

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390121

研究課題名(和文) 胚中心におけるリンパ球分化の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of memory B cell differentiation in germinal centers

研究代表者

徳久 剛史 (Tokuhiisa, Takeshi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20134364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：ワクチン療法の原動力である高親和性IgG産生メモリーB細胞や長期生存プラズマ細胞の胚中心での分化誘導におけるIL-21とBCL6の機能をIL-21やBCL6の機能改変マウスを用いて解析した。その結果、高親和性IgG抗体を産生する長期生存プラズマ細胞の分化にはIL-21が必須であることや、IL-21とBCL6はIgEへのクラススイッチを抑制することにより高親和性IgG産生メモリーB細胞や長期生存プラズマ細胞の分化を増強することを明かにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate a role of IL-21 or Bcl6 in differentiation of high affinity IgG producing memory B cells and long-lived plasma cells in germinal centers, we used IL-21-deficient or Bcl6-deficient mice. Using these mice, we demonstrated that IL-21 is essential to differentiation of high affinity IgG producing long-lived plasma cells, and that IL-21 or Bcl6 represses the Ig class switch recombination to IgE and augments the differentiation of high affinity IgG producing memory B cells and long-lived plasma cells.

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リンパ球 胚中心 サイトカイン 抗体産生細胞 IgE抗体

## 1. 研究開始当初の背景

ワクチン療法の原動力である高親和性 IgG 産生メモリー B 細胞や長期生存プラズマ細胞は、二次リンパ器官の胚中心 (Germinal Center: GC) で分化する。

脾臓では、抗原の侵入により濾胞内で特異的な成熟 B 細胞が活性化される。また T 細胞領域内で抗原を提示した樹状細胞により活性化されたヘルパー T 細胞の一部が CXCR5 陽性の濾胞ヘルパー T (T follicular helper; Tfh) 細胞となる。この両者が T/B Collaboration を起こして相互に活性化される。この活性化 B 細胞の一部が、CXCR4 を発現上昇させて Centroblast として濾胞内で増殖して胚中心を形成する。この Centroblast 内では、抗体遺伝子 V 領域において高率に体細胞超突然変異 (Somatic Hypermutation: SHM) を起こして抗原に対する親和性を変化させる。その後、Centroblast は Centrocyte となり CXCR4 の発現を低下させて濾胞樹状細胞の存在する場所に移動する。Centrocyte では IgG へのクラススイッチにより V 領域に変異をもつ IgG 抗体を細胞表面に発現させ、抗原に対して親和性がより強いクローンが、濾胞樹状細胞上の抗原と選択的に反応する。また、CXCR5 陽性の Tfh 細胞は、胚中心に移動して GL7 陽性の GC-Tfh 細胞に分化する。さらに、濾胞樹状細胞上の抗原を取り込んで活性化した Centrocyte は、GC-Tfh 細胞と T/B Collaboration を起こして、GC-Tfh 細胞からの IL-4 や IL-21 などの刺激を受けて、高親和性 IgG 産生メモリー B 細胞や長期生存プラズマ細胞へと分化する。しかし、その分化の分子機構の詳細は未だ不明である。

また、花粉症などのアレルギー患者は抗原の飛散しない時期にも高親和性 IgE 抗体が高値を示すことから、高親和性 IgE 抗体産生長期生存プラズマ細胞の存在が示唆されている。しかし、その分化の場所や機序なども明らかにされていない。さらに、高親和性 IgE 産生細胞の分化における GC-Tfh 細胞や Th2 細胞の役割なども未だ不明である。

申請者らはすでに、胚中心で強発現している BCL6 の欠損 (KO) マウスを作製し、活性化 B 細胞内における BCL6 の発現が胚中心形成に必須であることを明らかにした。さらに胚中心が欠損しても低親和性 IgG 産生メモリー B 細胞が分化できることから、胚中心は B 細胞が抗原に対する親和性を高める場であることや、長期生存プラズマ細胞は胚中心 B 細胞からのみ分化することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

IL-21 や BCL6 の機能改変マウスを用いて、

(1) 胚中心における高親和性 IgG 産生メモリー B 細胞や長期生存プラズマ細胞の分化誘導機序や、

(2) 高親和性 IgE 産生長期生存プラズマ細胞の分化誘導機序などを分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 高親和性 IgG 産生メモリー B 細胞の分化誘導機序の解析

IL-21 レセプター欠損 (IL-21R-KO) マウスを抗原 NP-CG とアジュバント (Alum) で免疫して、経時的に採血して血中 IgM や IgG1 抗 NP 抗体価を親和性ととも測定する。

上記のマウス脾臓における胚中心形成を、組織学的に解析したり、FACS を用いて解析する。

免疫後 10 日目における IL-21R-KO マウスや (IL-21R-KO x Lckd-BCL6-Tg) マウス脾臓由来の IgG1 陽性の胚中心 B 細胞を FACS で分取する。この胚中心 B 細胞から DNA を分離して、抗体遺伝子 V 領域 (VH186.2) の遺伝子を PCR 法で解析する。

(2) 高親和性 IgG1 産生長期生存プラズマ細胞の分化誘導機序の解析

IL-21R-KO マウスを抗原 NP-CG と Alum で免疫して 4 - 5 週後に、骨髄細胞を分離して、IgG1 抗 NP 抗体産生プラズマ細胞を ELISPOT 法により解析する。

(IL-21R-KO x Lckd-BCL6-Tg) マウスを抗原 NP-CG と Alum で免疫して、上記と同様の解析を行う。

(3) In vitro 系での IgG1 産生長期生存プラズマ細胞の分化誘導機序の解析

正常マウス脾臓由来の成熟 B 細胞を抗 IgM 抗体と抗 CD40 抗体と IL-4 で刺激する。その後、IL-21 で再刺激して 6 日目の培養上清中の IgG1 抗体価を ELISA 法で測定する。

成熟 B 細胞を抗 IgM 抗体と抗 CD40 抗体と IL-4 で刺激した後、3 日目に IL-21 で再刺激して 6 日目の培養細胞中のプラズマ細胞数を抗 CD138 (抗 Syndecan-1) 抗体と FACS で解析する。さらにプラズマ細胞の分化に関係する分子の発現をモノクローナル抗体と FACS を用いて解析する。

(4) In vitro 系を用いた IgE 産生長期生存プラズマ細胞の分化誘導機序の解析

IL-21R-KO マウス、Lckd-BCL6-Tg マウスや (IL-21R-KO x Lckd-BCL6-Tg) マウスの

脾臓由来の成熟 B 細胞を抗 IgM 抗体と抗 CD40 抗体と IL-4 で刺激する。その後、IL-21 で再刺激して 6 日目の培養上清中の IgE 抗体価を ELISA 法で測定する。

上記の実験から IgE の産生が最大となる培養系を用いて成熟 B 細胞を刺激培養して 6 日目の培養細胞中の IgE 産生プラズマ細胞の頻度を抗 CD138 抗体と FACS で解析する。

上記の細胞を CFSE でラベルした後、同系正常マウスに移植して 40 日後の骨髄や脾臓における IgE 産生長期生存プラズマ細胞の分化を FACS により解析する。

#### (5) In vivo 系を用いた高親和性 IgE 産生長期生存プラズマ細胞の分化誘導機序の解析

IL-4 遺伝子座内の DNA 領域 (IL-4 Intron2) 400bp を欠損させた (IE-KO) マウスを作製して NP-CG で免疫したところ、その Th2 細胞は IL-4 を全く産生できないのに、GC-Tfh 細胞では正常マウスと同様に IL-4 産生がみられることを見出している。そこで Th2 細胞からの IL-4 が IgG1 や IgE 抗体産生に重要であるかを明らかにするために、この IE-KO マウスを用いて以下の実験を行う。

IE-KO マウスを抗原 NP-OVA で免疫して IgG1 や IgE 抗 NP 抗体の産生を ELISA 法で解析する。

D011-10-Tg、(IE-KO x D011-10-Tg) や (BCL6-KO x D011-10-Tg) マウス由来の CD4 T 細胞から In vitro 系で OVA 特異的 Th2 細胞を誘導する。この Th2 細胞を同系の IE-KO マウスに移入した後、抗原 NP-OVA で免疫して IgE 抗 NP 抗体の産生を ELISA 法で解析する。

(IL-21-KO x D011-10-Tg) マウス由来の CD4 T 細胞から In vitro 系で OVA 特異的 Th2 細胞を誘導する。この Th2 細胞を同系の IE-KO マウスに移入した後、抗原 NP-OVA で免疫して IgE 抗 NP 抗体の産生を ELISA 法で解析する。

上記における Th2 細胞の存在する場を抗 TCR (KJ1-26) 抗体で組織学的に同定することにより、IgE 抗 NP 抗体産生細胞が分化する場を組織学的に明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) IL-21R-KO マウスを抗原 NP-CG で免疫して、血中 IgM や IgG1 抗 NP 抗体価を親和性とともに測定したところ、胚中心形成が著しく低下し、高親和性抗体の産生がほとんど見られなかった。さらに免疫して 4 - 5 週後に、IgG1 抗 NP 抗体産生長期生存プラズ

マ細胞を ELISPOT 法により解析したところ、ほとんど検出できなかった。この結果から、長期生存プラズマ細胞の分化には IL-21 が必須であることを明らかにした。

(2) IL-21R-KO マウスを抗原 NP-CG と Alum で免疫後 7 日目と 14 日目における脾臓由来の IgG1 陽性の胚中心 B 細胞を IgG1, Fas, GL7 に対する抗体と反応させて FACS で分取する。これらの胚中心 B 細胞の抗体遺伝子 V 領域 (VH186.2) の遺伝子解析を行ったところ SHM の頻度が正常マウスからの胚中心 B 細胞の頻度よりも著しく低いことを明らかにした。このことから、IL-21 が高親和性 IgG1 抗体産生メモリー B 細胞や長期生存プラズマ細胞の分化に必須であることを明らかにした。

(3) IL-21 や BCL6 の機能改変マウスの脾臓由来の成熟 B 細胞を抗 IgM 抗体と抗 CD40 抗体と IL-4 で刺激した。その後、IL-21 で再刺激して 6 日目の培養上清中の IgE 抗体価を ELISA 法で測定した。その結果、IL-21 は IgE へのクラススイッチを抑制することにより IgG1 抗体産生を増強することや、細胞内 BCL6 の量と IgE 抗体産生量が負の相関することから BCL6 は IgE へのクラススイッチを抑制することを明かにした。

(4) IE-KO マウスを抗原 OVA と Alum で免疫後に鼻腔から OVA を感作して、7 日目と 14 日目における血中 IgE や IgG1 抗 OVA 抗体量を ELISA 法で測定した。その結果、IgG1 抗 OVA 抗体価は正常であったが、IgE 抗 OVA 抗体の産生は全く見られなかった。また、感作 IE-KO マウス由来のヘルパー T 細胞の機能を解析したところ、OVA 刺激により濾胞ヘルパー T 細胞では IL-4 の産生が見られたが、Th2 細胞では見られなかった。これらの結果から、IgE 抗体産生には Th2 細胞からの IL-4 が必須であることが示唆された。

(5) D011-10-Tg マウス由来の Th2 細胞や濾胞ヘルパー T 細胞を IE-KO マウスに移入した後 OVA で感作したところ、Th2 細胞の移入により IgE 抗 OVA 抗体の産生が見られたが、濾胞ヘルパー T 細胞の移入では見られなかった。この結果、IgE 抗体産生には Th2 細胞からの IL-4 が必須であることが明らかとなった。すでに Th2 細胞は組織中に遊走することから、IgE 抗体産生細胞の分化は、胚中心ではなく組織中で起き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 14 件)

Ikari J, Inamine A, Yamamoto T, Watanabe-Takano H, Yoshida N, Fujimura L, Taniguchi T, Sakamoto A, Hatano M, Tatsumi K, Tokuhiisa T, and Arima M. Plant homeodomain finger protein 11 promotes class switch recombination to IgE in murine activated B cells. *Allergy* 69:223-230, 2014. 査読有, doi: 10.1111/all.12328.

Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, Tokuhiisa T, Oda S, and Hatano M. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit. Care* 17:R160, 2013. 査読有, PMID: 23883625.

Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano M, Arima M, Miyata S, Nagai N, Tokuhiisa T, and Matsuo O. Lack of both

2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. *Life Sci.* 93:89-95, 2013. 査読有, doi: 10.1016/j.lfs.2013.05.023.

Hirata H, Arima M, Fukushima Y, Sugiyama K, Tokuhiisa T, and Fukuda T. Leukotriene C4 aggravates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respirology* 18:674-681, 2013. 査読有, doi: 10.1111/resp.12072.

Tsuruoka N, Arima M, Yoshida N, Okada S, Sakamoto A, Hatano M, Satake H, Arguni E, Wang Ji-Y, Yang J-H, Nishikura K, Sekiya S, Shozu M, and Tokuhiisa T. ADAR1 protein induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6 gene-deficient cells. *J. Biol. Chem.* 288:826-836, 2013. 査読有, doi: 10.1074/jbc.M112.365718.

Huang J, Li X, Kohno K, Hatano M, Tokuhiisa T, Murray PJ, Brocker T, and Tsuji M. Generation of tissue-specific H-2K(d) transgenic mice for the study of K(d)-restricted malaria epitope-specific CD8(+) T-cell responses in vivo. *J. Immunol. Methods* 387:254-261, 2013. 査読有, doi: 10.1016/j.jim.2012.10.019.

Ouchida R, Mori H, Hase K, Takatsu H, Kurosaki T, Tokuhiisa T, Ohno H, and Wang Ji-Yang. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B cell

survival, and humoral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:2699-2706, 2012. 査読有, doi: 10.1073/pnas.1210706109.

Shigeta A, Tada Y, Wang JY, Ishizaki S, Tsuyusaki J, Yamauchi K, Kasahara Y, Iesato K, Tanabe N, Takiguchi Y, Sakamoto A, Tokuhiisa T, Shibuya K, Hiroshima K, West J, and Tatsumi K. CD40 amplifies Fas-mediated apoptosis: a mechanism contributing to emphysema. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 303:141-151, 2012. 査読有, doi:10.1152/ajplung.00337.2011.

Ohnuki H, Inoue H, Takemori N, Nakayama H, Sakaue T, Fukuda S, Miwa D, Nishiwaki E, Hatano M, Tokuhiisa T, Endo Y, Nose M, and Higashiyama S. BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signalling in angiogenesis. *Blood* 119:2688-2698, 2012. 査読有, doi: 10.1182/blood-2011-03-345306.

Seto T, Yoshitake M, Ogasawara T, Ikari J, Sakamoto A, Hatano M, Hirata H, Fukuda T, Kuriyama T, Tatsumi K, Tokuhiisa T, and Arima M. Bcl6 in pulmonary epithelium coordinately controls the expression of the CC-type chemokine genes and attenuates allergic airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy* 41:1568-1578, 2011. 査読有, doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03836.x.

Hirata H, Arima M, Fukushima Y, Honda K, Sugiyama K, Tokuhiisa T, and Fukuda T. Over-expression of the LTC(4) synthase gene in mice reproduces human aspirin-induced asthma. *Clin. Exp. Allergy* 41:1133-1142, 2011. 査読有, doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03720.x.

Shimada T, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Watanabe E, Abe R, Nakada TA, Tateishi Y, Otani S, Hirasawa H, Tokuhiisa T, and Uno H. Outcome prediction in sepsis combined use of genetic polymorphisms - A study in Japanese population. *Cytokine* 54:79-84, 2011. 査読有, doi: 10.1016/j.cyto.2010.12.001.

Yoshida N, Kitayama D, Arima M, Sakamoto A, Inamine A, Takano H, Hatano M, Koike T, and Tokuhiisa T. CXCR4 expression on activated B cells is down-regulated by CD63 and IL-21. *J. Immunol.* 186:2800-2808, 2011. 査読有, doi: 10.4049/jimmunol.1003401.

Ohtsuka H, Sakamoto A, Pan J, Inage S, Horigome S, Ichii H, Arima M, Hatano M, Okada S, and Tokuhisa T. Bcl6 is required for the development of mouse CD4<sup>+</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. J. Immunol. 186:255-263, 2011. 査読有, doi: 10.4049/jimmunol.0903714.

研究者番号：00202763

坂本 明美 (SAKAMOTO AKEMI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：90359597

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

〔学会発表〕(計 7 件)

徳久剛史「免疫記憶細胞の形成と維持」  
東京免疫フォーラム 2014年2月24日  
(東京)

徳久剛史、有馬雅史「IgE抗体産生機構と  
制御法の開発」第25回日本アレルギー学  
会 2013年5月12日(横浜)

Tokuhisa T. 「Development of High  
Affinity IgE B Cells」Chiba and Auckland  
University Immunology Forum Feb 23,  
2013 (New Zealand)

徳久剛史「免疫記憶細胞の形成と維持」  
第40回日本臨床免疫学会 2012年9月  
29日(東京)

徳久剛史「若き臨床研究者たちへ」第51  
回日本鼻科学会 2012年9月28日(幕張  
メッセ)

徳久剛史「免疫記憶と慢性アレルギー」  
第6回日本アミノ酸学会 2012年9月28  
日(松戸市)

徳久剛史「老化すると免疫記憶にもボケ  
がでるか」第11回日本抗加齢医学会「加  
齢と免疫」シンポジウム 2011年5月28  
日(京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

分化制御学教室のホームページのURLは、以  
下の通りである。

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devgen>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳久 剛史 (TOKUHISA TAKESHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：20134364

### (2) 研究分担者

有馬 雅史 (ARIMA MASAFUMI)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師