

94°C 9min の前処理後 94°C 1min、60°C 1min、72°C 1min のサイクルを 40 サイクル行った。プライマーは、RAG-2 が 5'-CACATCCACAAGCAGGAAGTACAC-3'、5'-GGTTCAGGGACATCTCCTACTAAG-3'、GAPDH が 5'-CCATCACCATCTTC CAGGAG-3'、5'-CCTGCTTCACCACCTTCCTTG-3' を使用している。

2.2.6 フローサイトメトリー

B 細胞の NP 特異性およびクラスについてはフローサイトメトリーで調べた。すなわち、それぞれ 1×10^6 個の細胞を 1% の BSA を含む PBS 約 50 μ l に懸濁し 10 μ g/ml となるようにビオチン化した NP-BSA を添加し、30 分間水中で静置した。PBS で洗浄後、PE 標識抗 B220 抗体 (Pharmlngen)、FITC 標識抗マウス IgM 抗体 (Pharmlngen)、FITC 標識抗マウス IgG1 (Pharmlngen) および streptavidin-PerCP (Becton-Dickinson) を適宜添加し、さらに 30 分間水中で静置した。その後、洗浄し 1ml の PBS に再懸濁し FACSCalibur (Becton-Dickinson) で解析した。

2.2.7 抗体可変部遺伝子のクローニングおよび構造解析

抗体可変部のクローニングには Pharmacia の ScFv cloning module を使用した。IgG1 クラスの抗体の可変部遺伝子を選択的にクローニングするために、逆転写時に IgG1 の定常領域に結合するプライマー (5'-3') を使用した。

クローニングした遺伝子のシーケンスは、前述の ScFv cloning module に示

されているプライマー配列を使用して dideoxy 法により行った。

2.2.8 ELISA 法による抗体の定量

IgG1 クラス特異的定量には、1 次抗体として固層に抗マウス IgG1 抗体 (Pharmingen) をコートした 96 穴プレート (NUNC) とペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (Vector) を用いるサンドイッチ ELISA 法を使用した。同様に IgE 特異的アッセイには 1 次抗体に抗マウス IgE 抗体 (ヤマサ)、2 次抗体にビオチン化抗マウス IgE 抗体 (Pharmingen) およびアビジン化ペルオキシダーゼを用いた。NP 特異的抗体の吸収は、NP 化 BSA を CNBr 活性化セファロース (Pharmacia) に結合し作製した NP-BSA-セファロースを吸収担体として行った。コントロールには BSA-セファロースを使用した。

2.3 結果

2.3.1 QM マウス B 細胞の抗原特異性

QM マウスは、NP ハプテンに特異性を有する重鎖可変部遺伝子である 17.2.25 を J 領域にノックインされているマウスである (図 2.1)。したがって、その B 細胞の大半が NP に対して特異性を有していると考えられるが、実際には未熟 B 細胞の段階でのレセプターエディティングにより NP に対する結合特異性を消失している細胞が生じていることが知られている。そこで、まず、非免疫の QM マウスの脾臓 B 細胞の抗原特異性についてフローサイトメーターを用いて解析することにした (図 2.2)。その結果、約 95% 程度の細胞が NP に対する特異性を有していることが明らかとなった。

2.3.2 LPS/IL4 刺激によって QM マウス B 細胞から産生される抗体の特異性

QM マウス B 細胞を LPS と IL4 で刺激した場合に野生型マウスと同様に IgE、IgG1 へ高効率にクラススイッチするか否かについて検討を加えることにした。その結果、図 2.3 に示すように QM マウス B 細胞を LPS と IL4 で刺激することにより野生型マウスと同レベルの IgE、IgG1 抗体が産生されることが明らかとなった。このことから、17.2.25 カセットの導入や、 κ 軽鎖遺伝子の破壊が B 細胞のクラススイッチを含む分化機構に影響を与えていないことを示唆しており、

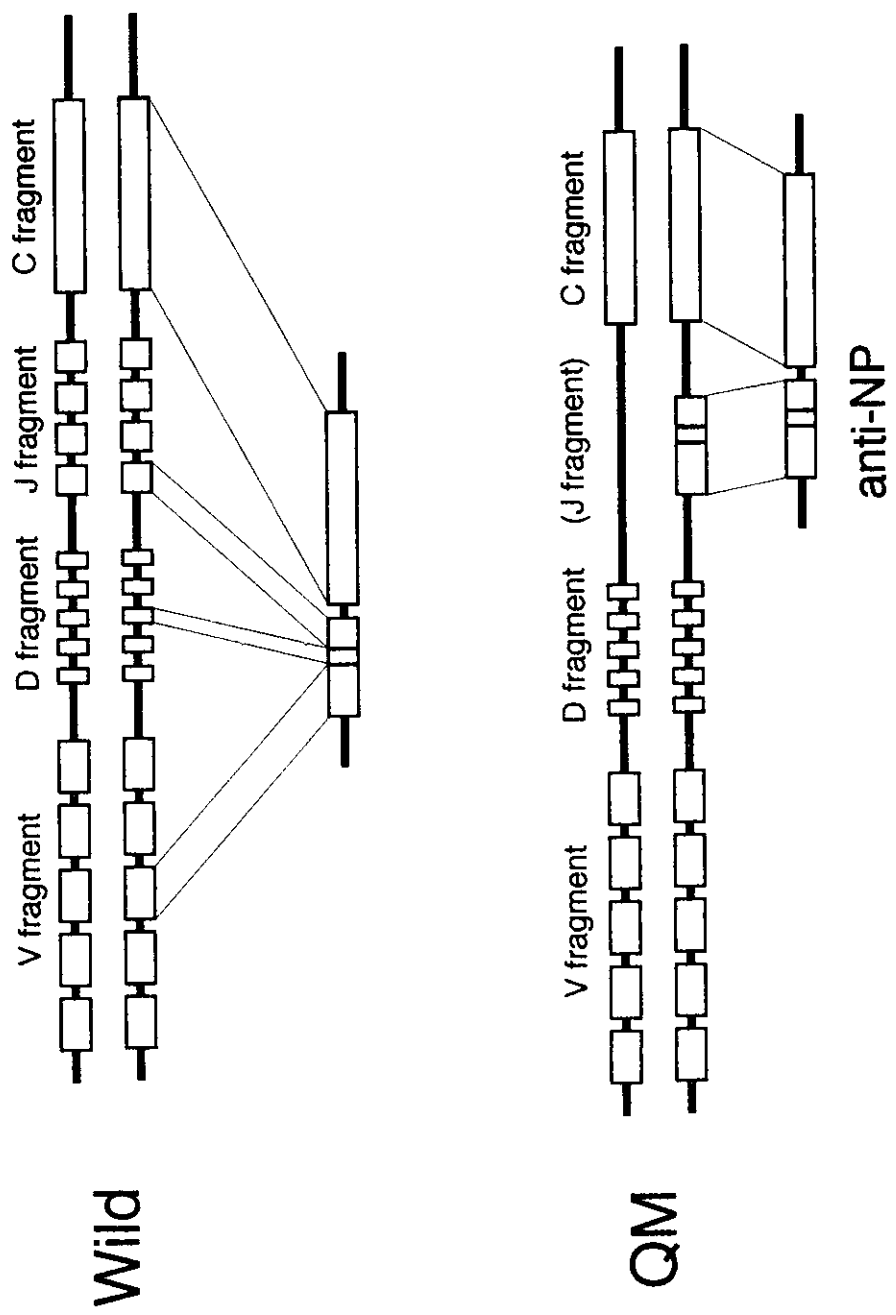


図 2.1 QMマウスの抗体遺伝子の構造

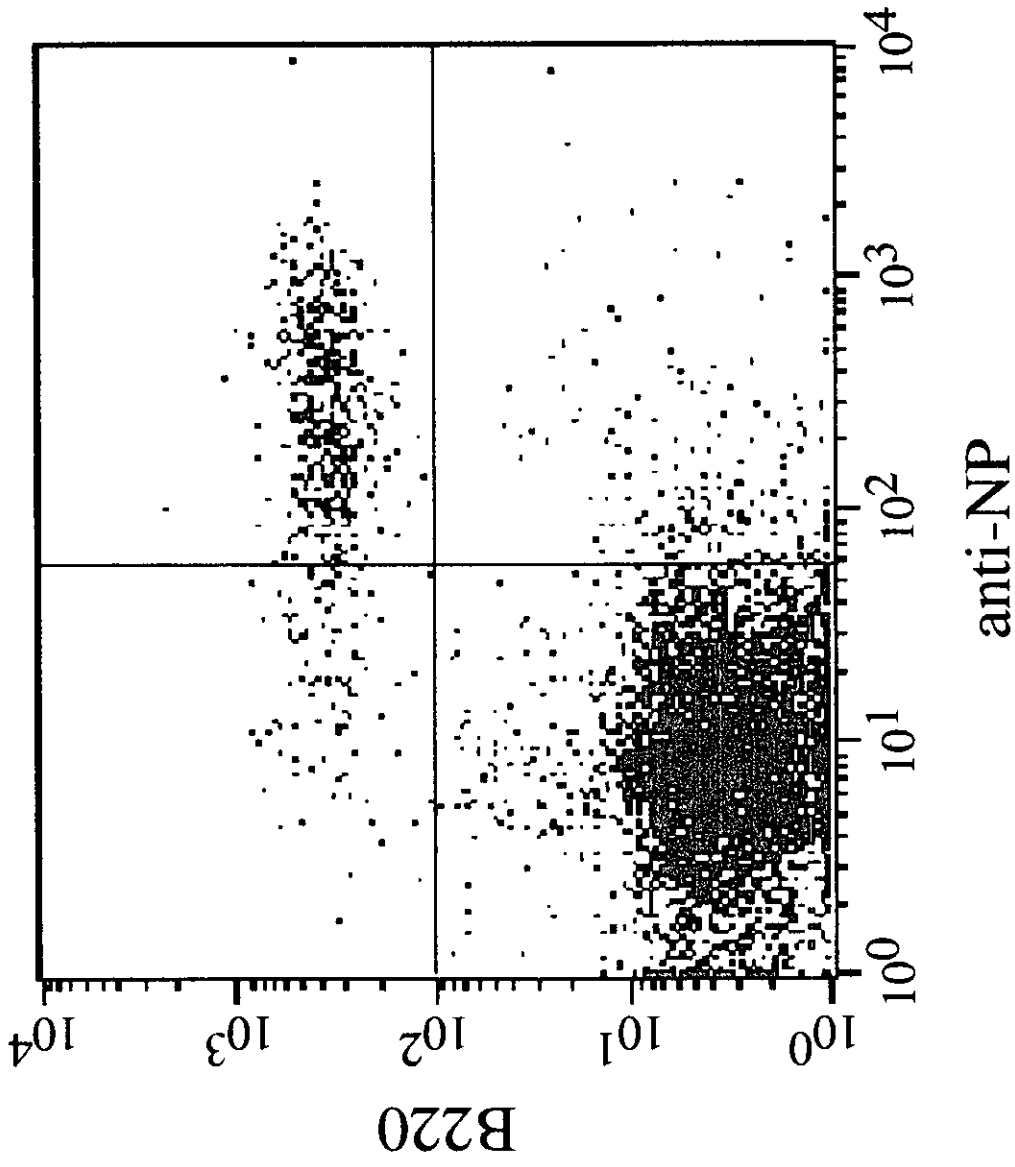


図 2.2 QMマウス脾臓細胞の抗原特異性

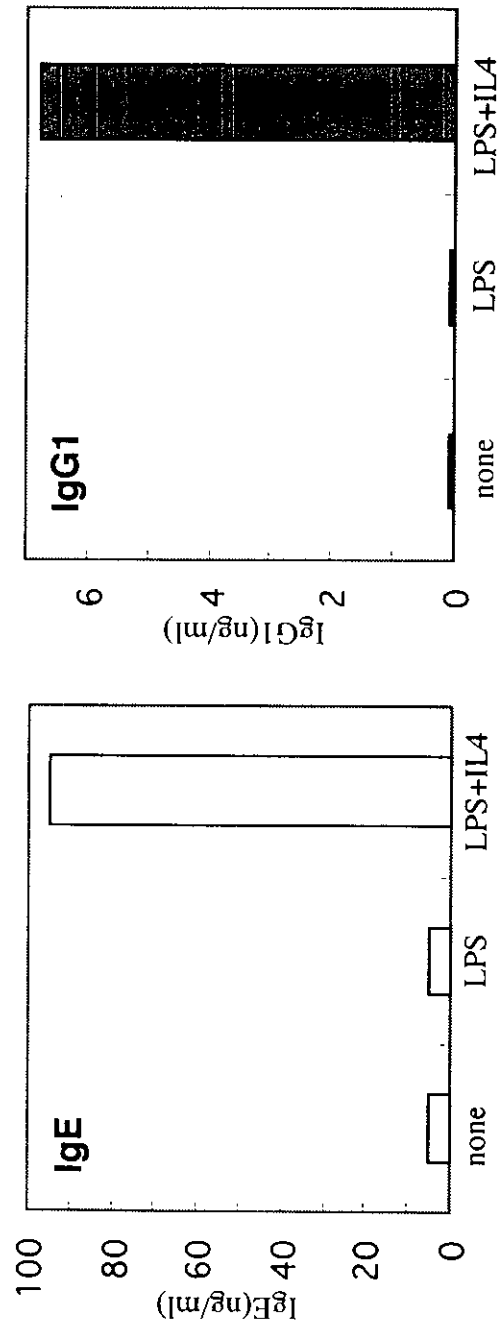


図 2.3 QMマウスB細胞のLPS/IL4刺激によるIgG1、IgEへのクラススイッチ
 QMマウス脾臓B細胞を20ug/ml LPSと10ng/ml IL4で刺激培養後6日目に培養上清を回収し、分泌されたIgG1、IgE抗体をサンドイッチELISA法で定量した。

今後の検討に適していると考えられる。

2.3.3 QM マウス B 細胞における RAG 再発現の誘導

野生型マウスにおいては成熟 B 細胞を LPS と IL4 で刺激することにより RAG の再発現が誘導されることが明らかとなっているが、QM マウスのように可変部遺伝子の構造が野生型マウスと異なっている場合にも野生型同様、RAG の再発現が起こるか否かについては不明である。そこで、QM マウス脾臓細胞から IgD 陽性成熟 B 細胞を精製し、LPS/IL4 刺激を加えることにより RAG の再発現が誘導されるかどうか検討した (図 2.4)。その結果、野生型マウスと同様の刺激条件により RAG の再発現が誘導可能であることが示された。

2.3.4 LPS/IL4 によって RAG が再発現した B 細胞の抗原特異性

以上の検討から、QM マウスにおいても野生型マウスと同様に LPS/IL4 刺激により、IgE、IgG1 へのクラススイッチや RAG の再発現が誘導されることが明らかとなったことから、実際にこのような条件で細胞を刺激培養した場合に産生される抗体の抗原特異性は NP 結合性を保持しているのか否かについて、NP-BSA-セファロースによる吸収を行った。その結果、図 2.5 に示すように LPS/IL4 によって誘導された IgE、IgG1 抗体のうち約 50% が NP に対する結合性を失っていたのに対し、IgM については NP 特異性を保持していた。

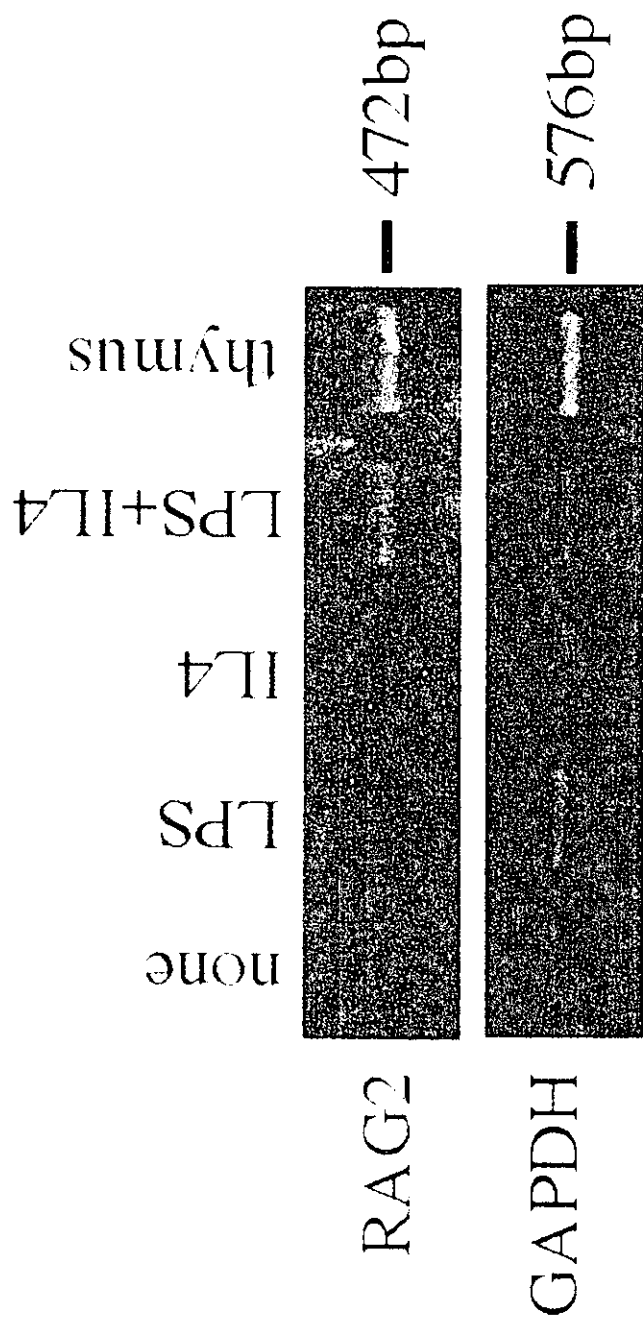


図2.4 QMマウスB細胞におけるRAGの再発現
 QMマウスB細胞を20ug/ml LPSと10ng/ml IL4で刺激培養後2日にRNAを抽出し、
 RT-PCR法でRAGの発現を検討した。

□ BSA sepharose absorbed
 ■ NP-BSA sepharose absorbed

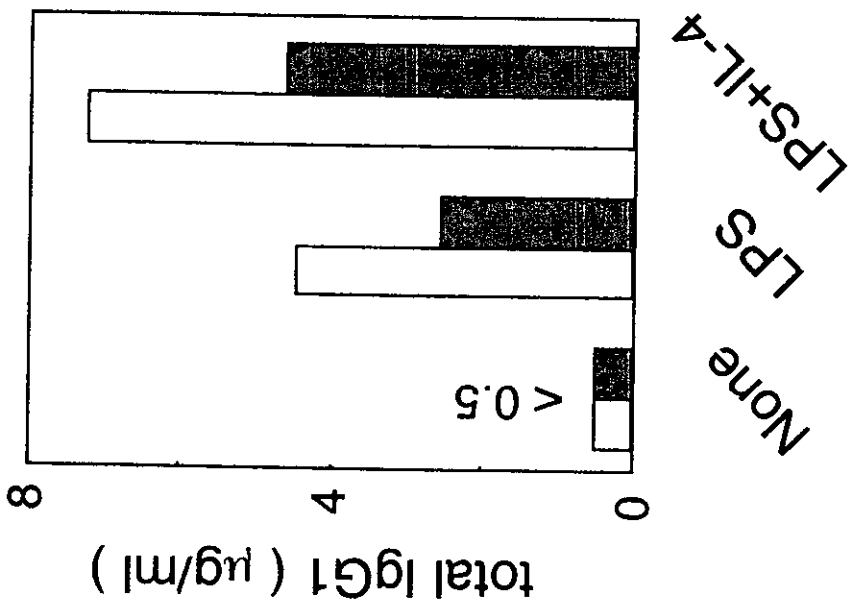
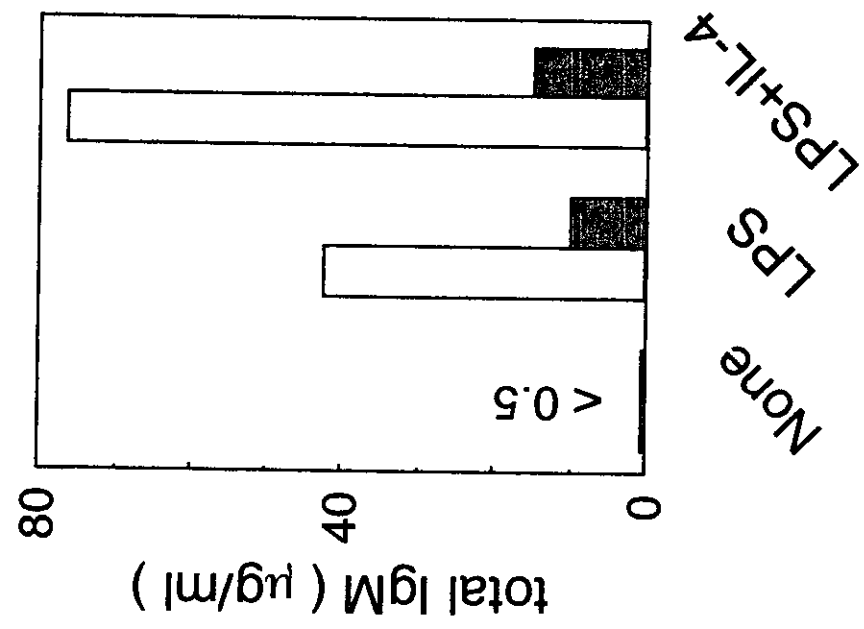


図 2.5 QM マウス B 細胞において再発現した RAG による抗体の特異性変化
 QM マウス脾臓 B 細胞を 20µg/ml LPS と 10ng/ml IL4 で刺激培養後 6 日目に培養上清を回収し、分泌された IgG1、IgE 抗体の抗原特異性を検討した。培養上清を NP-BSA-セファロースで吸収し、減少した抗体量を抗 NP 抗体の量とした。

2.3.5 LPS/IL4によって抗原特異性が変化した細胞の可変部遺伝子構造解析

さらに、LPS/IL4によって実際に 17.2.25 から別の VDJカセットへとエディティングが行われているか否かについて明らかにするため、培養6日目に細胞を回収し、IgG1 特異的なプライマーで逆転写を行った後、V断片の5'側およびJ断片に存在するコンセンサス配列をプライマーとしてPCR増幅を行いIgG1抗体の可変部遺伝子をクローニング、構造解析を行った。

その結果、図2.6に示すようなDJカセットのみ保存されており、Vのみが他の断片と組み換わっているクローンが複数得られた。このことは、LPS/IL4刺激によってQMマウスB細胞の17.2.25遺伝子断片がレセプターエディティングを起こしていることを示している。

[63.4% / 374 bp]

```

17.2.25 1' GAGGTTTCAGCTGCAGCAGCTGTGGGGCAGAGCTTGTGAGGCCAGGGGCTCAGTCAAGTTG
      * * * * *
Clone 19 1" CAGGTCACAACTGCAGGAGTCTGSAACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACTTTCACCTC
      * * * * *
61' TCCTGCACGGCTTCGGCTTCAACATTAAGACACCTATA---TGCACCTGGGTGAAGCAG
      * * * * *
61" ACCTGCACCTGTCACCTGGCTACTCCACTCACCAGTGGTTATAGCTGGCAGCTGGATCCGGCAG
      * * * * *
118' AGGCTGAAACAGGGCTTGGAGTGGATTGSAAGSATTGATCCCTGGGAATGGTAACTAAA
      * * * * *
121" TTTCCAGGAACAACACTGSAATGGATGGCTACATACA---CTAC-AGTGGTAGCCACTAAC
      * * * * *
178' TATGACCCGAAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCACCAACACAGCC
      * * * * *
178" TACAACCCATCTCCTCAAAGTCSAATCTGATCACTGGAGACACATCCAAGAACCCAGTTC
      * * * * *
238' TACCTGCACCTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGACACTGGCGTCTATTACTGTCTAG-----
      * * * * *
238" TTCCAGGTTGAAATTCGTGACTACTGAGGACACAGCCACATAATTACTGTCCAAGAGCC
      * * * * *
294' -----ATACTATAGGTACCCCTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCA
      * * * * *
      Dsp2.3 N Jh4
298" ACTGSSAAGGACTATAGGTACCCCTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGACCCAGC
      * * * * *
346' GTCACCGTCTCCCTCA
      * * * * *
358" GTCACCGTCTCCCTCA
      * * * * *

```

[78.4% / 375 bp]

```

17.2.25 1' GAGGTTTCAGCTGCAGCAGCTGTGGGGCAGAGCTTGTGAGGCCAGGGGCTCAGTCAAGTTG
      * * * * *
Clone 20 1" CAGGTCAGCTGCAGGAGTCAAGACCTGACCTGGTGAAGCCCTGGGGCTCAGTGAAGATT
      * * * * *
61' TCCTGCACGGCTTCGGCTTCAACATTAAGA-CACCTATAATGCACCTGGGTGAAGCAGAG
      * * * * *
61" TCCTGCAAAAGCTTCGGCTAC-GCATTCAGTAGCTCTTGSATGAACCTGGGTGAAGCAGAG
      * * * * *
120' GCCTGAAACAGGGCTTGGAGTGGATTGSAAGSATTGATCCCTGGGAATGGTAACTAAAATA
      * * * * *
120" GCCTGGACAGGGCTTTGAGTGGATTGSAAGSATTGATCCCTGGAGATGGAGATAACTA
      * * * * *
180' TGACCCGAAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCACCAACACAGCCTA
      * * * * *
180" CAATGGGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACTGACTGCAGACAAAATCCCTCCAGCACAGCCTA
      * * * * *
240' CCTGCAGCTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGACACTGGCGTCTATTACTGT-----
      * * * * *
240" CATGCAGCTCAGCAGCCCTGACCTCTGTGGACTCTGGCGTCTATTCTGTGCAAGCGAAGCT
      * * * * *
289' -----GCTAGATACTATAGGTACCCCTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTC
      * * * * *
      Dsp2.3 N Jh4
300" GGGACCCCCATACTATAGGTACCCCTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGACCCAC
      * * * * *
345' AGTCACCGTCTCCCTCA
      * * * * *
360" GGTACCGTCTCCCTCA
      * * * * *

```

図 2.6 抗原特異性の変化したO.MマウスB細胞の抗体可変部遺伝子構造

2.4 考察

従来、成熟B細胞においては個々の細胞の抗原特異性を保つために抗体可変部遺伝子のV(D)J再構成を触媒する酵素であるRAGの発現は抑制されていると考えられてきた。図2.4において示したように未刺激のQMマウス由来成熟B細胞においてもRAGの発現は抑制されている。しかし、これらの細胞をLPS/IL4で刺激することによりIgE、IgG1へのクラススイッチと同時にRAGの再発現が誘導されることが明らかとなった(図2.3、2.4)。また、クラススイッチした細胞の産生する抗体の約50%は、NPに対する結合性を失っているという興味深い結果が得られた(図2.5)。さらに、IgG1へクラススイッチした細胞の抗体重鎖可変部遺伝子の配列を明らかにしたところ、17.2.25カセットのDJカセットが保存され、V断片のみが他の断片と組換わっているクローンが見出された。従来、*in vivo*においてRAGがシグナル配列を認識して切断を行った場合に生成する、いわゆるsignal brakeの存在は明らかにされているが(5,6)、本研究で得られたクローンは典型的なレセプターエディティングの結果得られる可変部の遺伝子構造を持っており、実際に成熟B細胞においてコーディングエンドが再度結合して新たなVDJカセットを生成している直接的な証拠が得られたのは世界で初めてである。

さらに、これらの結果は、IL4/LPSの刺激によって再発現したRAGは、非特異的な活性化の結果誘導された産物ではなく、細胞内で生理活性を持つことを示している。従来の、我々の研究から*in vivo*においては胚中心B細胞の一部でRAGが再発現していることが明らかとなっていることから、そのような場にお

いても同様の V(D)J 再構成が起こっていることを強く示唆している。

再発現した RAG の生理的意義としては以下のような可能性が考えられる。一つ目は、不適切な抗原特異性を持つクローンの除去である。胚中心は、侵入してきた外来抗原に対する免疫応答の場であり、B 細胞は体細胞突然変異により抗原に対してより高い親和性を持つ抗原レセプターを獲得する。現在までこの体細胞突然変異の制御機構は全く明らかにされておらず、基本的にはランダムな変異によって生じた様々な細胞のうち抗原に対し高い親和性を持つものが選択され増殖してくると考えられている。しかし、最近、このような体細胞突然変異の過程で、自己応答性の細胞が生成されてしまう場合があることが明らかとなっている。このような細胞が生じた場合に、骨髄中での負の選択過程と同様に RAG の再発現が誘導され、レセプターエディティングが行われるのではないかという可能性である。最近 SLE の患者においてレセプターエディティングが健常者より高頻度に末梢で発生しているということを示唆する報告がなされており(9)、この可能性の存在を強く支持している。

もう一つは、RAG の再発現により低親和性レセプターの可変部カセットを大きく変化させることにより、抗原に対して高い親和性を持つ V(D)J カセットの獲得を試みているのではないかという可能性である(10)。我々の、以前の研究によれば、胚中心で RAG を再発現しているかなりの細胞はアポトーシスに陥っている(11)。前者の可能性が正しければ、RAG が再発現した細胞は除去されるべきであるし、後者の可能性が正しければ、ごく一部の細胞は新たな高親和性レセプターを獲得して増殖を始めることになるが、多くの細胞はエディティング以前より高い親和性を獲得することが出来ずやはり除去されてしまうはずで

ある。

いずれの可能性ともここまで得られている実験事実を矛盾することなく説明することができることから、今後、いずれが正しいのかまたどちらとも正しいのか検討を加える必要が残されている。特に、自己免疫疾患の発症と RAG による成熟 B 細胞でのレセプターエディティングに何らかの関係があれば、重度の自己免疫疾患の治療法開発につながる可能性があり非常に興味深い。

2.5 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) Chen C. et al., *Immunity* 1997; 278: 298-301.
- 5) Han S. et al., *Science* 1997; 278: 301-305.
- 6) Papavasiliou et al., *Science* 1997; 278: 298-301.
- 7) Hikida et al., *J.Exp.Med.* 1998; 187: 795-799.
- 8) Cascalho M. et al., *Science* 1996; 272: 1649-1652.
- 9) Doner T. et al., *J.Clin.Invest.* 1998; 102: 688-694.
- 10) George A.J.T. et al., *Immunol.Today* 1999; 20: 196.
- 11) Hikida M. et al., *J.Immunol.* 1997; 158: 2509-2512.

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

成熟B細胞における RAG の再発現は、in vitro における LPS や抗 CD40 抗体と IL4、IL7 の組み合わせばかりでなく(1-3)、生体内のリンパ節内胚中心でも起きていることが明らかとなっている。しかし、その再発現の誘導や抑制の分子機構については現在多くの研究が行われている段階である。

Herz らのグループによれば、B細胞の抗原レセプターを強架橋した場合には RAG の再発現は強く抑制され、逆に弱く架橋された場合には強い RAG の再発現が誘導されている(4)。これらの結果から彼らは、B細胞が高親和性抗原によって抗原レセプターを架橋された場合には RAG の再発現は抑制され、低親和性の抗原で架橋された場合には RAG によるエディティングが行われると考えている。このような考え方は、抗原に応答性を有するB細胞の抗原特異性を保持するということになり、RAG の再発現による免疫応答の発散を防ぐ意味でも重要な概念であると考えられる。しかし、彼らの研究においてはいずれもB細胞と抗原提示細胞との相互作用による調節を無視しており、実際の胚中心内での現象を厳密に捉えているとは考えにくい。

最近の研究によれば、胚中心内部では抗原抗体複合体に補体が結合した形で濾胞樹上細胞上に提示されているとされている(5)。B細胞はこのような免疫複合体を認識して結合すると考えられているが、このとき同時に補体レセプターも架橋されることになる。このような環境下で補体レセプターは抗原レセプターからのシグナルを増強する場合があることが報告されているが(6)、一方では、補体レセプターからのシグナルがB細胞上の抗原レセプターの強架橋によって

誘導されるアポトーシスを抑制するという報告もあり(7)、抗原レセプターからのシグナルに対して正の調節を行うのか負の調節の行うのかについて画一的な解釈はできないのが現状である。したがって、生体内でのB細胞による抗原認識を考える上で補体レセプターからのシグナルを合わせて考えることは必須であると考えられる。

この章においてはこの問題を明らかにするために抗原レセプターの架橋のみならず、補体レセプターと抗原レセプターの共架橋を行うことにより生体内でのRAGの再発現調節機構について明らかにすることを試みた。

3.2 方法

3.2.1 細胞培養

第2章と同様の方法で行った。ただし、抗原レセプターの架橋が必要な場合には抗IgM抗体のF(ab')₂断片 (Kapel) もしくはビオチン化した同断片を培地に10μg/mlの濃度で培養開始時から終了時まで添加している。さらに、補体レセプターの架橋は抗マウスCD21/35抗体 (Pharmingen) もしくは、この抗体をビオチン化した抗体を使用した。さらに、抗原レセプターと補体レセプターを共架橋する場合は、ビオチン化した抗IgM抗体のF(ab')₂と抗マウスCD21/35抗体を添加し、30分間氷上で静置した後、アビジンを添加、培養を行った。

3.2.1 フローサイトメトリー

第2章と同様の方法で行った。

3.2.2 組織染色

C3Hマウス (日本チャールズリバー) の後肢に抗原としてNP-CGGを20μgずつ免疫した。アジュバントにはalumを使用した。免疫後8から9日目に膝下リンパ節を摘出し、OCT compoudで包埋急速凍結した組織を使用時まで-80℃で保存した。使用時には、クリオスタットで8μmの凍結切片を作製し、アセト

ンで固定後、染色を行った。濾胞樹状細胞の染色には、FDC-M1 抗体を使用した。

3.2.3 RAG mRNA の検出

第 2 章と同様の方法で行った。