

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04852

研究課題名(和文) 生体内の抗体の親和性成熟機構を再現する細胞培養システムの開発

研究課題名(英文) Establishment of cell culture system to reproduce affinity maturation of antibody

研究代表者

曲 正樹 (Magari, Masaki)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学研究科・助教

研究者番号：50359882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗体の親和性成熟は、抗体の抗原への結合能力を向上させる機構であり、B細胞抗体遺伝子への変異導入(SHM)による抗体の多様化と抗親和性抗体産生細胞のクローン選択により達成される。本課題において、抗体の親和性成熟を制御する可能性を持つ単球系細胞のB細胞に与える作用機構を解析した。FDMCは、活性化B細胞の抗体遺伝子に体細胞突然変異を誘導するとともにアポトーシスを誘導した。このFDMCにより誘導されたアポトーシスは、アポトーシス因子Bimをロックアウトすることにより部分的に抑制された。さらに、FDMCにより産生される可溶性因子がB細胞の活性化に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体の親和性成熟機構は、免疫能力を高めるために重要な免疫反応であることが知られている。そのため、抗体の親和性成熟機構の解明は効果的な免疫能力を誘導できるワクチンの開発や免疫賦活剤の開発につながると考えられる。また、その高い効果から近年注目されている抗体医薬の開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Affinity maturation is the process to improve antibody affinity for an antigen, which is mediated by somatic hypermutation (SHM) of immunoglobulin (Ig) genes and clonal selection of high-affinity B cells. In this study, we examined whether a novel type of monocytic cell (FDMC) was involved in affinity maturation of antibody. Firstly, we revealed that FDMC induced not only somatic hypermutation at Ig gene but also apoptosis in cultured B cells. We also observed the reduced number of apoptotic cell in Bim-deficient B cells compared with that in wild-type B cells, when B cells were cultured with FDMC. Furthermore, the ability of B cell activation was observed in cultured medium of FDMCs, suggesting that B cell activation was promoted by soluble factor(s) secreted by FDMC.

研究分野：免疫学，細胞工学

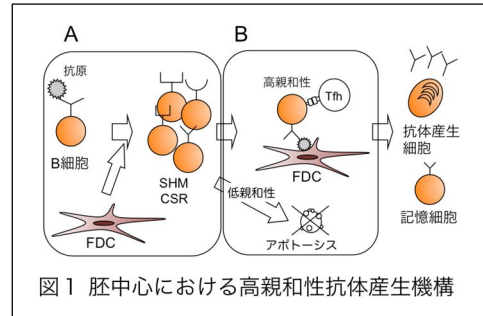
キーワード：抗体の親和性成熟 胚中心 濾胞樹状細胞 B細胞

1. 研究開始当初の背景

B 細胞より産生される抗体は、生体内に侵入した病原体 (抗原) の排除に重要な役割を担う。抗原を認識した B 細胞は、リンパ組織内において、濾胞樹状細胞 (FDC) や濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh) から産生される IL-4/IL-21 などからの刺激を受け、胚中心と呼ばれる微小構造を形成する。胚中心では、体細胞突然変異 (SHM) とクラススイッチ (CSR) による抗体の多様化と高親和性抗体産生細胞の選択により、抗体の抗原結合力の向上が達成される (抗体の親和性成熟)。また、二次免疫応答で活躍する記憶 B 細胞も胚中心で生成される (図 1)。しかし、どのような刺激を受けた B 細胞が胚中心を形成した後に SHM や CSR を導入するかを含め、胚中心反応の制御機構は不明である。その原因の一つとして、B 細胞に SHM を誘導し抗体の多様化プロセスを再現できる細胞培養系が存在しないことが挙げられる。

FDC は、一連の胚中心反応を制御する中心的な細胞であり、抗体の親和性成熟機構の鍵となる細胞である。しかし、FDC が体内に少数しか存在せず単離が困難であることや、FDC を維持する方法がないことなどから、その生理機能については不明な点が多い。そのため、FDC の機能解明は、抗体の親和性成熟機構の全容を明らかにするために必須の研究課題となっている。そこで、FDC の免疫学的機能の解析を中心とし、細胞および分子レベル、さらには個体レベルにおいて胚中心での B 細胞応答の解明を進めてきた。まず、これまでに世界に先駆けマウスのリンパ節より FDC 株、FL-Y を樹立した。FL-Y は、胚中心 B 細胞の生存・維持を促進するなど生体内の FDC の特徴を非常に良く再現する細胞株であり、新たな胚中心内での B 細胞の応答についての発見へと繋がっている。

その中での特筆すべき発見は、FDC が、胚中心 B 細胞の分化・増殖を著しく促進する単球系細胞 (FDC-induced monocytic cell (FDMC) と命名) の分化を誘導したことである。さらに驚くべきことに、FDMC により刺激された B 細胞は、生体内の胚中心 B 細胞と比較し頻度は低いが、抗体遺伝子に SHM を導入した。これらの発見は、FDMC を利用することにより、細胞培養系を用いて、B 細胞にこれまで実現不可能であった抗体の多様化プロセスを誘導できる可能性を示す。



2. 研究の目的

FDMC により刺激された B 細胞は、体内の胚中心 B 細胞と同様に細胞死が誘導されやすいため正確な SHM 導入頻度を評価できない。また、現状では長期間培養することができず抗体の多様化プロセスを再現することができない。

そこで本課題では、FDMC によって誘導される B 細胞死を回避する培養条件を探索し SHM 誘導能力を正確に評価する。さらに、B 細胞の SHM 頻度を向上させる因子を探索し、生体内と同等の抗体の多様化効率を実現できる細胞培養系を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) FDMC の誘導

Balb/c マウスから脾臓を摘出し、赤血球、付着性細胞、および T 細胞を除去した脾臓細胞懸濁液を調整した。調整した脾臓細胞を FL-Y 細胞上で 9~12 日間培養し、FDMC を分化誘導した。CD11b の発現を指標とし、フローサイトメーターを用いて FDMC の分化誘導効率を評価したのち、FDMC のみをセルソーターを用いて単離した。

(2) B 細胞と FDMC の共培養

Balb/c もしくは Bim ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を蛍光色素 CFSE で標識したのち、単離した FDMC と 2~4 日間共培養した。その際、T 細胞からの補助刺激を模倣するため、抗 CD40 抗体で刺激した。また、B 細胞に対する抗原刺激を模倣するため抗 IgM 抗体も添加した。トランスウエルを用いた培養実験では、上のチャンバーに Balb/c マウス由来の B 細胞を下のチャンバーに FDMC を配置し、直接的な接触がない条件で B 細胞を刺激培養した。培養 3~5 日後に細胞を回収し、胚中心様 B 細胞 (GL-7⁺Fas⁺) およびアポトーシス細胞 (Annexin V⁺) の割合をフローサイトメーターを用いて評価した。

(3) 抗体遺伝子の変異解析

B 細胞を刺激培養した後、CFSE の蛍光強度の減衰を指標とし分裂した B 細胞をセルソーターにより単離し、mRNA を抽出した。その後、抗体重鎖可変部遺伝子を RT-PCR により増幅したのちにクローニングし、塩基配列を決定した。

(4) FDMC により特徴的に高発現する遺伝子の qPCR 解析

マイクロアレイによる FDMC の網羅的遺伝子発現解析により、特徴的に高発現する遺伝子を選別した。その後、可溶性タンパク質のみを抽出し、B 細胞活性化因子の候補分子とした。FL-Y 細胞上で誘導した FDMC の mRNA を抽出し、FDMC において高発現が予想される遺伝子の mRNA 発現量を qRT-PCR により解析した。

(5) リコンビナントタンパク質の発現と活性測定

高発現が確認された遺伝子をクローニングし、B細胞活性化能力を持たないマウス線維芽細胞株(NIH3T3)に遺伝子導入した。導入遺伝子由来のタンパク質発現をウエスタンブロットにより確認した。遺伝子導入した NIH3T3 細胞上で脾臓 B 細胞を 3 日間培養し、B 細胞数を計数することにより、B 細胞活性化能力を評価した。

4. 研究成果

(1) FDMC による B 細胞の活性化

FDMC による胚中心反応の解析を精密に行うために *Bim* 遺伝子を欠損させることが有用であるか検討するため、野生型と *Bim* ノックアウト B 細胞を FDMC と 4 日間共培養した。培養後、B 細胞の分裂回数とアポトーシス細胞数をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、野生型 B 細胞において FDMC 依存的に細胞分裂が促進されるとともに、アポトーシス細胞数が増加した(図 2 AB)。この結果より、FDMC は活発に分裂するとともにアポトーシスが誘導される胚中心様 B 細胞の分化を誘導することが明らかとなった。次に、*Bim* ノックアウト B 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、野生型の B 細胞と比較し FDMC によるアポトーシス細胞の割合の抑制が見られるとともに、回収 B 細胞数も増加していた(図 2B)。これらの結果より、*Bim* 遺伝子を欠損することにより、FDMC による胚中心 B 細胞のアポトーシスを回避できることが示唆された。これらの表現系は、生体内の胚中心反応と類似している。

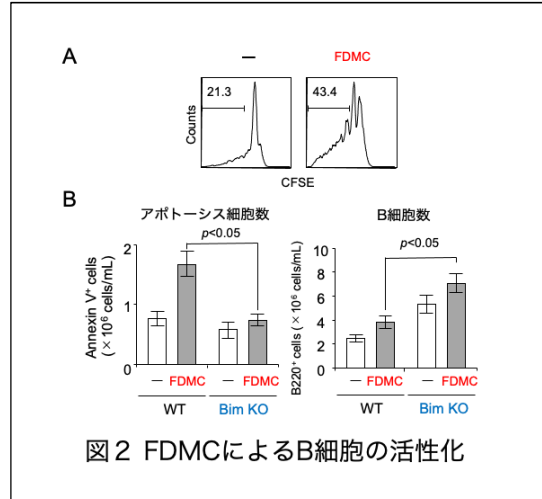


図 2 FDMCによるB細胞の活性化

FDMC による SHM 誘導能力を評価するため、FDMC と共培養した B 細胞の抗体重鎖可変部遺伝子の Jh4 イントロン領域に導入された変異を解析した。分裂回数の違いによる SHM の導入効率について比較したところ、分裂回数が多い集団において、抗体遺伝子への SHM 頻度が増加していた。さらに、分裂回数が多い集団において、野生型 B 細胞と比較して *Bim* ノックアウト B 細胞では FDMC 刺激条件下において SHM 頻度が上昇していた(図 3)。これらの結果より、*Bim* ノックアウト B 細胞を利用することが SHM の誘導系に有用であると考えられる。

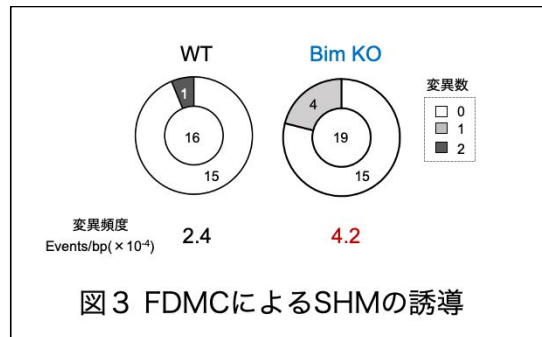


図 3 FDMCによるSHMの誘導

(2) FDMC による B 細胞活性化機構の解明

FDMC の産生する B 細胞活性化因子を同定するため、FDMC の培養上清を回収し、B 細胞刺激活性を評価した。その結果、FDMC の培養上清にも B 細胞の増殖促進活性化が見られた。また、トランスウエルを用いて細胞間接着を阻害した実験においても、B 細胞の分裂促進が認められた。これらの結果より、FDMC による B 細胞活性化は FDMC の産生する可溶性因子が関与すると考えられる。

(3) FDMC の産生する B 細胞活性化因子の同定

FDMC に特徴的に発現する遺伝子を探索するため、網羅的な遺伝子発現解析を行なった。本課題では、様々な細胞と比較し FDMC において特徴的に高発現する遺伝子を絞り込んだ。次に、FDMC に高発現している遺伝子の中で、これまでに細胞外に産生される可溶性因子として報告されている分子 (insulin growth factor-1 (IGF-1) とセリンプロテアーゼ) に注目した。候補分子を 3T3 細胞に発現させ、B 細胞活性化能力を評価したところ、FDMC において高発現が見られる Insulin growth factor-1 (IGF-1) には B 細胞刺激活性が見られなかったが、セリンプロテアーゼ遺伝子導入細胞において B 細胞の分裂促進が見られた。今後、実際にセリンプロテアーゼ遺伝子のコードするタンパク質が B 細胞に直接作用するか検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogawa Sayaka, Matsuoka Yukiko, Takada Miho, Matsui Kazue, Yamane Fumihiko, Kubota Eri, Yasuhara Shiori, Hieda Kentaro, Kanayama Naoki, Hatano Naoya, Tokumitsu Hiroshi, Magari Masaki	4. 巻 294
2. 論文標題 Interleukin 34 (IL-34) cell-surface localization regulated by the molecular chaperone 78-kDa glucose-regulated protein facilitates the differentiation of monocytic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 2386-2396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.006226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曲 正樹、小川紗也香、岡本千怜、西岡美玖、金山直樹、波多野直哉、徳光 浩
2. 発表標題 濾胞樹状細胞依存的分化するB細胞活性化能力を有した単球系細胞の分化機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西岡 美玖、西岡 美穂、小川 紗也香、金山 直樹、波多野 直哉、徳光 浩、曲 正樹
2. 発表標題 濾胞樹状細胞の発現するSLAM-family memberによる胚中心反応の制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曲 正樹、小川紗也香、松岡由希子、高田美帆、金山直樹、波多野直哉、徳光 浩
2. 発表標題 濾胞樹状細胞の発現するIL-34がB細胞活性化能力を有する単球系細胞の分化に関与する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西岡美玖、西岡美穂、小川紗也香、波多野直哉、金山直樹、徳光 浩、曲 正樹
2. 発表標題 濾胞樹状細胞の活性化に伴い高発現する分子の探索とその機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曲 正樹, 小川紗也香, 松岡由希子, 高田美帆, 金山直樹, 徳光 浩
2. 発表標題 濾胞樹状細胞による抗体の親和性成熟の制御機構の解明
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡由希子, 小川紗也香, 安原詩織, 金山直樹, 徳光 浩, 曲 正樹
2. 発表標題 濾胞樹状細胞が発現するIL-34の免疫学的作用についての解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川紗也香, 松岡由希子, 高田美帆, 松井一恵, 山根文寛, 安原詩織, 金山直樹, 波多野直哉, 徳光 浩, 曲 正樹
2. 発表標題 GRP78により発現制御される濾胞樹状細胞表面のIL-34が単球系細胞の分化に関与する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田美帆, 鳥家雄二, 稗田健太郎, 金山直樹, 徳光 浩, 曲 正樹
2. 発表標題 濾胞樹状細胞により誘導される単球系細胞によるB細胞活性化メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------