

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590529

研究課題名（和文） 記憶B細胞の迅速で強い抗体産生機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the robust antibody-production of memory B cells

研究代表者

安達 貴弘（ADACHI TAKAHIRO）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50222625

研究成果の概要（和文）：

記憶B細胞の迅速で強い抗体産生機能を調べるために、免疫したマウスで抗原刺激によりシグナリングが起こるB細胞集団を見出した。さらに蛋白性カルシウムプローブ Cameleon をB細胞に発現させたマウスを作製し、カルシウムシグナリングをモニターできるマウスの系を構築した。

研究成果の概要（英文）：

To analyze the mechanism of rapid and robust antibody production from memory B cells, we identified a subset of B cells from immunized mice, which induced antigen-induced signaling. We generated proteinaceous calcium probe, Cameleon, -expressing mice in which calcium signaling of B cells can be monitored.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：免疫記憶、シグナル伝達、B細胞、カルシウムシグナル

1. 研究開始当初の背景

感染症に対する生体防御として自然免疫とともに記憶免疫が重要な役割を果たしており、ワクチン療法の根源をなしている。記憶B細胞の多くはクラススイッチしてIgG陽性で、IgM/IgDを発現しているナイーブB細胞と比べ、抗原に対して迅速で強い抗体産生を引き起こす。インフルエンザなどの感染防御にはワクチンによる記憶B細胞の誘導が

重要であることが知られている。IgG陽性となった活性化B細胞は記憶B細胞や形質細胞に分化し、2次リンパ組織の濾胞を離れ、長寿命形質細胞は骨髄に、記憶B細胞は骨髄や2次リンパ組織の濾胞辺縁体などに局在することが知られている。

IgG陽性記憶B細胞の迅速で強い抗体産生機構を解明する目的で、C.C.GoodnowのグループはIgGあるいはIgGの膜貫通・細胞内

領域を持つ IgM/IgG キメラ分子を発現するトランスジェニックマウスを作製し、IgM/IgD の代わりに IgG を発現するだけで免疫に応じて著しく増殖し、免疫応答が亢進することを見出している (Nat Immunol 2002)。我々は同一の抗原特異性も持った IgM および IgG、IgM/IgG キメラを再構築した B 細胞株の抗原受容体 (BCR) シグナル伝達を解析することにより、IgM より IgG あるいは IgM/IgG キメラを抗原受容体として持つ場合の方が、抑制性共受容体による制御が弱く、より強い BCR シグナリングが起こることを見出している (Science 2003)。記憶 B 細胞からの抗体産生には、T 細胞と同時に、抗原が必要なことから BCR シグナリングがその活性化および形質細胞への分化に重要であると考えられており、我々の結果は記憶 B 細胞の特性を説明する上でよく合致していると考えていた。しかし、最近の研究から、抗原の種類などにより抑制性共受容体の制御の差異だけでは IgG 陽性 B 細胞の特性を説明できないことがわかってきており (Horikawa et al. JEM, Waisman et al. JEM 2007)、さらなる解析が必要である。

2. 研究の目的

記憶 B 細胞がナイーブ B 細胞に比べて迅速で強い抗体産生を起こす機序について BCR シグナリングの差異以外にも下記のようにいくつかの可能性が考えられる。

- ① 免疫後、樹状細胞などに保持された生体内に残る抗原と反応して既に活性化された状態でアナジー様になっている。
- ② IgG が細胞表面に発現することで恒常的な活性化が起きて、アナジー様になっている。
- ③ 高効率抗体産生は BCR シグナリングの強度とは関係なく、IgG 陽性細胞の他の分子との相互作用や抗原提示など他の機序による。

より効率的なワクチン開発のためにも、記憶 B 細胞による迅速で強い抗体産生の機序を理

解する必要がある、そのためには、IgG 陽性細胞の活性化、および形質細胞への分化の分子機構を解明することとともに、微小環境による記憶 B 細胞や形質細胞の空間的制御の解明は不可欠である。しかし、IgG 陽性の記憶 B 細胞についてはその活性化・分化機構は不明な部分が多く、長寿命形質細胞についてもその詳細は不明である。

そこで本研究では、我々がこれまでに得た *in vitro*、*in vivo* の知見をもとに、特に正常マウスからの IgG 陽性細胞に着目し、i) 記憶 B 細胞活性化の分子機構、ii) 記憶 B 細胞および形質細胞の空間的制御機構の 2 つを中心に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) IgG 陽性細胞の *in vitro* での BCR シグナリングの測定

C57BL/6 マウスは購入した。ハプテン (ニトロフェノール (NP)) に特異的な免疫グロブリン H 鎖可変領域遺伝子をノックインした QM マウスは Wabl 教授 (カルフォルニア大学サンフランシスコ校) より供与していただいた。これらのマウスから脾臓、大腿骨を摘出し、赤血球を除去した細胞について MAP キナーゼの活性化やカルシウムシグナリングを IgG 陽性細胞と IgM/IgD 陽性のナイーブ B 細胞で解析した。なおマウスは東京医科歯科大学・動物実験のガイドラインに従い、東京医科歯科大学難治疾患研究所・組換えマウス実験室で SPF 環境にて飼育した。

(2) B 細胞特異的 Cameleon 発現トランスジェニックマウスの作製

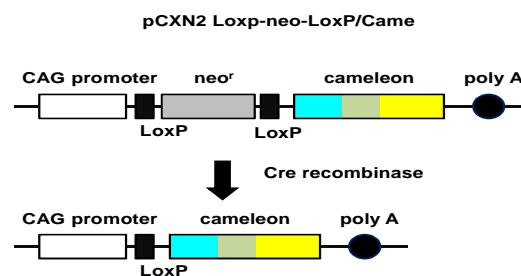


図 1. Cameleon 遺伝子トランスジェニックコン

ストラクト

CAG プロモーターの下流にタンデムな LoxP 配列に挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を持ち、Cameleon 遺伝子はその下流に挿入してある。Cre リコンビナーゼによりネオマイシン耐性遺伝子は切り出され、下段のような遺伝子構造になる。

Cre-LoxP の部位特異的組換えを利用して条件的に Cameleon を発現できる Cameleon (YC3.60) 遺伝子 (理研・宮脇博士より供与) を持つ発現ベクターDNA (図1) を制限酵素切断によって直線化した後、C57BL/6 の卵母細胞にインジェクションし、floxed YC3.60 トランスジェニックマウスを作製した。さらに、CD19 遺伝子座に Cre リコンビナーゼ遺伝子をノックインし、B 細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CD19-Cre マウスはハーバード大学 Rajewsky 教授より供与していただき、このマウスと floxed YC3.60 トランスジェニックマウスを交配することにより B 細胞特異的に Cameleon を発現するマウスを作製した。

(3) Cameleon 発現マウスでの in vivo のカルシウムシグナリングの検出

Cameleon を発現するマウスについて、共焦点レーザー顕微鏡を用いた生体イメージングにより脾臓 B 細胞のカルシウムシグナリングを Cameleon の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を検出することによって調べた。

4. 研究成果

(1) Cameleon を用いたの in vitro でのカルシウムイオンの動員の評価

記憶 B 細胞の BCR シグナリングを詳細に調べるために、まずマウス細胞株を用いてカルシウムイオンに対するタンパク質性バイオプローブ Cameleon を用いて抗原により BCR シグナリングをモニターできる系を構築し、従来のカルシウムイオン指示薬 Fluo-4

と感度的に比べてもそんな色がないことを示した。

(2) IgG 陽性細胞の in vitro での活性化の解析

IgG 陽性細胞 (記憶 B 細胞、長寿命形質細胞) を免疫した正常マウスから分離し、これらの細胞集団について抗原刺激によるシグナル分子の活性化を調べ、特に骨髄に抗原刺激によりシグナル分子の活性化が起こる亜集団があることを見出した (図2)。また、QM マウスの IgG 陽性 B 細胞では抗原刺激により IgM/IgD 陽性のナイーブ B 細胞とほぼ同程度のシグナリングがみられた。

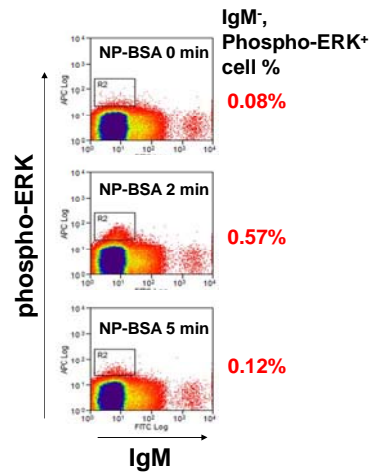


図2. 骨髄 B 細胞での抗原による ERK の活性化
骨髄の IgM 陰性 B 細胞で抗原 (NP-BSA) 刺激後、2分、5分で ERK が活性化される細胞が検出された。

(3) Cameleon トランスジェニックマウスを用いた B 細胞カルシウムシグナリングの解析

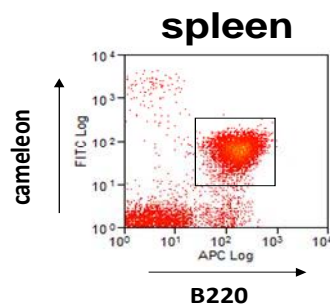


図3. 脾臓 B 細胞での Cameleon の発現

B細胞マーカーである B220 陽性細胞のほとんどが Cameleon 陽性となっている。

図 3 のようにほぼすべての B 細胞に Cameleon を発現する B 細胞特異的 Cameleon 発現するマウスを樹立した。

このマウスから脾臓 B 細胞を分離し、フローサイトメーターを用いて、抗原受容体架橋によるカルシウムイオンの動員が測定できる系を構築した (図 4)。

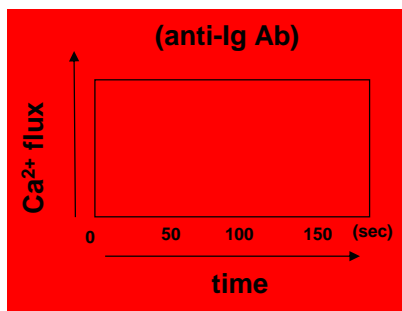
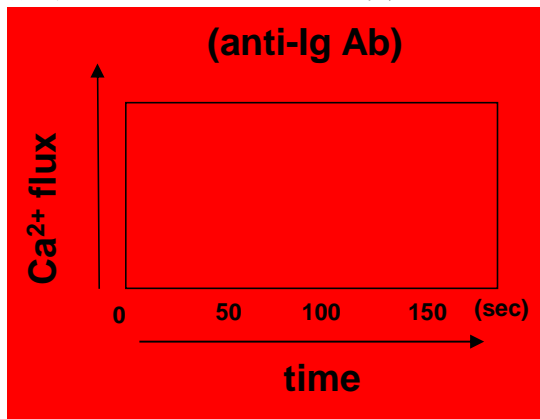


図 4. Cameleon 発現マウス B 細胞での抗原受容体を介したカルシウムイオンの動員



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 4 件)

- ① Adachi T, Harumiya S, Takematsu H, Kozutsumi Y, Wabl M, Fujimoto M, Tedder TF. CD22 serves as a receptor for soluble IgM. Eur J Immunol. 42:241-7, 2012.
- ② Ishiura, N., Nakashima, H., Watanabe, R., Kuwano, Y., Adachi, T., Takahashi, Y., Tsubata, T., Okochi, H., Tamaki,

K., Tedder, T.F., Fujimoto, M.: Differential Phosphorylation of Functional Tyrosines in CD19 Modulates B Lymphocyte Activation. Eur J Immunol40:1192-204,

- ③ Hou, R., Ohtsuji, M., Ohtsuji, N., Zhang, L., Adachi, T., Hirose, S., Tsubata, T.: Centromeric interval of chromosome 4 derived from C57BL/6 mice accelerates type 1 diabetes in NOD.CD72b congenic mice. Biochem Biophys Res Commun. 2009, 380:193-7.
- ④ Toda, M., Hisano, R., Yurugi, H., Akita, K., Maruyama, K., Inoue, M., Adachi, T., Tsubata, T. and Nakada, H.: Ligation of tumor-produced mucins to CD22 dramatically impairs splenic marginal zone B cells. Biochem J. 417:673-83, 2009.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Adachi, T., Analysis of signaling through the B cell antigen receptor in memory B cells. 日本免疫学会学術集会 (大阪) 2011
- ② Adachi, T., Signaling through the B cell antigen receptor on memory B cells. 日本免疫学会学術集会 (千葉) 2011
- ③ 安達貴弘, 腸管免疫細胞の活性化モニターリングマウスの樹立 日本農芸化学会大会 (京都) 2012

[図書] (計 2 件)

- ① 安達貴弘, CD70 と自己免疫疾患 臨床免疫・アレルギー科 第 56 巻第 2 号 p. 213 (2011 年 8 月発行)
- ② 安達貴弘, メモリー B 細胞における BCR シグナル伝達 臨床免疫・アレルギー科 第 56 巻第 4 号 p. 452 (2011 年 10 月発行)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 貴弘 (ADACHI TAKAHIRO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50222625

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：