Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Memory b cells without somatic hypermutation are generated from bc16-deficien b cells

外山, 博近

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2003-01-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2675
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002675

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 69 】

氏 名 ・(本 籍)　　外山 博近　　(宮崎県)

博士の専攻分野の名称　博士（医学）

学 位 記 番 号　　博い第1464号

学位授与の 要 件　　学位規則第４条第１項該当

学位授与の 日 付　　平成１５年３月３１日

【 学位論文題目 】

Memory B Cells without Somatic Hypermutation Are Generated from Bcl6-deficient B Cells

(Bcl6 欠損 B 細胞から Ig 遺伝子 V 領域に体細胞突然変異のないメモリー B 細胞が分化する)

審 査 委 員

主 査　教 授　黒田　嘉和

教 授　久野　高義

教 授　尾原　秀史

Memory B Cells without Somatic Hypermutation Are Generated from Bcl6-deficient B Cells

Bcl6 欠損 B 細胞から Ig 遺伝子 V 領域に体細胞突然変異のないメモリーB 細胞が分化する

外山博近[1,3]　岡田誠治[1]　幡野雅彦[1]　高橋宜聖[2]　武田紳江[1]　市井啓仁[1,3]
竹森利忠[2]　黒田嘉和[3]　徳久剛史[1]
[1]千葉大学大学院医学研究科分化制御学　[2]国立感染症研究所免疫部
[3]神戸大学大学院医学系研究科消化器外科学

Introduction

T 細胞依存性抗原(TD-Ags)に対する免疫反応では、まず免疫後 1-2 週間で一次抗体産生がおこる。この抗体産生は二次リンパ組織内の傍細動脈リンパ鞘(periarteriolar lymphoid sheaths: PALS)において分化した抗体産生細胞によるもので、抗原への親和性は低く、抗体の量も少ない。一方活性化された B 細胞の一部は follicle に遊走し、胚中心(Germinal Center)を形成する。胚中心において、B 細胞はイムノグロブリン(Ig)遺伝子の V 領域に高率に体細胞突然変異(Somatic Hypermutation)を起こしつつ増殖し、抗原に親和性の低いものや自己反応性の B 細胞は細胞死に陥り(negative selection)、抗原に対し高親和性を獲得したものは選択され(positive selection)、メモリーB 細胞や long-lived AFCs(Antibody Forming Cells)へと分化する。こうして分化したメモリーB 細胞は Resting State で長期間リンパ組織にとどまり、次に同じ抗原に免疫された際に形質細胞に分化し、効率よく親和性の高い抗体を産生する事ができる。これらの胚中心における Selection とメモリーB 細胞の分化は、免疫記憶の成立において中心的役割を果たしている。

Bcl6 遺伝子はヒト B cell lymphoma の転座部位から単離され、核内で抑制性の転写因子として働くことが知られている。多くの組織で恒常的に発現しているが、胚中心の B 細胞で特に強発現している。我々は既に Bcl6 欠損マウスを作成し、同マウスでは成熟 B および T 細胞は正常マウスと同等に分化し、T 細胞依存性抗原で免疫後、一次抗体産生は正常に行われるにもかかわらず、胚中心の形成が全くみられないことを明らかにしている。今回の研究で、我々は胚中心形成のみられない Bcl6 欠損 B 細胞においてもメモリーB 細胞は分化し、免疫記憶が成立しているが、それらのメモリーB 細胞では Somatic Hypermutation が全く認められず、抗原に対する親和性が低いことを明らかにし、さらにメモリーB 細胞の分化及び Somatic Hypermutation における胚中心の役割を考察した。

Materials and Methods

$Bcl6^{-/-}$RM (RAG1-deficient mice reconstituted with hematopoietic stem cells of $Bcl6^{-/-}$mice) の作成と免疫

Bcl6 欠損マウスの骨髄細胞から FACSVantage を用いて骨髄造血幹細胞(Lineage marker mix^{-}/$Sca1^{+}$ Cell)を sorting し、4Gy(subletal dose)放射線照射した RAG1 欠損マウス（リンパ球欠損マウス）に移植(1.5-2.0x10^{4} cells/mice)し、8-12 週後、末梢血にてリンパ球の再構築を確認し実験に用いた。これらのマウスを NP_{25}-CG alum 50μg 腹腔内注にて一次免疫、70 あるいは 90 日後に、水溶性 NP_{25}-CG50μg 静注にて二次免疫し、解析をした。

Results

$Bcl6^{-/-}$RM は抗原親和性の低い IgG1 二次抗体を産生する

まず、$Bcl6^{-/-}$RM 及び $Bcl6^{+/+}$RM を NP-CG in alum 腹腔内注で一次免疫し、70 日後に水溶性 NP-CG 静注にて二次免疫を行い、血中の抗 NP IgG1 抗体価を ELISA 法にて測定した。その結果 $Bcl6^{-/-}$RM でも $Bcl6^{+/+}$RM と同等に、一次免疫反応の約 7 倍の高い二次抗体産生が見られた。しかし、高親和性の IgG1 抗体はほとんど産生されなかった。この結果は、胚中心の欠損する $Bcl6^{-/-}$RM においても IgG1 メモリーB 細胞が分化しているが、親和性の成熟(affinity maturation)過程が障害されていることを示唆している。IgM も同様に二次免疫後、高い抗体産生を認めたことから、$Bcl6^{-/-}$RM において、IgM メモリーB 細胞も分化していることが示唆された。

これらの $Bcl6^{-/-}$RM で見られた二次免疫反応がメモリーB 細胞によるものかどうかを調べるため、一次免疫後 90 日の B 細胞(NP-primed B cell)と、免疫していない B 細胞(naive B cell)を、別の RAG1 欠損マウスに移植し、その免疫反応を調べた(Adoptive transfer method)。その結果、両マウスとも免疫後の B 細胞を移植したものは、免疫前の B 細胞を移植したものに比べ著しく高い IgG1 産生を認めた。しかし、$Bcl6^{-/-}$RM ででは、やはり高親和性の IgG1 は認められなかった。IgM の場合も同様の傾向が見られた。このことは、メモリーB 細胞は胚中心が欠損しても明らかに分化しているが、胚中心の形成及び Bcl6 が高親和性のメモリーB 細胞の分化に必須であることを示している。

さらに免疫後の脾臓にメモリーB 細胞が存在するか確かめるため、免疫後

60日の両マウスの脾臓細胞をFive colorのFlowcytometory (FACSVantage)にて解析した。その結果、両マウスでIgG1^{+}/CD38^{+} B-Cellが認められ、メモリーB細胞が脾臓内に存在することが示された。一方、胚中心B細胞(IgG1-/CD38^{dull})はBcl6$^{-/-}$RMではやはり認められず、胚中心が欠損するにもかかわらずメモリーB細胞が分化し、脾臓に存在することが示された。これらのIgG1メモリーB細胞はBrdU取り込み試験で取り込みがないresting stateであり、in vitroの抗体産生反応(in vitro Secondary Antibody Response)でも高い抗体産生能を示した。これらのことから、機能的にもメモリー細胞であることが示された。

Bcl6$^{-/-}$RMでは一次免疫反応後、急速に血中IgG1抗体価が低下することから、骨髄中のLong-lived IgG1 AFCsの分化が障害されていることが考えられた為、ELISPOT法をもちいて細胞数を測定した。その結果、Bcl6$^{-/-}$RMではほとんどLong-lived IgG1 AFCsが分化していなかった。しかしながら、骨髄中にIgM AFCsは認められた。これらのことから、Long-lived IgG1 AFCsは胚中心に依存して分化し、Long-lived IgM AFCsは胚中心に依存せずに分化することが示唆された。

通常メモリー細胞は、そのIg遺伝子のV領域に、高率に体細胞突然変異を起こす(Somatic Hypermutation)ことにより抗原への親和性を上昇させる(affinity maturation)ことが知られている。そこで、NPにて免疫後、両マウスのIgG1メモリーB細胞の、Ig遺伝子V領域の塩基配列をSingle Cell RT-PCR法で解析した。Bcl6$^{+/+}$RMでは、ほとんどの細胞のV186.2領域にmutationが認められ、78%の細胞は、NP抗原に対して親和性を著しく上げるとして知られている33番目のアミノ酸置換(TriからLeu)を有し、affinity maturationが正常に行われていることを示した。しかしながら、驚くべきことにBcl6$^{-/-}$RMのメモリーB細胞ではV領域に全くmutationが認められなかった。IgMのメモリー細胞においても同様にmutationが認められなかった。このことからBcl6及び胚中心の形成がメモリーB細胞のSomatic Hypermutationに必須であることが強く示唆された。

Discussion

胚中心欠損マウスにおけるメモリーB細胞の分化については、LTα欠損マウスやBlr1欠損マウス等、過去にいくつかの報告がある。しかしながら、メモリーB細胞の分化における胚中心の役割は未だ明確に解明されていない。Bcl6$^{-/-}$RMでは二次リンパ組織の構造が保たれており、一次免疫反応も正常に見られるにもかかわらず、どのリンパ組織にも胚中心が形成されないことから、胚中心の役割を明確に解明できると考える。

今回我々はBcl6$^{-/-}$RMにおいて一次免疫後60日および90日で、IgG1メモリーB細胞が分化していることをadoptive transfer法とFACSによる解析で明らかにした。これらのメモリーB細胞は機能的であり、かつresting stateであった。一方胚中心B細胞は過去の報告や今回の研究からも全く認められないことから、我々はついに、ある種のメモリーB細胞は胚中心に依存せずに分化するという結論に達した。

通常、IgG1メモリーB細胞では抗原親和性の高い抗体を産生するが、Bcl6$^{-/-}$RMでは抗原親和性が低く、Somatic Hypermutationが認められない。このことは明らかにメモリーB細胞の、少なくとも一部は、somatic hypermutationに依存せず分化していることを示している。実際、過去の報告や我々の実験でも、正常マウスでmutationのないメモリーB細胞が約10%認められた。これらのことから、正常マウスにおいてもmutationのないメモリーB細胞は胚中心に依存せず、従来の胚中心とmutationに依存した経路とは別の経路で分化している可能性が示唆される。

また、近年IgG1ばかりでなく、IgMにもメモリー細胞があることが報告されている。我々はBcl6$^{-/-}$RMマウスで、IgMの二次免疫反応が高いことをadoptive transferで示しており、IgMメモリーB細胞も胚中心に依存せず分化していることが強く示唆される。このように胚中心の形成はメモリーB細胞の分化に必須ではないが、mutationとaffinity maturationに重要であることが示された。

まとめると、Bcl6欠損B細胞は胚中心を形成しないにもかかわらず、IgM, IgG1のメモリーB細胞に分化しうる。しかし、これらのメモリーB細胞は、Somatic Hypermutationを伴わない。我々は今回の研究で、Bcl6および胚中心の形成は、Somatic Hypermutationに必須であり、胚中心形成がなくてもmutationのない低親和性のメモリーB細胞が分化することを明らかにした。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第　1464 号	氏　名	外山　博近
論文題目	Memory B Cells without Somatic Hypermutation Are Generated from Bcl6-deficient B Cells Bcl6欠損B細胞から Ig遺伝子V領域に体細胞突然変異のないメモリーB細胞が分化する		
審査委員	主　査　黒田嘉和 副　査　久野高義 副　査　尾倉秀史		
審査終了日	平成　14 年　12　月　11　日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

論文審査の結果の要旨

生体の防御機構において、免疫学的記憶の成立は不可欠な役割を果たしている事は周知の通りであり、ワクチネーションを含め、現代医療においても様々な形で応用されている。本研究は免疫学的記憶の主体である、記憶 B 細胞の分化、及び記憶の獲得の機序に関する研究である。

通常、T 細胞依存抗原により免疫された B 細胞は、二次リンパ組織で胚中心を形成する。活性化された B 細胞は、胚中心において、免疫グロブリンの可変領域に高率に体細胞突然変異を誘導することにより抗原に対し高い親和性を獲得した細胞が選択される。選択された高親和性の B 細胞は、記憶 B 細胞へと分化して体内に長くとどまり、再び同じ抗原に免疫された場合、親和性の高い抗体を急速に、かつ大量に産生する。この免疫学的記憶、記憶 B 細胞の分化において、胚中心は非常に重要な役割をはたしているといわれているが、その役割については現在まで様々な報告があり、未だ議論の多いところであった。

Bcl6 は、B cell lymphoma の転座部位からクローニングされた oncogene であるが、核内で抑制性の転写因子として働くことがしられている。本研究者らのグループではすでに Bcl6 欠損マウスを作成し、同マウスでは、T 細胞依存性の免疫反応において、胚中心が全く形成されないことを明らかにしていた。本研究ではその Bcl6 欠損マウスの B 細胞を胚中心欠損モデルとして用い、記憶 B 細胞の分化と、胚中心の役割を解析している。

まず本研究では、Bcl6 欠損 B 細胞でも、高い二次免疫反応が起こることを示している。さらに、フローサイトメトリーによる記憶 B 細胞の解析から、胚中心が欠損しても、IgM および IgG1 の記憶 B 細胞が分化しており、免疫学的記憶が成立していることを明らかにている。また、これらの Bcl6 欠損マウスで分化した記憶 B 細胞は、正常マウスの記憶 B 細胞と同様、通常は増殖せず休止期でとどまっているが、同じ抗原で免疫すると著しく高い抗体産生をするという性質を持っていることを示した。

しかしながら、Bcl6 欠損マウスで分化した記憶 B 細胞では、抗原に対する親和性が、一次免疫反応と同様に低いものであった。そのためこの記憶 B 細胞をソーティングし、免疫グロブリン可変領域の遺伝子の配列を、Single cell RT-PCR 法を用いて解析している。その結果、Bcl6 欠損マウスで分化した記憶 B 細胞では、免疫グロブリン遺伝子の可変領域にまったく体細胞突然変異が起こっていないことを明らかにした。

これらのことから、記憶 B 細胞は、胚中心の形成、体細胞突然変異、および免疫グロブリンのクラススイッチがなくても分化し、免疫学的記憶が成立しうること、さらに、Bcl6 遺伝子と、胚中心の形成は、免疫グロブリン遺伝子可変領域の体細胞突然変異に必須であることを示した。このことは、記憶 B 細胞の定義、あるいは分化のプロセスについての新しい知見である。さらに、正常マウスにおいても、体細胞突然変異を伴わない記憶 B 細胞が分化していることとあわせ、正常マウスにおいても、胚中心に依存しない記憶 B 細胞が分化している可能性があることを示唆している。

本研究は、免疫学的記憶の成立機序について研究したものであるが、従来おこなわれたことのない、Bcl6 欠損 B 細胞を用いた研究により、記憶 B 細胞の分化プロセスと、胚中心の役割について重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。