

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19373

研究課題名（和文）T細胞非依存性免疫応答と細胞内分解

研究課題名（英文）T cell-independent immune response and intracellular degradation

研究代表者

鏑田 武志（TSUBATA, Takeshi）

日本大学・歯学部・客員教授

研究者番号：80197756

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：多糖抗原はT細胞非依存的にB細胞を活性化し、特異抗体の産生を誘導するが、そのメカニズムには不明な点が多い。B細胞が抗原を認識すると、抗原はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソーム/リソソームに移行する。タンパク質抗原は速やかに分解されるが、多糖は分解されず長時間保持される。多糖抗原デキストランを分解するデキストラナーゼは微生物が分泌する。デキストラナーゼを動物のリソソームタンパク質と融合することで、リソソーム酵素として機能させることに成功した。さらに、この酵素を用いることで、多糖抗原へのB細胞の活性化にエンドソーム/リソソームで保持される多糖抗原の重要性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌など莢膜を持つ細菌の莢膜多糖には抗体が産生され、莢膜多糖への抗体がこれら細菌への獲得免疫応答で中心的な役割を果たす。小児や高齢者では多糖抗原への抗体産生が低下するためにこれら感染症に罹患しやすくなる。一方、莢膜多糖を含むワクチンがこれらの感染症の予防に有用である。多糖抗原による抗体産生のメカニズムが明らかになれば、小児や高齢者での多糖抗原への抗体産生低下の予防法の開発や、莢膜を持つ細菌への有効性の高いワクチンの開発につながる。

研究成果の概要（英文）：Polysaccharide antigens activate B cells and induce production of specific antibodies in a manner independent of T cells. However, little is known about how polysaccharides activate B cells. When B cells recognize antigens, antigens are endocytosed and translocated to the endosome/lysosome compartment. Protein antigens are rapidly degraded whereas polysaccharides persist there for a prolonged time. Dextranase that degrades the polysaccharide dextran is a secretory protein expressed by microbes. By fusing dextranase with an animal lysosomal protein, we succeeded in converting dextranase to an animal lysosomal enzyme. Using this enzyme, we showed that persistence of polysaccharides in the endosome/lysosome compartment is crucial for B cell activation induced by polysaccharides.

研究分野：免疫学、生化学

キーワード：多糖抗原 デキストラン B細胞 抗体産生 細胞内分解

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌など莢膜を持つ細菌の莢膜多糖には抗体が産生され、莢膜多糖への抗体がこれら細菌への獲得免疫応答で中心的な役割を果たす。T細胞は樹状細胞などの抗原提示細胞が発現する主要組織適合抗原複合体(major histocompatibility complex, MHC)と抗原由来のペプチドの複合体をT細胞抗原受容体(TCR)により認識し、抗原提示細胞によって活性化する。B細胞が抗原を認識するとB細胞抗原受容体(BCR)を介してシグナルが伝達されるとともにBCRを介するエンドサイトーシスにより抗原を細胞内に取り込み分解し、抗原由来のペプチドとMHCの複合体を細胞表面に発現する。同じ抗原を認識して活性化したT細胞は、B細胞が提示したMHCと抗原ペプチドの複合体を認識し、B細胞と接触する。この際に、T細胞が活性化によって発現したCD40LがB細胞表面のCD40によって認識され、BCRを介する刺激とCD40を介する共刺激によりB細胞が活性化する。このようなT細胞によるB細胞への共刺激は、抗原に反応したB細胞の活性化に必要である。

MHCが提示できるのは、タンパク質由来のペプチドと糖脂質の一部のみで、多糖やその分解産物であるオリゴ糖を提示することはできない。このため、T細胞は多糖を抗原として認識し、活性化することはない。一方、T細胞とは異なり、B細胞は抗原を直接認識し、タンパク質以外にも、核酸、多糖、糖脂質などの種々の非タンパク質抗原をBCRで認識し、これらの抗原への抗体を産生する。タンパク質を含まない精製した莢膜多糖などの多糖をT細胞を欠失する動物に投与しても特異的な抗体が産生されることから、これら非タンパク質抗原を認識したB細胞はT細胞からの共刺激がなくても活性化することが明らかであり、多糖などの非タンパク質抗原への免疫応答は、タンパク質抗原への免疫応答とは全く異なるメカニズムでおこることが示唆される。多糖抗原などのT細胞非依存性抗原がしばしば繰り返し構造を持つことから、これまで確固とした証拠がないまま、BCRを強く架橋することによりT細胞からのヘルプがなくてもB細胞が活性化し、抗体を産生すると説明されてきた。したがって、多糖などの非タンパク質抗原へのT細胞に依存しないB細胞の応答の仕組みの詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

デキストランは一部の乳酸菌などが産生するグルコースが重合した多糖で、T細胞非依存性抗原として抗体産生を誘導する。一般に抗原がBCRに反応すると、BCRを介するシグナル伝達が起こるとともに、抗原は細胞にとりこまれ、エンドソームへと移行する。研究代表者は、ウシ血清アルブミン(BSA)などのタンパク質抗原にニトロフェノール(NP)を付加し、NPに反応するBCRを発現するマウス脾臓B細胞(NP反応性B細胞)に*in vitro*で反応させると、NP-BSAはB細胞に取り込まれたのちに速やかに分解されるが、NP化したデキストランはB細胞に取り込まれたのちに長時間細胞内にとどまることを明らかにした(未発表)。そこで、本研究では、デキストランのB細胞内持続がB細胞の活性化・増殖に関わるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子の発現にはウイルスベクターであるpMX(東京大学北村俊雄先生より供与)を用い、発現する遺伝子を挿入したウイルスベクターをマウスのecotropicウイルスのpackaging細胞PlatE(東京大学北村俊雄先生より供与)にトランスフェクションを行い、ウイルスを含む培養上清を得た。培養上清をCH1細胞と共培養することで、遺伝子導入を行った。

タンパク質の細胞内局在は、Mycタグを導入したタンパク質を発現させ、細胞を固定し、サポニンで透過処理をし、抗Myc抗体と、後期エンドソーム/リソソームのマーカーであるLamp1への抗体で染色したのちに、共焦点顕微鏡で観察した。細胞表面のCD69の発現は細胞を抗CD69抗体で染色したのちに、フローサイトメーターで解析した。

細胞内での抗原の分解は、NP特異的なBCRを発現するB細胞をNP化した抗原とともに培養し、経時的に細胞を固定、透過処理したのちに、抗NP抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。

カテプシンB デキスラナーゼ融合タンパク質をコードするcDNAをCreリコンビナーゼ依存的に発現するマウスを樹立するため、ROSA26のゲノム領域、CMVエンハンサー、アクチンプロモーター、loxP配列で挟まれたpolyAシグナルを用いてターゲティングベクターを作製した。

Benchling でデザインし、活性をオリゴ DNA の切断で確認した gRNA、CRIPR タンパク質とターゲットベクターをマウス受精卵にマイクロインジェクションし、得られたマウスを PCR でスクリーニングすることで、カテプシン B デキストラナーゼ遺伝子が ROSA26 遺伝子座にノックインされたマウスを得た。

4. 研究成果

デキストランを分解する酵素デキストラナーゼは細菌や酵母の一部で産生され、細胞外に分泌される。哺乳動物細胞のリソソームでも作用するような低い pH でも活性があるデキストラナーゼを産生する酵母 *Lipomyces starkey* (山梨大学長沼孝文先生より供与) から RT-PCR によりデキストラナーゼ遺伝子の cDNA を単離した。このデキストラナーゼを B 細胞のエンドソーム/リソソームで発現するため、マウスマクロファージ細胞 RAW264.7 から RT-PCR によりリソソームタンパク質であるカテプシン B の cDNA を得た。カテプシン B の酵素活性を不活化するため、PCR mutagenesis により活性部位に変異を導入し、デキストラナーゼ遺伝子との融合タンパク質をコードする融合遺伝子を作製した。カテプシン B デキストラナーゼ融合遺伝子を pMX ベクターに挿入し、カテプシン B デキストラナーゼ遺伝子を発現するウイルスを作製し、B 細胞株 CH1 に感染させた。感染させた CH1 細胞でのカテプシン B デキストラナーゼの局在を共焦点顕微鏡で観察したところ、カテプシン B デキストラナーゼは Lamp1 と共局在し、後期エンドソーム/リソソームに局在することが明らかとなった。

ニトロフェノール (NP) に特異的な膜型 IgM の H 鎖と L 鎖 cDNA を発現するウイルスベクターを用いて CH1 細胞に NP 特異的な IgM を BCR として発現させたのちに NP-BSA または NP-デキストランでこの細胞を刺激した。NP-BSA、NP-デキストランともに細胞内に取り込まれ、エンドソーム/リソソームに移行した。Primary B 細胞と同様に、NP-BSA は速やかに分解されたが、NP-デキストランは細胞内で長時間保持された。さらに、NP-BSA 刺激では活性化マーカーである CD69 の発現増強は見られなかったが、NP-デキストラン刺激で CD69 の発現増強が誘導された。また、NP-BSA で刺激するとともに抗 CD40 抗体で共刺激を誘導した場合にも CD69 の発現増強がおこった。このため、CH1 細胞での CD69 の発現増強が、primary B 細胞の活性化とよく合致し、CD69 がデキストランによる B 細胞活性化を調べる上での良い指標となることが明らかとなった。

ついで、NP 特異的な膜型 IgM とカテプシン B デキストラナーゼ融合タンパク質を発現する CH1 細胞を樹立した。この細胞を NP-デキストランで刺激したところ、NP デキストランの分解が促進され、エンドソーム/リソソームに局在するカテプシン B デキストラナーゼがデキストランを分解することが明らかとなった。これらの結果から、酵素活性を不活化したカテプシン B との融合タンパク質を作製することで、微生物の分泌タンパク質であるデキストラナーゼを、動物細胞のエンドソーム/リソソームでデキストランを分解するようなリソソーム酵素に変換されることが明らかとなった。また、カテプシン B デキストラナーゼを発現する CH1 細胞では、NP-デキストランで刺激しても CD69 の発現増強が起らなかった。これらの結果から、多糖抗原がエンドソーム/リソソームで分解されずに長時間保持されることが、多糖抗原による B 細胞の活性化で重要な役割を果たすことが明らかとなった。

Primary B 細胞でも多糖抗原のエンドソーム/リソソームの保持が多糖抗原による T 細胞非依存的な B 細胞の活性化で重要な役割を明らかにするため、カテプシン B デキストラナーゼ融合タンパク質を発現するマウスの作製を行った。Cre リコンビナーゼ依存的に発現するようデザインしたカテプシン B デキストラナーゼ融合遺伝子 cDNA を ROSA26 遺伝子座に挿入するためのターゲットベクターを作製し、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によりノックインマウスの作出を行った。インジェクションと得られた産仔のスクリーニングを繰り返し、カテプシン B-デキストラナーゼ遺伝子が ROSA26 遺伝子座に挿入された組み換えマウスを得ることができた。さらに、カテプシン B-デキストラナーゼノックインマウスを、B 細胞で特異的に Cre が発現する CD19-cre マウスと交配したマウスを作製し、このマウスの B 細胞でカテプシン B-デキストラナーゼタンパク質が産生されていることを明らかにした。このマウスは、デキストランによる T 細胞非依存的な B 細胞の活性化や抗体産生の仕組みを明らかにする上で有用なモデルになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Long Wang, Kunitake Shinji, Sawada Shin-ichi, Akiyoshi Kazunari, Tsubata Takeshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Protein antigen conjugated with cholesteryl amino-pullulan nanogel shows delayed degradation in dendritic cells and augmented immunogenicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 7526 ~ 7530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2021.11.047	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 -
1. 著者名 Tsubata Takeshi	4. 巻 307
2. 論文標題 Role of inhibitory B cell co receptors in B cell self tolerance to non protein antigens*	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 53 ~ 65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imr.13059	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 -
1. 著者名 Li Yingqian, Tang Yue, Liu Jun, Meng Xin, Wang Ying, Min Qing, Hong Rongjian, Tsubata Takeshi, Hase Koji, Wang Ji-Yang	4. 巻 34
2. 論文標題 Glia maturation factor- is involved in S1P-induced marginal zone B-cell chemotaxis and optimal IgM production to type II T-independent antigen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 35 ~ 43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab097	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 該当する
1. 著者名 Wang Ying, Liu Jun, Akatsu Chizuru, Zhang Runyun, Zhang Hai, Zhu Han, Liu Kangwei, Zhu Han-Ying, Min Qing, Meng Xin, Cui Chaoqun, Tang Yue, Yu Meiping, Li Yaxuan, Feng Xiaoqian, Wei Hao, Wen Zichao, Ji Sihan, Weigert Martin G., Tsubata Takeshi, Wang Ji-Yang	4. 巻 119
2. 論文標題 LAPTM5 mediates immature B cell apoptosis and B cell tolerance by regulating the WWP2-PTEN-AKT pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2205629119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2205629119	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 布川朝陽, 松村佳奈, Huang Yuming, 鏑田武志
2. 発表標題 多糖抗原によるB細胞活性化メカニズムの解明
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuming HUANG, Kana MATSUMURA, Nazim MEDZHIDOV, Toshitaro TAKATA, Miao TANG, Takeshi TSUBATA
2. 発表標題 The mechanism of T cell-independent B cell activation to bacterial polysaccharides
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuming Huang, Kana Matsumura, Nazim Medzhidov, Toshitaro Takata, Miao Tang, Takeshi Tsubata
2. 発表標題 The mechanism for T cell-independent B cell activation by the bacterial polysaccharide dextran
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松村 佳奈, Nazim Medzhidov, 鏑田 武志
2. 発表標題 多糖に対する抗体産生のメカニズムの解明
3. 学会等名 第 94 回日本生化学 会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村佳奈、Nazim Medzhidov, 鏑田 武志
2. 発表標題 糖に対する抗体産生のメカニズムの解明
3. 学会等名 日本生化 学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kana Matsumura, Takeshi Tsubata
2. 発表標題 Persistence of antigens in endosome/lysosome is essential for B cell response to T1-2 polysaccharide antigens.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinji Kunitake, Wang Long, Takeshi Tsubata
2. 発表標題 Conjugation with pullulan enhances production of specific antibodies by augmenting activation of dendritic cells
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021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
研究 分担者	スルタン ソフィア・シェリル (Sultan Sophia Cheryl) (20838437)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・非常勤講師 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	沼本 修孝 (Numoto Nobutaka) (20378582)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授 (12602)	

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