

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月7日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790537

研究課題名（和文）

新規なマウス濾胞樹状細胞株を用いる胚中心B細胞選択機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of selection mechanisms of germinal center B cells by using a novel follicular dendritic cell line.

研究代表者：曲 正樹 (MAGARI MASAKI)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：50359882

研究成果の概要（和文）：胚中心において、B細胞は免疫複合体を保持している濾胞樹状細胞とIL-21を産生する濾胞ヘルパーT細胞（Tfh）によるクローン選択を受ける。細胞レベルでこの選択機構を解析するため、我々は濾胞樹状細胞株、FL-YBを利用し、*in vitro*において胚中心B細胞を解析することが出来る培養系を構築した。FL-YBは、BAFF依存的にマウスB細胞の生存を促進する。興味深いことに、我々は、主にTfhから産生され、単独ではB細胞に対し生存促進効果を示すIL-21が、FL-YBとの共培養時には、逆に急速なB細胞死を誘導することを見いだした。このIL-21依存的なB細胞死は、FL-YBから産生される低分子の可溶性因子に依存しており、この可溶性因子がプロスタグランジンE<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）であること同定した。さらに、IL-21/PGE<sub>2</sub>によりB細胞を刺激すると、転写因子Foxo1とその下流に存在する、アポトーシス促進因子の一つとして知られているBimの発現が上昇することを発見した。また、IL-21/PGE<sub>2</sub>によるB細胞死には、PGE<sub>2</sub>受容体のなかでも、EP4が重要であった。これは、PGE<sub>2</sub>がB細胞に対し、IL-21の作用を反転させる内因性のケミカルメディエーターであることを示す。さらに、IL-21/PGE<sub>2</sub>によるB細胞死は、抗CD40抗体の刺激により救済された。また、IL-21受容体欠損マウスにおいて、免疫後、胚中心内のcaspase3陽性B細胞の頻度は優位に減少しており、これと一致して、抗体の親和性成熟も抑制されていた。以上の結果は、IL-21/PGE<sub>2</sub>誘導性のB細胞死が、胚中心内のB細胞選択において重要な役割をもつことを示す。

研究成果の概要（英文）：In germinal centers (GCs), B cells are selected through interaction with follicular dendritic cells bearing immune complexes and follicular helper T (Tfh) cells secreting Tfh cytokines, including IL-21. To analyze these cellular interactions, we have explored culture conditions that can simulate GC B cell selection *in vitro* using a mouse follicular dendritic cell line, FL-YB. FL-YB cells efficiently enhanced viability of cocultured mouse B cells in a BAFF-dependent fashion. Interestingly, we found that addition of IL-21, a major Tfh cytokine, readily induced death of B cells that were cocultured with FL-YB cells, whereas IL-21 alone sustained viability of B cells in the absence of FL-YB cells. The IL-21-induced death was dependent on a low m.w. soluble factor that was released

from FL-YB cells, which was finally identified as PGE<sub>2</sub>. Treatment of B cells with IL-21 plus PGE<sub>2</sub>, but not either alone, resulted in enhanced expression of a proapoptotic protein Bim and the upstream transcription factor Foxo1. A PGE<sub>2</sub> receptor isoform, EP4, was responsible for IL-21/PGE<sub>2</sub>-induced B cell death. Thus, PGE<sub>2</sub> is an endogenous chemical mediator that can switch pleiotropic actions of IL-21 on B cells. IL-21/PGE<sub>2</sub>-induced B cell death was rescued if B cells were costimulated via CD40. In immunized mice, deficiency of IL-21R in B cells led to a significant decrease in the frequency of activated caspase-3-positive GC B cells concomitant with impaired affinity maturation of Abs. Taken together, results implicate a physiological role of IL-21/PGE<sub>2</sub>-induced B cell death in GC B cell selection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：抗体の親和性成熟，胚中心，濾胞樹状細胞

### 1. 研究開始当初の背景

生体内に病原体（抗原）が侵入した際，リンパ球の一種であるB細胞より産生される抗体は，その排除において必要な役割をもつ。抗原により活性化されたB細胞は最終的に抗体産生細胞へと分化するが，その過程で一部のB細胞は活発に増殖しリンパ節内に胚中心と呼ばれる微小環境を形成する。胚中心は，主に抗原により活性化したB細胞，濾胞ヘルパーT細胞（Tfh細胞）そして濾胞樹状細胞（FDC）より構成され，その三者の相互作用により，B細胞の抗体分子の多様化と抗原に対する親和性に基づく高親和性クローンの選択による，親和性成熟が達成されると考えられている。抗体の親和性成熟は，効率良い病原体の排除に重要なプロセスであるが，現在までB細胞の多様化誘導機構や高親和性クローンの選択機構など，不明な点が多数存在する。その主たる原因として，胚中心の形成および

高親和性クローンの選択に重要であるとされているFDCが生体内には少数しか存在せず，安定な単離，維持が困難なため，*in vitro*での詳細な解析が不可能であったことが挙げられる。

これらの問題を解決するべく，申請者らはマウスFDC株の樹立を試み，カラーゲンゲル三次元培養法を用いることにより，免疫したマウスのリンパ節より初めてFDC株（FL-YB）の樹立に成功した。さらには，FDC株の遺伝子改変も可能であって。これは，胚中心内の細胞間相互作用を*in vitro*で解析するために非常に有用なツールと成り得る。

### 2. 研究の目的

本研究課題では，申請者らが独自に確立した新規*in vitro*胚中心反応解析系を利用し，抗体の親和性成熟機構，特に多様化したB細胞の抗原に対する親和性に基づく選択機構の

解明を目的とした。

申請者は、それぞれ生存促進効果をもつ IL-21 と FL-YB を B 細胞と共培養すると、逆に積極的に B 細胞死が誘導することを発見していた。これは、IL-21 の多面的な作用を FDC が制御する事を示唆する。更に、IL-21 の作用を反転させる FDC 由来因子がプロスタノイドの 1 種であるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) である事を発見していた。一方で、この B 細胞死は高親和性クローンが Tfh より受けるとされている CD40 刺激により救済された。以上の結果は、胚中心内での B 細胞選択において、Tfh と FDC が高親和性クローンの正の選択のみならず IL-21 と PGE<sub>2</sub> による低親和性クローンの負の選択に関与する可能性を示唆している。

そこで、本研究では、IL-21 と FDC の関与する B 細胞アポトーシス誘導メカニズムの解析及び IL-21/PGE<sub>2</sub> 誘導性アポトーシスの抗体の親和性成熟への関与、特に低親和性 B 細胞の負の選択機構への寄与について詳細な解析を行った。

### 3. 研究の方法

IL-21 と PGE<sub>2</sub> により誘導される活性化 B 細胞アポトーシス誘導のメカニズムを解明し、親和性成熟への寄与を解析するため、以下の検討を行った。

- (1) IL-21/PGE<sub>2</sub> により誘導される B 細胞アポトーシスに関与する PGE<sub>2</sub> レセプターを同定するため、抗原 TNP-KLH を免疫したマウスよりリンパ節細胞を回収し、抗 Thy1.2 抗体を結合したマグネティックビーズを用いて T 細胞を除去し、B 細胞のみを単離した。その後、各レセプターの mRNA 発現を RT-PCR 法とフローサイトメーターを用いて検討した。
- (2) IL-21/PGE<sub>2</sub> によるアポトーシスに関与する可能性のある因子を (1) で同定した後、各

PGE<sub>2</sub> レセプターに対するアゴニスト、アンタゴニストやターゲット分子に対する阻害剤を利用し、IL-21/PGE<sub>2</sub> によるアポトーシスの誘導メカニズムについて検討した。

(3) IL-21/FDC による B 細胞アポトーシスの Bcl-2 ファミリー因子の関与を検討するため、(1) と同様に調製した B 細胞を、IL-21 と PGE<sub>2</sub> を含む培地で 1 日間培養した。その後、培養した B 細胞より mRNA を抽出し、Bcl2 ファミリー分子 (Bcl-2, Bim, Bcl-xL, Bax) の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて解析した。

(4) 活性化 B 細胞での PGE<sub>2</sub> レセプター及び IL-21 レセプター (IL-21R) 発現パターンを解析するため、抗原を免疫したマウスの脾臓細胞を回収し、胚中心 B 細胞での PGE<sub>2</sub> レセプターおよび IL-21R の発現量を RT-PCR 法とフローサイトメーターを用いて検討した。

(5) IL-21/PGE<sub>2</sub> によるアポトーシスの、抗体の親和性成熟に関与を解析するため、IL-21R ノックアウト (IL-21R-KO) マウスに抗原 NP-CGG を免疫した後、免疫染色とフローサイトメーターを用い、胚中心内のアポトーシス細胞の頻度について検討した。更に、免疫マウスの血清中の抗 NP IgG 抗体の親和性を ELISA 法を用いて評価した。

### 4. 研究成果

- (1) 免疫したマウスのリンパ節細胞における PGE<sub>2</sub> 受容体の発現を解析した結果、EP1, EP2, EP4 の発現が認められた。
- (2) 様々な PGE<sub>2</sub> 受容体のアンタゴニストおよびアゴニストを用いて、IL-21/PGE<sub>2</sub> 誘導性の B 細胞アポトーシスについて検討した結果、IL-21/PGE<sub>2</sub> 誘導性のアポトーシスには EP4 からのシグナルが重要であった。
- (3) 免疫マウスより調整した B 細胞を IL-21/PGE<sub>2</sub> で刺激した結果、アポトーシス促進因子 Bim と転写因子 Foxo1 mRNA の発

現増加が見られた。更に、IL-21/PGE<sub>2</sub> 誘導性の B 細胞アポトーシスは Bim ノックアウトマウスでは見られなかった事から、IL-21/PGE<sub>2</sub> 誘導性のアポトーシスには、Foxo1-Bim 経路が関与することが示唆された。

(4) 免疫したマウスの IL-21 受容体および EP4 の発現レベルを検討した結果、活性化 B 細胞と比較し、胚中心 B 細胞においてわずかに発現上昇が認められた。

(5) 生体内での IL-21/PGE<sub>2</sub> 誘導性の B 細胞死を調べるため、IL-21 受容体欠損マウスおよび PGE<sub>2</sub> 合成阻害剤であるインドメタシンと PGE<sub>2</sub> 受容体のアンタゴニストを用いた。その結果、IL-21 受容体欠損マウスにおいて、胚中心内のアポトーシス細胞の減少が認められた。また、インドメタシンと PGE<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストを投与したマウスにおいても同様の傾向が認められた。更に、IL-21 受容体欠損マウスにおいては、抗体の親和性成熟の抑制が認められた。

以上の結果は、FDC (PGE<sub>2</sub>) と IL-21 による胚中心 B 細胞死の誘導が抗体の親和性成熟において、負の選択機構の一端であることを示唆する。

抗体の親和性成熟機構の解明は、効果的なワクチンの開発や免疫賦活剤の開発の基礎的な研究となる。また、IL-21 の多面的な作用は、がん治療などの標的分子としても注目されている。そのため、IL-21 の多面的な作用と FDC による制御機構を明らかにし、更にその分子メカニズムを明らかにする事は、がん治療などへの応用が期待出来る。

## 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 4 件)

① Kanehiro, Y., Todo, K., Negishi, M., Fukuoka, J., Gan, W., Hikasa, T., Kaga, Y., Takemoto, M., Magari, M., Li, X., Manley, J.L., Ohmori, H., Kanayama, N.,  
Activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation requires splice isoform of the serine/arginine-rich (SR) protein SRSF1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 109:** 1216-1221. (2012) (査読有)  
DOI: 10.1073/pnas.1120368109.

② 曲正樹、金山直樹、大森斉  
胚中心における B 細胞の negative selection と濾胞樹状細胞  
臨床免疫・アレルギー科 Vol. 58 (3), pp.259-265. (査読無)

③ Magari, M., Nishikawa, Y., Fujii, Y., Nishio, Y., Watanabe, K., Fujiwara, M., Kanayama, N., Ohmori, H.,  
IL-21-dependent B cell death driven by prostaglandin E<sub>2</sub>, a product secreted from follicular dendritic cells.  
**J. Immunol.187:** 4210-4218. (2011) (査読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.1100934.

[学会発表] (計 13 件)

① 岩崎映理子他、IL-34 依存的に発生する新規単球系細胞による胚中心 B 細胞の分化誘導、第 35 回日本分子生物学会年会、2012. 12. 11. 福岡

② 谷本晃他、濾胞樹状細胞依存的に発生する新規 CD11b+CXCR4+単球系細胞の解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012. 12. 11. 福岡

③ 山根文寛他、IL-34 依存的に発生する新規単球系細胞の分化機構；IL-34 と CSF1 の異なる作用、第 35 回日本分子生物学会年会、2012. 12. 11. 福岡

④ 川口祐加他、スプライシング因子 SRSF1 のアイソフォーム SRSF1-3 は、R-loop を形成することで IgV 高頻度突然変異を誘導する、第 35 回日本分子生物学会年会、2012. 12. 11. 福岡

⑤ Magari Masaki et al., IL-34-dependent monocytic cells that promote centroblast-associated phenotype expression in mouse activated B cells. 2012 日本免疫学会総会・学術集会、2012. 12. 6. 神戸

⑥ Kanayama Naoki et al., A splicing isoform of the splicing factor SRSF1, SRSR1-3, has role in R-loop formation in IgV hypermutation. 2012 日本免疫学会総会・学術集会、2012.12.6. 神戸

⑦ 松井一恵他、IL-34 依存的に発生する新規な単球系細胞による胚中心 B 細胞への分化促進、第 31 回岡山免疫懇話会、2012.3.7. 岡山

⑧ Koji Watanabe et al., IL-21-dependent germinal center B cell death driven by prostaglandin E2, a product secreted from follicular dendritic cells. 第 5 回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム、2012.1.15-16. 岡山

⑨ 曲正樹他、IL-34 依存的に発生する新規ミエロイド系細胞；IL-34 と M-CSF の異なる作用、第 34 回日本分子生物学会年会、2011.12.14. 横浜

⑩ 曲正樹他、IL-21 依存的な胚中心 B 細胞死は FDC より産生されるプロスタグランジン E2 により誘導される、2011 免疫学会総会・学術集会、2011.11.28. 千葉

⑪ 松井一恵他、A novel class of IL-34-dependent CD11b+ Gr-1+ myeloid lineage cells induce expression of centroblast phenotypes in activated B cells、2011 免疫学会総会・学術集会、2011.11.28. 千葉

⑫ 金山直樹他、AID に依存した IgV 変異には、SR タンパク質 SRSF1 のスプライスアイソフォームが必要である、2011 免疫学会総会・学術集会、2011.11.28. 千葉

⑬ 金山直樹他、AID に依存した体細胞突然には、SR タンパク質 SRSF1 のスプライスアイソフォームが必要である、第 84 回日本生化学会大会、2011.9.23-24. 京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曲 正樹 (MAGARI MASAKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：50359882

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：