

# 抗体産生細胞の多様性とその選択機構の解明

石毛 晶子

秋田大学  
2021

## 目次

	ページ
<b>1. 研究背景</b>	
1-1. 進化と生体防御	6
1-2. 「二度なし」から免疫学へ	6
1-3. 自然免疫と獲得免疫	7
1-4. 獲得免疫応答	8
1-5. 抗原受容体の多様性獲得機構	8
1-6. B 細胞の分化と成熟	9
1-7. 胚中心の形成と抗親和性細胞の選択	10
1-8. 体細胞突然変異と細胞選択	12
1-9. 記憶免疫応答	13
1-10. B細胞選択と Bcl-2 ファミリー分子	14
引用文献	17
<b>2. 序章</b>	
2-1. イントロダクション	22
引用文献	26
<b>3. 方法</b>	
3-1. 使用マウス	30
3-2. Bim conditional ノックアウトのためのターゲティング コンストラクトの作製	30
3-3. ES 細胞株 Bruce4 の培養	32
3-4. Bruce4 への遺伝子導入と選択	32
3-5. 相同組換え体の検出	33
3-6. ES 細胞の受精卵へのマイクロインジェクションと	

産仔の解析	33
3-7. 交配による Bim cKO 系統の樹立	34
3-8. 抗原およびマウスの免疫	34
3-9. ELISA 法による血中抗体価の測定	35
3-10. フローサイトメーターによる細胞集団の解析	36
3-11. 免疫したマウスからの抗体産生細胞の シングルセルソーティング	38
3-12. 胚中心B細胞のシングルセルソーティング	38
3-13. ELISPOT 法による抗体産生細胞数の解析	39
3-14. V <sub>H</sub> 186.2 抗体可変部塩基配列の RT-PCR 法による解析	40
3-15. 組織染色	41
3-16. 統計学的計算	41
引用文献	46

## 4. 結果

4-1. Bim コンディショナルノックアウト ( cKO ) マウスの 作製	48
4-2. Bim による T 細胞非依存性の免疫応答の調節	50
4-3. B 細胞での Bim の欠損による T 細胞依存性の 抗体産生調節	57
4-4. Bim による T 細胞依存性免疫反応の初期段階での 抗体産生細胞の生成調節	64
4-5. 正常マウスと Bim 欠損マウスにおける 高親和性細胞の選択	69
4-6. B Bim cKO マウスにおける胚中心形成以前の	

IgG1 産生細胞の増加	72
引用文献	74
5. 考察	
5-1. 考察	78
引用文献	86
6. 総括	
6-1. 総括	90
7. 謝辞	
7-1. 謝辞	92

# 1. 研究背景

### 1-1. 進化と生体防御

生物は地球上に誕生して以来、様々な進化を繰り返し、いかに種を繁栄させるか、存続させるかの模索を繰り返してきた。最初は単細胞であった生物は、種の存続、個体維持のために、その他の種の存続も脅かし、そうした競争の中で偶然変化を起こし生き残ったもの、あるいは偶然、共生という形が成立し、新たな生体として維持されたものが新たな種となり進化をとげてきた。しかし、生体は他の生物の生存を脅かすだけでなく、外敵から脅かされる側にもなり得ることから、脅威に対する防御方法も模索してきたと考えられている(1)。例えば、現代のバイオテクノロジーには欠かせない制限酵素は、大腸菌に代表される微生物が別の種の微生物からの侵略を防ぐ際に自己と非自己を区別し、非自己の DNA を切断し排除する防御機構の一つと考えられる(2)。カビなどの真菌類では抗生物質により他の原核生物から自己を防衛し、多細胞生物に進化すると、動物界ではカイメンなどの無脊椎動物においても自己と非自己を区別する機能を獲得している(3)。より高等な脊椎動物になると、生体を維持するためには個々の細胞レベルでは対処できなくなる。そのため生物はホメオスタシスを維持しつつ、外敵からの防御を行う専門の組織を作り複雑なネットワークを築いてきた。現代では、このような防御の仕組みを免疫系と総称している。

無顎類から有顎類への進化するにつれ、当初、非常に単純な防御機構しか持たなかったのが、より複雑かつ強固な防御の仕組みへと変化してきた。

### 1-2. 「二度なし」から免疫学へ

体系だった免疫学の学問としての始まりは、1798 年に報告されたエドワード・ジェンナーの天然痘に対する牛痘ワクチンの利用(4)であるとされている。しかし、紀元前 5 世紀頃のギリシアの記録書には「二度なし」の記述があり、この頃には既に人類は「免疫」の現象に気がついていたことになる。その後、中世ヨーロッパでペストが大流行した際、ペストに罹患したにも関わらず奇跡的に助かった者は二度とペストには罹らないことから、法王はこれを神ご加護と捉え、これらの者の課税を免除した。この「神のご加護のある人は課税(munitas)

を免れる(im-)」が後に immunity の語源となった。それから 500 年あまり後、オスマントルコの人痘法や牛飼いが天然痘に罹患しにくいなどのことに着想を得たジェンナーが「二度なし」を安全にかつ意図的に起こす牛痘ワクチンを確立した。だがこの時点でも、どのような仕組みで「二度なし」が起こるのかは科学的に説明することはできなかった。そして 19 世紀終盤にルイ・パスツール、ロベルト・コッホ、そして北里柴三郎により抗毒素・抗体が発見され免疫学は大きく前進することとなった(5)。

### 1-3. 自然免疫と獲得免疫

ヒトにおける免疫系は大きく分けると、自然免疫系と獲得免疫系に分けられる(6)。自然免疫は、先に述べたカイメンなどのように、糖鎖の繰り返し構造等のパターン認識にもとづく比較的単純な仕組みで自己・非自己を区別し、外来からの侵入者を補体や食作用などにより非選択的に排除する様式である。哺乳類における自然免疫系では、補体系による侵入細胞やバクテリアの直接破壊に加えて、好中球やマクロファージ、樹状細胞などの免疫細胞により侵入してきた細菌などを食作用で排除する(7)。しかし、自然免疫は異物の侵入後、長期間にわたって維持されることはないことから、主に外敵からの第一防御を担っていると考えられている。加えて、自然免疫を担う細胞は、病原体に共通して変化しない構成成分を単純な仕組みでパターン認識する。そのため、同一の病原体が再び侵入してきても、排除のための免疫反応は初回と同じ単純なものになり、免疫応答が初回に比べて増強されることはない。したがって、自然免疫だけで「二度なし」の機構を説明することは困難である。「二度なし」の現象では、侵入した異物を個々に記憶するメカニズム(免疫記憶)があり、同じ外敵が再度侵入した際には迅速かつ効果的に反応する仕組みの存在が示唆されてきた。現代では、多くの研究の結果、これらの免疫記憶が獲得免疫と呼ばれる免疫系で実現されているということが明らかとなっている(8)。さらに、獲得免疫と自然免疫は相互に関係していることが明らかとなっている。主に、自然免疫で働くマクロファージと樹状細胞(Dendritic cell; DC 細胞)は補体によりオプソニン化された主にタ

ンパクよりなる異物や病原体を貪食すると細胞内で分解し、生成したペプチド断片を class II 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC II) 上に結合した形で獲得免疫の司令塔の役割をする T 細胞に提示する。その後、抗原提示を受けた T 細胞が活性化し多くの免疫細胞の活性化を誘導することで獲得免疫が稼働する。抗原提示の作用はとりわけ樹状細胞が強く、未経験の外敵が侵入した際の獲得免疫応答の開始は主に樹状細胞の抗原提示により開始されると考えられている(9)。このように 2 つの免疫系はお互いに完全に独立しているわけではなく、樹状細胞やマクロファージによる橋渡しがあることで、自然免疫から獲得免疫への移行が効率よく、かつ正確になされ、免疫系全体が効果的に働くようなメカニズムを構成している。

#### 1-4. 獲得免疫応答

獲得免疫に関与する代表的な細胞は、造血幹細胞に由来し骨髄で分化・成熟する B 細胞と、骨髄から移動して胸腺で分化・成熟する T 細胞である。B 細胞は、異物を除去する抗体を産生し体液性免疫で中心的な役割を果たしている。一方、T 細胞は様々なサイトカインを分泌したり共刺激分子を細胞表面に発現することで、B 細胞に対するヘルプ機能を提供したり抑制する機能を有する CD4<sup>+</sup> T 細胞群(Th1, Th2, Th17, Treg)と、ウイルスや細菌などの外敵が感染した細胞を直接認識し破壊する、細胞性免疫で中心的な役割を果たしている CD8<sup>+</sup> T 細胞群の 2 つに分けられる。体液性免疫においては、B 細胞は抗原受容体を架橋した抗原をエンドサイトーシスで貪食しペプチドまで分解し、MHC II 複合体として CD4<sup>+</sup> T 細胞に提示する。抗原提示を受けた CD4<sup>+</sup> T 細胞はサイトカインを分泌し、共受容体を発現して B 細胞を活性化することで獲得免疫が惹起される(10)。

#### 1-5. 抗原受容体の多様性獲得機構

高等真核生物は外部から侵入する全ての外敵に対して対抗する必要がある、高度な抗原認識システムを構築することでこれを達成している。一方で、このような多種多様な抗原すなわち異物をすべて認識するためには、B 細胞上の B 細

胞受容体( BCR )、T 細胞上の T 細胞受容体( TCR )がこの世に存在する全ての抗原のエピトープ (抗原決定基) の種類だけ存在しなければならない。それぞれの抗原に対するレセプター遺伝子が 1 対 1 対応で存在すると仮定すると、それだけで  $10^{15}$  個もの遺伝子が存在することになるが、ヒトの場合ゲノム上に存在する遺伝子は 2~3 万個であると言われており、このような少ない数の遺伝子で極めて大きな多様性を実現するメカニズムは、免疫学の大きな謎とされてきた。利根川らは、1976 年に遺伝子再構成による抗体の多様性創出機構の存在を証明し、この問題を解決した(11)。この研究から、抗原受容体の抗原が結合する部位 (可変領域) を決定する遺伝子は複数の遺伝子断片からランダムに選ばれた後に、切断・再結合の過程をへて再構成されることで作られることが明らかとなった。さらに、その後の研究により、この抗原受容体の遺伝子再編成が行われる際に断片と断片の間にランダムに塩基が挿入されることも示された。これらの研究から、抗原受容体である TCR と BCR の多様性は、遺伝子断片のランダムな選択と塩基のランダムな挿入・欠失の二重の仕組みで膨大な種類の抗原に対抗していることが明らかとなった(12)。

#### 1-6. B 細胞の分化と成熟

B 細胞は成体においては、一時リンパ組織である骨髄で proB 細胞、preB 細胞を経て immature B 細胞まで分化し、未成熟の状態です二次リンパ組織である脾臓に移動し(13)、さらに transitional 1、transitional 2 B 細胞の各段階を経て naive 成熟 B 細胞まで成熟する(14)。体外からの抗原が侵入していない状態では、B 細胞は脾臓やリンパ節といった二次リンパ組織中で 1 次濾胞と呼ばれる領域を形成しており、T 細胞が集まっている T 細胞領域とは分かれて存在している。このように 1 次濾胞を形成している成熟 B 細胞は、抗原によって活性化されるとその一部が T 細胞領域との境界で T 細胞からの活性化を受ける。抗原と T 細胞による活性化を受けた B 細胞は、髄索へと移動し一部が、いわゆる short-lived plasma cell と呼ばれる短寿命の抗体産生細胞へと分化する(15)。さらに、一部は 1 次濾胞へと戻り胚中心を形成する。

### 1-7. 胚中心の形成と高親和性細胞の選択

B 細胞が抗原に感作し T 細胞からの刺激を受けると、抗体産生細胞へと分化しなかった細胞の一部が、脾臓などの 2 次リンパ組織において胚中心 ( germinal center; GC ) と呼ばれる微小環境を形成する。胚中心では B 細胞は活発に増殖し、その数を増やすとともに、抗体遺伝子の可変部遺伝子にランダムに体細胞突然変異 ( somatic hyper mutation; SHM ) と呼ばれる変異を入れる。体細胞突然変異により、一部の B 細胞が抗原に対してより強固に結合できる可変部を持つ抗体を産生出来る細胞に変化することが知られている(16)。

胚中心は発達すると、その内部に明領域 ( light-zone; LZ ) と暗領域 ( dark-zone; DZ ) と呼ばれる領域が形成される。DZ では細胞分裂が活発に行われるとともに、一部の B 細胞の持つ BCR のクラスが IgM から、IgG1 などの他のクラスへと変化するクラススイッチが起きる。さらに、BCR の可変部遺伝子に SHM が導入される。DZ で体細胞突然変異を起こした B 細胞は LZ へと移動する。LZ では、多数の B 細胞のうち、DZ で SHM を起こした結果、抗原と十分強く結合できる BCR を獲得できた細胞は、濾胞樹状細胞 ( follicular dendritic cell; FDC ) が細胞表面に補体受容体を介して保持している抗原を FDC から奪い取り Tfh 細胞に抗原提示する。その結果、これらの B 細胞は、Tfh から、さらなる分化シグナルを受けることになり、抗体産生細胞や記憶 B 細胞へと分化することが可能となる。それに対して、SHM によって高い親和性を獲得することに失敗した B 細胞については、FDC から抗原を奪うことができないため、Tfh からの活性化シグナルを受けることができずアポトーシスによって排除されるか、再び DZ へと戻り SHM を繰り返すと考えられている(17,18)。

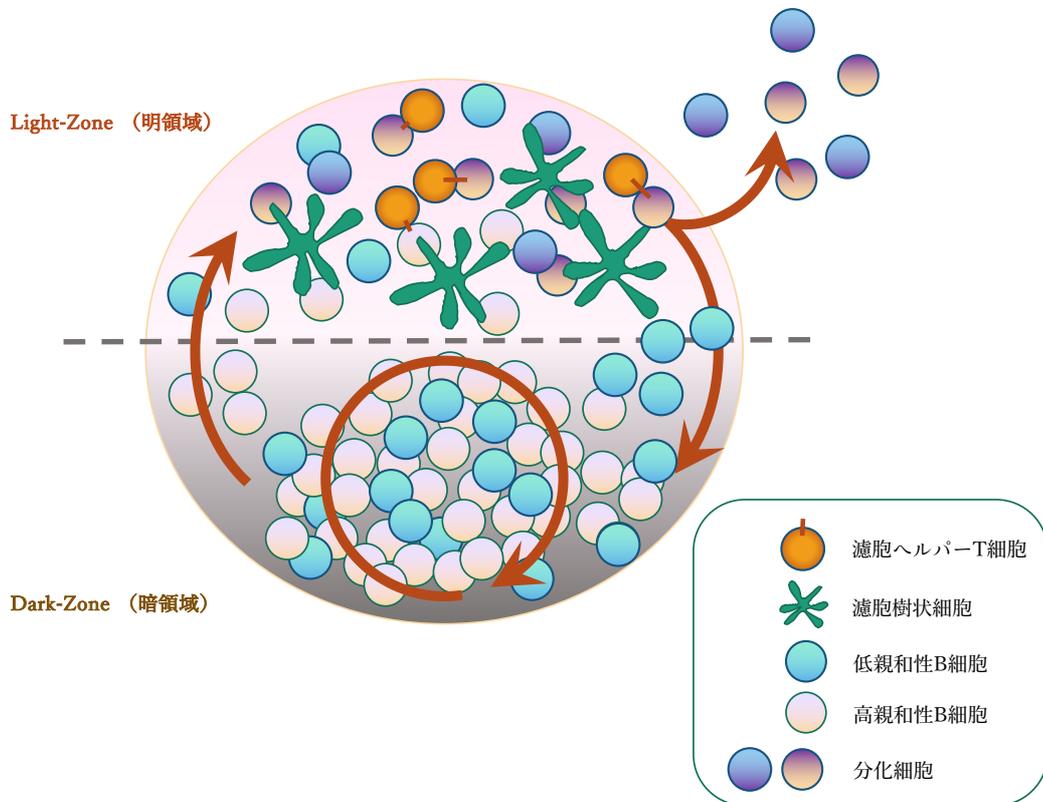


図 1-1. 胚中心におけるB細胞の分化

胚中心を形成したB細胞の一部は、明領域で選択を受け記憶B細胞や抗体産生細胞へと分化して胚中心から離脱する。離脱できなかった細胞は、暗領域へと移動し増殖した後に再び明領域へと移動し選択を受ける。

## 1-8. 体細胞突然変異と細胞選択

胚中心では上述したように、クラススイッチと並行して、抗体可変部遺伝子の塩基配列に SHM を起こし、さらなる多様性と親和性を獲得することが知られている。これを触媒しているのが Activation-Induced Cytidine Deaminase ( AID ) と呼ばれる酵素である(19)。

B細胞で起こる SHM は、抗体可変部を構成するアミノ酸の置換・欠失・挿入を行うことにより、分子レベルで抗体の抗原に対する親和性に変化をもたらす。このような現象を実現するために、AID は RAG-1、2 の働きで再構成された抗体重鎖可変部をコードする VDJ カセット、および、軽鎖可変部をコードする VJ カセットに変異を導入する。AID が1本鎖 DNA に結合すると、AID のシチジン脱アミノ基酵素活性により DNA 中の C (シチジン) を U (ウリジン) へと変えてしまう。U を塩基として含むデオキシウラシル残基は、RNA を構成するヌクレオチドであるウラシルに類似したヌクレオチドであり、本来、DNA には含まれていない。したがって、CU 変換は、B細胞にとっては DNA の損傷に相当するため、DNA の修復機能が働き U は T (チミン) へと修正される。この修復により、DNA 上で C から T への変異がおこることになる。その結果、元々は、C-G の塩基対を構成していた2本鎖 DNA のうち、片側の C が T へと変わってしまったために、T-G ミスマッチを生じることになる。このミスマッチを解消するために、細胞は、UT 修復に引き続き、G を A に置換する反応を行う。その結果、CG ペアであった配列が TA ペアへと置き換えられることになる。このような修復機構による塩基置換以外にも、DNA に U が入り込んだ部位を認識して、ウラシル N グリコシラーゼ ( UNG ) などの働きにより、異常な塩基の除去修復機構により塩基が除かれ修復が行われる。その際、T/A/G のいずれかが非選択的に挿入される反応が起こることによって変異が導入される場合があることが知られている。あるいは、塩基が取り除かれた領域周辺で error-prone DNA ポリメラーゼによる DNA 合成が起きることにより、塩基置換、挿入、欠失を伴う体細胞突然変異が引き起こされる場合があることも知られている。胚中心で活性化して AID を発現しているB細胞での SHM は分裂1世代

で 1000 塩基対に 1 つの程度の割合で起こり、AID が発現していない静止期 B 細胞と比較すると約 100 万倍高い変異の導入頻度であることが知られている (20)。このようにして、胚中心中で元々の可変部の構造をランダムに変化させた B 細胞集団から、( 1-7 ) で述べたような機構で高親和性を獲得したクローンが選択され、さらなる増殖、分化を行うことになる。

### 1-9. 記憶免疫応答

自然免疫と獲得免疫の大きな違いは、一度体内に侵入した外敵をタンパクレベルで記憶し、再度侵入された際に迅速に、かつ初回よりも強力な免疫応答がなされる点である。この、いわゆる記憶免疫応答では、初回免疫によって誘導される分化過程で長期寿命を獲得した記憶 B 細胞と記憶 T 細胞が非常に重要な役割を果たしている。さらに、これらの細胞に加えて、初回の免疫応答時に高親和性を獲得した B 細胞から分化し、骨髄へと移動した後、長期間にわたって抗体を出し続ける長寿命の抗体産生細胞も重要な役割を果たしていることが知られている。

最近の我々や他のグループの研究により、これまで広く知られていた胚中心を經由して産生される記憶 B 細胞に加えて、胚中心を經由せずに産生される記憶 B 細胞の存在が明らかとなっている。これらの記憶 B 細胞は二回目に抗原に再感作されると、迅速かつ大規模に胚中心を形成し、さらなるクラススイッチと親和性成熟が行われる。その速さは初回の免疫応答が 1 ～ 2 週間かかるのに対し、二回目の応答では 4 ～ 5 日程度であると言われている。さらに、記憶応答においては、一次応答と比べて高親和性の抗体が産生されるように変化する。

繰り返し同一のウイルスに感作されることに対する防御機構の解明や効果的なワクチンを実現するためには、記憶応答がどのような分子機構によって制御されているのか、すなわち、胚中心反応により、記憶 B 細胞がどのようなメカニズムで生成されているのかという問題を明らかにする必要がある。しかし、記憶 B 細胞の数が非常に少ないことや、記憶 B 細胞の誘導に非常に長い時間がかかる、などの技術的なハードルの高さが障害となり、記憶 B 細胞の生成機構や制御機構の分子メカニズムには不明な点が多く残されている(15)。

## 1-10. B細胞選択と Bcl-2 ファミリー分子

真核高等生物において不要な細胞を取り除くメカニズムとして中心的な役割を果たしているのがアポトーシスによるプログラム細胞死である。免疫系においても自己反応性の B 細胞や T 細胞は、それぞれ骨髄や胸腺でアポトーシスが誘導され、非自己反応性の細胞だけが選択され残されている。このようなアポトーシスによる、いわゆる負の選択を人為的に正常に起こせなくした遺伝子組換え動物では激しい炎症反応を伴う自己免疫疾患様の症状を呈することから、正常な個体では、アポトーシスにより自己を攻撃する細胞を除去することで自己免疫疾患の発症が抑制されていることが広く知られている。

一方で、獲得免疫応答の中で、血中抗体の親和性成熟を実現するために、高親和性を獲得した B 細胞が選択され増殖し、低親和性の B 細胞がどのように排除されているのかという分子機構は未だ詳細には解明されていない。本研究では免疫応答における B 細胞のアポトーシス制御機構に着目し、この重要な問題にアプローチを試みた。

これまでの多くの研究から細胞選択に関わる最も重要なアポトーシス制御分子群として Bcl-2 ファミリー分子が広く知られている(21)。Bcl-2 ファミリー分子群は、アポトーシスを抑制する anti-apoptotic な分子群とアポトーシスを促進する pro-apoptotic な分子群より構成されており、これらの分子群の中で代表的な pro-apoptotic な制御分子の一つである Bim は胸腺における自己反応性の T 細胞における負の選択に強く関与していることが報告されている(22)(23)。また、B 細胞においても Bim 遺伝子を欠損させると自己抗原による BCR の刺激によるアポトーシスの誘導が阻害され、骨髄中での自己反応性の B 細胞の除去に問題を生じることが報告されている(24)。しかし、これらの報告においては、いずれも T 細胞もしくは B 細胞が成熟する過程での選択機構を解析しており、それらの選択が正常に終わった後、末梢リンパ組織において免疫応答が惹起された時に、胚中心で起こる高親和性 B 細胞の選択の過程に Bim によるアポトーシスがどのように関与しているかという点については多くが未解明のまま残されてい

る。

さらに、胚中心 B 細胞においては通常の B 細胞と大きく異なる遺伝子の発現制御が行われていることが知られており、遺伝子の発現を制御する転写因子に関する研究も多くなされている。中でも、Bcl6 は胚中心の形成に不可欠な重要な転写制御因子であることが明らかにされている。我々は、この点に着目し、Bcl6 の B 細胞選択的コンディショナルノックアウト ( cKO ) マウスを作製し、免疫応答を詳細に解析した。その結果、記憶 B 細胞の生成経路には、これまで知られてきた胚中心における生成経路以外にも、胚中心を経由せず免疫応答のごく初期の段階で生成される経路が存在することが明らかとなった(25) (26) (27)。同時期に、他の研究グループからも同様の報告がなされており(28) 、このような経路で生成される記憶 B 細胞がどのような役割を持っているのかという点に注目が集まっている。

胚中心外で生成された記憶 B 細胞は、体細胞突然変異を受けることができないことから、胚中心で生成される記憶 B 細胞と比べて抗原に対して低親和性を保持していることが明らかとなっている。したがって、二度目の抗原感作が起きたときには、これらの記憶細胞が分化して生成される形質細胞からは、抗原に対して低親和性の抗体がつくられることが予想される。一方で、実際の免疫応答においては、多くの場合、抗原に対して高親和性を獲得した記憶 B 細胞が分化して生成される形質細胞が抗原の排除に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、比較的短期間に構造を変化させるウイルス等の生体内からの排除においては、特定の限られたエピトープにだけ高親和性を獲得した抗体だけで十分排除できるのか否かは明らかではない。そのような抗体を産生する B 細胞の BCR は、その他の類似した構造のエピトープに対する結合活性を失っている可能性があり、ウイルスの抗原性の変化に対応できなくなってしまうとも考えられるからである。このような仮説にもとづき、免疫応答の初期に胚中心を経由せずに抗原に対して低親和性の記憶 B 細胞が形成されるのは、親和性は低いものの広範なエピトープに結合できる抗体を産生する形質細胞を生成できる可能性を残して、高親和性の抗体が内包するリスクを回避するためではな

いかと予想されているが詳細は明らかとなっていない。

そこで、本研究では、B細胞の初期選択に重要な役割を果たしているアポトーシス促進因子である **Bim** に着目し、胚中心に由来する記憶B細胞が分化してつくられる高親和性の抗体産生細胞と、胚中心を経由せずにつくられる低親和性の抗体産生細胞の生成に、**Bim** が係わっているのか否かを詳細に調べることで、免疫応答における **Bim** によるB細胞選択の生理的意義を明らかにすることを試みた。

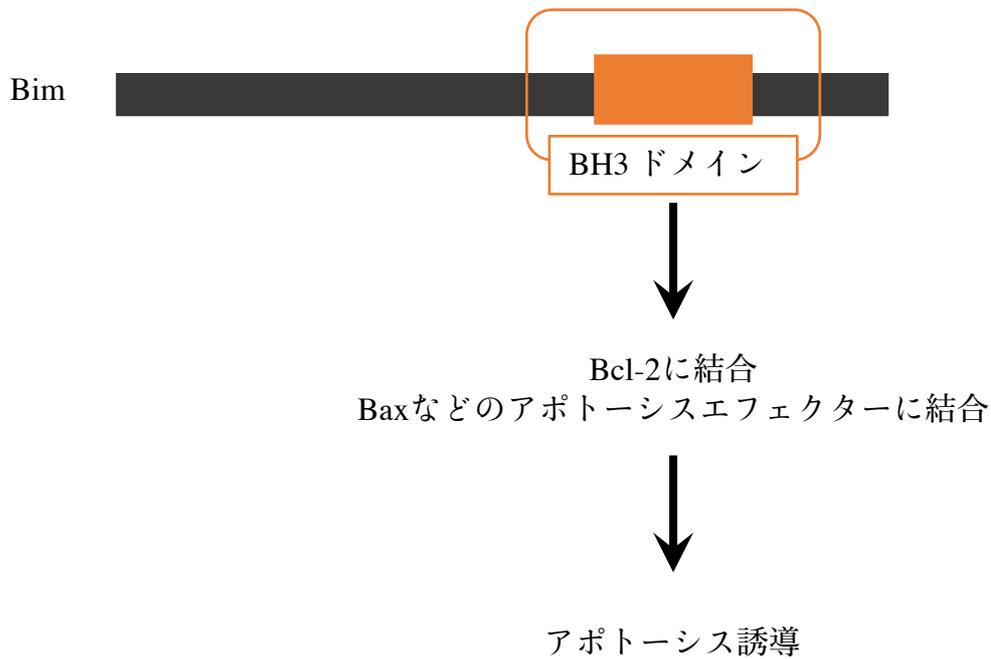


図 1-2 : anti-apoptotic BH3- only タンパク質 Bim の働き

Bim に代表される BH3-only タンパク質は、bcl-2 ファミリー分子に特徴的な BH1、BH2、BH3 ドメインのうち、BH3 ドメインのみを有しており、その BH3 ドメインを介して Bcl-2 や Bax などと相互作用することで機能を発揮していることが知られている。

## 引用文献

- 1 Kasahara, M. 1998. What do the paralogous regions in the genome tell us about the origin of the adaptive immune system? *Immunol. Rev.* 166:159.
- 2 F, D. I. F., Micheli, G., and Camilloni, G. 2019. Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *J Biosci* 44.
- 3 Saito, Y. 2013. Self and nonself recognition in a marine sponge, *Halichondria japonica* (Demospongiae). *Zoolog Sci* 30:651.
- 4 Riedel, S. 2005. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 18:21.
- 5 Cavaillon, J. M. 2018. Historical links between toxinology and immunology. *Pathog Dis* 76.
- 6 谷口 克. 標準免疫学 第3版 第2章
- 7 Litman, G. W. and Cooper, M. D. 2007. Why study the evolution of immunity? *Nat Immunol* 8:547.
- 8 Pancer, Z. and Cooper, M. D. 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 24:497.
- 9 Heath, W. R., Kato, Y., Steiner, T. M., and Caminschi, I. 2019. Antigen presentation by dendritic cells for B cell activation. *Curr Opin Immunol* 58:44.
- 10 Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., and Antonetti, F. R. 2011. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 7 Suppl 1:S1.
- 11 Hozumi, N. and Tonegawa, S. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3628.
- 12 Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575.
- 13 Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D., and Hayakawa, K.

1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173:1213.
- 14 Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C., and Carsetti, R. 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* 190:75.
- 15 Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. 2015. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* 15:149.
- 16 Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. 1991. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354:389.
- 17 MacLennan, I. C. 1994. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12:117.
- 18 De Silva, N. S. and Klein, U. 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* 15:137.
- 19 Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102:553.
- 20 Pilzecker, B. and Jacobs, H. 2019. Mutating for Good: DNA Damage Responses During Somatic Hypermutation. *Front Immunol* 10:438.
- 21 Huang, D. C. and Strasser, A. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103:839.
- 22 Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., Adams, J. M., and Strasser, A. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286:1735.
- 23 Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., and Strasser, A. 2002. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415:922.

- 24 Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D. M., and Strasser, A. 2003. Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J. Exp. Med.* 198:1119.
- 25 Takahashi, Y., Ohta, H., and Takemori, T. 2001. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* 14:181.
- 26 Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T. 2002. Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* 17:329.
- 27 Inamine, A., Takahashi, Y., Baba, N., Miyake, K., Tokuhisa, T., Takemori, T., and Abe, R. 2005. Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *Int Immunol* 17:581.
- 28 Taylor, J. J., Pape, K. A., and Jenkins, M. K. 2012. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* 209:597.

## 2. 序章

## 2-1. イントロダクション

液性免疫応答は、T細胞依存性と非依存性応答に分類できることが知られている。T細胞非依存性応答は、B細胞上の Toll-like-receptor 群等の種々の活性化受容体からのシグナルによってB細胞が抗体産生細胞へと分化するシステムであり、いわゆる自然免疫に近い応答様式であることが知られている。一方で、T細胞依存性の免疫反応では、B細胞はリンパ節や脾臓などの二次リンパ組織のT細胞領域の外側で抗原をBCRによって取り込んだ後、MHC II 上に提示する。これらのB細胞は、自身の MHC II 上に提示したペプチド断片を認識できるTCRを発現しているT細胞と cognate interaction と呼ばれる相互作用することにより活性化される(1)(2)。これらの活性化されたB細胞の一部は、速やかに形質細胞（plasma cell）に分化する濾胞外反応系に移行する。残りの活性化B細胞の一部は、濾胞に戻り転写因子 Bcl-6 の発現により胚中心（germinal center; GC）を形成する。これまでの多くの研究から、GCは高親和性の抗体産生細胞や記憶B細胞が作られる中心的な場所であると一般的に考えられてきた。

T細胞との cognate interaction によって活性化され、ただちに形質細胞へと分化するB細胞は、濾胞とT細胞領域の境界からT細胞領域と赤脾髄との間の領域にある splenic bridging channel または junction 領域と呼ばれる部位に移動する(3)。移動したB細胞群は、体細胞突然変異を受ける前のオリジナルの germline 型配列を持った重鎖可変領域（VH）、軽鎖可変領域（VL）遺伝子から作られる、抗原に対して相対的に低い親和性を持つ抗体を産生する短寿命（short-lived）の抗体産生細胞の集団を形成する(4)(5)。このようにして濾胞外の分化経路で生成された short-lived の抗体産生細胞は、免疫応答の早い段階での抗体産生を担っており、病原体に対する初期防衛における重要な役割を果たしていることが知られている(6)。しかし、免疫応答が進むにつれ、胚中心における体細胞突然変異とそれに続く細胞選択が行われることにより、高親和性B細胞が全B細胞中に占める割合が上昇する。その結果、高親和性B細胞が優先的に抗原を取り込むようになるため、低親和性B細胞が抗原に接触できる機会が低減し免疫応答への参加が制限されていくことになる(7)。このような一連の反応の結果、

血中に分泌される抗体の親和性は徐々に高まっていくことになる。

一方、ほとんどの plasma cell の前駆細胞である plasma blast は細胞分裂の S 期にあり、盛んに DNA を合成して細胞分裂を繰り返しているにもかかわらず、抗原特異的な plasma cell の数は免疫後 4 日目にピークを迎え、その後 7 日目までに急速に減少する(3)(8)。これまで多くの研究がなされてきたにもかかわらず、なぜこれらの plasma cell が急速に減少するのかは未解明のままである。

濾胞外の分化経路に由来する抗体産生細胞よりも遅れて生成されることが知られている(9)(10)、胚中心依存性、すなわち胚中心を経由する分化経路によって生成される抗体産生細胞(= plasma cell)は、抗体の VH、VL 遺伝子に体細胞突然変異を蓄積し抗原への親和性を高くすることで、より質の高い抗体反応が可能な抗体を産生すると考えられている。また、抗原の排除後に免疫反応が低下した後も主に骨髄中で生き続ける長寿命(long-lived)の高親和性抗体産生細胞も胚中心に由来することが知られている(10)(11)。免疫 10 日目頃から、胚中心由来の高親和性抗体産生細胞が脾臓やリンパ節から骨髄へと移動を始め、一次応答の後期までに徐々に蓄積されていくことが明らかとなっている(9)(12)(13)。その後、これらの細胞が骨髄中の周囲の外部環境からのシグナルに依存して長寿命を獲得すると考えられている。このような、胚中心依存性の long-lived な高親和性抗体産生細胞が骨髄に優先的に蓄積される現象は、血中抗体の親和性向上の必須要素であり、免疫防衛にとって重要であると考えられている。

アポトーシスは免疫機構において重要な役割を果たすことが知られている(14)。アポトーシスを制御する重要な分子群の一つが Bcl-2 ファミリーと呼ばれており、それらの中でも、BH-3 only タンパク質ファミリーを構成するタンパク質群はアポトーシス促進性(pro-apoptotic)であり、多くの外部刺激に反応し細胞にアポトーシスを誘導する重要な役割を果たすことが示されている。代表的な BH-3 only タンパク質が Bim であり、このタンパク質はアポトーシス抑制的に働く Bcl-2 ファミリーのタンパク質である Mcl-1、Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w などと相互作用し、アポトーシスを誘導するシグナル経路を起動する(15)。

これまで、抗原による BCR の架橋が、Bim と Bcl-2 の相互作用を引き起こし、

B細胞の生存を抑制することが明らかとなっている。このことは Bim が BCR の架橋によって誘導されるアポトーシスによる B 細胞の選択的な除去において重要な役割を果たしていることを示唆している(16)。また、Bim 全身性欠損マウスにおいて、免疫応答の後期においても脾臓と骨髄中の低親和性 IgG1 抗体産生細胞が増殖し続けることが報告されている(17)。この研究において、抗体産生細胞の Bim 遺伝子を *in vitro* で欠失させる実験でも抗体産生細胞が長寿命を獲得できることが示されたことから、Bim 遺伝子を欠失した形質細胞が骨髄中で長寿命を獲得することが支持されている。さらに、Bim 全身性欠損マウスにおいて、免疫反応後期においても十分な親和性成熟が起こらないということから、Bim が胚中心由来の抗体産生細胞のアポトーシスを介する細胞選択に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆されているが、詳細な検討は行われていない。

これまでの多くの研究より、Bim は様々な組織で発現しており(18)、Bim の全身性欠損は多くの細胞に影響を及ぼし、種々の免疫疾患を引き起こすことが示されている(19) (20) (21) (22) (23)。したがって、Bim が全身で欠損したマウスにおける異常な抗体産生細胞の生成や蓄積が B 細胞において Bim が欠失したことによる内因性 ( B cell-intrinsic ) の現象なのか、B細胞以外の細胞で Bim が欠失したことによる外因性 ( B cell-extrinsic ) なものなのかは判然とせず、その解明が期待されていた。

これらのことを考慮して、本研究では、より生理学的な条件下において抗体産生細胞における Bim の役割を明らかにするために、Bim 遺伝子の BH3 ドメインをコードする第 4 エクソンを Cre recombinase の認識配列である LoxP で挟んだ Bim (f/f) マウスを新たに作成し、IgG1 へとクラススイッチする細胞でだけ Cre recombinase を発現する Cγ1-cre マウス(24)または、全 B細胞でのみ Cre recombinase を発現する mb1-cre (25)マウスと交配することで、Cre recombinase を発現する B細胞でのみ Bim 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウス ( Bim cKO ) の系統を構築した。これらのマウスを用いて、免疫後の胚中心形成と抗体産生細胞の生成・維持を調べることにより、液性免疫応答での

B細胞における Bim の生理的な役割を明らかにすることを試みた。

## 引用文献

- 1 Coffey, F., Alabyev, B., and Manser, T. 2009. Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles. *Immunity* 30:599.
- 2 Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y., and Cyster, J. G. 2009. EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* 460:1122.
- 3 MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C., and Vinuesa, C. G. 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194:8.
- 4 Jacob, J. and Kelsoe, G. 1992. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J. Exp. Med.* 176:679.
- 5 McHeyzer-Williams, M. G., McLean, M. J., Lalor, P. A., and Nossal, G. J. 1993. Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 178:295.
- 6 Luther, S. A., Maillard, I., Luthi, F., Scarpellino, L., Diggelmann, H., and Acha-Orbea, H. 1997. Early neutralizing antibody response against mouse mammary tumor virus: critical role of viral infection and superantigen-reactive T cells. *J Immunol* 159:2807.
- 7 Zhang, Y., Meyer-Hermann, M., George, L. A., Figge, M. T., Khan, M., Goodall, M., Young, S. P., Reynolds, A., Falciani, F., Waisman, A., Notley, C. A., Ehrenstein, M. R., Kosco-Vilbois, M., and Toellner, K. M. 2013. Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J. Exp. Med.* 210:457.
- 8 Sze, D. M., Toellner, K. M., Garcia de Vinuesa, C., Taylor, D. R., and MacLennan, I. C. 2000. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J. Exp. Med.* 192:813.
- 9 Smith, K. G., Light, A., Nossal, G. J., and Tarlinton, D. M. 1997. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *Embo j* 16:2996.

- 10 Takahashi, Y., Dutta, P. R., Cerasoli, D. M., and Kelsoe, G. 1998. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection. *J. Exp. Med.* 187:885.
- 11 Weisel, F. J., Zuccarino-Catania, G. V., Chikina, M., and Shlomchik, M. J. 2016. A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* 44:116.
- 12 Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K., and Ahmed, R. 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8:363.
- 13 Slifka, M. K., Matloubian, M., and Ahmed, R. 1995. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol* 69:1895.
- 14 Marsden, V. S. and Strasser, A. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.* 21:71.
- 15 Youle, R. J. and Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47.
- 16 Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D. M., and Strasser, A. 2003. Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J. Exp. Med.* 198:1119.
- 17 Fischer, S. F., Bouillet, P., O'Donnell, K., Light, A., Tarlinton, D. M., and Strasser, A. 2007. Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells. *Blood* 110:3978.
- 18 O'Reilly, L. A., Cullen, L., Visvader, J., Lindeman, G. J., Print, C., Bath, M. L., Huang, D. C., and Strasser, A. 2000. The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am. J. Pathol.* 157:449.
- 19 Chen, M., Huang, L., and Wang, J. 2007. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood* 109:4360.

- 20 Andina, N., Conus, S., Schneider, E. M., Fey, M. F., and Simon, H. U. 2009. Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. *Cell Death Differ* 16:1248.
- 21 Zhan, Y., Zhang, Y., Gray, D., Carrington, E. M., Bouillet, P., Ko, H. J., O'Reilly, L., Wicks, I. P., Strasser, A., and Lew, A. M. 2011. Defects in the Bcl-2-regulated apoptotic pathway lead to preferential increase of CD25 low Foxp3+ anergic CD4+ T cells. *J Immunol* 187:1566.
- 22 Chougnet, C. A., Tripathi, P., Lages, C. S., Raynor, J., Sholl, A., Fink, P., Plas, D. R., and Hildeman, D. A. 2011. A major role for Bim in regulatory T cell homeostasis. *J Immunol* 186:156.
- 23 Wang, X., Szymczak-Workman, A. L., Gravano, D. M., Workman, C. J., Green, D. R., and Vignali, D. A. 2012. Preferential control of induced regulatory T cell homeostasis via a Bim/Bcl-2 axis. *Cell Death Dis* 3:e270.
- 24 Casola, S., Cattoretti, G., Uyttersprot, N., Koralov, S. B., Seagal, J., Hao, Z., Waisman, A., Egert, A., Ghitza, D., and Rajewsky, K. 2006. Tracking germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin gamma1 transcripts by conditional gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7396.
- 25 Hobeika, E., Thiemann, S., Storch, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., Pelanda, R., and Reth, M. 2006. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13789.

### 3. 実験方法

### 3-1. 使用マウス

C57BL/6J は日本クレア株式会社より 8 週齢を購入した。mb1-cre、cγ1-cre、及び Bcl6(f/f) マウスはこれまでの報告で既に使用しているマウスを使用した(1)。

### 3-2. Bim conditional ノックアウトのためのターゲティングコンストラクトの作製

NCBI データベースから C57BL/6J の Bim 遺伝子の塩基配列を入手し、BH3 ドメインを欠損させるためのターゲティングコンストラクトを作製した (図 3-2-1)。BH3 ドメインを含む領域の 1.4 kbp の両側に Cre recombinase が認識する LoxP 配列を挿入し、その 5' 側 3.9 kbp を相同組換えのための long arm とした。また、3' 側の LoxP 配列の下流に FRT 配列で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子発現ユニット (Neo<sup>f</sup>) を配置した。さらに、その 3' 側に 1.6 kbp の short arm を結合し、random insertion されたクローンを除去するためのジフテリアトキシン発現ユニット (DTa) を配置して、プラスミド pEZ-LoxP/FRT-Neo-Bim を得た。

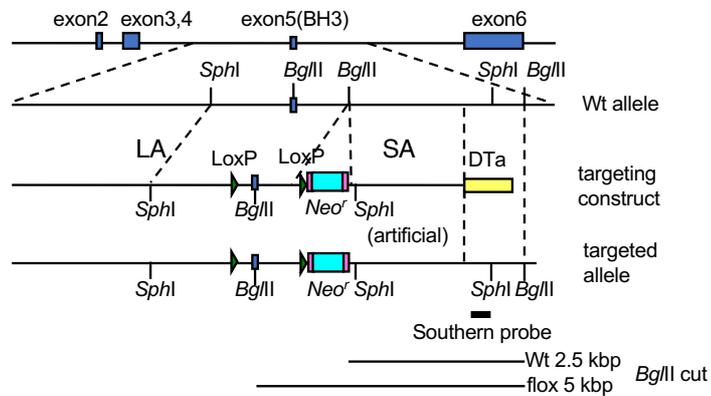


図 3-2-1 *Bim* conditional ノックアウトのためのターゲティングコンストラクトの作製

*Bim* floxed マウスは *Bim* 遺伝子の exon 5 の両側のイントロンに、それぞれ一つずつの *LoxP* 配列が組み込まれている。ターゲティングベクターを作製するために、C57BL/6 マウス由来の ES 細胞株 Bruce4 株のゲノムからロングアーム (LA) とショートアーム (SA) のゲノム DNA 断片を PCR により増幅し pEZ-Frt-Lox-DT ベクターにサブクローニングした。同様にしてターゲット領域も pEZ-Frt-Lox-DT にサブクローニングした。ターゲット領域は *LoxP* 配列を含むように増幅され、増幅した領域をターゲティングベクターの LA と SA の間に挿入した。

### 3-3. ES 細胞株 Bruce4 の培養

C57BL/6/N 由来の ES 細胞株である Bruce4 (2) は以下のように培養した。即ち、マイトマイシン C 処理を行った  $3 \times 10^6$  個の C57BL/6J マウス由来胎児繊維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞として 10 cm のディッシュに播種したものを用意し、その上に Trypsin で単細胞に分散した Bruce4 を加えた。4 ~ 5 日後に Bruce4 が 50 ~ 70% コンフルエントになったところで、Trypsin 処理を行い 4、5 枚のフィーダーで覆われた 10 cm ディッシュに継代を行った。Bruce4 の継代回数が増すと全分化能が徐々に低下していくため、極力、継代回数を抑制した。また、培養中は、ES 細胞用の増殖培地を 1 日 2 回交換した。

### 3-4. Bruce4 への遺伝子導入と選択

pEZ-LoxP/FRT-Neo-Bim 25  $\mu$ g を NotI で処理し直鎖状にした後に、 $1 \times 10^7$  個の Bruce4 に 230V、500 $\mu$ F の条件で BioRad 製エレクトロポレーターを使用して遺伝子導入した。

エレクトロポレーション後に、Bruce4 をフィーダー細胞でコートされた 10 cm ディッシュ 5 枚に播種した。培養開始後 24 時間後にネオマイシン耐性を獲得した ES クローンを選択するために G418 を添加し培養を継続した。相同組換えが正常に行われずに vector 全体がゲノムに挿入されてしまった ES 細胞はジフテリアトキシンが発現するため死滅する。したがって、コロニーを形成する ES 細胞は、pEZ-LoxP/FRT-Neo-Bim が Bim 遺伝子座に相同組換えを起こしたクローンが濃縮されていると考えられる。5 ~ 6 日後に形成されたコロニーを実体顕微鏡下で 1 個ずつ p200 ピペットマンで吸引し Trypsin 処理により単細胞へとばらばらにした。合計約 800 クローンをフィーダー細胞でコートした 96 well plate に単離した。96 well plate 中でコロニーが十分大きくなったことを確

認め、全ての well を trypsin 処理後に 3 枚の 96 well plate に分割した。これらのプレートのうち 2 枚は、十分な ES 細胞の増殖を確認後に凍結保存し、残りの 1 枚から DNA を抽出して PCR による相同組換え体のスクリーニングに使用した。

### 3-5. 相同組換え体の検出

ターゲティングベクターの short arm の 3' 側の領域とネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットの中にプライマーを設計し、PCR で目的の長さ（約 2.2 kbp）の長さの増幅産物が得られた相同組換え体の候補を 15 クローン得た。これらの細胞を凍結ストックから起眠し、PCR スクリーニングの再チェックおよび Southern blotting 用の DNA を得られる数の細胞と、保存用の細胞が得られるまで各クローンを増殖した。PCR により増幅された断片のクローニングと塩基配列の解析を行い正しく PCR が行われていることが明らかとなった ES クローンから Southern Blotting により正確に相同組換えが行われたクローンを 1 つ選び出し、マウス受精卵に導入する ES 細胞を得た（図 4-1-1）。

### 3-6. ES 細胞の受精卵へのマイクロインジェクションと産仔の解析

ES 細胞の導入は BALB/c の受精卵にインジェクション法により行った（実施は理化学研究所横浜研究所 RCAI（現 IMS）動物管理グループに依頼した）。生まれてきたオスのキメラマウスを C57BL/6J と交配し、F1 マウスの尾材から DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として、PCR による genotyping を行い、ES 細胞の相同染色体のうち、ターゲティングされた染色体を有する生殖細胞に由来する個体をスクリーニングし、Bim(f+)NeoR 系統を得た。

### 3-7. 交配による Bim cKO 系統の樹立

ES 細胞の選抜に使用したネオマイシン耐性遺伝子を染色体中に有する Bim (f/+) NeoR を FRT 配列の組換えを行う flippase を発現するトランスジェニックマウスである FLPe/B6(3)マウスと交配し、NeoR 遺伝子の削除を行い、Bim (f/+) を得た。Bim (f/+) 同士を交配し、Bim (f/f) を作製し、mb1 (cre/+) または Cγ1 (cre/+) と交配することで、Bim (f/f) mb1 (cre/+) および Bim (f/f) Cγ1 (cre/+) を得た。Bim (f/f) mb1 (cre/+) マウスは、全 B 細胞でのみ Bim 遺伝子が欠失する系統であり、Bim (f/f) Cγ1 (cre/+) マウスは、全 B 細胞のうち、IgG1 ヘクラススイッチを行う B 細胞亜集団でのみ Bim 遺伝子の欠損が起こる系統である。mb1-cre マウスは、ドイツフライブルク大学兼マックス・プランク免疫学研究所の Dr. M. Reth より分与いただいた。さらに、Bim (f/f) mb1 (cre/+) マウスについては、Bcl6 (f/f) マウス(1)と交配し、ダブルコンディショナルノックアウトマウス Bim (f/f) Bcl6 (f/f) mb1 (cre/+) を作製した。

### 3-8. 抗原およびマウスの免疫

免疫には 9-14 週齢のマウスを使用した。人工抗原としては、4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP) をハプテンとして、キャリアタンパクである Chicken Gamma Globulin (CGG) に結合した NP-CGG、あるいは Ficoll に結合した NP-Ficoll を作製し、それぞれ免疫に用いた。天然抗原としては、不活化インフルエンザウイルス (PR 8 株) を抗原として免疫を行った。

NP-CGG を抗原とした場合は、硫酸カリウムアルミニウムと水酸化カリウムの反応により得られた多孔性の水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとして使用し、不活化インフルエンザウイルスを抗原として用いる場合は、Addavax™ (InvivoGen) をアジュバントとして使用し、それぞれマウス腹腔内に

免疫した(1)(4)。また、T細胞非依存性の抗原である NP-Ficoll は、PBS で希釈し腹腔免疫をおこなった。1匹あたり、NP-CGG は 100 µg、不活化インフルエンザウイルス抗原は 10 µg、NP-Ficoll は 50 µg、を用いた。弱毒化 PR8 株及び Narita 株由来、不活化インフルエンザウイルス抗原は国立感染症研究所免疫部の高橋先生、安達悠先生より分与いただいた。

### 3-9. ELISA 法による血中抗体価の測定

血中抗体価は ELISA 法を用いて測定した。NP-Ficoll 及び NP-CGG で免疫したマウスから得られた血清に含まれる抗 NP 抗体を測定する場合は、Maxisorp 96 well plate ( NUNC ) を 50 µg/ml NP<sub>2</sub>-BSA または、50 µg/ml NP<sub>18</sub>-BSA を 100 µl/well で 4 °C で一晩コートした。インフルエンザウイルスを免疫したマウスから得られた血清中の抗ウイルス抗体価を測定する場合は、1µg/ml の濃度の HA 抗原または弱毒化ウイルスを 50 µl/well で 4 °C で一晩コートした Maxi-sorp 96 well plate を使用した。抗原でコーティングした 96 well plate は、洗浄後に 1% の BSA を含む PBS 溶液で一晩、4 °C でブロッキングを行った。

測定時は、血清を適宜希釈し抗原でコーティング後ブロッキングした 96 well plate に添加し 4 °C で一晩反応させた。洗浄後、2次抗体として goat-anti-mouse IgG-HRP ( 1:5000 希釈)、goat-anti-mouse IgG1-HRP ( 1:10000 希釈)、anti-mouse IgM-HRP ( 1:1000 希釈)、または anti-mouse IgG3-HRP ( 1:1000 希釈) (いずれも SouthernBiotech )のいずれかを添加し室温で2時間反応させた。発色は、1-step Ultra TMB-ELISA substrate solution ( Thermo Scientific )を使用し、発色停止には 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を使用した。450 nm の吸光度の測定には ARVO ( Perkin Elmer )を使用した。anti-HA IgG については、感染症研究所から定量済みのマ

ウス血清をご提供いただき、これを基準に血清の抗体価を求めた。anti-NP 抗体については、精製した anti-NP IgG1 モノクローナル抗体を用いて検量線を plate ごとに作製し抗体価を算出した。anti-NP IgG3 および anti-NP IgM については、サブクラス的一致する精製モノクローナル抗体を入手できなかったため、anti-NP IgG1 モノクローナル抗体を基準として、相対値として抗体価を求めた。抗体価の算定は、各標準抗体およびサンプルを系列希釈し、各希釈倍率における吸光度を測定した。最大値の 50% の吸光度を示す希釈倍率を各サンプルのユニットとした。

### 3-10. フローサイトメーターによる細胞集団の解析

非免疫マウスから脾臓、パイエル板、骨髄を摘出し、脾臓とパイエル板はスライドガラスで磨り潰しメッシュを通してから遠心後、ACK buffer ( 0.15 mM NH<sub>4</sub>Cl / 1.0 mM KHCO<sub>3</sub> / 0.1 mM EDTA ) による赤血球除去を行った。骨髄はシリンジを用いて骨髄細胞を押し出しほぐした後メッシュを通してから遠心した後、同様に赤血球除去を行った。洗浄後、細胞数を数え、解析に必要な数の細胞を 96 well plate に分注した。染色用抗体が細胞の Fc レセプター II/III に結合することを防ぐために、 $2 \times 10^7$  cells/ml の細胞懸濁液に、anti-mouse Fc $\gamma$ II/III 抗体 (clone:2.4G2, American Type Culture Collection) を 20 $\mu$ g/ml で添加し、氷上で 20 分間反応させた。その後それぞれの組織ごとに FACS 用の染色を行った。

脾臓 B 細胞系細胞に含まれる Transitional 1、2 及び 3 (T1、T2、T3) 細胞の解析では 2.4G2 の処理後、無関係の細胞を全て除外して解析するために、Biotin 化された anti-mouse Thy1.2 ( BioLegend )、CD3e ( BioLegend )、TER119 ( BioLegend )、NK1.1 ( BioLegend )、Gr-1 ( BioLegend )、DX5 ( BioLegend )、CD138 ( BD Bioscience )、CD43 ( BD Bioscience ) で染色し、streptavidin<sup>PE-CF594</sup> ( BD Bioscience )

で標識した ( dump 染色)。同時に、目的の細胞を染色するための以下の蛍光標識抗体を添加した。用いた抗体は、anti-B220<sup>BV510</sup> ( BioLegend )、anti-AA4.1<sup>APC</sup> ( BioLegend )、anti-CD21<sup>FITC</sup> ( BD Bioscience )、anti-IgM<sup>PacificBlue</sup> ( Molecular Probe Antibody labelling kit により自家作製 )、anti-CD23<sup>PE</sup> ( Thermo Fisher scientific ) である。B220<sup>+</sup>AA4.1<sup>-</sup> の成熟 B 細胞集団は、さらに、IgM<sup>int</sup>CD21<sup>int</sup> の濾胞 B 細胞と IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> の辺縁帯 B 細胞について解析し、B220<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup> 未熟 B 細胞集団は T1 ( IgM<sup>high</sup>CD23<sup>dull</sup> )、T2 ( IgM<sup>high</sup>CD23<sup>high</sup> ) および T3 ( IgM<sup>dull</sup>CD23<sup>dull</sup> ) について解析した。脾臓全 T 細胞と全 B 細胞の解析には、anti-mouse CD4<sup>APC</sup> ( BioLegend )、CD8 $\alpha$ <sup>FITC</sup> ( BioLegend )、anti-TCR $\beta$ <sup>PE</sup> ( Thermo Fisher scientific )、および anti-B220<sup>BV510</sup> で染色し解析した。

骨髄 B 細胞の解析では、2.4G2 処理後に同様に dump 染色と、FACS 用抗体 anti-B220<sup>BV510</sup>、anti-AA4.1<sup>APC</sup>、antiCD24<sup>FITC</sup>、anti-CD43<sup>PE</sup> ( BD Bioscience )、anti-IgM<sup>PacificBlue</sup> で染色した。B220<sup>+</sup> の B 細胞系列細胞の集団はさらに、AA4.1<sup>+</sup> 未熟 B 細胞については、CD24<sup>low</sup>CD43<sup>hi</sup> のプレプロ B 細胞、CD24<sup>int</sup>CD43<sup>int</sup> のプロ B 細胞、CD24<sup>hi</sup>CD43<sup>lo</sup> のプレ B 細胞について解析を行った(5)(6)。

パイエル板の B 細胞は 2.4G2 処理後、37 °C で anti-CXCR5<sup>APC</sup> ( BD Bioscience ) の染色を 30 分行い、洗浄後、anti-B220<sup>BV510</sup>、anti-Fas<sup>PE-Cy7</sup> ( BD Bioscience )、anti-PD-1<sup>PE</sup> ( Thermo Fisher Scientific )、anti-CD4<sup>BV421</sup> ( BioLegend ) および Peanut Agglutinin (PNA)<sup>FITC</sup> ( Vector Laboratories ) の染色を氷上で行った。解析では、全細胞集団を B220<sup>+</sup> B 細胞と CD4<sup>+</sup> T 細胞に分けた後、B 細胞は PNA<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> の細胞集団をパイエル板の胚中心細胞として、また T 細胞は、CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> の細胞集団を Tfh 細胞として解析した。

フローサイトメーターは、FACS AriaIII または FACS LSRFortessa X-20 ( BD Bioscience ) を使用した。

### 3-11. 免疫したマウスからの抗体産生細胞のシングルセルソーティング

免疫後 14 日後の脾臓を採取し、スライドガラスですりつぶした後、200 U/ml コラゲナーゼ ( Merck ) と 20 µg/ml DNaseIV ( Roche ) を含む DMEM 培地で懸濁し、37°C で 30 分間インキュベーションした。その後、洗浄し、ACK buffer による溶血処理を行った。2 × 10<sup>7</sup> cells/ml の細胞懸濁液に 2.4G を 20 µg/ml になるように加え氷上で 20 分間反応した。FITC で標識された anti-IgM ( Thermo Fisher Scientific )、anti-IgD ( Thermo Fisher Scientific )、anti-CD11b ( BioLegend )、anti-CD90.2 ( BioLegend )、anti-Gr-1 ( BioLegend )、anti-DX5 ( BioLegend )、anti-TER119 ( BioLegend ) で染色し、洗浄後 anti-FITC microbeads ( Miltenyi Biotec ) を添加し、MACS LS カラム ( Miltenyi Biotec ) で flow through 画分の細胞を回収することにより目的の抗体産生細胞を濃縮した。濃縮した細胞をビオチン化した anti-Igλ<sub>1,2,3</sub> ( BD Bioscience ) で染色し、更に FACS 用の抗体 anti-CD138<sup>PE</sup> ( BD Bioscience )、anti-B220<sup>BV510</sup>、NIP-BSA<sup>APC</sup>、及び streptavidin<sup>BV421</sup> ( BD Bioscience ) で染色した。洗浄後、Propidium Iodide を含む溶液に細胞を懸濁し BD FACS AriaIII により FITC<sup>negative</sup>/Igλ<sup>+</sup>/CD138<sup>high</sup>/NIP<sup>+</sup>/B220<sup>dull</sup> の細胞集団を抗体産生細胞として RT-PCR を行うための 96 well plate の各ウェルに細胞を 1 つずつ分取した。ソーティングには BD FACS AriaIII を使用した。

### 3-12. 胚中心B細胞のシングルセルソーティング

免疫後 14 日後の脾臓を採取し、抗体産生細胞のソーティングと同様の前処理を行った。その後、biotin 標識された IgM、IgD、AA4.1、CD3、CD90.2、TER119、

Gr-1、F4/80、DX5、NK1.1、CD43、CD11b および CD11c を添加し、氷上で 30 分間反応させた。洗浄後、streptavidin microbeads ( Miltenyi Biotech )を  $1.5 \times 10^8$  個の細胞あたり 100  $\mu$ l 添加し、MACS カラムにより flow through 画分の細胞を回収し、その後 FACS 用の抗体 anti-CD83<sup>PE</sup> ( BioLegend )、anti-I-A/I-E<sup>Alexa Fluor700</sup> ( BioLegend )、anti-CD38<sup>BV510</sup> ( BD Bioscience )、anti-IgG1<sup>BV421</sup> ( BD Bioscience )、NIP-BSA<sup>APC</sup>、anti-Fas<sup>FITC</sup> ( BD Bioscience )、streptavidin<sup>PE-CF594</sup> で染色を行った。ソーティングには BD FACSAriaIII を使用し、B220<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup>NIP<sup>+</sup> B 細胞を CD83<sup>high</sup>/MHC II<sup>high</sup>、CD83<sup>negative</sup> / (MHC II<sup>high</sup> and MHC II<sup>dull</sup> ) の集団に分けて RT-PCR を行う 96 well plate にシングルセルソートした。

### 3-13. ELISPOT 法による抗体産生細胞数の解析

ELISPOT 法の解析は(4)の方法を参考に行った。測定の前日に PVDF メンブレン 96 well plate ( Merck ) を 50  $\mu$ g/ml NP<sub>2</sub>-BSA または 50  $\mu$ g/ml NP<sub>18</sub>-BSA を 100  $\mu$ l/well で室温 2 時間 incubation し、PBS で洗浄後 1 % BSA/PBS 溶液を添加し 4 °C で一晩 blocking した。

NP-CGG 免疫後 14 日目のマウスから骨髓と脾臓を摘出し、脾臓はコラゲナーゼ・DNase 処理と赤血球除去を行った後、骨髓細胞は赤血球除去を行った後、NP<sub>2</sub>-BSA または、NP<sub>18</sub>-BSA でコートした PVDF メンブレン 96 well plate に添加した。添加した細胞数は、脾臓細胞は野生型マウスでは  $2 \times 10^4$  cells/well、Bim cKO マウスでは  $1 \times$  または  $2 \times 10^4$  cells/well、骨髓細胞では野生型、Bim cKO マウスとも  $2 \times 10^5$  cells/well で細胞を蒔種し、2 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。培養には 10 % の FCS を含む RPMI-1640 培地を使用した。培養後、plate を水道水で洗い、EDTA を含む PBS を加えて 15 分間静置し、0.1 % Tween20 を含む PBS ( PBS-Tween20 ) で洗浄し、1% BSA を含む PBS で一

晩ブロッキングした。翌日、PBS-Tween20 で洗浄後、アルカリホスファターゼ標識抗体 anti-mouse IgG1-AP (SouthernBiotech) を 10000 倍希釈した溶液を加えて室温で 2 時間静置し、その後、発色反応を行った。細胞のカウントは実体顕微鏡を用いて行った。

### 3-14. V<sub>H</sub>186.2 抗体可変部塩基配列の RT-PCR 法による解析

5 ng/μl の carrier RNA (QIAGEN) を 96 well PCR plate に 10 μl ずつ分注し、各 well に細胞をシングルセルソートした後、-80 °C で凍結保存した。その後、各 well に、V186.2 sense (5'-TTCTTGGCAGCAACAGCTACA-3') と Cγ1 external antisense (5'-GGATCCAGAGTTCCAGGTCAC-3') のプライマーを含む SuperScript One-Step High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) のプレミックス溶液を 15 μl ずつ添加し、最終容量 25 μl で逆転写 (RT) と 1 回目の PCR の 40 サイクルを 1 ステップで行った。この PCR 産物を 1 μl 使用し、V186.2 sense と Cγ1 internal-antisense (5'-GGAGTTAGTTTGGGCAGCAG-3') プライマーを用いて Platinum Pfx DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) により、2 回目の PCR を 40 サイクル行った。この PCR 産物を Cγ1 internal antisense プライマーを用いて塩基配列の決定を行い、それぞれの細胞集団における V<sub>H</sub>186.2 遺伝子の体細胞突然変異の解析を以前の報告(1) と同様に行った。

抗体産生細胞における体細胞突然変異の解析では、Blimp-1 を発現している細胞を抗体産生細胞と考え、それらの細胞での突然変異を解析するために、抗体可変部の配列解析を行う前に、あらかじめ Blimp1 の発現を PCR で確認した。RT と同時に行う 1 回目の PCR では上述の V186.2 sense と Cγ1 external antisense のプライマーに加えて、Blimp-1 external forward primer (5'-TTCAAGCCGAGGCA TCCTT-3') と Blimp-1 reverse primer (5'-AGTGTAGACTTCACCGATGAGG-3')

を加えて反応し、2 回目の PCR では Blimp-1 forward internal primer ( 5'-GAACCTGCTTTTCAAGTATGCTG-3' ) と Blimp-1 reverse primer を使用して PCR を行い Blimp-1 の発現を確認した。Blimp-1 の発現は 2 回目の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認し、Blimp-1 を発現している細胞に対して V<sub>H</sub>186.2 遺伝子塩基配列解析を行った。

解析で得られた塩基配列は Accession No. LC523040–LC523173 で生命情報・DDBJ センター、EMBL Nucleotide Sequence Data Base、GeneBank から閲覧可能である。

### 3-15. 組織染色

組織染色はこれまでの報告を参考にして行った(7)。NP-CGG で免疫後 12 日目のマウスから脾臓を摘出し、O.C.T compound ( Miles ) で包埋し、ドライアイスで冷却したエタノール上で 30 秒間凍結し、-80 °C で凍結保管した。クリオスタットで 7 μm の凍結切片を作製し、冷却したアセトンで 10 分間固定した。染色 buffer ( 0.1 M Tris-HCl pH8.0、0.1 M NaCl、0.1% Tween-20、1% BSA ) で洗浄後、100 μg/ml の 2.4G2 抗体と 10% 非働化ヤギ血清を添加した染色 buffer で 4 °C 一晩あるいは室温で 4 時間ブロッキングした。anti-GL7<sup>Alexa Fluor488</sup> ( BioLegend )、anti-mouseCD38<sup>APC</sup> ( Thermo Fisher Scientific )、anti-mouse IgG1<sup>BV421</sup> ( BD Biosciences ) を含む染色抗体溶液を調製し、使用前に 15,000 rpm で 20 分間遠心して不溶な沈殿を取り除いた後、室温で 2 時間染色を行った。観察には KEYENCE BZ-X700 蛍光顕微鏡を使用した。

### 3-16. 統計学的計算

t 検定の p 値は KaleidaGraph 4.5 software ( Synergy Software ) あるいは

Microsoft Excel ( Microsoft )を使用して算出した。  $p < 0.05$  となった場合に統計学的に有意な差があるとした。

Table1:プライマーリスト

primer名	配列	用途
AI01 LA-F	TCCCTACACCCCATCCCTGT	long arm増幅
AI02 LA-R	TCAGCCTTTCCACAGCAAG	long arm増幅
AI03 Tg-F	GCTCGCTGCAGGCAGG	Target 領域増幅
AI04 Tg-R	GCTACTCAAAGGAACAAGGCTG	Target 領域増幅
AI05 SA-F	ATCTATCAGGGAGTCCCGG	short arm増幅
AI06 SA-R	CCTACTAAGAAAGCTAAAGTCCT	short arm増幅
AI13 SouthernProbeR	CTAGTGATAGCTGACTGCAGTG	Souther Hybridization probe合成
AI14 SouthernProbeF	GGGATAGATTCCAGGCTAGG	Souther Hybridization probe合成
AI15 screen1-F	GTCTCACCAGTCCTGGGATT	ES screening
AI16 screen1-R	AGGTAGGTGAAGCCATTGAA	ES screening
AI17 screen2inNEO-F	TATCGCCTTCTTGACGAGTT	ES screening/mouse typing
AI18 screen2inSA-R	AACCATTCTTCCAAAAGACTGC	ES screening/mouse typing
AI19 screen3inTg-F	AGCATCTCAGAAGCAGTGTGTT	ES screening/mouse typing
AI20 screen3inNEO-R	CACTGCTCGACCATATGGGA	ES screening/mouse typing
AI21 scrn4LoxPcheckinLA-F	CTCATCAACTGGACACAAGC	ES screening/mouse typing
AI22 scrn4LoxPcheckinTg-R	CTAACTGAAACCAGATTAGGG	ES screening/mouse typing
V186.2 sense	TTCTTGGCAGCAACAGCTACA	single cell 1step RT-PCR/2nd PCR
Cy1 external antisense	GGATCCAGAGTTCCAGGTCACT	single cell 1step RT-PCR
Cy1 internal antisense	GGAGTTAGTTTGGGCAGCAG	single cell 2nd PCR, sequence
Blimp-1 external forward	TTCAAGCCGAGGCATCCTT	single cell 1step RT-PCR/2nd PCR
Blimp-1 reverse	AGTGTAGACTTCACCGATGAGG	single cell 1step RT-PCR
Blimp-1 forward internal	GAACCTGCTTTTCAAGTATGCTG	single cell 2nd PCR

Table 2 : 細胞染色使用試薬一覧

## A: 蛍光標識抗体

試薬名	メーカー	カタログ番号	clone
anti-mouse IgM-Pacific Blue	our laboratory		II/41
APC anti-mouse CD93	BioLegend	136510	AA4.1
FITC anti-mouse CD24	BioLegend	101805	M1/96
PE anti-mouse CD43	BD	553271	S7
FITC anti-mouse CD21/CD35	BD	561769	7G6
APC anti-mouse CD4	BioLegend	100515	RM4-5
BV421 anti-mouse CD4	BioLegend	100563	RM4-5
FITC anti-mouse CD8a	BioLegend	100705	53-6.7
anti-mouse TCR $\beta$ -PE	Thermo Fisher Scientific	12-5961-82	H57-597
anti-mouse B220 BV510	BioLegend	103248	RA3-6B2
APC anti-CXCR5	BD	560615	2G8
PE anti-mouse PD-1	ThermoFisherScientific	12-9985-82	J43
BV421 Rat Anti-Mouse IgG1	BD	562580	A85-1
anti-mouse CD38 -BV510	BD	740129	90
anti-mouse CD38 -APC	ThermoFisherScientific	17-0381-82	90
FITC anti-mouse CD95 (Fas)	BD	554275	Jo2
PECy7 anti-mouse CD95 (Fas)	BD	557653	Jo2
PE anti-mouse CD83	BioLegend	121508	Michel-19
Alexa Fluor®700 anti-mouse I-A/I-E	BioLegend	107622	M5/114.15.2
anti-mouse IgM FITC	ThermoFisherScientific	11-5790-81	II/41
anti-mouse IgD FITC	ThermoFisherScientific	11-5993-81	11-26
FITC anti-mouse CD90.2	BioLegend	105306	30-H12
FITC anti-mouse/human CD11b	BioLegend	101206	M1/70
FITC anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	BioLegend	108406	RB6-8C5
FITC anti-mouse CD49b (pan-NK cells)	BioLegend	108906	DX5
FITC anti-mouse TER-119/Erythroid Cells	BioLegend	116206	TER-119
PE anti-mouse CD138 (Syndecan-1)	BioLegend	142504	281-2
Alexa Fluor® 488 anti-mouse GL7 Antigen	BioLegend	144612	GL-7

Tabel2: 細胞染色使用試薬一覧(続き)

B:Biotin化抗体

試薬名	メーカー	カタログ番号	clone
Anti-mouse IgM Biotin	ThermoFisherScientific	13-5790-85	II/41
Anti-mouse IgD Biotin	ThermoFisherScientific	13-5993-85	11-26
Anti-Mouse CD93 (AA4.1) Biotin	ThermoFisherScientific	13-5892-85	AA4.1
Anti-Mouse CD90.2(Thy-1.2) Biotin	Biolegend	105304	30-H12
Biotin Anti-mouse CD3ε	Biolegend	100304	145-2C11
Biotin Anti-mouse F4/80	Biolegend	123106	BM8
Anti-mouse Ly6G (Gr-1) Biotin	Biolegend	108404	RB6-8C5
Biotin Anti-mouse CD11c	Biolegend	117304	N418
Biotin anti-mouse CD11b	Biolegend	101204	M1/70
Biotin Anti-mouse TER-119/Eeythoid cells	Biolegend	116204	TER-119
Biotin anti-mouse CD49b (DX5)	Biolegend	108904	DX5
Biotin anti-mouse NK1.1	Biolegend	108704	PK136
Biotin Mouse Anti-CD138	BD	553713	281-2
Biotin rat Anti-mouse CD43	BD	553269	S7
Biotin Rat Anti-Mouse Ig, λ1, λ2, λ3 Light Ch	BD	553433	R26-46

C:その他

試薬名	メーカー	カタログ番号
NIP-PE	our laboratory	
NIP-APC	our laboratory	
Peanut Agglutinin-FITC	Vector Laboratories	FL-1071
PE-CF594 Streptavidin	BD	562318
Brilliant Violet 421™ Streptavidin	Biolegend	405225
Streptavidin microbeads 2mL	Miltenyi	130-048-101
anti-FITC microbeads 2ml	Miltenyi	130-048-701

## 引用文献

- 1 Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohara, O., Rajewsky, K., and Takemori, T. 2012. Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J. Exp. Med.* 209:2079.
- 2 Kontgen, F., Suss, G., Stewart, C., Steinmetz, M., and Bluethmann, H. 1993. Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *Int Immunol* 5:957.
- 3 Kanki, H., Suzuki, H., and Itohara, S. 2006. High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J background. *Exp. Anim.* 55:137.
- 4 Takahashi, Y., Ohta, H., and Takemori, T. 2001. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* 14:181.
- 5 Allman, D., Lindsley, R. C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A., and Hardy, R. R. 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* 167:6834.
- 6 Nagaoka, H., Takahashi, Y., Hayashi, R., Nakamura, T., Ishii, K., Matsuda, J., Ogura, A., Shirakata, Y., Karasuyama, H., Sudo, T., Nishikawa, S., Tsubata, T., Mizuochi, T., Asano, T., Sakano, H., and Takemori, T. 2000. Ras mediates effector pathways responsible for pre-B cell survival, which is essential for the developmental progression to the late pre-B cell stage. *J. Exp. Med.* 192:171.
- 7 Kaji, T., Hijikata, A., Ishige, A., Kitami, T., Watanabe, T., Ohara, O., Yanaka, N., Okada, M., Shimoda, M., Taniguchi, M., and Takemori, T. 2016. CD4 memory T cells develop and acquire functional competence by sequential cognate interactions and stepwise gene regulation. *Int Immunol* 28:267.

## 4. 結果

#### 4-1. Bim コンディショナルノックアウト ( cKO ) マウスの作製

BH3 ドメインは Bim が pro-apoptotic な機能を果たすために必須の領域であり(1)(2)、このドメインをコードする exon 5 を LoxP 配列で挟み、目的の細胞でだけ Cre-recombinase を発現させることにより BH3 ドメインを欠失できる Bim(f/f) マウスを樹立した ( 図 3-2-1 )。ES 細胞の 1 次スクリーニングには、PCR 法を用い、候補となったクローンについては、Southern blot 解析を行い、相同組換えが起きている ES クローンを得た ( 図 4-1-1 )。BH3 ドメインが欠損した Bim は Bcl-2、Bcl-xL あるいは Bcl-w などのアポトーシスを抑制するタンパク質と結合できないため(3)、アポトーシスを促進する Bim の機能が完全に失われる。このマウスを、Cre-recombinase の cDNA を *mb-1* 遺伝子座にノックインした *mb1-cre* マウス(4)、または *Cy1-cre* マウス(5)と交配することで全 B 細胞選択的、もしくは IgG1 にクラススイッチする B 細胞選択的に *Bim* 遺伝子を欠損する Bim コンディショナルノックアウト ( Bim cKO ) マウスを樹立した。*mb-1* は CD79A (  $Ig\alpha$  ) をコードする遺伝子で、B 細胞分化の早期の段階である初期プロ B 細胞から発現が始まることから、Bim(f/f) *mb1cre*(+/-) マウスでは、ほぼ全ての B 細胞において *Bim* 遺伝子が欠失すると予想される。

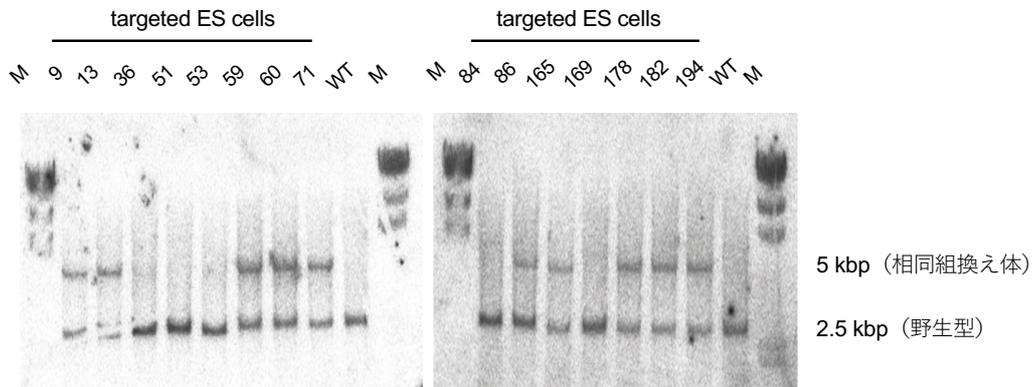


図 4-1-1 サザンハイブリダイゼーションによる相同組換えクローンの選抜

環状のターゲティングコンストラクトベクターを制限酵素で処理して直鎖にし、エレクトロポレーション法で Bruce4 ES 細胞に導入した。細胞は G418 を含む培地で培養し、耐性のクローンから PCR 法で第一段階の選抜を行い、さらに、サザンハイブリダイゼーションを行い相同組換えクローンを取得した。野生型の *Bim* allele の場合は、2.5kbp のバンドが検出され、相同組換えが起きた *Bim* allele については、5kbp のバンドが検出される。

#### 4-2. Bim による T 細胞非依存性の免疫応答の調節

樹立した Bim (f/f) mb1cre (+/-) cKO マウスにおいて、非免疫のマウスにおける B 細胞の分化状態を調べた。これまでの研究から Bim は、proB 細胞、preB 細胞、未熟 B 細胞、成熟 B 細胞で発現するとされ(6)、Bim 遺伝子の exon 2-4 を欠失する cKO マウス ( Mb1-Cre<sup>ki/+</sup> Bim<sup>fl/fl</sup>) では対照マウスに比べて脾臓の成熟 B 細胞の数がおよそ 2 倍増加したという報告がある(7)。本研究で樹立した Bim exon5 を欠損した cKO マウスにおいても同様に、脾臓において、わずかではあるが統計学的に有意な総細胞数、B 細胞数の増加が見られた。一方で、骨髄、パイエル板にける細胞総数に影響は見られなかった ( 図 4-2-1、4-2-3-B )。さらに、骨髄における B 細胞の分化に対する影響を調べたところ、未成熟 B 細胞の preB 細胞がわずかに減少する以外の影響は見られなかった ( 図 4-2-2 )。加えて、脾臓 B 細胞数においてわずかであるが統計学的に有意な増加が見られたが各 Transitional B 細胞 ( T1、T2、T3 細胞) の数に有意な変動は見られなかった ( 図 4-2-3-A,B )。これらの結果から、Bim 欠損マウスにおける preB 細胞数の減少は細胞周期の進行を促進する Bim の働きによるものではないかと考えた。Bim による細胞周期の促進については、Carxton が *in vitro* の解析結果に基づき示している(8)。また、パイエル板の胚中心 ( GC ) B 細胞数が Bim 欠損マウスでコントロールマウスと比較して有意に増加していた ( 図 4-2-4 ) が、これはおそらく、CD40 からの活性化を受けた B 細胞が Bim によるアポトーシスの制御を受けることが *in vitro* の培養系で示されていることから(9)、Tfh から CD40 を介する活性化シグナルを受けた pre-GC B 細胞の選択に、Bim が抑制的に働いているためであると推測される。

次に、B 細胞選択的に Bim を欠失した場合の免疫反応への影響を調べるために、Bim (f/f) mb1cre (+/-) マウスとコントロールとして mb1cre (+/-) マウスを共に 4-hydroxy-3-nitro-phenylacetyl ( NP ) 基と Ficoll を結合した T 細胞非依存性抗原である NP-Ficoll で免疫した。その結果、NP に対して高親和性を持つ抗 NP IgG3 および抗 NP IgM 抗体の血中抗体価は Bim 欠損マウスとコントロールマウスとで同程度であった。このことから Bim は T 細胞非依存性の B 細胞反応

には大きな影響を与えていないことが明らかとなった（図 4-2-5-A, B）。

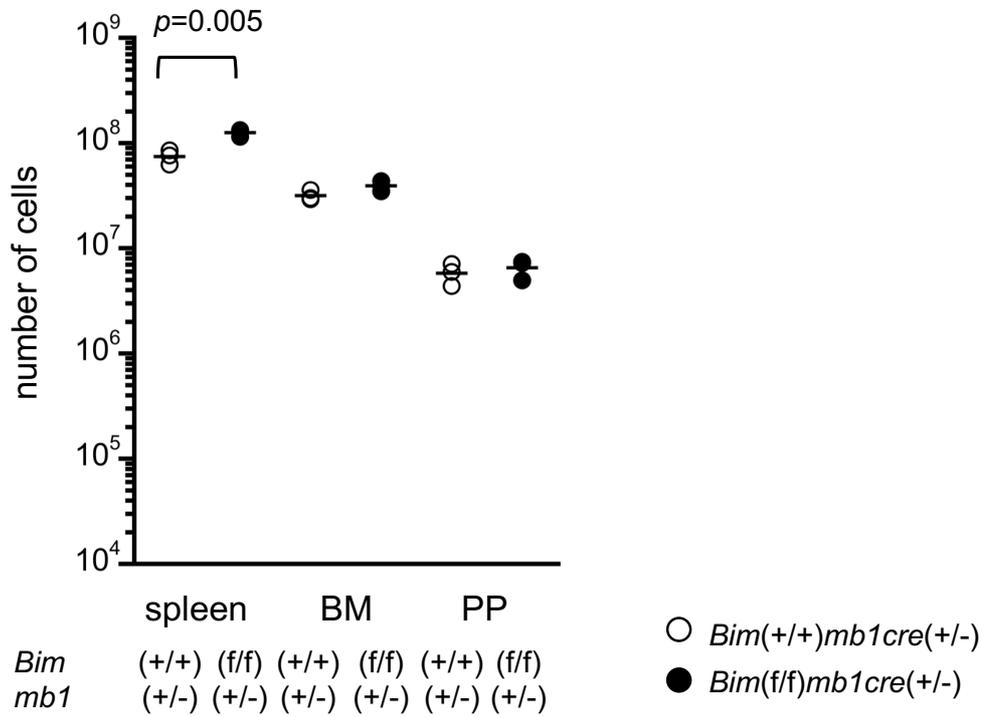


図 4-2-1 Bim 野生型マウスと Bim cKO マウスにおける各組織の有核細胞数

非免疫の Bim 野生型マウス (○) と Bim cKO マウス (●) の脾臓 (spleen)、骨髄 (BM)、及びパイエル板 (PP) の有核細胞の数を血球計算盤を用いて計数した。それぞれのマウスの遺伝子型をグラフの下方に記載した。アスタリスクはそれぞれ\* p<0.05、\*\* p<0.01、\*\*\*p<0.005を表す。

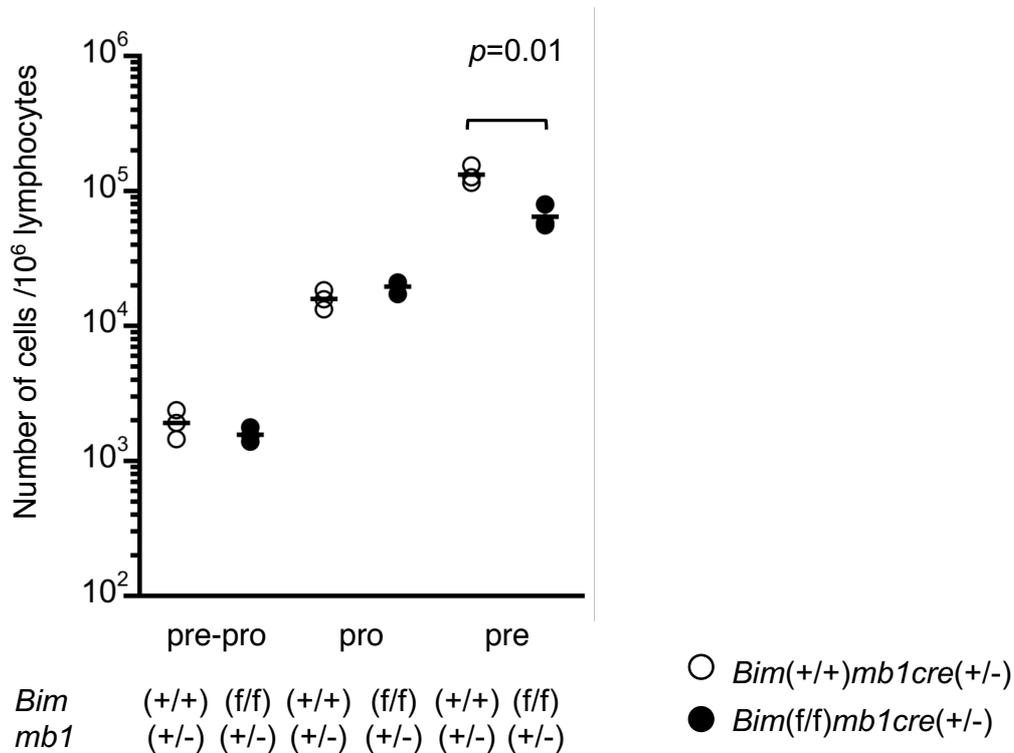


図 4-2-2 野生型マウスと Bim cKO マウスの骨髄中のB細胞前駆細胞の数

非免疫の野生型マウス(○)と Bim cKO マウス (●)の骨髄に存在するB細胞前駆細胞である pre-pro B、pro B 及び pre B 細胞の  $1 \times 10^6$  個のリンパ球あたりの細胞数をフローサイトメーターにより解析した。それぞれの遺伝子型をグラフの下方に記載している。アスタリスクはそれぞれ\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.005$ を表す。

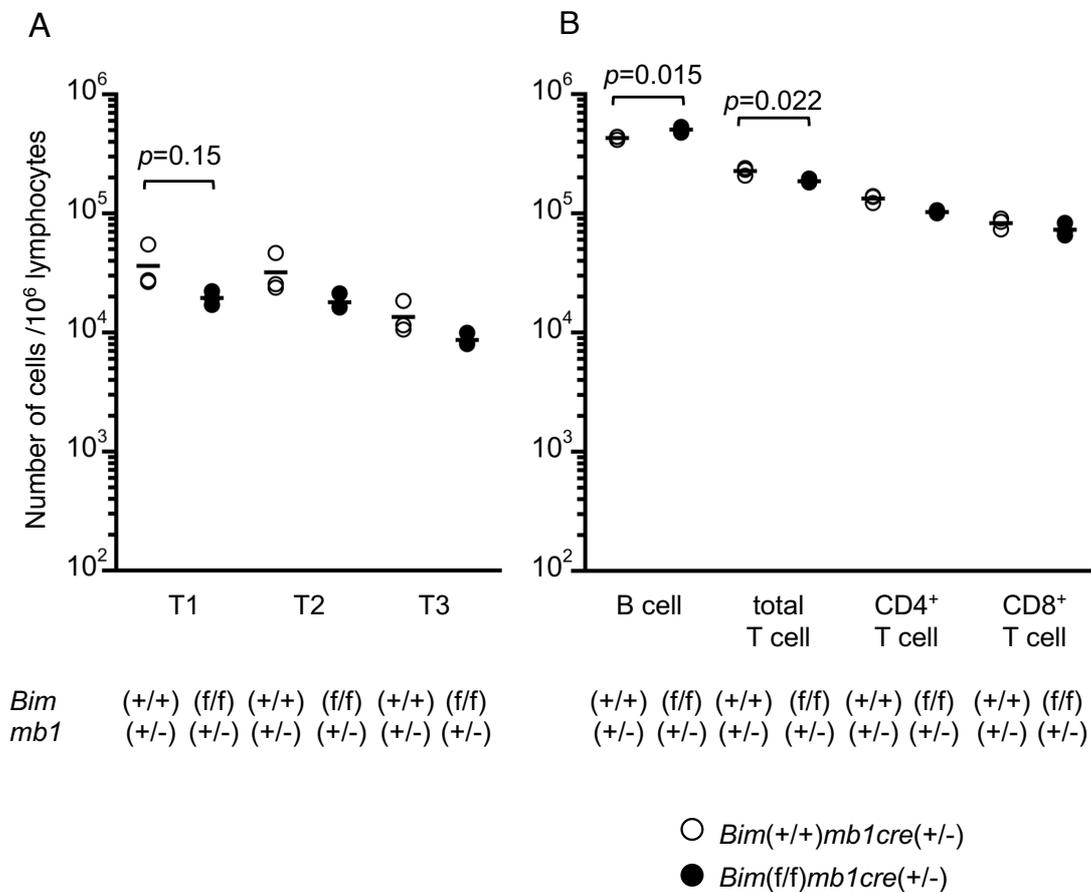


図 4-2-3 野生型マウスと Bim cKO マウスの脾臓における細胞数

非免疫の野生型マウス(○)と Bim cKO マウス(●)の脾臓に存在する各 B 細胞前駆細胞である Transitional B 細胞 T1、T2、T3 の細胞数を計数した (A)。全 B 細胞数、全 T 細胞数、CD4<sup>+</sup> T 細胞数および CD8<sup>+</sup> T 細胞数を計数した (B)。それぞれ、10<sup>6</sup> 個のリンパ球あたりの細胞数を示している。それぞれの遺伝子型をグラフの下方に記載した。アスタリスクはそれぞれ \* *p*<0.05、\*\* *p*<0.01、\*\*\**p*<0.005 を表す。

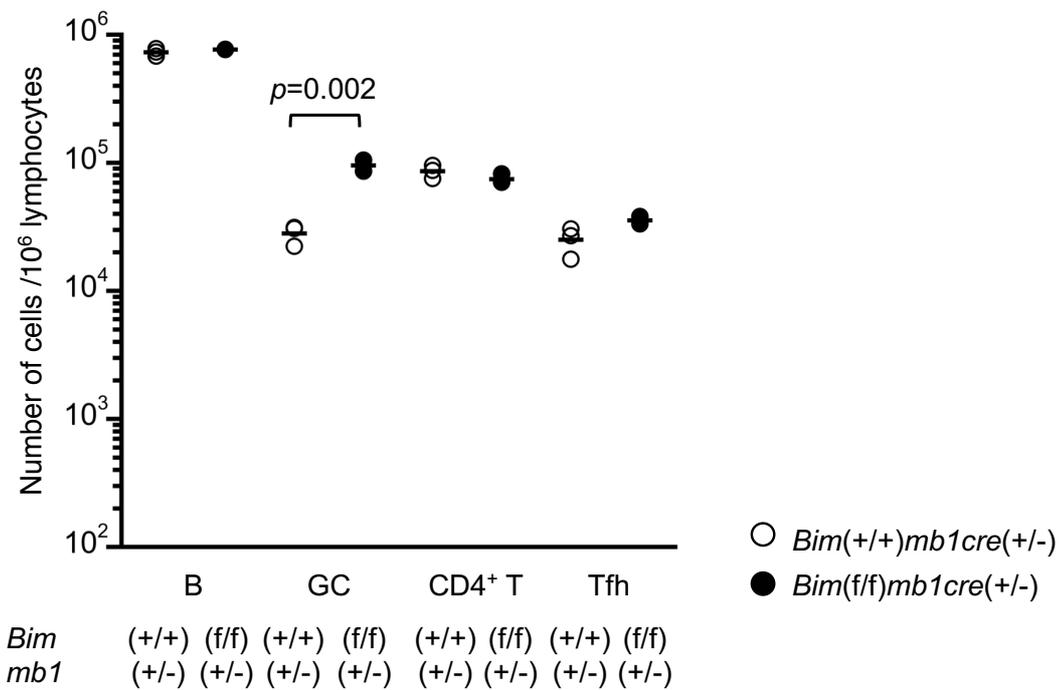


図 4-2-4 *Bim* 野生型マウスと *Bim* cKO マウスのパイエル板の細胞数

非免疫の野生型マウス(○)と *Bim* cKO マウス(●)のパイエル板中の全 B 細胞の数 (B)、PNA<sup>+</sup> の胚中心 B 細胞 (GC)、CD4<sup>+</sup> T 細胞 (CD4<sup>+</sup> T)、Tfh 細胞 (Tfh) のそれぞれの細胞数をフローサイトメーターにより計数し、10<sup>6</sup> 個のリンパ球あたりの細胞数を示している。それぞれの遺伝子型をグラフの下方に記載した。アスタリスクはそれぞれ \* p<0.05、\*\* p<0.01、\*\*\*p<0.005 を表す。

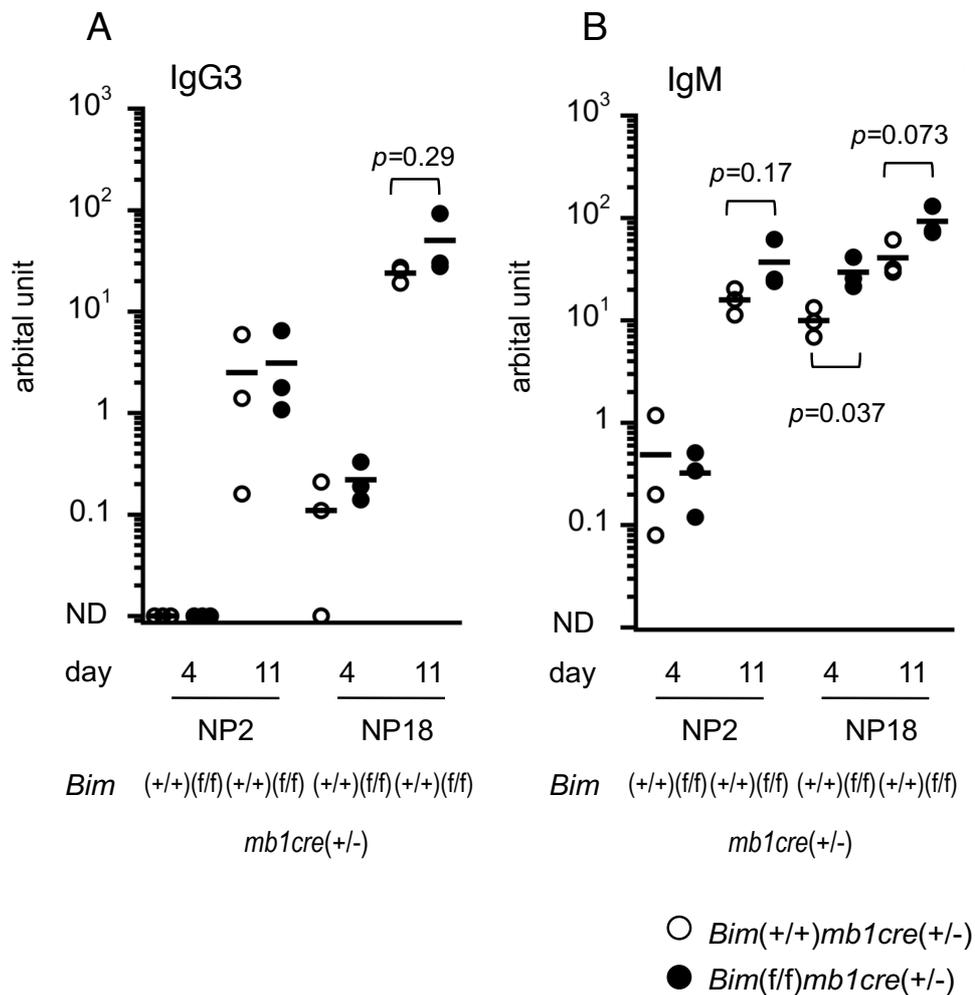


図 4-2-5 T細胞非依存性抗原に対する抗体産生に *Bim* の欠損が与える影響

NP-Ficoll で免疫後 4 日目と 11 日目に *Bim* 野生型(○)と *Bim* cKO (●)マウスから血清を採取し、ELISA 法により血清中に含まれる抗 NP IgG3 抗体 (A) と抗 NP IgM 抗体 (B) の定量を行った。NP<sub>18</sub>-BSA をコーティングに使用して検出した抗体 (NP18) は総抗体量を、NP<sub>2</sub>-BSA をコーティングに使用して検出した抗体 (NP2) は高親和性の抗体量とした。血中抗体価は精製された anti-NP IgG1 モノクローナル抗体を標準として相対量 (arbitrary unit) として算出した。○または●は個々のマウスの値を示している。

#### 4-3. B 細胞での Bim の欠損による T 細胞依存性の抗体産生応答調節

Bim の T 細胞依存性免疫応答への影響を調べるために、Bim (f/f) mb1cre (+/-) とコントロールマウス mb1cre (+/-) を、NP 基とニワトリの  $\gamma$  グロブリン (CGG) を結合した抗原 (NP-CGG) で免疫した。免疫後 14 日目に、高親和性の抗 NP 抗体を競争的に結合する NP2-BSA および全抗 NP 抗体を結合する NP<sub>18</sub>-BSA を抗原としてコーティングに用いた ELISA 法で血中の抗 NP 抗体価を測定したところ、従来から報告されているように(10)、Bim 欠損マウスにおいて抗 NP IgG1 抗体の全抗体、高親和性抗体いずれも血中抗体価がコントロールマウスに比べて有意に増加していた (図 4-3-1-A)。一方、高親和性抗体価と全抗体価の比で求められる血清中の抗 NP 抗体の NP ハプテンに対する親和性の平均値を求めたところ、統計的に有意ではないものの、cKO マウスの値がやや高いということが明らかとなった (図 4-3-1-B)。

さらに、NP-CGG は人工抗原であることから、天然抗原においても同様の結果が得られるか否かを検討するために、不活化インフルエンザウイルスを抗原として用いて同様の実験を行った。その結果、NP-CGG を抗原として用いた場合と同様 Bim 欠損マウスで抗 HA IgG 抗体で代表される抗インフルエンザウイルス抗体の増加が認められた (図 4-3-2)。このことから、Bim cKO マウスにおける T 細胞依存性抗原に対する抗体価の上昇は人工抗原だけでなく、天然抗原でも認められる普遍的な表現型であることが明らかとなった。

さらに、図 4-3-3-A で示すように、mb-1-cre によって全 B 細胞で Bim 遺伝子の欠失を誘導したマウスだけでなく、C $\gamma$ 1-cre により IgG1 ヘクラススイッチする一部の B 細胞でのみ Bim 遺伝子を欠損させたマウスにおいても、免疫後 10 日目から 40 日目にかけてコントロールマウスよりも、高い抗 NP IgG1 抗体の血中濃度が確認された。また、コントロールマウスでは、免疫後 30 日までに、全抗体中に高親和性抗体が占める割合がおおよそ 20% まで上昇したのに対して、Bim 欠損マウスにおいては、約 12% にとどまった (図 4-3-3-A, B)。このことから、統計学的な有意差は見られないものの、cKO マウスでは、コントロールマウスと比較して高親和性の抗 NP 抗体産生細胞の生成に対する抑制

効果が見られることから、Bim cKO マウスでは、抗体の親和性成熟の機構に何らかの障害が発生していると推測された。

そこで、NP-CGG の免疫によって誘導される、高親和性の抗 NP 抗体を産生する細胞の数と抗 NP 抗体を産生する全抗体産生細胞の数を ELISPOT 法により計測することにした。その結果、Bim 欠損マウスでは、コントロールマウスに比べ、抗 NP IgG1 抗体産生細胞 (Antibody Forming Cell; AFC) の細胞数が、脾臓では約 100 倍 (図 4-3-4-A)、骨髄では約 10 倍 (図 4-3-4-B) 多くなっていることが明らかとなった。しかし、Bim cKO マウスでもコントロールマウスでも、骨髄中の AFC の数は脾臓に比べてはるかに少なかった。このことから、抗 NP 抗体産生細胞の生成において Bim によるアポトーシスは重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、全 AFC に占める高親和性抗体産生細胞の割合は、骨髄でも脾臓でも、Bim cKO マウスよりもコントロールマウスの方が高いことが明らかとなったが、骨髄におけるコントロールと cKO マウスにおける高親和性細胞数の占める割合の違いは、脾臓の違いと比べると大きくないことから、高親和性の抗体産生細胞が骨髄に移動する機構は比較的正常に保たれていることが示唆された (図 4-3-4-C)。

さらに、cKO マウスにおける、抗 NP 抗体産生細胞の生成に対する Bim の役割について、免疫組織染色によりより詳細な解析を行うことにした。NP-CGG 免疫後 12 日目の Bim cKO マウス、およびコントロールマウスの脾臓を免疫組織染色した結果、コントロールマウスでは T 細胞との接触領域である濾胞外領域と赤脾髄領域に少数の抗 NP IgG1 産生細胞のみが確認された (図 4-3-5-左)。それに対して、Bim cKO マウスでは膨大な数の IgG1 抗体産生細胞が赤脾髄領域に存在することが明らかとなった (図 4-3-5-右)。これらの結果は、図 4-3-4-A の ELISPOT 法による細胞数の計数結果とも一致している。

これらの結果から、Bim は、T 細胞非依存性抗原に対する免疫応答には大きな影響を与えていないのに対して、B 細胞特異的 Bim 欠損マウスでは、抗体産生細胞の蓄積を介して、T 細胞依存性抗原に対する抗体産生応答が顕著に促進されていることが明らかとなった。

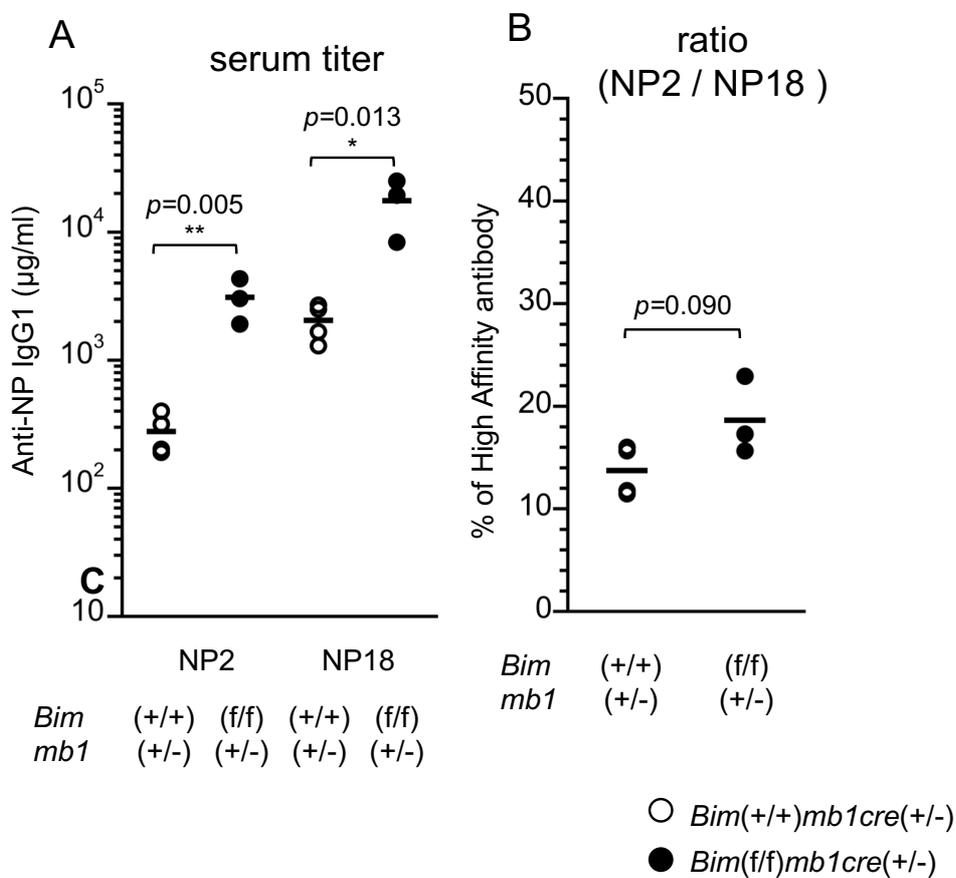


図 4-3-1 T細胞依存性抗原に対する抗体産生に *Bim* の欠損が与える影響

(A) *Bim* 野生型マウス (○、n=4) 及び *Bim* cKO マウス (●、n=4) を NP-CGG で免疫した。2週間後、血清を採取し血中の総抗 NP 抗体 (NP18) と高親和性抗 NP 抗体 (NP2) を ELISA で測定した。

(B) 総抗 NP 抗体量と高親和性抗 NP 抗体の量の比 (高親和性抗体量: NP2 / 総抗体量: NP18) から、高親和性抗体の割合を求めた。

○ または ● は個々のマウスの値を示している。アスタリスクはそれぞれ \* p<0.05、\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.005 を表す。

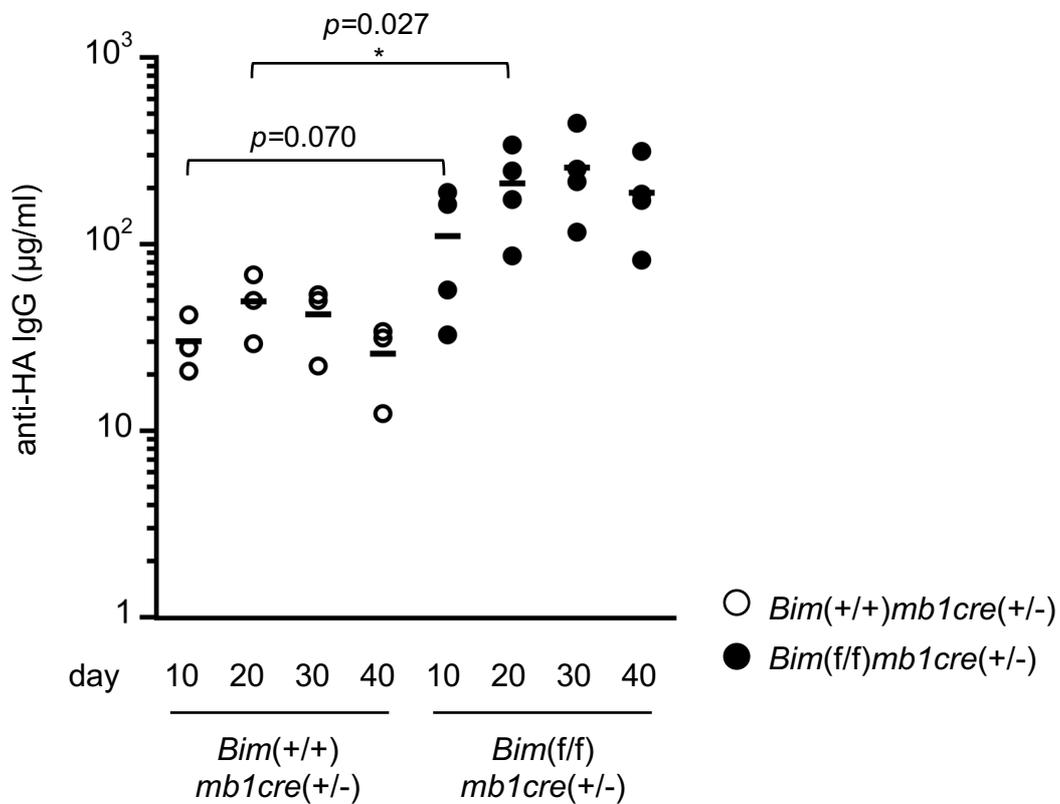


図 4-3-2 T細胞依存性抗原に対する抗体産生に Bim の欠損が与える影響

Bim 野生型マウス (○、n=3) 及び Bim cKO マウス (●、n=4) を不活化インフルエンザウイルス PR8 株を AddaVax™ をアジュバントとして免疫した。免疫後、血清を経時的に個別採取し血中の抗ヘマグルチニ (HA) IgG 抗体量を ELISA 法で測定した。

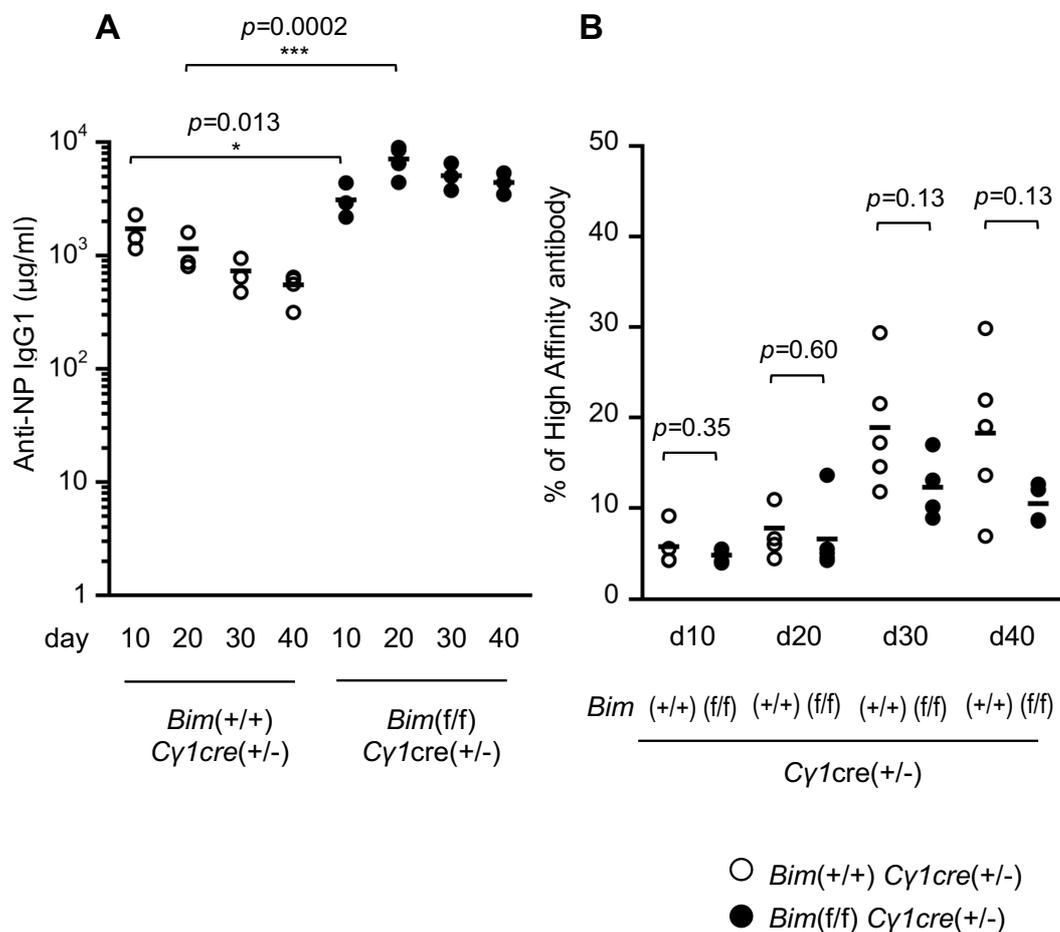


図 4-3-3 IgG1 B細胞のみで Bim が欠損するマウスにおけるT細胞依存性抗原に対する抗体産生

(A) Bim 野生型 (○、n = 5) ( $Bim(+/+) C\gamma1 cre (+/-)$ ) 及び Bim cKO マウス (●、n = 4) ( $Bim(f/f) C\gamma1-cre$ ) を NP-CGG で免疫した。免疫後、血清を経時的に個別採取し血中の総抗 NP-IgG1 抗体の量と高親和性抗 NP 抗体の量を ELISA 法で測定した。(A) には総抗体量のみ示している。実験は 3 回実施した。

(B) 高親和性抗体量と総抗体量の比から高親和性抗体の割合(%)を求めた。アスタリスクはそれぞれ\*  $p<0.05$ 、\*\*  $p<0.01$ 、\*\*\* $p<0.005$ を表す。

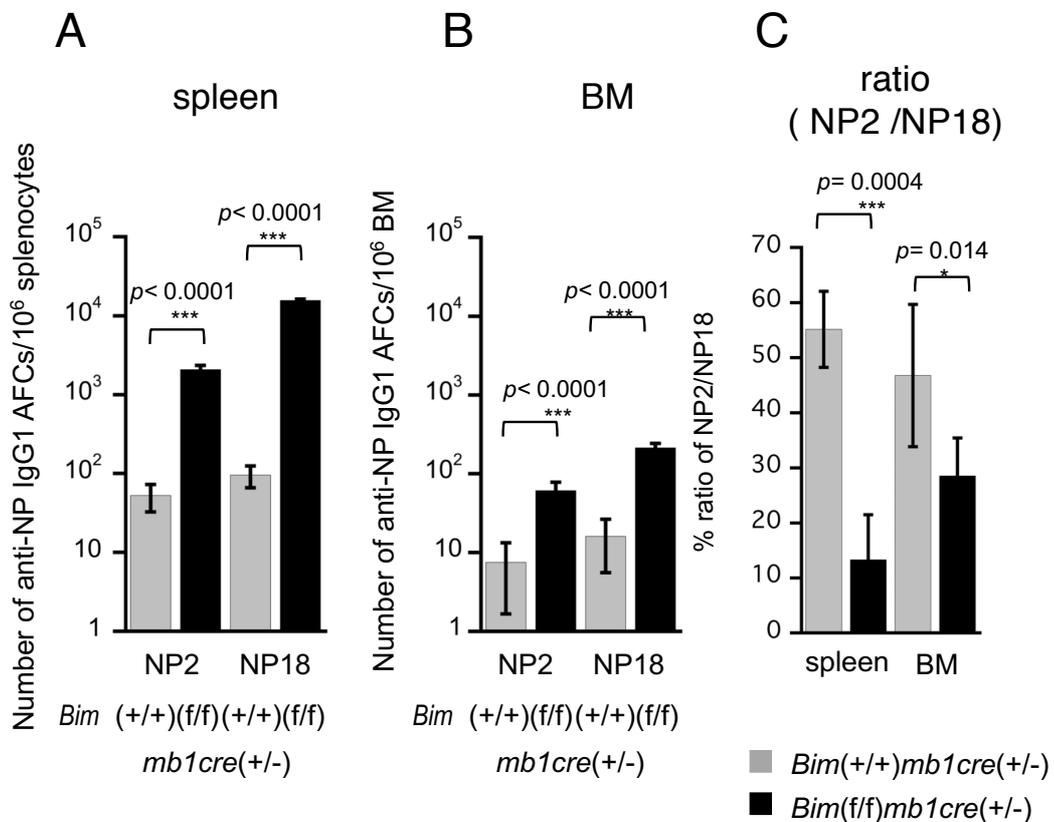


図 4-3-4 抗原特異的抗体産生細胞の産生における Bim の役割

Bim 野生型マウス(灰色、n=3)と Bim cKO マウス (黒、n=3) を NP-CGG で免疫し、2 週間後に脾臓細胞 (spleen) と骨髄細胞 (BM) を採取した。単細胞に処理し、溶血処理の後、ELISPOT 解析により抗 NP IgG1 抗体産生細胞 (AFC) 数を調べた。NP<sub>18</sub>-BSA をコーティングに使用して検出した細胞数 (NP18) は総抗体産生細胞数、NP<sub>2</sub>-BSA をコーティングに使用して検出した細胞数 (NP2) は高親和性抗体産生細胞の細胞数として、1 × 10<sup>6</sup> 個の脾臓細胞あたりの数で示した。(A) は脾臓、(B) は骨髄における抗体産生細胞を示す。実験は 2 回行った。(C) では、(A) および (B) で示したデータをもとに、全抗体産生細胞数に占める高親和性抗体産生細胞数の比を算出した。

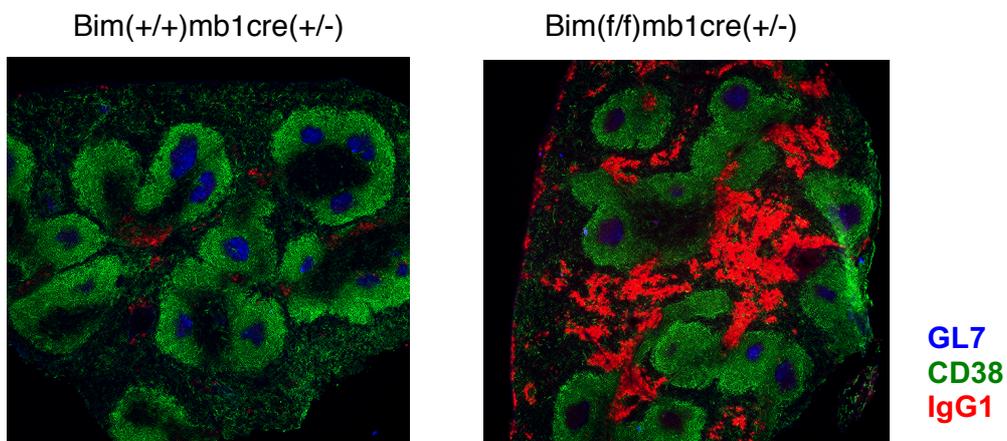


図 4-3-5 Bim 野生型マウス(左)と Bim cKO マウス(右)の NP-CGG 免疫後 12 日目の脾臓の免疫染色像

NP-CGG で免疫後 12 日目の Bim 野生型マウス (左) 、 Bim cKO マウス (右) から脾臓を採取し凍結切片を作製した。切片を固定後、胚中心 B 細胞マーカーとして抗 GL-7<sup>Alexa Fluor 488</sup> 抗体 (青) 、 IgG1 抗体産生細胞を検出するために抗 mIgG1<sup>BV421</sup> 抗体 (赤) 及び非活性化 B 細胞および記憶 B 細胞マーカーとして抗 CD38<sup>APC</sup> 抗体 (緑) で染色した。

#### 4-4. Bim によるT細胞依存性免疫反応の初期段階での抗体産生細胞の生成調節

野生型マウスである C57BL/6 を NP-CGG で免疫をすると、重鎖可変領域遺伝子に V<sub>H</sub>186.2 遺伝子を使用し、 $\lambda$  軽鎖を持つ抗 NP 抗体が主に生成されることが示されている(11)。そこで、このことを利用して、Bim cKO マウスにおける体細胞突然変異と高親和性抗体産生細胞の選択について解析を加えることを試みた。

まず、NP-CGG 免疫後 14 日目における、Bim (f/f) mb1 cre (+/-) マウスとコントロールマウスである mb1 cre (+/-) マウスでの抗 NP 抗体産生細胞の V<sub>H</sub>186.2 遺伝子の突然変異の頻度を解析した。その結果、Bim 欠損 AFC においては、突然変異が一つも起きていない細胞の割合がコントロールマウスの 14 % と比べて 86 % と非常に高値を示していることが示された。さらに、1つの V<sub>H</sub>186.2 あたりの突然変異の平均個数は、コントロールマウスで 2.7 個であったのに対して、Bim 欠損マウスでは 1.5 個と明らかに低下していた (表 4-4-1)。一方で、J<sub>H</sub> 断片の使用頻度は、両者で大きな違いは認められなかった (図 4-4-1、図 4-4-2)。これらの結果から体細胞突然変異が起こらなかった IgG1 抗体産生細胞は、コントロールマウスでは、恐らくアポトーシスを介する細胞死に除去されるため、胚中心で生成された体細胞突然変異を受けた抗体産生細胞に置き換わっていると考えられるのに対して、Bim cKO マウスでは、突然変異を受けていない抗体産生細胞も、そのまま死ぬことなく保持された結果、脾臓内に蓄積することが強く示唆された。

これまでの多くの研究から、Igh<sup>b</sup> アロタイプを有する C57BL/6 等の野生型マウスにおける NP-CGG 免疫時の抗 NP 抗体産生応答においては、V<sub>H</sub>186.2 可変部遺伝子より転写・翻訳される抗体ペプチド配列の 95 番目がチロシン (Tyr) である場合に、突然変異が起きる前はトリプトファン (W) であった 33 番目のアミノ酸が、体細胞突然変異の結果ロイシン (L) に置換された W33L/Tyr95 は、W33/Tyr95 と比べて高親和性を獲得することが明らかとなっている。本研究では、コントロールマウスにおいて W33L/Tyr95 の変異を持つ細胞が、変異を持つ全ての細胞に占める割合は、63.8 % と過半数を占めていた (表 4-4-1)。

一方で、1つの  $V_H186.2$  遺伝子あたりの平均変異数は、2.7 個と比較的少数である。このように、可変部全体における変異の数が少ないにもかかわらず、抗親和性を獲得した細胞の割合が高いということは、これらの細胞が GC 反応の初期で選択され生き残っていることを示唆している。我々のグループで、野生型マウスの AFC において、 $V_H186.2$  の系統樹解析を行った結果、W33L の置換により急速な高親和性を獲得すると、そのほかの場所の置換変異を蓄積し、免疫後 14 日目までに一つのファミリー内に多くの多様性をもたらすことを報告している(12)。それに対して、W33L に変異を持たないクローンは、さらなる変異を蓄積することにより、他の研究者らが見出している W33L 変異と同等の高親和性を獲得していると考えられる(11)。図 4-4-1 と表 4-4-1 に示すように、Bim cKO マウスにおける  $V_H186.2$  の W33L への置換変異により高親和性を獲得した細胞の割合は、コントロールマウスの半分程度である。この結果は、Bim の欠損により、胚中心での AFC の生成過程における体細胞突然変異の生成と高親和性抗体の選択に決定的な障害を生じているわけではないことを示唆している。

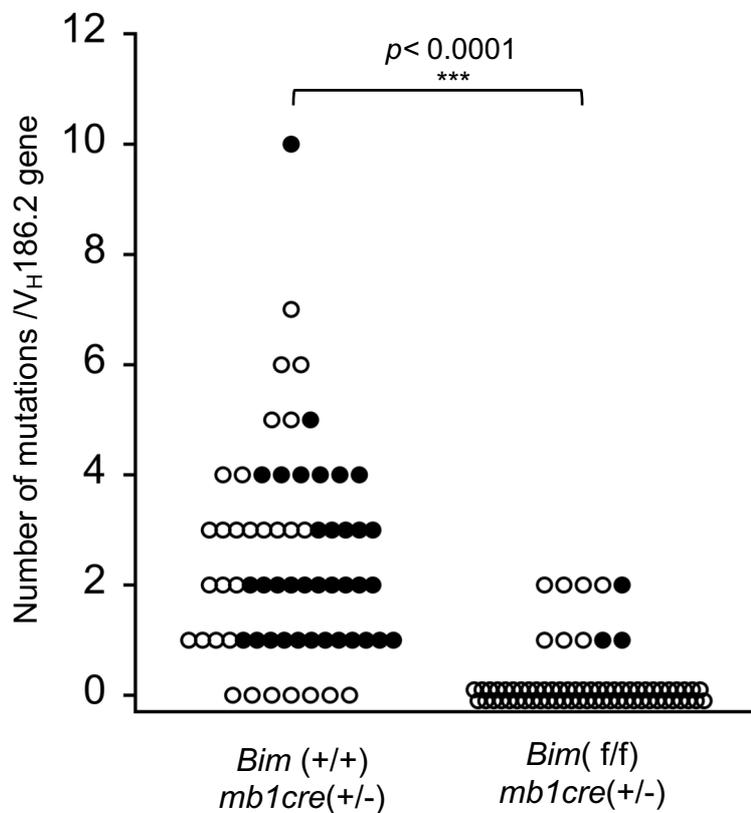


図 4-4-1 Bim 野生型マウス及び Bim cKO マウスにおける抗体産生細胞の免疫 14 日目の V<sub>H</sub> 遺伝子の体細胞突然変異の解析

Bim 野生型マウス ( Bim (+/+) mb1 cre (+/-) ) および Bim cKO マウス ( Bim ( f/f) mb1 cre (+/-) ) を NP-CGG で免疫後 14 日目に、Bim 野生型は 5 匹の、Bim cKO マウスは 4 匹のマウスのプールから、抗 NP IgG1 抗体産生細胞を single cell sorting で 1 細胞ずつ単離し、V<sub>H</sub>186.2-Cγ1 領域を RT-PCR で増幅後に塩基配列の解析を行った。縦軸は 1 細胞あたりの突然変異の数を示し、○または●は個々の細胞の値を示す。●は W33 L あるいは K58R の変異を持つ高親和性の細胞を示す。

Bim	mutated VH gene <sup>b</sup>	Number of W33L/Tyr95			K58R/Gly95 <sup>f</sup>
		mutations <sup>c</sup>	total <sup>d</sup>	mutated <sup>e</sup>	
+/+	58/65	155/58	37/65	37/58	<1/65
	89.2%	2.7	56.9%	63.8%	
-/-	10/70	15/10	3/70	3/10	<1/70
	14.3%	1.5	4.3%	30.0%	

**表 4-4-1** 抗体産生細胞(AFC)の VH 遺伝子突然変異解析のまとめ

<sup>a</sup> 図 4-4-1 の塩基配列解析のデータをもとにした。

<sup>b</sup> 突然変異があった細胞数 / 解析した細胞数

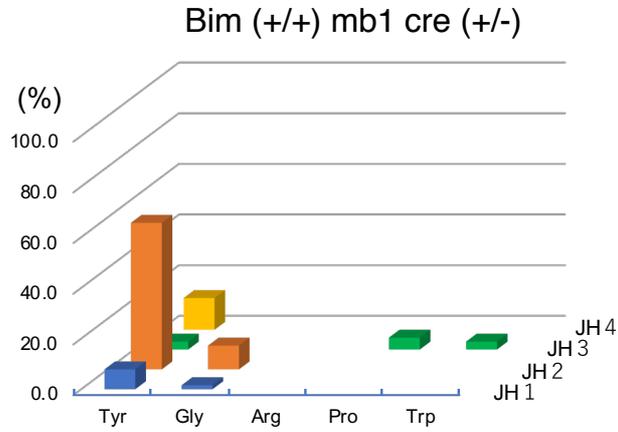
<sup>c</sup> 突然変異の総数 / 突然変異があった細胞数.

<sup>d</sup> W33L の突然変異が入っていた細胞数 / 解析した細胞数

<sup>e</sup> W33L の突然変異が入っていた細胞数 / 突然変異があった細胞数

<sup>f</sup> K58R の突然変異が入っていた細胞数 (未検出)

A



B

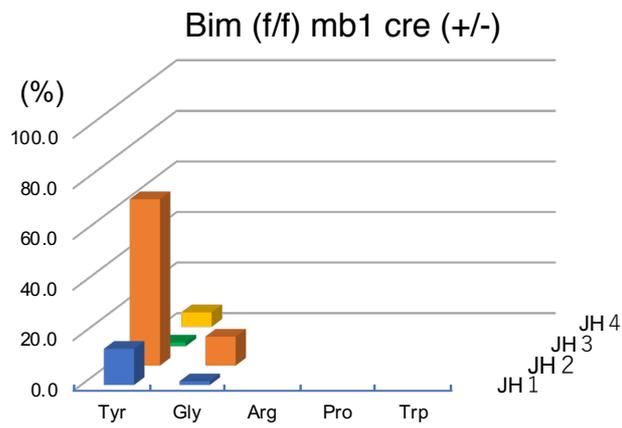


図 4-4-2 V<sub>H</sub>186.2 遺伝子における各 JH カセットの使用頻度と 95 番目のアミノ酸の解析

図 4-5-1 のデータをもとに、Bim 野生型マウス (A) と Bim cKO マウス (B) における、抗 NP 抗体産生細胞が持つ V<sub>H</sub>186.2 遺伝子の JH カセットの選択と 95 番目のアミノ酸残基を解析した。

#### 4-5. 正常マウスと Bim 欠損マウスにおける高親和性細胞の選択

Bim cKO マウスの胚中心において高親和性抗体の選択が、適切に行われているか否かをさらに詳細に調べるために、免疫後 14 日目における Bim (f/f) mb1 cre マウスとコントロールマウスである mb1 cre (+/-) マウスの V<sub>H</sub>186.2 領域の突然変異の蓄積を解析した。

胚中心における高親和性細胞の選択は明領域 ( Light Zone; LZ ) で行われると考えられている。CD83 は、LZ の胚中心 B 細胞を識別するマーカーとして利用できると報告されており(13)、CD83 の中心細胞での発現は、主要組織適合遺伝子複合体 II ( MHC II ) の膜表面での安定な発現を助けるため、CD83<sup>+</sup> の細胞では、高いレベルの MHC II の発現が観察されると報告されている(14)。したがって、CD83<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup> の集団には LZ に位置する B 細胞が濃縮されると考えられることから、胚中心 B 細胞を CD83<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup>、CD83<sup>-</sup>MHC II<sup>high</sup>、および CD83<sup>-</sup>MHC II<sup>dull</sup> の集団に分けて V<sub>H</sub>186.2 の突然変異を解析することにした。

その結果、Bim cKO マウスとコントロールマウスの、これらの集団における可変部遺伝子への変異の導入頻度は、ほぼ同程度であった ( 図 4-5-1、表 4-5-1 )。CD83<sup>high</sup> の LZ に位置する B 細胞では、突然変異を起こした細胞に占める W33L の置換をもつ高親和性獲得細胞数の割合はコントロールマウス ( 31.3 % ) よりも Bim cKO マウスの方 ( 51.2 % ) が高い結果となった。この結果より、少なくとも免疫後 14 日目では、Bim の欠失により、胚中心における高親和性細胞の選択が抑制された結果、低親和性の細胞が多数生成されたわけではないということが強く示唆された。さらに、V 領域の 95 番目のアミノ酸がグリシンの場合に、58 番目のアミノ酸のリジン ( K ) がアルギニン ( R ) に置換された変異を起こしたクローンも高親和性を獲得する可能性が報告されている(15)(16)。そこで、この変異についても W33L/Tyr 95 と同様の解析を行ったところ、全ての胚中心集団からこのタイプのクローンが検出されたが、W33L/Tyr 95 と比べ低頻度で大きな差も認められなかった。ことから、K58R/Gly95 変異を受けた細胞の選択にのみに異常をきたした結果、低親和性の抗体産生細胞の著しい蓄積が起きたわけではないということも明らかとなった (表 4-4-1)。

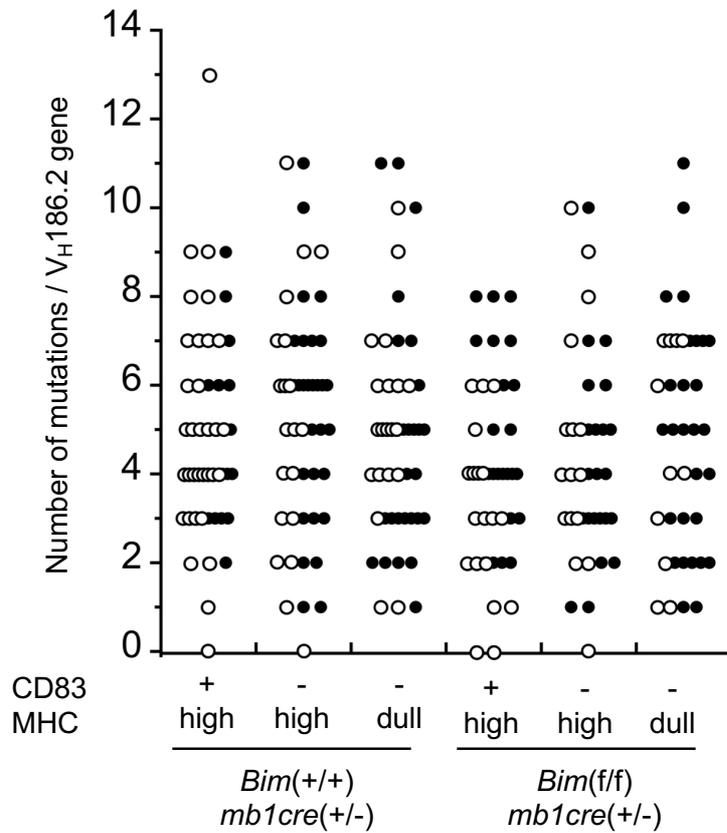


図 4-5-1 Bim 野生型マウス及び Bim cKO マウスにおける胚中心B細胞の免疫 14 日目の V<sub>H</sub> 遺伝子の体細胞突然変異の解析

Bim 野生型マウス (*Bim (+/+) mb1 cre (+/-)*) および Bim cKO マウス (*Bim (f/f) mb1 cre (+/-)*) に NP-CGG を免疫後 14 日目に、Bim 野生型マウスは 6 匹から、Bim cKO マウスは 3 匹のプールから、それぞれの胚中心 B 細胞集団を single cell sorting で 1 細胞ずつ単離し、*V<sub>H</sub>186.2-C $\gamma$ 1* 領域を RT-PCR で増幅後に塩基配列の解析を行った。胚中心 B 細胞は CD83<sup>+</sup>/MHC II<sup>high</sup>、CD83<sup>-</sup>/MHC II<sup>high</sup>、および CD83<sup>-</sup>/MHC II<sup>dull</sup> の 3 つの集団に分けて解析を行った。縦軸は 1 細胞あたりの *V<sub>H</sub>186.2* 遺伝子中の突然変異の数を示し、○または●は、個々の細胞を示す。●は W33L あるいは K58R の変異を持つ高親和性を獲得した胚中心 B 細胞を示す。

CD83<sup>high</sup>/MHC II<sup>high</sup> GC B cells

Bim	mutated VH gene <sup>b</sup>	Number of mutations <sup>c</sup>	W33L/Tyr95 total <sup>d</sup>	mutated <sup>e</sup>	K58R/Gly95 <sup>f</sup>
+/+	47/48 (98%)	239/49 (4.9)	15/48 (31.3%)	15/47 (31.9%)	1/49 (2.0%)
-/-	39/41 (95.1%)	166/41 (4.0)	21/41 (51.2%)	21/39 (53.8%)	1/41 (2.4%)

CD83<sup>low</sup>/MHC II<sup>low</sup> GC B cells

Bim	mutated VH gene <sup>b</sup>	Number of mutations <sup>c</sup>	W33L/Tyr95 total <sup>d</sup>	mutated <sup>e</sup>	K58R/Gly95 <sup>f</sup>
+/+	46/46 (100%)	226/46 (4.9)	22/46 (47.8%)	22/46 (47.8%)	4/46 (8.7%)
-/-	39/39 (100%)	186/39 (4.8)	27/39 (69.2%)	27/39 (69.2%)	1/39 (2.6%)

CD83<sup>low</sup>/MHC II<sup>high</sup> GC B cells

Bim	mutated VH gene <sup>b</sup>	Number of mutations <sup>c</sup>	W33L/Tyr95 total <sup>d</sup>	mutated <sup>e</sup>	K58R/Gly95 <sup>f</sup>
+/+	48/49 (98.0%)	258/49 (5.3)	24/49 (49.0%)	24/48 (50.0%)	5/49 (10.2%)
-/-	37/38 (97.4%)	166/38 (4.4)	21/38 (55.3%)	21/37 (56.8%)	1/38 (2.6%)

**表 4-5-1 胚中心の VH 遺伝子突然変異解析のまとめ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> 図 4-5-1 の塩基配列解析のデータをもとにした。

<sup>b</sup> 突然変異があった細胞数 / 解析した細胞数

<sup>c</sup> 突然変異の総数 / 突然変異があった細胞数.

<sup>d</sup> W33L の突然変異が入っていた細胞数 / 解析した細胞数

<sup>e</sup> W33L の突然変異が入っていた細胞数 / 突然変異があった細胞数

<sup>f</sup> K58R の突然変異が入っていた細胞数 / 解析した細胞数

#### 4-6. Bim cKO マウスにおける胚中心形成以前の IgG1 産生細胞の増加

T細胞に抗原提示を行い、活性化したB細胞は、Bcl6 の発現に依存した胚中心を経由する分化経路と濾胞外の経路で抗体産生細胞に分化することが知られている (17)(18)。一方、ここまでの解析により、Bim cKO マウスにおいても胚中心での高親和性細胞の選択には著しい異常は生じていないことが強く示唆された。そこで、Bim cKO マウスにおいて生成される膨大な数の低親和性抗体産生細胞が、胚中心非依存的な経路である濾胞外の分化経路で産生されている可能性について検討を加えることにした。B細胞で選択的に Bcl6 を欠失させることで、胚中心の形成が起こらなくなることが報告されていることから(17)(18)、mb1 cre マウスと Bim (f/f) マウス、Bcl6 (f/f) マウスを交配して Bim/Bcl-6 ダブルコンディショナルノックアウト ( dcKO ) マウスを樹立した。Bim (f/f) Bcl-6 (f/f) mb1 cre (+/-)、Bcl6 (f/f) mb1 cre (+/-) およびコントロール系統として mb1 cre (+/-) マウスを NP-CGG で免疫した。これらのマウスの免疫後 14 日目の抗 NP IgG1 抗体の血中抗体価を測定する実験を 2 回行った。その結果、いずれの実験においても、Bim/Bcl-6 dcKO マウスではコントロール、および Bcl-6 cKO マウスよりも約 5-10 倍高い血中抗体価を示した ( 図 4-6-1 )。このことは、Bim cKO マウスにおける低親和性の抗体産生細胞の異常な蓄積は胚中心非依存的に起きるということを示している。これらの結果より、Bim が胚中心非依存的に生成された低親和性 AFC のアポトーシスによる除去を担っていることが強く示唆された。

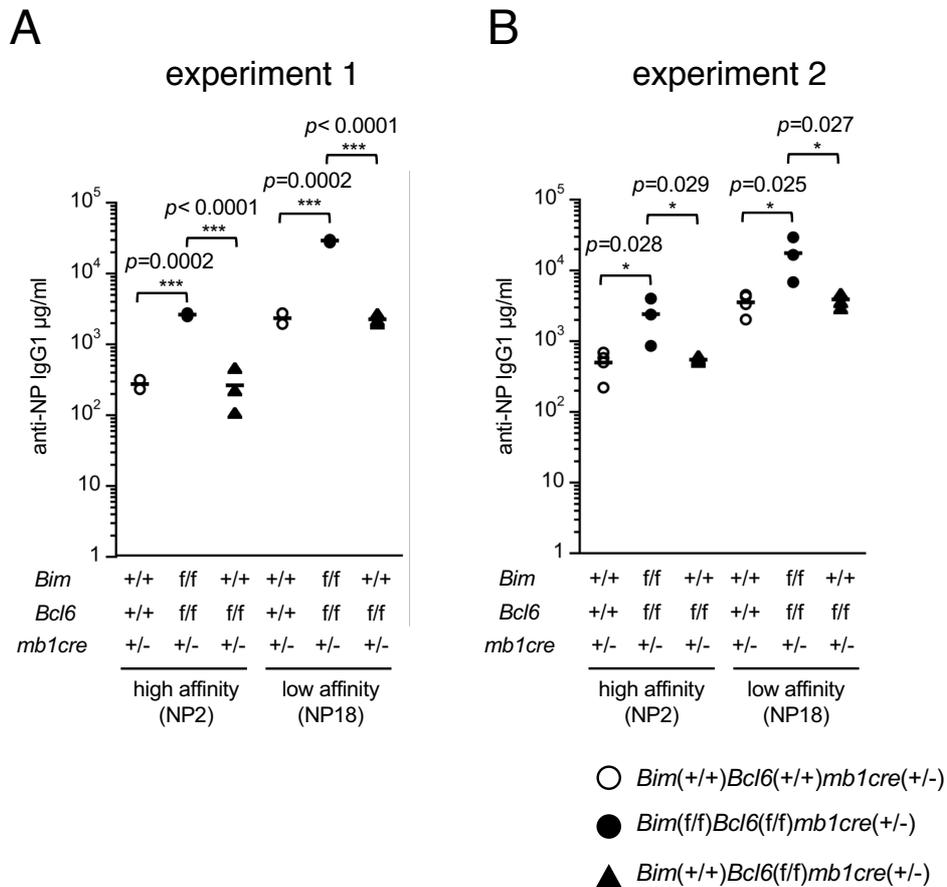


図 4-6-1 Bcl6 と Bim 遺伝子が欠損する Bim / Bcl-6 dcKO マウスにおける血中抗体量の解析

B細胞選択的に *Bim* 遺伝子と *Bcl-6* 遺伝子が欠損するダブルコンディショナルノックアウトマウス *Bim* / *Bcl-6d* cKO マウス (*Bim* (f/f) *Bcl-6* (f/f) *mb1 cre* (+/-); ●)、*Bcl-6* cKO (*Bim* (+/+) *Bcl-6* (f/f) *mb1 cre* (+/-); ▲)、および野生型マウス (*Bim* (+/+) *Bcl-6* (+/+) *mb1 cre* (+/-); ○) を NP-CGG で免疫した。免疫後 14 日目に、血清を採取し ELISA 法により血清中の抗 NP-IgG1 抗体量を測定した。NP<sub>18</sub>-BSA をコーティングに使用して検出した抗体 (NP18) は総抗体量を、NP<sub>2</sub>-BSA をコーティングに使用して検出した抗体 (NP2) は高親和性の抗体量とした。実験は 2 回行い、実験 1 を (A) に実験 2 を (B) に示した。アスタリスクはそれぞれ \*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.005$  を表す。

## 引用文献

- 1 Sionov, R. V., Vlahopoulos, S. A., and Granot, Z. 2015. Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget* 6:23058.
- 2 Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., Adams, J. M., and Strasser, A. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286:1735.
- 3 O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., and Huang, D. C. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 17:384.
- 4 Hobeika, E., Thiemann, S., Storch, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., Pelanda, R., and Reth, M. 2006. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13789.
- 5 Casola, S., Cattoretti, G., Uyttersprot, N., Koralov, S. B., Seagal, J., Hao, Z., Waisman, A., Egert, A., Ghitza, D., and Rajewsky, K. 2006. Tracking germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin gamma1 transcripts by conditional gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7396.
- 6 Oliver, P. M., Wang, M., Zhu, Y., White, J., Kappler, J., and Marrack, P. 2004. Loss of Bim allows precursor B cell survival but not precursor B cell differentiation in the absence of interleukin 7. *J. Exp. Med.* 200:1179.
- 7 Liu, R., King, A., Bouillet, P., Tarlinton, D. M., Strasser, A., and Heierhorst, J. 2018. Proapoptotic BIM Impacts B Lymphoid Homeostasis by Limiting the Survival of Mature B Cells in a Cell-Autonomous Manner. *Front Immunol* 9:592.
- 8 Craxton, A., Draves, K. E., and Clark, E. A. 2007. Bim regulates BCR-induced entry of B cells into the cell cycle. *Eur J Immunol* 37:2715.
- 9 Gao, Y., Kazama, H., and Yonehara, S. 2012. Bim regulates B-cell receptor-mediated apoptosis in the presence of CD40 signaling in CD40-pre-activated

- splenic B cells differentiating into plasma cells. *Int Immunol* 24:283.
- 10 Fischer, S. F., Bouillet, P., O'Donnell, K., Light, A., Tarlinton, D. M., and Strasser, A. 2007. Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells. *Blood* 110:3978.
- 11 Allen, D., Simon, T., Sablitzky, F., Rajewsky, K., and Cumano, A. 1988. Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response. *Embo j* 7:1995.
- 12 Kaji, T., Furukawa, K., Ishige, A., Toyokura, I., Nomura, M., Okada, M., Takahashi, Y., Shimoda, M., and Takemori, T. 2013. Both mutated and unmutated memory B cells accumulate mutations in the course of the secondary response and develop a new antibody repertoire optimally adapted to the secondary stimulus. *Int Immunol* 25:683.
- 13 Victora, G. D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A. B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., and Nussenzweig, M. C. 2012. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* 120:2240.
- 14 Bannard, O., McGowan, S. J., Ersching, J., Ishido, S., Victora, G. D., Shin, J. S., and Cyster, J. G. 2016. Ubiquitin-mediated fluctuations in MHC class II facilitate efficient germinal center B cell responses. *J. Exp. Med.* 213:993.
- 15 Lu, Y. F., Singh, M., and Cerny, J. 2001. Canonical germinal center B cells may not dominate the memory response to antigenic challenge. *Int Immunol* 13:643.
- 16 Furukawa, K., Akasako-Furukawa, A., Shirai, H., Nakamura, H., and Azuma, T. 1999. Junctional amino acids determine the maturation pathway of an antibody. *Immunity* 11:329.
- 17 Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L. M. 1997. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276:589.

- 18 Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., Rothman, P., Stall, A. M., Pandolfi, P. P., and Dalla-Favera, R. 1997. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 16:161.

## 5. 考察

## 5-1. 考察

T細胞依存性抗原に対する初期のB細胞の応答で産生される記憶B細胞と抗体産生細胞は、短命で低親和性抗体を発現するのに対して、胚中心では抗原に対して高親和性を獲得した長期寿命の記憶B細胞と抗体産生細胞が作られることが報告されている(1)。

これまでの研究では、全身性に Bim を欠失したマウスにおいては、免疫応答の後期においても低親和性 IgG1 抗体産生細胞の蓄積が認められている(2)。しかし、全身性の Bim ノックアウトマウスの研究では、Bim の欠失によって高親和性細胞の胚中心での選択に異常をきたしたため、これらの低親和性細胞が胚中心で、選択的に産生されるのか否かなど、Bim がどのような分子機構で低親和性細胞の生成に関与しているのかは明らかとなっていなかった。

そこで、本研究においては、この点を明らかにする目的で、新規に Bim (f/f) マウスを作製し、cre 発現マウスと交配することで細胞選択的 Bim コンディショナルノックアウト ( cKO ) マウスを樹立した。この cKO マウスを用いて検討を行った結果、全B細胞選択的 Bim cKO マウスでは、NP-CGG を免疫した場合に、コントロールマウスと比較するとおよそ 5-10 倍の低親和性の抗 NP IgG1 抗体の血清抗体価の上昇が見られた ( 図 4-3-1 )。また、Bim cKO マウスでは、NP-CGG で免疫後 2 週間目に脾臓および骨髄中の抗 NP IgG1 抗体産生細胞数がコントロールマウスと比較して、顕著に増加していた ( 図 4-3-4 )。Bim cKO ではさらに、不活化インフルエンザウイルスに対する免疫応答においても抗インフルエンザウイルス IgG 抗体の増加が認められたことから ( 図 4-3-2 )、Bim cKO マウスに対する NP-CGG の免疫で観察された現象は、人工抗原に限らない普遍的な現象であることが明らかとなった。

NP-CGG を免疫した結果生じた胚中心外に存在する IgG 1 抗体産生細胞は、

コントロールマウスにおいては、V<sub>H</sub>186.2 遺伝子の 33 番目トリプトファンからロイシンへ ( W33L )、あるいは 58 番目のリジンからアルギニンへの単独での変異 ( K58R ) による親和性の上昇を高頻度で起こしている ( 図 4-4-1、表 4-4-1 )。一方、同一時期の胚中心 B 細胞の V<sub>H</sub>186.2 遺伝子の変異を解析すると、V<sub>H</sub>186.2 遺伝子中の変異の数は、胚中心外の抗体産生細胞と比べて少なくなっている ( 表 4-5-1 )。胚中心 B 細胞において V<sub>H</sub> 遺伝子に起きている変異の頻度が胚中心外の抗体産生細胞と比べて低く、胚中心外に出た高親和性の抗体産生細胞において、より高頻度に突然変異を起こしている細胞が多いことは、これらの高親和性抗体産生細胞が胚中心反応の初期で選択されていることを示していることが報告されている(3)。

本研究では、NP-CGG に対する免疫応答において、変異により高親和性 V<sub>H</sub>186.2 遺伝子を獲得した胚中心 B 細胞の選択が Bim 欠損マウスでも正常マウスと同様に起きているかを調べた。その結果、Bim cKO で観察される胚中心 B 細胞の集団は、高親和性を獲得する突然変異を、V<sub>H</sub>186.2 遺伝子にコントロールマウスと同等に蓄積していた ( 表 4-5-1 )。このことから、胚中心 B 細胞が抗体産生細胞へ分化する段階で、Bim の欠失により低親和性細胞の除去に異常が起きている可能性は低いと考えられる。したがって、Bim cKO において、変異を起こしていない IgG1 抗体産生細胞が異常に蓄積する現象は、胚中心細胞の選択の異常によって生じたというよりは、NP-CGG に対する免疫応答の比較的初期に胚中心の形成と無関係に生じたと考えられる。

さらに、Bim/Bcl6 dcKO マウスに NP-CGG を免疫した場合における抗 NP 抗体反応の解析では、Bcl6 の欠損により胚中心が形成されない場合においても Bim の欠損により、低親和性 IgG1 抗体を産生する細胞の異常な蓄積が観察された ( 図 4-6-1 )。この実験結果も、免疫応答の初期に濾胞外で生成された低親

和性抗体産生細胞を Bim がアポトーシスによって除去しているか、低親和性抗体産生細胞の前駆細胞である plasmablast のプログラム細胞死を誘導するメカニズムで Bim が中心的な役割を果たしているという可能性を支持している。

体内における、免疫応答初期から後期にかけて抗体産生細胞の集団を構成する細胞の変遷は、抗体産生細胞が生存するための有限なスペースである niche を、すでに確保していた抗体産生細胞と新たに形成された抗体産生細胞が競争的に奪い合うことによって実現されていると考えられている(4)。本研究における、免疫組織染色の解析により、膨大な数の IgG1 陽性抗体産生細胞が免疫後 2-4 週目の Bim cKO マウスの赤色脾髄に広がっていることが明らかとなった (図 4-3-5)。一方、これまでの研究により、骨髄中で維持される長寿命の抗体産生細胞と同様に、長期的な体液性免疫において脾臓は重要な役割を担っており(5)、抗体産生細胞は長期にわたって脾臓中での生存を維持し続けるために、脾臓の物理的な niche を確保しているという可能性の存在が示唆されている(6)。しかし、抗体産生細胞が濾胞外で plasmablast の分化によって生じたにせよ、胚中心由来の細胞であるにせよ、niche は有限であるため脾臓に留まることのできる抗体産生細胞の総数に限界があるのは明らかである。したがって、免疫応答で niche が許す最大限にまで脾臓中で増殖した抗体産生細胞は、免疫応答の減退期には減少し、niche に余裕をもつ一定数に落ち着いていくと考えられている(4)(7)。

これまでに、全身性の Bim 欠損マウスにおいては、抗体産生細胞が野生型マウスと比べて長寿命を得ていると報告されている(2)。このことを考慮すると、本研究で解析した Bim cKO マウスにおいては、免疫応答の初期に生成された低親和性抗体産生細胞が長寿命を獲得して長期的に脾臓に蓄積されてしまったことにより、免疫反応の後期に生成される胚中心由来の高親和性抗体産生細胞へ

の置き換わりが正常に行われていないことが示唆される。つまり、初期に生成された低親和性の抗体産生細胞が Bim の欠損により長期寿命を獲得したことで、有限な niche に居座り続けたため、後から胚中心で生成された高親和性抗体産生細胞が、然るべき場所に入れられない状態にあるのではないかと推測できる。このように考えると、Bim は、微生物等の感染時に惹起される初期防衛において濾胞外で生成される、変異が入っていない抗体産生細胞の数が一気に増える時期から、高親和性を獲得した高品質な長寿命の抗体産生細胞が胚中心で生成され供給される免疫応答後期にわたる時間軸に沿って、抗体産生細胞の種類、すなわち、産生される抗体の組成を低親和性中心から高親和性中心に切り変える役割を担っている可能性が強く示唆される。

さらに、同様の現象が記憶 B 細胞の応答でも起きている可能性も示唆される。すなわち、これまでの我々の研究により、免疫応答の初期においては、低親和性の抗体が産生されるが、これらの抗体は特異抗原以外の抗原に対して交叉反応性を示すことが明らかとなっている(8)。しかし、免疫応答の後期においては、これらの抗体を産生する抗体産生細胞は、徐々に特異抗原に対して高親和性で長寿命を持つ記憶細胞由来のものに置き換わっていくことが明らかとなっている(9)(10)。この細胞の移り変わりに Bim によって誘導されるアポトーシスが関与している可能性がある。しかし、この現象に実際に Bim が関与しているのか否かを明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

これまで、濾胞外で生成された低親和性の抗体産生細胞のアポトーシスに対する Bim の役割を論じてきたが、Bim を介するアポトーシスは、変異の入っていない濾胞外細胞だけでなく胚中心由来の抗体産生細胞の寿命も制御していると考えられる。一般的に、B 細胞上の抗原受容体 ( BCR ) の抗原による架橋で惹起される BCR シグナルは、Bcl-2 への Bim の結合を誘導し、Bcl-2 による

生存効果を抑制することが知られている(11)。その一方で、樹状細胞が分泌する BAFF と APRIL は B 細胞活性化能を有し、Bim の発現を抑制することで BCR 介在性アポトーシスを抑え込むと言われている(12)。また、B 細胞上に発現している BCMA は、これら 2 つのリガンド、BAFF と APRIL と結合することが知られている。さらに、BCMA と相同性を有する TACI も BCMA と同様に、これらのリガンドと結合し、活性化すると胚中心 B 細胞においてクラススイッチを誘導すると報告されている(13)。これらの受容体のうち、BCMA を欠損した場合は、骨髄に存在する長寿命の高親和性抗体産生細胞の大幅な減少をもたらすのに対して、短寿命の抗体産生細胞の異常は認められない(14)。この現象は、骨髄の抗体産生細胞において、BCMA を介するシグナル伝達が anti-apoptotic な Bcl-2 ファミリー分子の一員である Mcl-1 の転写を誘導するため(15)、BCMA を欠失したことにより Mcl-1 が正常につくられなくなることが原因で起きていると考えられる。これらの過去の報告を総合すると、胚中心由来の抗体産生細胞では、Bim 誘導性のアポトーシスは、BCMA を介するシグナル伝達により抑制されるのに対して、胚中心非依存性の濾胞外で生成される抗体産生細胞の前駆細胞である BCR 陽性の plasmablast では、Bim 誘導性のアポトーシスは、BCMA を介するシグナルでは抑制されないと予想される。

一方で、本研究の結果より、Bim 介在性のアポトーシスは、T 細胞依存性の免疫応答においては濾胞外抗体産生細胞の生成に大きく影響を与えるのに対して、NP-Ficoll に代表される 2 型 T 細胞非依存性 (TI-2) 抗原によって誘導される免疫応答には影響を与えていないことが明らかとなった (図 4-2-5)。

TACI は、T 細胞非依存性抗原による体液性免疫に必須の共刺激シグナルを伝えることが知られている(16)。そのため、TACI の欠損下では B 細胞の分化は正常に行われるが、TI-2 抗原に対する抗体産生能が著しく低下する(16)(17)。した

がって、TACI 介在性シグナルは、T細胞非依存性の NP-Ficoll に対する反応では、Bim 介在性のB細胞のアポトーシスを抑制するが、T細胞依存性抗原に対するB細胞応答では抑制しないと考えられる。したがって、BCMA が胚中心由来の抗体産生細胞において Bim 介在性のアポトトーシスを抑制する役割を担っている可能性があるのに対して、TACI は、胚中心由来ではない、濾胞外で生成された抗体細胞の前駆細胞である plasmablast に対して、Bim 介在性のアポトーシスを抑制する役割を果たしている可能性は残されている。すなわち、本研究や以前の研究の結果より、免疫応答初期において濾胞外で生成された低親和性の抗体産生細胞は、やがて胚中心由来の高親和性抗体産生細胞に置換されていくと考えると、TACI 欠損マウスにおいて、T細胞依存性抗原に対する抗体産生に大きな影響が現れなかったのは、TACI が胚中心依存性の抗体産生細胞の生成には大きな影響を与えないからではないかと考えられる。しかし、実際に、このようなメカニズムが存在するか否かは、現在のところ全く不明であるため、今後のさらなる検討が必要である。

胚中心依存性、非依存性のB細胞の反応は、それぞれ種類の異なるT細胞からのヘルプにより惹起されると考えられている(9)(17)(18)(19)。Bcl-6<sup>+</sup> / PD-1<sup>high</sup> / Cxcr5<sup>+</sup> の濾胞ヘルパーT ( Tfh ) 細胞は脾臓の濾胞に存在し、そこで胚中心形成をうながし、B細胞の高親和性獲得を促進することが知られている(20)。Bcl-6<sup>+</sup> T細胞は、胚中心が形成される前にT細胞領域とB細胞領域の境界に現れ、B細胞と相互作用し免疫応答を開始させるとともに、PD-1 の発現を低下させる。そのため、Bcl-6<sup>+</sup> T細胞の欠損は、T細胞依存性の濾胞外抗体反応を著しく減少させると報告されている。これらのことより、Bcl-6<sup>+</sup> T細胞はB細胞が濾胞外反応起こすために必須の細胞であると考えられている(18)。しかし、どのようにB細胞が、Tfh 細胞あるいは Tfh 細胞以外のT細胞からの刺激により、異なる

活性化状態を獲得するのか、どのように異なるのか、さらには、Bim 介在性アポトーシスに対する感受性が異なるのか否かは未解明のまま残されている。

これまでの報告によると、転写伸長因子 EAF2 の欠損により胚中心B細胞のアポトーシスの促進が観察され、NP-CGG と NP-Ficolin に対する反応において血清中の抗 NPIgG 抗体の量が僅かながら上昇することが知られている(21)。この反応では、Bim 欠損マウスとは対照的に低親和性細胞が優勢とはならないことが、抗体可変部の突然変異の解析より示されている。一方で、EAF2 は、Fas 介在性のアポトーシスに関与するだけであり、EAF2 欠損は Bim の発現には影響しないことも明らかとなっている。そのため、EAF2 欠損マウスにおいては、Bim 欠損と同様にアポトーシスが促進されるにもかかわらず、Bim の発現量の変動しないと予想されるため、Bim 欠損マウスとは異なる表現型を示したと考えられる。しかし、一方で、Bim、EAF2 そして Fas は、体細胞突然変異の結果として生じる multi-reactive 抗体や抗 dsDNA 抗体を含む自己抗体の産生を抑制するなど共通の性質を有することも知られている(11) (22) (23) (24)。これらのことを総合すると、T細胞依存性の抗原に対する抗体応答における免疫のバランスの維持は、単一のシグナル伝達機構によって制御されているのではなく、複数のシグナル伝達メカニズムの相互作用により調節されることを示していると考えられる。今後、これらのシグナル経路がどのように相互作用をしているのかを明らかにする必要がある。

本研究で、Bim は、免疫応答初期の T細胞依存性のかつ胚中心に由来しない抗体産生細胞の寿命を制御するメカニズムの一部を構成しており、これらの細胞が無尽蔵に増え続けることを防ぐことで、免疫応答後期に胚中心内で産生される高親和性の抗体産生細胞や記憶 B細胞が分化して胚中心から出てきて安定に維持される場である niche を確保する役割を担っていることを明らかにした。すなわち、Bim が発現することにより、初期に産生された低親和性の抗体産生

細胞が短命となり、高親和性抗体産生細胞が産生される応答後期には、有限なサイズの niche の必要な領域が開放されており、胚中心内で高親和性を獲得した抗体産生細胞等が胚中心内から外部へと移動することを可能としている。その結果、免疫応答が進むにつれて血中抗体は、低親和性の抗体が大半を占める状態から、質の高い高親和性抗体が相対的に増加し、体内からの抗原の排除効率が向上すると考えられる。さらに、低親和性の抗体産生細胞がアポトーシスによって取り除かれず、niche を占拠したままの状態では、胚中心内で高親和性の記憶B細胞に分化したB細胞も外部へ出て来て生存することができないと予想されることから、niche の制御は、1次応答後に惹起される2次応答にも影響を与えると考えられる。したがって、今後、どのような分子機構で niche が実現されているのか詳細な検討が行われることが期待される。

## 引用文献

- 1 Weisel, F. J., Zuccarino-Catania, G. V., Chikina, M., and Shlomchik, M. J. 2016. A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* 44:116.
- 2 Fischer, S. F., Bouillet, P., O'Donnell, K., Light, A., Tarlinton, D. M., and Strasser, A. 2007. Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells. *Blood* 110:3978.
- 3 Smith, K. G., Light, A., Nossal, G. J., and Tarlinton, D. M. 1997. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *Embo j* 16:2996.
- 4 Manz, R. A., Thiel, A., and Radbruch, A. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388:133.
- 5 Ellyard, J. I., Avery, D. T., Phan, T. G., Hare, N. J., Hodgkin, P. D., and Tangye, S. G. 2004. Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow. *Blood* 103:3805.
- 6 Wilmore, J. R. and Allman, D. 2017. Here, There, and Anywhere? Arguments for and against the Physical Plasma Cell Survival Niche. *J Immunol* 199:839.
- 7 Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D. M., Dietrich, W., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., and Nutt, S. L. 2004. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J. Exp. Med.* 200:967.
- 8 Kaji, T., Furukawa, K., Ishige, A., Toyokura, I., Nomura, M., Okada, M., Takahashi, Y., Shimoda, M., and Takemori, T. 2013. Both mutated and unmutated memory B cells accumulate mutations in the course of the secondary response and develop a new antibody repertoire optimally adapted to the secondary stimulus. *Int Immunol* 25:683.
- 9 Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T.,

- Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohara, O., Rajewsky, K., and Takemori, T. 2012. Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J. Exp. Med.* 209:2079.
- 10 Weisel, F. and Shlomchik, M. 2017. Memory B Cells of Mice and Humans. *Annu. Rev. Immunol.* 35:255.
- 11 Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D. M., and Strasser, A. 2003. Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J. Exp. Med.* 198:1119.
- 12 Craxton, A., Draves, K. E., Gruppi, A., and Clark, E. A. 2005. BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J. Exp. Med.* 202:1363.
- 13 Bossen, C. and Schneider, P. 2006. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin. Immunol.* 18:263.
- 14 O'Connor, B. P., Raman, V. S., Erickson, L. D., Cook, W. J., Weaver, L. K., Ahonen, C., Lin, L. L., Mantchev, G. T., Bram, R. J., and Noelle, R. J. 2004. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J. Exp. Med.* 199:91.
- 15 Peperzak, V., Vikstrom, I., Walker, J., Glaser, S. P., LePage, M., Coquery, C. M., Erickson, L. D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., Nutt, S. L., and Tarlinton, D. M. 2013. Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat Immunol* 14:290.
- 16 von Bulow, G. U., van Deursen, J. M., and Bram, R. J. 2001. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 14:573.
- 17 Yan, M., Wang, H., Chan, B., Roose-Girma, M., Erickson, S., Baker, T., Tumas, D., Grewal, I. S., and Dixit, V. M. 2001. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol* 2:638.
- 18 Taylor, J. J., Pape, K. A., and Jenkins, M. K. 2012. A germinal center-independent

- pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* 209:597.
- 19 Lee, S. K., Rigby, R. J., Zotos, D., Tsai, L. M., Kawamoto, S., Marshall, J. L., Ramiscal, R. R., Chan, T. D., Gatto, D., Brink, R., Yu, D., Fagarasan, S., Tarlinton, D. M., Cunningham, A. F., and Vinuesa, C. G. 2011. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J. Exp. Med.* 208:1377.
- 20 Linterman, M. A., Pierson, W., Lee, S. K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T. F., Srivastava, M., Divekar, D. P., Beaton, L., Hogan, J. J., Fagarasan, S., Liston, A., Smith, K. G., and Vinuesa, C. G. 2011. Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17:975.
- 21 Crotty, S. 2019. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 50:1132.
- 22 Li, Y., Takahashi, Y., Fujii, S., Zhou, Y., Hong, R., Suzuki, A., Tsubata, T., Hase, K., and Wang, J. Y. 2016. EAF2 mediates germinal centre B-cell apoptosis to suppress excessive immune responses and prevent autoimmunity. *Nat Commun* 7:10836.
- 23 Hughes, P. D., Belz, G. T., Fortner, K. A., Budd, R. C., Strasser, A., and Bouillet, P. 2008. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* 28:197.
- 24 Tiller, T., Kofer, J., Kreschel, C., Busse, C. E., Riebel, S., Wickert, S., Oden, F., Mertes, M. M., Ehlers, M., and Wardemann, H. 2010. Development of self-reactive germinal center B cells and plasma cells in autoimmune Fc gammaRIIB-deficient mice. *J. Exp. Med.* 207:2767.

## 6. 総括

## 6-1. 総括

T 細胞依存性の抗体反応において、活性化した一部の B 細胞は濾胞外経路を経由して低親和性の抗体産生細胞や記憶 B 細胞に分化する。一方でその他の活性化 B 細胞は濾胞経路を経由して胚中心を形成する。胚中心では体細胞突然変異が起これ親和性が向上する。一方、これまでの研究により、Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス促進性の BH-3 only 分子群の一つである Bim は T 細胞依存性免疫応答の初期から後期にかけての B 細胞の抗原に対する多様性の構築に関与していることが示されている。

免疫応答の初期に濾胞外で生成される抗体産生細胞は脾臓中で増殖するが、野生型マウスにおいては、これらの細胞は後から出現する胚中心由来の抗体産生細胞に置き換わり急速に減少する。これとは対比的に、Bim を B 細胞で選択的に欠失させた Bim cKO マウスでは、濾胞外で生成される低親和性の抗体産生細胞が脾臓中で増加・蓄積し、この蓄積が免疫応答の後期まで持続されることで、胚中心由来の高親和性抗体産生細胞が、これらの低親和性抗体産生細胞と置き換わることが妨げられることを明らかにした。

さらに、Bim cKO マウスにおいても、コントロールマウスとほぼ同等の割合の胚中心細胞が VH 遺伝子に高親和性となる変異を起こしていたことから、Bim の欠損は、胚中心における高親和性抗体産生細胞の選択には、大きな影響を及ぼしていないことも明らかにした。

これらの結果から、Bim は免疫応答の過程で、最初に生成される低親和性の抗体産生細胞の寿命を短くすることで、後から産生される、胚中心由来の高親和性抗体産生細胞が生存・維持される niche を確保していると考えられる。その結果、最初に生成した低親和性の抗体産生細胞は、徐々に高親和性抗体産生細胞へと置き換わっていくため、血中の抗体が低親和性から高親和性の抗体へと遷移することで、効果的に特異抗原を除去できるようにする重要な役割を果たしていると考えられる。

## 7. 謝辭

## 7-1. 謝辞

本研究を行うにあたり、また理化学研究所に就職して以来の長きに渡り、ご指導と学問のみならず数々のご助言をいただきました秋田大学大学院 理工学研究科 生命科学領域 分子細胞生理学研究室 疋田正喜教授に心より感謝申し上げます。また、秋田大学大学院 理工学研究科 生命科学領域 分子細胞生理学研究室の皆様にも感謝申し上げます。

審査をお引き受けくださいました、秋田大学大学院 理工学研究科 生命科学領域 涌井秀樹教授、尾高雅文教授、藤原憲秀教授には多くのご助言をいただきましたこと心より感謝申し上げます。

理化学研究所 創薬抗体基盤ユニット前ユニットリーダー竹森利忠先生には2005年の国立感染症研究所に配属の時から免疫学について一から教えていただき、また社会人学生として学位取得の機会と、本研究の場をいただきましたこと、深く感謝申し上げます。

理化学研究所、旧免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫記憶研究グループの加地友宏研究員におかれましては、国立感染症研究所に加地研究員の技術スタッフとして配属され当時から数々の実験手法と技術をご教授いただき、本研究でも多くの助言を賜りましたこと、深く御礼申し上げます。

不活化インフルエンザウイルスと標準抗体をご分与いただき、ご助言を賜りました、国立感染症研究所 免疫部部長 高橋宜聖先生、並びに安達悠主任研究官に感謝申し上げます。

本研究を疋田教授、竹森利忠先生のご指導のもと行っていた研究室でもある創薬抗体基盤ユニットの原田通成研究員、田中実穂テクニカルスタッフには実験遂行に多大なご協力をいただきました。ここにお礼を申し上げます。

2020年度は新型コロナウイルス感染拡大により緊急事態宣言が発令され、理化学研究所も約2ヶ月間の活動自粛とその後の感染拡大予防措置等により半年に渡り研究活動制限が行われました。このような状況下での論文投稿となり、revise 実験の時間を取らせていただくことに了解を下さりました現所属長であ

られる、理化学研究所 統合生命医科学研究センター 炎症制御研究チーム 田中貴チームリーダーに心より感謝申し上げます。

B 細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウス樹立に際し、理化学研究所動物管理グループ並びに統合ゲノミクスグループの方々には中央支援としてご協力をいただきました。理化学研究所では数々の中央支援と、また多くの先生方からのご助言とご協力を頂ける環境がありました。こうした充実した環境での研究を行えたことは本当に幸せであったと思います。この場をお借りしてそのような機会をくださいました全ての皆様にお礼申し上げます。

石毛 晶子