

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860327

研究課題名(和文) 胚中心B細胞に発現するCD3分子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of CD3 molecule expressing in germinal center B cells

研究代表者

藤堂 景史 (Todo, Kagefumi)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：50452561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢リンパ組織内の胚中心でのB細胞の正・負の選択機構の分子メカニズムの詳細は明らかでない。この異常は種々の自己免疫疾患発症の引き金になると考えられていることから、この機構の詳細を明らかにすることは重要である。本研究では、T細胞特異的に発現する分子であるCD3が、胚中心B細胞に発現していることを明らかにした。また、この胚中心B細胞に発現するCD3分子は細胞死と関連していること明らかとした。さらには、B細胞でCD3を欠損したマウスは高い抗体産生や自己抗体の産生など、胚中心でのB細胞の負の選択の異常を認めた。胚中心B細胞に発現するCD3分子は胚中心でのB細胞の選択に重要であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of positive and negative selection of B cells in germinal center during the immune response have not been fully elucidated. It is important to understand these mechanisms because it has been thought that the dysregulation of the B cells selection in germinal center leads to autoimmune disease.

In this study, I revealed that CD3 molecule that is a major component of T cell antigen receptor complex expressed in germinal center B cells. In addition, these CD3-expressing B cells were highly sensitive apoptosis. Moreover, markedly increased levels of antigen-specific and auto-reactive antibodies were both detected when mice harboring CD3e-deficient B cells and normal T cells were immunized.

These results suggest that CD3e expressed in B cells plays critical roles in germinal center B cell selection during the immune response.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞 胚中心

1. 研究開始当初の背景

生体に感作した病原体等の外来抗原は、免疫システムによつて的確に認識され速やかに排除されるが、この的確な抗原認識を行うために重要となるのが、抗原認識細胞であるリンパ球の厳密な選択である。

無数に存在する抗原は、リンパ球の発現する多様な抗原受容体によつて認識される。抗原受容体は非常に多様性をもつが、それぞれのリンパ球は単一の抗原受容体のみを発現しており、単一の抗原受容体をリンパ球クローンの多様性により、抗原受容体の多様性が生み出されている。すなわち適切な抗原受容体をもつリンパ球が、適切な抗原を認識することで、数多量に存在する抗原を認識・排除することができる。

適切なリンパ球集団を生体内に形成するため、リンパ球は適切に選別される必要があるが、この選別は各々のリンパ球の発現する抗原受容体の特異性の違いよつて厳密に行われる。このリンパ球の選別は生命を維持するのに非常に重要なメカニズムであり、特に自己成分を認識するリンパ球の速やかな排除（負の選択）は、リンパ球の非自己応答性を担保するため必要不可欠なメカニズムである。このリンパ球の負の選択機構の破綻は、自己を構成する物質が免疫システムの攻撃対象になるため、自己免疫疾患発症の原因となる。すなわち、リンパ球の厳密な選択を通じて、生体の自己・非自己の厳密な区別を行っている。

リンパ球は大きく分類すると、細胞性免疫を担う T 細胞と、抗体産生を伴う体液性免疫を担う B 細胞とに分類できるが、T 細胞の選択は胸腺内で行われており、そのメカニズムに携わる分子は、CD3 などの T 細胞抗原受容体を形成する分子群、およびその細胞内シグナルを担っている一連の分子群であり、これらの分子の働きによつて T 細胞の選択が行われている。

一方、B 細胞の選択は 2 度あると考えられており、1 度目は、T 細胞の胸腺での選択に相当する骨髄内における選択。そしてもう一度は、抹消リンパ組織内での胚中心における B 細胞の親和性成熟機構の過程で起こる、高親和性 B 細胞の正の選択と、その際に生じる自己応答性の B 細胞の除去という負の選択である。

抗原に暴露された B 細胞は、抹消リンパ組織内の胚中心へと移行し、親和性成熟と呼ばれる B 細胞の抗原受容体の高機能化が行われる。この親和性成熟機構の過程において、B 細胞の抗原受容体はその抗原特異性が DNA レベルで改変されるため、再び特異性のチェックのための選択が必要となる。しかしながら、この親和性成熟の際の B 細胞の選択機構の詳細な分子メカニズムは明らかではない。

骨髄での B 細胞の選択や胸腺内での T 細胞の選択は古くから数多くの研究がなされてきており、多くの部分が解明されてきた。しかしながら、末梢組織の胚中心での B 細胞の選

択メカニズムの解明は、胚中心 B 細胞の数の少なさや、それに伴う解析の困難さによつて未だその詳細は明らかではない。胚中心の親和性成熟の際に導入される体細胞突然変異の蓄積によつて自己応答性を獲得する可能性があることが明らかとなっているが (*J. Exp. Med.* **207**, p2225, 2010)、これらの自己応答性の B 細胞がどのように効率よく取り除かれているかの詳細は明らかになっておらず、胚中心における B 細胞の選択機構の解明は自己免疫疾患の原因解明という点においても重要なことである。

細胞のアポトーシスを誘導する Fas/FasL 系や抗アポトーシス分子である Bcl-2 が胚中心での B 細胞の正・負の選択に関与していることはかなり以前から知られている。また最近でも、アポトーシス誘導性因子である Bim (*Blood* **110**, p3978, 2007) や抗アポトーシス分子である Mcl-1 (*Science* **330**, p109, 2010) のノックアウトマウスにおいて、胚中心における B 細胞の選択機構の破綻が報告されており、胚中心での B 細胞の選択機構にアポトーシスのメカニズムが深く関与していることは周知であるが、具体的にどのようなシグナルにより胚中心 B 細胞が細胞死に陥っているかについては明らかではない。胚中心では、抗原に対してより高親和性な受容体をもつ B 細胞クローン選択され、自己応答性を有する受容体を獲得したクローンが除去されるように、胚中心での B 細胞選択メカニズムは抗原受容体依存的に行われているため、選択に伴う細胞死を誘導するシグナルも抗原受容体からのシグナルが関与していることは容易に想像できるが、その選択を決定づける分子実体については未知のまま残されている。

2. 研究の目的

胚中心 B 細胞の選択機構の解明のため数多くの国際的研究がなされてきており、数多くの仮説が立てられてきているが、そのメカニズムの全容は明らかとなっていない。この胚中心での B 細胞選択メカニズムの破綻は、自己免疫疾患を引き起こすため、メカニズムの全容を明らかにすることはこれらの疾患を克服するためにも重要課題となる。そこで本研究ではこの選択メカニズムの全容にアプローチするために、これまでに B 細胞におけるその発現が報告されていない CD3 分子に着目した。CD3 分子は T 細胞抗原受容体を構成する分子の一つであり、胸腺での T 細胞の抗原受容体を介した選択機構に大いに関与するシグナル分子である。

本研究では、マスマイトメトリーによる網羅的な発現解析により、胚中心 B 細胞に CD3 分子が予想外に発現していることを見出した。CD3 分子は胸腺での T 細胞の選択を担う重要分子の一つであるため、この胚中心 B 細胞に発現する CD3 分子の生理的意義を解明し、CD3 分子の胚中心での B 細胞の選択への関

与を明らかとし、胚中心における B 細胞の選択機構の全容にアプローチすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

マスサイトメトリーを用いて CD3 分子を発現する細胞集団の網羅的解析を行った。その後、より厳密に CD3 分子の発現を解析するため、フローサイトメトリーを用いての CD3 分子の発現の解析を行った。また、CD3 分子を発現する胚中心 B 細胞をセルソーターにより単離し、リアルタイム PCR 法を用いて CD3 分子の発現の確認を行った。

マウス生体内で観察された胚中心 B 細胞における CD3 分子の発現が、実際に精製した B 細胞においてもその発現が誘導できるかどうかの検討を行った。胚中心において B 細胞は濾胞ヘルパー T 細胞から IL-21 等の刺激を受ける。そこで、マウス脾臓から B 細胞を精製し、胚中心で受けると思われる刺激 (IL-21, IL-4, 抗 CD40 抗体) で刺激した後、6 日後に CD3 の発現をリアルタイム PCR で計測した。また、胚中心 B 細胞は小胞体ストレスが上昇していることが明らかであることから、この小胞体ストレスを模倣するため、Tunicamycin や Thapsigargin でマウス脾臓 B 細胞を刺激し、小胞体ストレスを人為的に誘導した。この時の CD3 分子の発現をリアルタイム PCR で測定した。

胚中心 B 細胞に発現する CD3 分子の生理的な意義を調べるため、B 細胞のみで CD3 分子を欠損するマウスを以下の 2 通りの手法で作成した。(1) B 細胞欠損マス (μ MT) マウスに、CD3 ϵ 欠損マウスの骨髄を移植した骨髄キメラは、レシピエントマウスは B 細胞を欠損しているため、出現する B 細胞はすべてドナーである CD3 ϵ 欠損マウス由来である。一方 T 細胞はレシピエントマウス由来であり、その他の細胞は、レシピエント、ドナーの両方のマウス由来となる。(2) CD3 ϵ 欠損マウスは正常な T 細胞の発達が阻害され、末梢には T 細胞が存在しない。一方で、B 細胞を含むその他の細胞は CD3 分子を欠損していることを除いては正常に分化する。そこでこの CD3 ϵ 欠損マウスに正常な T 細胞を移植することで、リンパ球において見かけ上 B 細胞のみで CD3 分子を欠損するマウスを作製することができる。

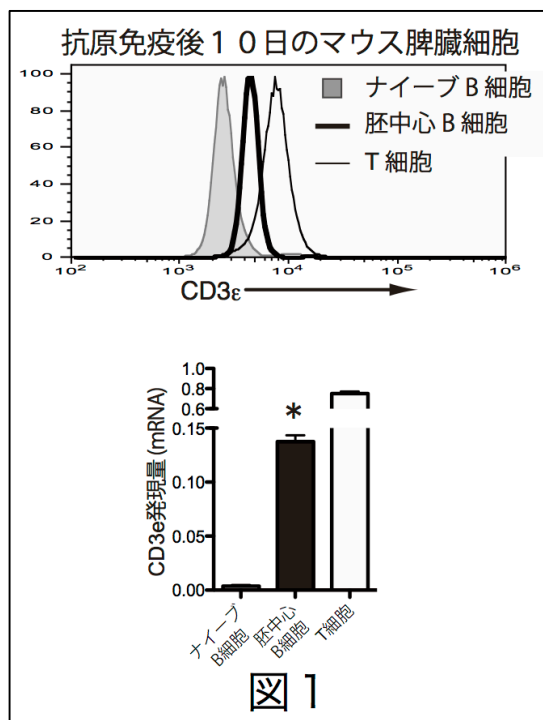
この 2 種類の、B 細胞で CD3 ϵ 分子を欠損するマウスに、NP ハプテンを結合させたニトリ IgG (NP-CGG) をモデル抗原として免疫し、免疫応答を誘導しその解析を行った。

B 細胞における CD3 分子の発現の生理的意義を細胞レベルで解明するため、バーキットリンパ腫 (ヒト胚中心 B 細胞腫) である Ramos 細胞の解析を行った。Ramos 細胞の極めて少数の細胞集団が CD3 分子を発現していることを見出した。そこで、この CD3 分子を発現している少数の集団を cell sorter で分取し、CD3 分子を発現する Ramos 細胞を樹立した (図 4

左)。CD3 を発現する Ramos 細胞と CD3 を発現しない細胞における、アポトーシス促進分子で Bim の発現をウエスタンブロッティングで調べた。また、CD3 の発現誘導を行った精製 B 細胞においても同様に Bim の発現を定量性 PCR で測定し、その時の死細胞の割合をフローサイトメトリーによって測定した。

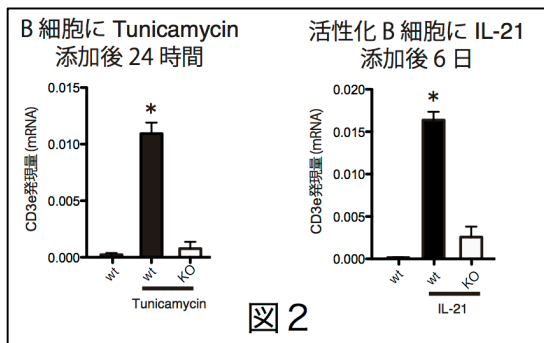
4. 研究成果

CD3 分子は T 細胞抗原受容体を構成するシグナル分子であり、T 細胞特異的に発現していると考えられてきた。しかしながら、マスサイトメトリーによる、様々な分化段階の B 細胞のタンパク分子の発現の網羅的解析を行った結果、驚くべきことに胚中心 B 細胞のサブpopulationにおいて CD3 分子の発現が、T 細胞の 1/10 程度のレベルではあるが認められることを明らかとした。この胚中心 B 細胞における CD3 分子の発現は、フローサイトメトリーや定量性 PCR においても確認することができた (図 1)。



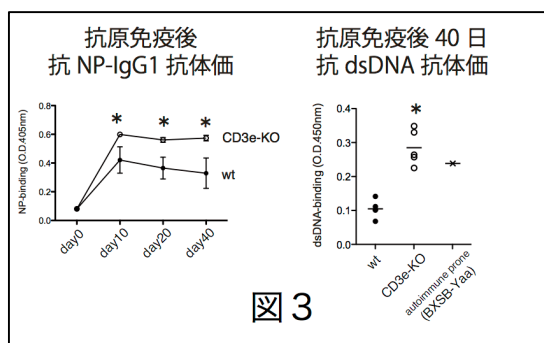
抗原免疫で誘導したマウスの胚中心 B 細胞において、フローサイトメトリーや定量性 PCR において CD3 分子の発現が認められたが、どちらの実験においても胚中心 B 細胞の同定にはフローサイトメトリーを用いているため、それらのアーティファクトである可能性を否定するため、B 細胞において CD3 分子の発現誘導ができるかどうかの検討を行った。B 細胞は胚中心において様々な刺激を受ける。そこで、精製した B 細胞に胚中心応答を模倣した刺激を加えることで CD3 分子の発現が誘導できるかを調べた。胚中心 B 細胞は小胞体ストレスが上昇している事が報告されている。そこで、精製した B 細胞に Tunicamycin を電化することで小胞体ストレスを誘導し、CD3 分

子の発現を調べたところ、その発現が著しく上昇していることを明らかとした (図2左)。また、胚中心 B 細胞は濾胞ヘルパー T 細胞から IL-21 による刺激を受けている。そこで精製 B 細胞を IL-21 により刺激を行ったところ、CD3 分子の発現が著しく上昇している事を明らかとした (図2右)。またこれらの発現はフローサイトメトリーによっても確認することができた。これらのことより、胚中心環境下を模倣する刺激により B 細胞で CD3 分子の発現が誘導されることを見出した。



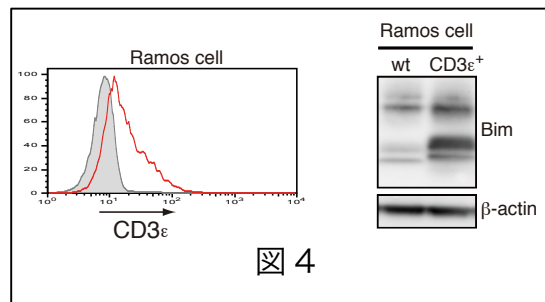
そこで、胚中心 B 細胞において発現が誘導される CD3 分子の生理的な役割を検討するために、B 細胞のみで CD3 分子を欠損するマウスを作製しその解析を行った。CD3ε欠損マウスは T 細胞の分化が完全に抑制されることから、T 細胞依存的な免疫応答を誘導することができない。一方、B 細胞は正常な分化が行われるため、このマウスに正常な T 細胞を移植することで、B 細胞で CD3 分子を欠損した T 細胞依存的な免疫応答可能なマウスとなる。この T 細胞を移植した CD3ε欠損マウスに、モデル抗原である NP-CGG を免疫し、血中に誘導される抗 NP 抗体価を経時的に調べたところ、興味深いことに IgG クラスの抗体価が著しく上昇することを明らかとした。また、驚くべきことに、自己抗体である抗二本鎖 DNA 抗体価の著しい上昇を認めることができた。この抗日本鎖 DNA 抗体価の上昇は、胚中心における自己応答性の B 細胞の排除、すなわち胚中心 B 細胞の負の選択の破綻されていることを示唆する。

またこれら結果は、B 細胞のみで CD3ε分子を欠損した骨髄キメラにおいても同様に観察することができた。



そこで、CD3 分子の発現が、細胞の負の選択、すなわち細胞死の誘導活性に関与しているか

どうかを調べるために、CD3 発現のモデル細胞を樹立し、解析を行った。Ramos 細胞はヒトバーキットリンパ腫であるため、胚中心 B 細胞由来の細胞である。この Ramos 細胞の CD3 分子の発現を確認したところ、極一部の細胞において CD3 分子を発現していることを見出した。そこでこの CD3 分子を発現している細胞集団を cell sorter で単離し、クローン化したところ、CD3 を細胞表面に発現する Ramos 寒くロンを樹立することができた (図4左)。CD3 分子の発現が細胞死に関与しているかどうかを調べるため、CD3 発現 Ramos 細胞株のアポトーシス促進タンパク Bim の発現を調べたところ、CD3 を発現していない Ramos 細胞に比べて、CD3 を発現する細胞株において Bim の発現が著しく促進されていることが明らかとなった (図4右)。また、この Bim の発現は、図2で示したような、精製 B 細胞で CD3 分子の発現誘導をした系でも認めることができ、それに伴った細胞死が増加も観察することができた。これらのことは、CD3 分子の発現により、胚中心 B 細胞で細胞死が誘導されることを示唆しており、B 細胞の胚中心での選択メカニズムに CD3 分子の発現が深く関与してい



ることが明らかとなった。

以上のことから、B 細胞は胚中心環境下では CD3 分子の発現が誘導され、この発現誘導が胚中心 B 細胞の細胞死の制御を担っており、CD3 分子の発現制御異常は、胚中心での B 細胞の厳密な選択の破綻を引き起こすことが明らかとなった。すなわち、胚中心 B 細胞で発現する CD3 分子が、B 細胞の胚中心での負の選択を厳密に制御していることが明らかとなった。

この本研究で明らかとなった事は、今後より詳細に解析されることで、B 細胞の胚中心での選択メカニズムの全容にアプローチできると考えられる。

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1件)

- ① 藤堂景史、疋田正喜
胚中心 B 細胞のシグナル伝達機構
炎症と免疫、23 巻：535-540 頁、2015 年

[学会発表] (計1件)

- ① Kagefumi Todo and Masaki Hikida
Screening of novel negative regulator
in class-switched B cells.
第 43 回日本免疫学会学術集会・総会、2014 年
12 月、京都国際会議場（京都市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤堂 景史 (TODO KAGEFUMI)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：50452561