 欠損 B 細胞が T 細胞に非依存的な抗体産生にも影響を与えるのか検討するために、B 細胞特異的に PKC δ を欠失するマウスに型 T 細胞非依存性抗原である NP-Ficoll を投与し、抗原特異的な抗体産生を解析した。興味深いことに T 細胞依存性非免疫応答にお

いて B 細胞特異的に PKC δ を欠失するマウスでは IgM の産生が亢進し、IgG2 ならびに IgG3 の産生が低下していた。このことから PKC δ 欠損 B 細胞が T 細胞を介さない免疫応答にも影響を与える可能性が示唆された。

上記の結果から申請者らは B 細胞特異的に PKC δ を欠損したマウスにおいて制御性 B 細胞および制御性 T 細胞の活性化が促進し、T 細胞依存性免疫応答における IgE 産生や T 細胞非依存性免疫応答における IgG2, IgG3 産生が抑制されることを見出した。

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)

Haniuda, K., Fukao, S., Kodama, T.,

Hasegawa, H. and Kitamura, D.

Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. *Nature Immunology* 17: 1109-1117, 2016. 査読有

羽生田圭、深尾紗央里、北村大介: 膜型

IgE の自発的シグナル伝達による B 細胞記憶形成の制御. 臨床免疫・アレルギー

一科 65 (4): 329-333 2016 年、査読無

羽生田圭、深尾紗央里、北村大介: 膜型

IgE 産生の制御機構. 臨床免疫・アレルギー

一科 67 (5): 506-512 2017 年、査読無

[学会発表](計 4 件)

Kei Haniuda, Saori Fukao, Tadahiro

Kodama, Hitoshi Hasegawa, Daisuke

Kitamura. Molecular mechanisms for

prevention of IgE-memory formation by

membrane IgE. 第 45 回日本免疫学会学

術集会、2016 年 12 月

Saori Fukao, Kei Haniuda, Hiroki Sasanuma,

Nobuaki Yoshida, Daisuke Kitamura.

Regulation of IgE production by an RNA

binding protein. 第46回日本免疫学会学術

集会、2017年 12月

Kei Haniuda, Saori Fukao, Daisuke

Kitamura. Germinal center B cell development by glycolysis and mitochondrial metabolism. 第46回日本免疫学会学術集会、2017年 12月

HANIUDA Kei, FUKAO Saori,

KITAMURA Daisuke. Molecular

mechanisms for prevention of IgE-memory formation by membrane IgE. 19th

International Conference on Lymphatic

Tissues and Germinal Centers in Immune

Reactions, 2017年 9月

[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

<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~ribsjm/kitamuralab/indexj.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

深尾 紗央里 (FUKAO Saori)

東京理科大学・研究推進機構

生命医科学研究所・ポスドクトラル研究員

研究者番号: 20778914

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者