

19980064

平成 10 年度

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別事業）研究報告書

末梢における抗体産生細胞分化機構に関する研究

（課題番号 10010109）

岡山大学工学部

生物機能工学科

疋田 正喜

平成 10 年度

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別事業）研究報告書

末梢における抗体産生細胞分化機構に関する研究

（課題番号 10010109）

岡山大学工学部

生物機能工学科

疋田 正喜

厚生科学研究補助金（厚生科学特別事業）

総括研究報告書

末梢における抗体産生細胞分化機構に関する研究

研究者 疋田正喜 岡山大学工学部講師

研究要旨 従来、抗体産生細胞の抗原特異性を制御する組み換え酵素である RAG は、未成熟なB細胞でのみ発現するとされてきた。しかし、最近の研究により成熟B細胞においても適切な刺激により RAG が再発現することが明らかとなっている。本研究においては、このような再発現した RAG の詳細について種々の検討を行った。その結果、1) 再発現した RAG による組み換えが実際に行われている 2) 生体内においてはその制御に補体レセプターが重要な役割を果たしていること 3) IgE へのクラススイッチを行うときに RAG による抗原特異性の変化を生じている可能性が強いということが明らかとなった。

A. 研究目的

近年種々のアレルギー疾患が社会問題化しているが、これらの疾患の発症原因の一つとして、アレルゲン特異的な IgE 抗体の過剰産生が知られている。従来、このような抗原特異的抗体を産生するB細胞の抗原特異性は骨髓中の未分化な段階で決定されていると考えられてきた。しかし、最近末梢においてもB細胞の抗原特異性が変化し得るということが明らかとなりつつある。本研究においては、この末梢における抗体産生細胞の分化機構を詳細に検討することにより、抗原特異的 IgE 抗体産生細胞への分化抑制法を開発するための基礎的な知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

再発現した RAG の機能評価には quasi-mono-clonal mouse を使用する。また、IgE 抗体産生系のモデルとして、マウスに対する寄生虫感染の系を使用する。

C. 研究結果

Quasi-mono-clonal マウスを使用した検討の結果、末梢に存在する成熟B細胞においても再発現した RAG の働きにより新たな抗体可変部遺伝子を再構成し、抗原特異性が変化し得るということが明らかとなった。

また、生体内で抗原による RAG の再発現調節機構について検討したところ、抗原レセプターばかりでなくB細胞表面の補体レセプターが非常に重要な調節機構を果たしていることが明らかとなった。

さらに、このような再発現した RAG によりアレルギーの原因となる IgE 抗体の抗原特異性が変化し得るか否か検討したところ、正常な条件においては、再発現した RAG によって IgE 抗体の抗原特異性は種々の特異性を持つものへと拡散していることを示唆する結果が得られた。

D. 考察

従来どのような機構でアレルゲン特異的なB細胞が選択的に分化増殖してくるのか全く不明であったが、本研究により正常な状態では末梢での抗原特異性変化により、特定のアレルゲンに対してのみ過剰応答することのないよう調節されていることが示唆された。

今後、実際のアレルギーを発症しているモデル動物等で、この分化機構の制御がどのような状態におかれているのか検討する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

J.Exp.Med. 投稿中

研究要旨

従来、抗体産生細胞の抗原特異性を制御する組み換え酵素である RAG は、未成熟なB細胞でのみ発現するとされてきた。しかし、最近の研究により成熟B細胞においても適切な刺激により RAG が再発現することが明らかとなっている。本研究においては、このような再発現した RAG の詳細について種々の検討を行った。その結果、1) 再発現した RAG による組み換えが実際に行われている 2) 生体内においてはその制御に補体レセプターが重要な役割を果たしていること 3) IgE へのクラススイッチを行うときに RAG による抗原特異性の変化を生じている可能性が強いということが明らかとなった。

目次

1. 緒言

1.1 はじめに

1.2 B細胞の分化と V(D)J 組み換え

1.3 成熟B細胞における V(D)J 組み換え

1.4 成熟B細胞における RAG 再発現の制御機構

1.5 IgE クラススイッチングと RAG 再発現

2. 成熟B細胞における V(D)J 再構成

2.1 イントロダクション

2.2 方法

2.3 結果

2.4 考察

3. In vivo における RAG 再発現の調節機構

3.1 イントロダクション

3.2 方法

3.3 結果

3.4 考察

4. ポリクローナル IgE 抗体産生機構と RAG 再発現

4.1 イントロダクション

4.2 方法

4.3 結果

4.4 考察

5. 総括

1. 緒言

1.1 はじめに

近年、種々のアレルギー疾患が社会問題化しており、アレルギー疾患のコン治療法が切望されている。一方、これらの疾患の発症原因の一つとしてアレルギー特異的 IgE 抗体の過剰産生が明らかとなっている。したがって、抗原特異的 IgE 抗体産生を選択的に抑制できれば、アレルギー疾患の根治療法となる可能性を秘めている。

抗体産生細胞である B 細胞の抗原特異性は recombination activating gene (RAG)-1 および RAG-2 が触媒する抗体可変部遺伝子の組み換えによることが知られている。従来 RAG は、骨髄中の未成熟 B リンパ球でのみ発現しており、末梢では発現しないとされてきた。しかし、研究者は、抗体産生細胞の選択の場である胚中心において RAG が発現していることを発見している。このことは、胚中心に骨髄中とは異なる新たな抗原特異性の選択機構が存在することを示している。本研究においては、この胚中心における RAG の再発現調節機構を明らかにすると共に、再発現した RAG によって抗原特異的 IgE 抗体の産生がどのような影響を受けているか明らかにし、アレルギー疾患の根治療法開発のための基礎的な知見を得ることを試みる。

1.2 B細胞の分化と V(D)J 組み換え

B細胞前駆細胞は、図 1.1 に示すように骨髄中で造血幹細胞から成熟B細胞へと分化・成熟していくことが知られている。その過程において RAG は、proB 細胞の段階で発現し重鎖遺伝子の VDJ 組み換えを行う。その後、large preB の段階でいったん RAG の発現は抑制されるが small preB の段階で再度、発現が誘導され今度は軽鎖の VJ 組み換えを行う(1)。このようにして細胞表面に IgM、IgD を発現するようになった成熟B細胞は末梢リンパ組織へと移動し、その後これらの細胞での RAG の再発現は認められないと考えられてきた。

一方、RAG 遺伝子のいずれかを欠損したマウスにおいては重鎖遺伝子の VDJ 組み換えを完了することが出来ないため proB 細胞の段階でB細胞の分化が停止してしまうことが明らかとなっている(2)。また、in vitro の研究から抗体可変部遺伝子の V(D)J 組み換えには RAG 以外のタンパクは必要ないということも明らかとなっている(3)。

これらのことからB細胞の分化成熟には抗原レセプターの可変部遺伝子の V(D)J 再構成が必須であり、V(D)J 組み換えには RAG の発現が必要不可欠であるということが示される。さらに、このような考え方に基づいた場合、B細胞の抗原特異性は体細胞突然変異による場合を除いてすべて骨髄中で決定されているということになる。従来、このような理論はB細胞の抗原特異性が末梢で不用意に変化しないというクローン選択説の根幹をなす重要な理論であり広く認められてきた。

しかし、最近、本研究者や他のグループにより 1) in vitro では CD40 抗体と

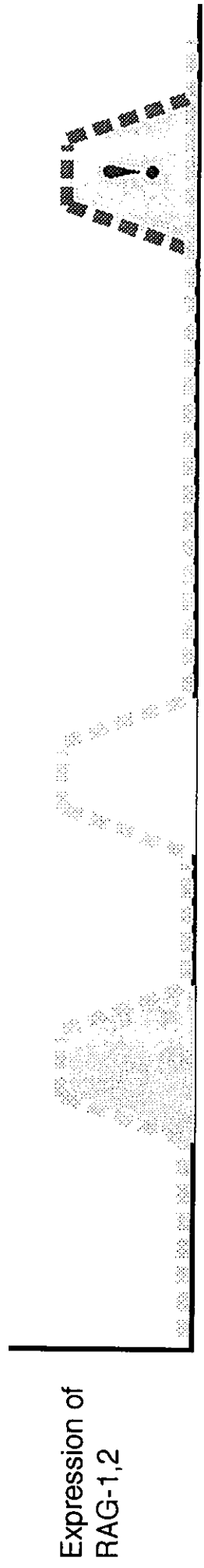
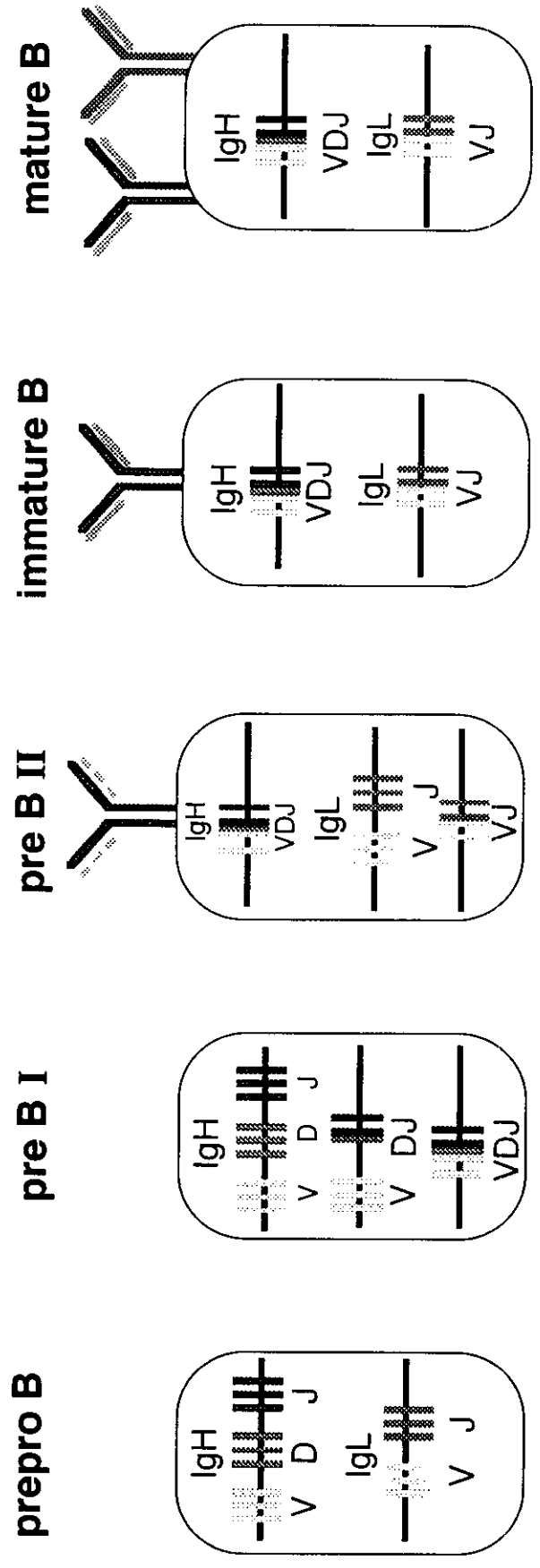


図 1.1 B 細胞分化と RAG の発現パターン

IL4 または IL7 の刺激が加えられた成熟B細胞において 2) *in vivo* においては抗原感作によって流入リンパ節中に形成された胚中心で RAG が再発現しているということが明らかになるにいたって、B細胞が骨髄中で獲得した抗原特異性が末梢で再度変化し得るとということが明らかとなった(4-7)。このことは従来まったく考慮されていなかったB細胞分化機構が存在していることを示しており、この分化機構がどのような生理的意義を持っているのかについて検討を加えることは重要な研究課題である。

1.3 成熟B細胞における V(D)J 再構成

近年、自己抗体を産生する細胞の成因や選択機構を研究する目的で、自己抗体の可変部遺伝子を本来の免疫グロブリン座に導入したいわゆるノックインマウスと呼ばれる特殊なトランスジェニックマウスが作製され種々の検討が行われている。その結果、当初このようなマウスにおいては骨髄中での負の選択によりB細胞がほとんど存在しないのではないかと予想されていたのに対して、実際には組み込んだ可変部遺伝子とは異なるイデオタイプを持つ抗原特異性を示すB細胞が多数存在することが示された(8,9)。この結果は、トランスジェニックマウスの免疫グロブリン座における対立遺伝子排除が破綻をきたし、野生型のアレルが組み換わって新たな抗体を作るようになったとも解釈できるが、実際に抗体可変部遺伝子の構造を解析した結果は、いったん V(D)J 再構成を行い抗原レセプターを細胞表面に発現するようになったB細胞前駆体が再度 V(D)J 再構成を行い、自らの抗原特異性を変化させているということを示して

いた。その後、複数の研究室による検討の結果、未熟B細胞の段階で自己反応性がある抗原レセプターを発現しているB細胞前駆体は、アポトーシスにより除去されるものと、上述の機構で抗原特異性を変化させるものがあることが明らかとなりその過程はレセプターエディティングと名付けられた(8-10)。

成熟B細胞においては先にも述べたように、V(D)J 組み換え酵素である RAG の発現が抑制されていると考えられていたため、このような選択機構は存在しないと考えられてきた。しかし、成熟B細胞においても RAG が発現するという結果より、成熟B細胞でレセプターエディティング様の分化機構が存在するか否かについても検討する必要があるが生じている。しかし、未熟な場合と異なり成熟B細胞に関する検討を行うためにはいくつかの問題がある。もっとも大きな問題は野生型マウスではもともと末梢に存在するB細胞が極めてヘテロな集団であるためエディティングにより一部の細胞集団の抗原特異性が変化したとしてもその検出が難しいということである。また、もう一つの問題としてあげられるのは未成熟な分化段階でのエディティングと成熟した後でのエディティングの区別がつかないということである。本研究では、このような問題を解決するために 4-nitro-3-hydroxyphenyl acetyl (NP) ハプテンに対する特異性を持つことが既に明らかにされている 17.2.25 という可変部遺伝子を用いて作製されたノックインマウス(11)を用いて検討を行っている。このようなマウスは末梢の成熟B細胞の約 80% 程度が均一な抗原特異性を有していることから、エディティングの結果生じた抗原特異性の変化が容易に検出可能であると考えられる。さらに、このようなマウスの成熟B細胞から NP ハプテンに結合性を持つ細胞のみを選択しB細胞を欠損しているマウスに移入することによって、未熟な段

階でのエディティングの可能性を排除することができるため非常に有用な実験系となり得る。

1.4 成熟B細胞における RAG 再発現の制御機構

成熟B細胞において RAG が再発現する意義を明らかにするためには、どのような機構によって RAG の再発現が調節されているのかについて検討する必要がある。現在までに、B細胞の抗原レセプターを強く架橋することにより RAG の再発現が抑制されることから少なくとも高親和性の抗原によって架橋された場合には RAG の再発現による再レセプターエディティングは生じないということが明らかとなっている(12,13)。しかし、生体内に自由に浮遊している抗原は非常に少ないと考えられることから(14)、実際にはB細胞と抗原のみで再発現の調節が行われているとは考えにくく、胚中心内の樹上細胞などの抗原提示細胞からの働きかけが重要な役割を演じていると考える必要がある。

しかし、このような観点にたった研究は未だ行われておらず、これらの細胞の RAG 再発現への関与の有無は全く不明なままである。そこで、本研究においては、生体内における RAG 再発現の調節機構を明らかにする目的で抗原レセプター以外の表面分子からのシグナルによる RAG 再発現調節機構の解明を行う。

1.5 IgE クラススイッチングと RAG 再発現

近年、増加の一途をたどっている種々のアレルギー疾患の原因の一つにアレルギー特異的な IgE 抗体の過剰産生が挙げられる。したがって、抗原特異的な IgE 抗体の産生を選択的に抑制することが出来ればこのような疾患の根治療法になる可能性がある。

従来より、IgM 抗体産生細胞が IgE 抗体産生細胞へと変化するいわゆるクラススイッチングと呼ばれる B 細胞分化過程については多くの研究がなされており、マウスの B 細胞においてはバクテリアのリポ多糖である LPS と IL4 や抗 CD40 抗体と IL4 を組み合わせて刺激することによって IgM から IgE、IgG1 へのクラススイッチを誘導できるということが明らかにされている(15)。同様に、ヒトにおいても抗 CD40 抗体と IL4 の刺激により IgE へのクラススイッチが誘導されることが明らかとなっている(16)。さらに、その後の研究により生体内における CD40 のリガンドが活性化ヘルパー T 細胞上に発現する gp39 (CD40L)であるということが明らかになり今日に至っている。

ここで、先にも述べたように成熟 B 細胞における RAG の再発現は抗 CD40 抗体と IL4 または IL7 の組み合わせによって誘導できる。これらの条件のうち抗 CD40 抗体と IL4 による刺激は IgE へのクラススイッチの条件と一致している。このことは、末梢のリンパ節胚中心内で発現した RAG によるレセプターエディティングが抗原特異的抗体産生細胞、中でも IgE や IgG1 抗体産生細胞の選択に深く関わっていることを示唆している。そこで本研究においては、実際に IgE へのクラススイッチングと RAG の再発現の関係について、マウスにおける IgE クラススイッチングのモデル系である寄生虫感染の系を用いて検討を加える。

1.6 文献

- 1) Grawunder U. et al., *Immunity* 1995; 3: 823-831.
- 2) Shinkai Y. et al., *Cell* 1992; 68: 855-867.
- 3) McBlane, J.F. et al., *Cell* 1995; 83:387-395.
- 4) Hikida M., et al., *Science* 1996; 274: 2092-2094.
- 5) Han S. et al., *Science* 1996; 274: 2094-2097.
- 6) Han S. et al., *Science* 1997; 278: 301-305.
- 7) Papavasiliou et al., *Science* 1997; 278: 298-301.
- 8) Tiegs S.L. et al., *J.Exp.Med.* 1993; 177: 1009-1020.
- 9) Gay D. et al., *J.Exp.Med.* 1993; 177: 999-1008.
- 10) Chen C. et al., *Immunity* 1997; 278: 298-301.
- 11) Cascalho M. et al., *Science* 1996; 272: 1649-1652.
- 12) Hertz M. et al., *Nature* 1998; 394: 292-295.
- 13) Meffre E. et al., *J.Exp.Med.* 1998; 188: 765-772.
- 14) MacLennan I.C.M. et al., *Annu.Rev.Immunol.* 1994; 12: 117-139.
- 15) Coffman R.L. et al., *J.Immunol.* 1986; 1316: 949-955.
- 16) Zhang K.E. et al., *J.Immunol.* 1991; 146: 1836-1841.

2. 成熟B細胞における V(D)J 再構成

2.1 イントロダクション

B細胞の抗原特異性は recombination activating gene (RAG)-1,2 の触媒する V(D)J 組み換えにより決められることが明らかとされている(1-3)。しかし、この抗原特異性は普遍的なものではなく以下のような機構により変化することが知られている。その一つ目が骨髄中においてランダムな V(D)J 組み換えの結果生成した自己応答性B細胞の除去に役立っていると考えられている未熟B細胞の分化段階におけるレセプターエディティングである(4)。二つ目が胚中心における体細胞突然変異である。この過程により抗原に应答したB細胞は抗原に対する親和性をさらに増すことが知られており、親和性成熟と呼ばれている。最後に、やはりリンパ節胚中心における成熟B細胞のレセプターエディティングである(5-7)。

これら三つの抗原特異性の修飾機構のうち前者二つの機構（未成熟段階でのレセプターエディティング、体細胞突然変異）については少なくともその合目性は明らかにされているが三番目にあげた成熟B細胞におけるレセプターエディティングについては未だにその合目性や誘導機構がまったく明らかにされていない。

このような研究を行う上で最も大きな問題は野生型マウスにおいては末梢に存在するB細胞が極めてヘテロな集団であるため再エディティングにより一部の細胞集団の抗原特異性が元来のものから変化したとしてもその検出が難しいということである。また、もう一つの問題としてあげられるのは未熟B細胞におけるエディティングと成熟B細胞まで分化・成熟が完了した後の段階でのエ

ディテイングの区別をつけることが非常に困難であるということである。

そこで、本研究においてはカリフォルニア大学の Cascalho らによって開発された quasi-monoclonal (QM) マウス(8)を用いて検討を行うことにした。このマウスにおいては、抗 (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl (NP) ハプテンに対する抗体の重鎖可変部遺伝子である 17.2.25 が本来の J 遺伝子断片をコードする領域に相同組み換えの手法で組み込まれている。また、軽鎖に関しては κ 鎖遺伝子を破壊してあり全ての B 細胞が λ 鎖を発現するように操作されている。したがって QM マウスにおいては末梢に存在する B 細胞の大部分が均一な VDJ カセットを持ち、 λ 軽鎖を発現する抗 NP 抗体を産生する細胞であると予想される。

この章においては、成熟 B 細胞におけるレセプターエディテイングの機構を明らかにする目的で *in vitro* での実験系の確立を最初の目的で行った種々の検討の結果について述べる。

2.2 方法

2.2.1 動物

Quasi-monoclonal (QM) マウスは、カリフォルニア大学の Cascalho 博士より分与していただき、所属研究室において交配したものを使用した。QM マウス以外のマウスに関しては日本チャールズリバーより購入、使用した。

2.2.2 細胞培養

すべての培養は、RPMI-1640 培地に 2mM の L-グルタミンおよび 1mM ピルビン酸ナトリウムを追加した培地に、10% の牛胎児血清 (FCS)、 1×10^{-5} M の 2-メルカプトエタノールを添加したものを使用した。また、この培地には抗生物質としてペニシリン G とストレプトマイシンが添加してある。培養はすべて 5% の CO₂ 存在下、湿度 100% で行った。培養容器は NUNC 社製の 24 穴培養皿を使用した。

2.2.3 成熟 B 細胞の単離

成熟 B 細胞はパニング法により行った。まず、QM マウスの脾臓細胞浮遊液を調製し、ここから赤血球を除去後、抗 Thy-1 抗体 (Serotec) とウサギ低毒性補体 (Cedarlane) を用いて T 細胞も取り除き粗 B 細胞画分とした。この画分に

少数混入している未成熟B細胞を取り除くため、以下の操作を行った。すなわち、あらかじめ抗 IgD 抗体を 10 μ g/ml でコートした 9cm 径のシャーレに 2 \times 10⁶ cell/ml の密度になるよう調製した粗 B 細胞浮遊液をまいた。その後室温で 30 分静置しシャーレに付着した細胞のみを回収し成熟 B 細胞画分としてその後の実験に用いた。

2.2.4 成熟B細胞における RAG 再発現の誘導

成熟 B 細胞における RAG の再発現の誘導には以下のような方法を用いた。すなわち、1 \times 10⁶ cells/ml の密度で B 細胞を増殖培地に懸濁し、LPS (Sigma) および IL4 (Peprotech) をそれぞれ 20 μ g/ml、500u/ml の濃度で添加した。培養開始後 2 日目に培養した細胞の一部を回収し RT-PCR 法を用いて RAG の再発現を確認した。

2.2.5 RT-PCR 法による RAG mRNA の検出

RAG の再発現は、RAG-2 mRNA の RT-PCR 法により行った。すなわち、1 \times 10⁶ 個の細胞を回収し、RNA-zol (GIBCO BRL) を用いて total RNA を抽出した。その後、oligo dT (Pharmacia) をプライマーとして逆転写を行い、RAG-2 特異的なプライマーを用いて PCR 法で cDNA を増幅した。検出は、7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて行った。また、コントロールとして GAPDH の mRNA を同一のサンプルから検出した。PCR の条件は、RAG-2 に関しては、