

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590497

研究課題名（和文）免疫記憶の形成と維持において PLC $\gamma$ 2 が果たす役割の解析

研究課題名（英文）Analysis on the roles of PLC $\gamma$ 2 in generation and maintenance of immunological memory

研究代表者

疋田 正喜 (MASAKI HIKIDA)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60228715

研究成果の概要（和文）：これまでの多くの研究にも関わらず、記憶B細胞の生成や生存に関する分子機構には不明な点が多く残されている。そこで、本研究においては PLC $\gamma$ 2 が、これらの機構にどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを試みた。その結果、PLC $\gamma$ 2 が記憶B細胞生成の場である胚中心の形成に重要な役割を果たしていることが明らかになり、さらに生成した記憶B細胞の維持にも必須であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In spite of previous researches, molecular basis for the development and survival of memory B cells remains largely unknown. In this study, we tried to clarify the roles of PLC $\gamma$ 2 on such molecular machinery. As the result, we found that PLC $\gamma$ 2 is playing a pivotal role in the formation of germinal center, where memory B cells are formed. It was also revealed that PLC $\gamma$ 2 is essential for the maintenance of the memory B cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：免疫学、遺伝子、動物、病理学、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

個体レベルの免疫システムがどのような分子機構で構築されているのかを明らかにすることは、免疫疾患に対する医学的な応用を考える上でも非常に重要であると考えられる。また、個体レベルでの免疫情報の獲得、選別、蓄積、いずれの過程においても種々のシグナ

ル分子がもっとも基本的なコンポーネントとして働いているのは明らかである。しかし、これらのシグナル分子による細胞レベルの応答制御が個体レベルの免疫システムをどのように実現しているのかという問題については、多くのアプローチがなされてきたが依然として不明な点が多く残されている。中でも、獲

得・選別された免疫情報の蓄積というべき、免疫記憶の形成と維持において抗原レセプター (BCR) シグナル分子群がどのような役割を果たしているのかという点については、国際的にも少数の研究のみが行われており不明な点が多く残されていることから、この点を明らかにする研究の進展が強く期待されていた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、BCR シグナル分子群の中でも、複数のシグナル経路の分岐点に位置する重要な分子である PLC $\gamma$ 2 に焦点を当てて、記憶応答の形成と維持に果たしている役割を詳細に解析し、明らかにすることを試みた。

一方、従来より、BCR シグナル分子群が免疫応答に果たす役割を明らかにする試みは、本研究を含め多くのグループが行ってきた。しかし、BCR シグナル分子の多くにおいては、それらの分子の欠失によってB細胞の分化そのものに異常をきたすことが知られている。そのため、B細胞分化が正常に行われる野生型マウスと同様の条件下で、それらの分子が記憶応答に果たしている役割を解析することは困難であると考えられてきた。本研究の代表者は、従来より PLC $\gamma$ 2 の重要性に着目し、その免疫応答における役割について明らかにすることを試みてきた。しかし、先に述べたように、通常のノックアウトマウスを使用する解析には問題点が多く、記憶応答における本質的な疑問を解決するには至っていない。そこで、これまでの成果を踏まえて、分化・成熟過程においては正常に PLC $\gamma$ 2 を発現し、成熟後に抗原により活性化したB細胞でのみ PLC $\gamma$ 2遺伝子が欠失するコンディショナルノックアウトマウスの開発を試みてきた。本研究においては、当該マウスを利用し、記憶応答の形成・維持において、PLC $\gamma$ 2 を介するシ

グナルがどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) IgG1-CreマウスとLoxP-PLC- $\gamma$ 2 との交配

IgG1 遺伝子座3'端にIRES-Cre をノックインしてあるマウス(PNAS,103:7369,2006)と研究代表者らのグループによりすでに作製・解析が進んでいるLoxP-PLC- $\gamma$ 2 マウスを交配し、IgG1-Cre/PLC- $\gamma$ 2flox マウス(PLC G1 KO)を作製した。このマウスにおいては、IgM 陽性成熟B細胞ではCreの発現が認められないため、分化・成熟過程ではPLC- $\gamma$ 2 を正常に発現している。その後、抗原刺激に反応して活性化し、IgG1 germline transcript の発現の開始と共に Cre が発現するため、この段階ではじめて PLC- $\gamma$ 2 を選択的に欠失することが期待される。したがって、分化・成熟段階に影響を与えることなく、IgG1 陽性B細胞においてのみPLC- $\gamma$ 2 を介するBCRの働きを解析できる。

### (2) PLC G1KO マウスにおける記憶応答および親和性成熟の解析

現在までの、予備検討の結果、当該マウスにおける抗原特異的 IgG1 記憶応答の著しい低下が認められていることから、さらにこの点に関して、他のクラスの抗体産生量を含めて詳細な検討を行った。さらに、そのとき、一次応答、記憶応答の両者において、抗原に対する親和性成熟が正常に行われているか否かを検討した。

### (3) PLC G1KO マウスにおける胚中心形成・記憶細胞形成の継時的解析

記憶細胞の多くは、胚中心における選択を経て生成されると言われている。一方、胚中心B細胞ではCD38の発現が低下し、記憶B細胞では、CD38の高い発現が認められることが報告されている。そこで、PLC G1KOマ

ウスにおいて、免疫記憶の形成が正常に行われているか否かを明らかにする目的で、一次免疫後の胚中心の形成および、記憶B細胞の生成を、CD38の発現を指標として継時的に解析した。

#### (4) PLC G1KO マウス由来IgG1 陽性B細胞の寿命の測定

本研究の代表者は、過去にPLC- $\gamma$ 2 欠損マウスにおいては、未熟B細胞から成熟B細胞の turnover rate が上昇していることを示している。そこで、本研究においては、PLC- $\gamma$ 2 の欠失によりBCRシグナルが伝わらない状態で、IgG1 にクラススイッチした細胞の寿命が変化するか否かをBrdU のin vivo での pulse-chase 実験により解析した。その結果より、記憶細胞の維持にBCR シグナルが果たしている役割を明らかにした。

#### (5) PLC G1KO マウス由来 IgG1 陽性細胞における体細胞突然変異の検討

先の項目(1)で作製、検討を加えたPLC G1KO マウスに NP ハプテンを免疫し、抗体産生を誘導した。PLC G1KO マウスが C57BL/6 back ground であることから、NP 化抗原を免疫した場合には VH186.2 可変部を持つ抗NP 抗体陽性B細胞がdominant に応答することが予想された。そこで、PLC G1KO マウスにNP-CGG を免疫後、IgG1 陽性細胞の抗体可変部の塩基配列をRT-PCR法によって解析した。その結果より、野生型と比べて PLC- $\gamma$ 2 欠損IgG1 陽性細胞における体細胞突然変異の出現頻度が低下しているのか否かを検討し、体細胞突然変異におけるPLC- $\gamma$ 2 を介するBCR シグナルの役割を明らかにした。

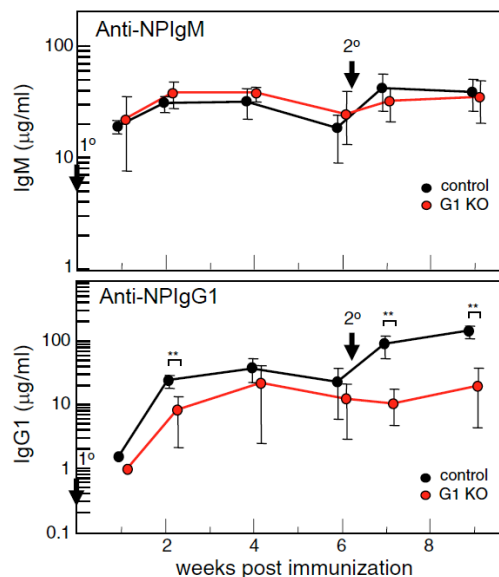
## 4. 研究成果

### (1) 胚中心でコンディショナルに PLC $\gamma$ 2 の遺

伝子を欠失した (PLC G1KO) マウスにおける記憶応答

本実験で使用した PLC G1KO マウスにおいては、IgM 陽性成熟 B 細胞では Cre の発現が認められないため、分化・成熟過程では PLC- $\gamma$ 2 を正常に発現している。その後、抗原刺激に応答して活性化し、IgG1 germline transcript の発現の開始と共に Cre が発現するため、この段階ではじめて PLC- $\gamma$ 2 を選択的に欠失することが期待された。実際に当該マウスに抗原 NP-CGG を免疫して、IgM 陽性細胞や胚中心細胞等を分画し、それぞれの細胞集団の遺伝型を PCR 法で検討したところ、期待どおり IgM 陽性細胞では野生型の PLCg2 遺伝子座を維持しており、胚中心以降の分化段階においてのみ PLCg2 遺伝子の欠失が認められた。

そこで、免疫後に採取した血清中の免疫抗原に対する抗体価を調べたところ、図1のように IgM クラスの応答は野生型のコントロールマウスと有意の差が見られなかったのに対して、PLCg2 遺伝子をコンディショナルに欠失させた IgG1 クラスにおいては、記憶応答に特に著しい障害を受けていることが明らかとなった。従来の方と異なり細胞分化に影響を与えず、記憶応答を評価した結果として、非常に重要な発見であると考えられる。

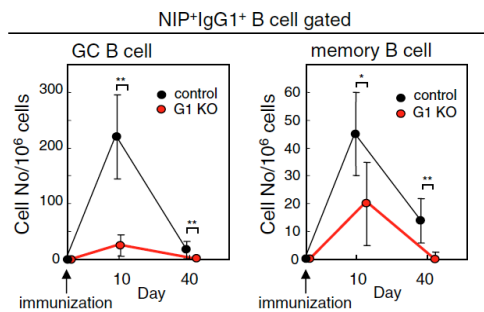


(図1) PLC G1KOにおける免疫応答

### (2) 胚中心の形成と記憶B細胞の生成における PLC $\gamma$ 2 の役割

PLC G1KO マウスの IgG1 クラスにおける記憶応答の減弱が、胚中心の形成能の低下による記憶B細胞数の減少によるものなのか否かを検討する目的で、PLC G1KOマウスの免疫後の胚中心 (GC) B細胞数と記憶(memory) B

細胞数について検討を加えた (図 2)。その結果、胚中心 B 細胞の数が著しく減少しており、記憶 B 細胞も 1/2 程度まで減少していた。記憶 B 細胞数の減少は、これらの細胞が生成される場である胚中心の形成に障害を受けていることに、その原因の一部があると考えられる。しかし、記憶 B 細胞数の減少の度合いを考えると、(図 1) に示した IgG1 クラスの記憶応答の障害の程度は、それのみでは説明できないと考えられる。したがって、PLC G1K0 マウスにおいては、胚中心形成能の低下を介する記憶 B 細胞数の減少のみならず、記憶 B 細胞の維持もしくは抗体産生細胞への分化に障害を受けていることが予想された。



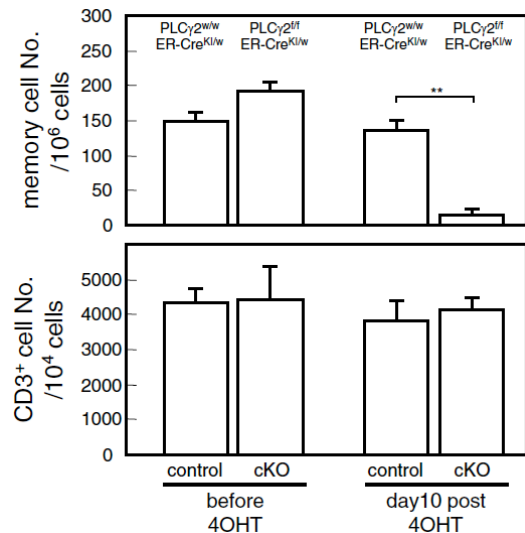
(図 2) PLC G1K0マウスにおける胚中心(GC)細胞数と記憶(memory) B細胞数の経時変化

### (3) 記憶 B 細胞の維持における PLCγ2 の役割

上記の検討の結果、PLC G1K0マウスにおいては、記憶 B 細胞の維持にもある程度の異常をきたしている可能性が示唆されたため、PLCγ2 の記憶 B 細胞の維持に対する影響についても評価を加えた。

この目的を実現するために、タモキシフェン(4OHT)の投与に依存して PLCγ2 遺伝子座をコンディショナルに欠失させることができる PLC cKO マウスを PLCγ2 flox マウスと ER-Cre マウスの交配により作製した。当該マウスにおいて、生成した記憶 B 細胞の維持を解析するために、免疫後記憶 B 細胞が生成した後にタモキシフェンを投与して、コンディショナルに PLCγ2 遺伝子座を欠失させるよう試みた。その結果、PLC G1K0マウスと同様に期待通り、タモキシフェンを投与したマウスにおいてのみ、PLCγ2 遺伝子座の欠失が認められたことから、タモキシフェン処理後の記憶 B 細胞の数について検討を加えた (図 3)。その結果、タモキシフェン投与前にはコントロール群と同程度生成されていた記憶 B 細胞の数が、投与後 10 日目には、PLC cKOマウスにおいて激減していることが明らかとなった。このことは、PLCγ2 が記憶 B 細胞の生成にのみ重要な役割を果たしているのではなく、いったん生成された記憶 B 細胞が、免疫後に長期にわたって生体内で維持されて

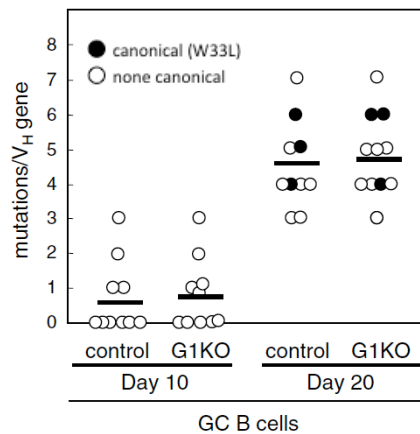
いくために必須の役割を果たしていることが明らかとなった。



(図 3) タモキシフェン(4OHT)処理による PLCγ2 遺伝子座欠失の後の記憶 B 細胞数

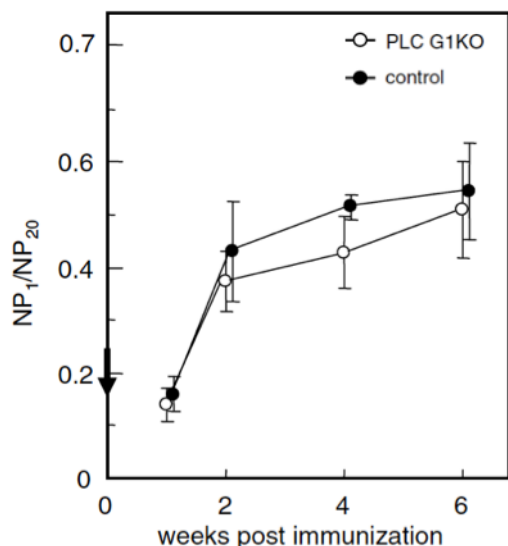
### (4) 体細胞突然変異と親和性成熟における PLCγ2 の役割

記憶 B 細胞の生成と維持に PLCγ2 が必須であるということを明らかにしたが、一方で胚中心中で行われている正の選択・負の選択に PLCγ2 が必要であるか否かという点についても検討を加えた。一般に、記憶応答は一次応答に比べて抗原に対して、高親和性の抗体が生成されることが知られている。そこで、まず、NP-CGG で免疫した抗体の抗原に対する親和性に大きく影響を与えることが知られている W33L のアミノ酸置換を含む点変異の有無について検討を加えた (図 4)。その結果、PLCγ2 の欠失の有無に関わらず、W33L の置換を伴った体細胞突然変異が生じることが明らかとなった。



(図 4) PLC cKO マウスにおける体細胞突然変異

加えて、PLC G1KO マウスに抗原 NP-CGG を免疫し血清中の抗 NP 抗体の NP ハブテンに対する親和性を詳細に調べたところ、PLC G1KO マウスにおいて弱い親和性の低下は見られたものの、記憶応答の IgG1 抗体価とはことなりほぼ正常に親和性成熟が行われていることが示された (図 5)。



(図 5) 血中抗体の親和性成熟に対する PLC $\gamma$ 2 の果たす役割。

本研究の結果を総合すると、PLC $\gamma$ 2 は、記憶 B 細胞の生成の場である胚中心の形成を介して記憶 B 細胞の生成を制御すると共に、生成された記憶 B 細胞が生体内で長期にわたって維持されるためにも必要であることが明らかになった。一方で、PLC $\gamma$ 2 を欠失した場合にもクローン選択には顕著な影響を及ぼしていないが、このことは本研究で使用した Cre マウスによって PLC $\gamma$ 2 遺伝子座が欠失する以前に選択が完了しているという可能性を否定するものではなく、今後、この点についてさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

## 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 2 件)

(1) Hikida M., Casola S, Takahashi N, Kaji T, Takemori T, Rajewsky K, Kurosaki T., PLC- $\gamma$ 2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *J.Exp.Med.* 2009;**206**(3):681-9. (査読有)

(2) Kurosaki T, Hikida M., Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol.Rev.* 2009; **228**(1):

132-48. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

(1) Masaki Hikida, PLC $\gamma$ 2 is essential for formation and maintenance of memory B cells, 日本免疫学会、シンポジウム、2008 年 12 月 1 日、国立京都国際会館

[その他]

ホームページ等

<http://www.scienceportal.jp/news/daily/0903/0903131.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

疋田 正喜 (HIKIDA MASAKI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60228715