

## 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31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590545

研究課題名（和文） 記憶B細胞の位置情報および動態の解析

研究課題名（英文） Analysis of distribution and cellular dynamics of memory B cells

研究代表者

饗場 祐一 (AIBA YUICHI)

独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・研究員

研究者番号：00273516

研究成果の概要（和文）：

記憶B細胞の末梢リンパ器官内での存在領域を明らかにするため、免疫組織染色を行った。その結果 IgG 陽性記憶B細胞は収縮した胚中心の近傍に位置することが明らかとなった。また、IgG 陽性記憶B細胞は抗原による再刺激後、その存在場所、胚中心の近傍で活性化されることを明らかにした。IgG 陽性の記憶B細胞とは異なり、IgM 陽性の記憶B細胞は濾胞の胚中心とは異なる領域に存在していることも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

For clarifying the location of memory B cells at peripheral lymphoid organs, I performed immunohistological analysis. This analysis reveals that IgG positive memory B cells locate adjacent to contracted germinal centers. I also clarified that IgG positive memory B cells enter S/G2/M phase of cell cycling after antigen re-stimulation in vivo adjacent to germinal center, where they reside. In contrast to IgG positive memory B cells, IgM positive memory B cells reside at follicle outside germinal center.

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   |
|        |           |         |           |
|        |           |         |           |
| 総計     |           |         |           |

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、B細胞

## 1. 研究開始当初の背景

外来抗原を有効に排除するために免疫システムが備えている最も重要な特性として、外部環境に応じてそのシステムを調節できることがあげられる。たとえば外部環境に存

在する有害な感染源などに対して免疫応答を惹起された個体は、再度の感染源への暴露に備え、迅速かつ有効に同一の感染源に対して応答するためのシステムを構築することが知られる。この免疫記憶と呼ばれる機構は

長期間にわたって維持されるため、ヒトなどでは幼年期に一度感染した病原体に対して、ほぼ一生にわたり耐性を示す例がある。また、ワクチンにより感染防御を付与する際には、免疫記憶を適切に誘導できるか否かによってその有効度が大きく左右されることが知られている。

記憶 B 細胞は免疫記憶応答時に高親和性抗体を分泌する抗体産生細胞へ迅速に分化すると考えられており、その重要性が広く認められているのに対して、これらの細胞が末梢リンパ器官のどのような領域に存在しているのか、またそれらが再度の抗原刺激に対してどのような様式で応答しているかについては全く不明であった。上記の問題はワクチンなど人為的に免疫系を賦活化する際に、どのような形態、形状の抗原をどのような経路で投与するのが有効かを考察する上でも重要な知見となる。

近年、細胞動態や細胞の位置情報を解析するための種々の遺伝子改変マウスが開発されており、生体内に少数しか存在しない細胞の検出、動態解析が可能となった。これらの解析系を免疫記憶担当細胞に応用しようとする試みがされだしてきてきた。

## 2. 研究の目的

これまで報告されている記憶 B 細胞の細胞表面マーカーを染色する抗体を用いて免疫組織染色を行い、記憶 B 細胞の末梢リンパ器官内での存在領域を明らかにする。また、ナイーブ B 細胞が抗原刺激により活性化される際、活性化の初期に AID 分子が発現することを利用し、この分子の発現に依存して細胞が蛍光ラベルされるシステムを構築する。それにより、記憶 B 細胞の存在領域を明らかにすることも試みる。

免疫担当細胞はその活性化、分化の際、種々の細胞との相互作用を行うため末梢リンパ器官の様々な領域を移動することが知られている。これを踏まえたうえで、記憶 B 細胞が再度の抗原刺激により活性化する際に、その存在領域で活性化されるのか、あるいは別の領域へと移動した後活性化されるのかについて明らかにする。

これら記憶 B 細胞の存在領域、活性化様式がナイーブ B 細胞と異なることが示唆された場合、記憶 B 細胞の活性化に必要とされる細胞群の同定を試みる。

## 3. 研究の方法

AID 分子の転写制御領域に cre 遺伝子を結合させたものを導入した遺伝子改変マウスと ROSA 遺伝子座に cre の発現に依存して蛍光タンパク RFP を発現するように遺伝子が組み込まれた遺伝子改変マウスを交配して、抗原刺激を受け AID を発現した細胞のみが RFP

で標識されるマウスを作製した。このマウスに NP-CGG を免疫し、抗 CD38 抗体や抗 IgG 抗体を用いて免疫組織染色を行った。また、遺伝子の改変を行っていない野生型マウスに同様の抗原を投与し、抗体による染色で記憶 B 細胞の存在領域を明らかにする試みも行った。

上記のマウスを用いた実験系では、検出された記憶 B 細胞が投与した NP-CGG に特異的なものを明らかにすることは困難である。また近年その重要性が指摘されだしてきている IgM 陽性記憶 B 細胞の検出は上記の実験系では困難なため、NP に特異的に反応する免疫グロブリン重鎖が組み込まれた遺伝子導入マウスを用いて同様の実験を行った。

検出された記憶 B 細胞が再度の抗原刺激によりどのような領域でどのような様式で再活性化されるかを明らかにするため、細胞周期の S/G2/M 期の細胞のみが蛍光ラベルされる遺伝子導入マウス (Fucci-マウス) を使い、二次免疫応答時に記憶 B 細胞がどのような領域、様式で活性化されるかについて明らかにしようと試みた。

## 4. 研究成果

野生型のマウス、C57BL/6 マウスに抗原として NP-CGG を alum アジュバントとともに免疫した。免疫後 30 日、60 日後にマウスより脾臓を回収し、IgG 陽性記憶 B 細胞のマーカーとして知られる CD38 に対する抗体、及び記憶 B 細胞ではきわめて弱い発現をし、胚中心細胞では強い発現を示す GL7 に対する抗体を、抗 IgG 抗体とともに用いて免疫組織染色を行った。その結果、CD38 陽性で IgG を発現する IgG 陽性記憶 B 細胞は GL7 陽性の胚中心細胞の周辺に細胞塊を形成して存在していることが示唆された。またこの細胞塊は免疫グロブリン鎖を発現していることも明らかとなり、NP に反応して形成されたことを示唆していた。

上記の胚中心の周辺には濾胞樹状細胞が存在し、この細胞には免疫グロブリンと抗原の複合体が高い濃度で結合することが知られている。したがって、上記の免疫組織染色で抗 IgG 抗体により検出されたシグナルは記憶 B 細胞上の IgG 発現を検出しているものではなく、濾胞樹状細胞上の免疫グロブリン抗原複合体を検出している可能性がある。この可能性を検証するため、B 細胞の活性化に伴い発現する AID 分子の転写調節領域下流に cre 遺伝子を結語させた遺伝子を導入し、ROSA 遺伝子領域に cre の発現に依存して蛍光タンパク RFP を発現する形で遺伝子を導入したマウス (AID-cre/RFP-ROSA マウス) を作製した。このマウスでは記憶 B 細胞を含む抗原刺激で活性化された B 細胞は RFP で標識されるが、濾胞樹状細胞など B 細胞系列以外の細胞

は標識されないため、上記の可能性を検証することが可能となる。このマウスで IgG 陽性記憶 B 細胞が RFP で実際に標識されているかを検討するため、NP-CGG で免疫されたこのマウスから脾臓細胞を調整し、フローサイトメトリー解析により、NP 特異的 IgG 陽性記憶 B 細胞での RFP 発現を検討した。その結果、NP 特異的 CD38 陽性 IgG 陽性の記憶 B 細胞のうち、約 90% のものが RFP で標識されていることが明らかとなり、この手法は記憶 B 細胞の標識法として有効であることが確認された。NP-CGG で免疫された AID-cre/RFP-ROSA マウスの脾臓免疫組織染色を行ったところ、野生型マウスで見られたのと同様の CD38 陽性の細胞塊が胚中心周辺でみられ、それらの細胞の大多数が RFP で標識されていることが明らかとなった。さらに、RFP で標識され抗 IgG 抗体で染色される細胞の大多数は、胚中心周辺に存在していることが明らかとなり、IgG 陽性の記憶 B 細胞の多数は胚中心の周辺に細胞塊を形成して存在していることが明らかとなった。

上記 AID-cre/RFP-ROSA マウスを NP-CGG で免疫した場合、IgG 陽性の記憶 B 細胞以外の CD38 陽性細胞も RFP で標識されることが明らかとなった。これらの多くは B 細胞濾胞内に散在する形で存在していた。これらが IgG を発現しない記憶 B 細胞、すなわち IgM 陽性の記憶 B 細胞である可能性を検討するため、免疫した AID-cre/RFP-ROSA マウス脾臓細胞のフローサイトメトリー解析を行ったところ、CD38 が陽性で IgM を発現する NP-特異的 B 細胞が RFP で標識されることが明らかとなった。IgM 分子はナイーブ B 細胞に発現しており、それらは濾胞内に多数存在しているため、抗 IgM 抗体染色により記憶 B 細胞を検出、同定することは困難となる。上記の濾胞内に散在する抗原刺激を受けたと想定される B 細胞が IgM 陽性記憶 B 細胞である可能性を検討するため、NP 反応性の免疫グロブリン重鎖遺伝子がノックインされ B 細胞の多数が NP 反応性を持つ遺伝子改変マウス (B1-8<sup>hi</sup> マウス) を利用し、NP 反応性 B 細胞を養子移植する実験系を用いた。このマウスの脾臓から精製した B 細胞を細胞分裂回数の指標となる CFSE で標識した後、野生型マウスに移入した。移入マウスを免疫し 1-2 カ月後の脾臓細胞を解析したところ、移植細胞由来の CD38 陽性で IgM が陽性、さらに CFSE 標識の程度から、細胞分裂を多数回行っていると判断された細胞が観察され、IgM 記憶 B 細胞がこの実験系で生成したことが示唆された。これらの細胞の脾臓内での存在領域を明らかにするため、IgM allotype を特異的に認識する抗 IgM<sup>a</sup> 抗体を用いた免疫組織染色を行った。この実験系では移植された B1-8<sup>hi</sup> マウス由来細胞は IgM<sup>a</sup> を発現しているのに対して、宿主由来のナイ

ーブ B 細胞等は IgM<sup>b</sup> を発現しているため、記憶 B 細胞とナイーブ B 細胞との区別をつけることが可能である。免疫組織染色の結果から、宿主由来の CD38 陽性 IgM<sup>a</sup> 陽性 B 細胞は濾胞内に散在していることが明らかとなり、またこれらの細胞は多数回の細胞分裂を経て生成したものであることが明らかとなった。この結果は、IgM 陽性記憶 B 細胞は IgG 陽性の記憶 B 細胞と異なった領域、すなわち濾胞内に散在して存在していることが明らかとなった。

濾胞内に存在するナイーブ B 細胞が抗原刺激を受けた場合は T 細胞領域へと移動し、そこで抗原刺激を受けた T 細胞と相互作用を行った後、活性化、抗体産生細胞等へと分化することが明らかにされている。記憶 B 細胞のうち、IgG 陽性記憶 B 細胞はナイーブ B 細胞とは異なった領域に存在していることが明らかとなったので、特にこの細胞が二次免疫応答時に活性化される場合、どのような様式で活性化されるのかについて解析した。この目的のために、細胞周期の S/G2/M 期の細胞のみが特異的に蛍光標識される probe, Fucci-probe の遺伝子を導入された遺伝子改変マウスを用いた (Fucci マウス)。このマウスでは増殖期の細胞のみが緑色の蛍光で標識されるため、記憶 B 細胞の再活性化に伴う細胞増殖をフローサイトメトリー及び免疫組織染色で観察することが可能となる。Fucci マウスに NP-CGG を免疫し、2 カ月後の脾臓細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、IgG 陽性 CD38 陽性の NP 特異的 IgG 記憶 B 細胞は、Fucci-probe を発現していない静止期の細胞であることが明らかとなった。一方、免疫後 2 カ月の後、再度 NP-CGG を投与されたマウスでは 20-30% の IgG 陽性記憶 B 細胞が Fucci-probe を発現するようになり、Fucci マウスを用いた実験系は記憶 B 細胞の再活性化を観察することが可能な系であることが確認された。上記と同様の実験系で、脾臓の免疫組織染色を行ったところ、NP-CGG の再投与により胚中心周辺の CD38 陽性 IgG 陽性細胞塊が Fucci-probe を発現するようになることが明らかとなった。すなわち、IgG 記憶 B 細胞が抗原刺激により活性化される際には、ナイーブ B 細胞とは異なり、細胞の移動を伴わずその存在領域で迅速に活性化されることが示唆された。

上記の結果から、IgG 陽性記憶 B 細胞はナイーブ B 細胞とは全く異なった領域、様式で活性化されることが明らかとなった。このことを踏まえ、IgG 陽性記憶 B 細胞の活性化時にどのような細胞種が必要とされるのかを検討した。ナイーブ B 細胞が T 依存性抗原で活性化される際は T 細胞が必須であることが知られているため、記憶 B 細胞の活性化時に T 細胞が必要とされるのかについて検討した。

野生型マウスに NP-CGG で免疫を行い、2 カ月後に抗 CD4 抗体で CD4 陽性 T 細胞を生体内から除去し、その後 NP-CGG を再投与した場合、二次免疫応答に特徴的な高親和性抗体の産生は見られなかった。また Fucci マウスに NP-CGG を免疫し、2 カ月後に CD4 陽性細胞の除去を同様の手法で行った場合、NP-CGG の再投与による記憶 B 細胞の細胞増殖は起こらないことが明らかとなった。これらの結果は IgG 記憶 B 細胞の活性化初期に CD4 陽性の T 細胞が必要であることを示唆している。IgG 陽性の記憶 B 細胞の活性化時に、どのような種類の CD4 陽性 T 細胞が必要かについて検討するため、下記の細胞移入実験を行った。野生型マウスより精製した IgG 記憶 B 細胞を T 及び B 細胞を欠損した Rag1 欠損マウスへと移入し、NP-CGG 投与を行ったところ、記憶 B 細胞の抗体産生細胞への分化が見られず、この実験系では記憶 B 細胞単独では活性化を誘導できないことが明らかとなった。この実験系で、CGG 免疫された野生型マウスから精製した T 細胞を IgG 陽性記憶 B 細胞とともに Rag1 欠損マウスへ移入し、NP-CGG を投与したところ、抗体産生細胞への分化が観察された。また、このとき移入する T 細胞を CGG で免疫を行っていないマウスから精製、移入した場合には、記憶 B 細胞の活性化、分化は起こらなかった。これらのことから IgG 陽性記憶 B 細胞の活性化には、抗原で刺激を受けた T 細胞が必要とされることが示唆された。さらに、IgG 陽性記憶 B 細胞の周辺には、抗原刺激に依存して出現する PD-1 陽性の T 細胞群が存在することを免疫組織染色により明らかにした。これらの結果から、IgG 陽性記憶 B 細胞が近傍に位置する T 細胞と相互作用することにより、記憶 B 細胞の迅速な活性化が可能になっていることが示唆された。

#### 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 2 件)

1. ERKs induce expression of the transcriptional repressor Blimp-1 and subsequent plasma cell differentiation. Yasuda T., Kometani K., Takahashi N., Imai Y., Aiba Y. and Kurosaki T. Sci. Signal. 2011 vol. 4 ra25. 査読有

2. Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers

Aiba Y., Kometani K., Hamadate M., Moriyama S., Sakaue-Sawano A., Tomura M., Luche H., Fehling HJ., Casellas R.,

Kanagawa O., Miyawaki A. and Kurosaki T. Proc. Natl. Acad. Sci. 2010, Vol.107, p12192-12197.

査読有

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

饗場 祐一 (AIBA YUICHI)

独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・研究員

研究者番号：00273516

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし