

《農芸化学奨励賞》



抗体産生を制御する機能分子に関する研究

国立感染症研究所 免疫部 主任研究官 高橋 宜 聖

近年、高病原性トリインフルエンザや SARS をはじめとしたさまざまな感染症や、花粉症をはじめとしたアレルギーが大きな社会問題として取り上げられているが、いずれの問題にも抗体依存性の免疫反応が深く関与する。病原体やアレルゲンなどの抗原が生体内に侵入すると、侵入した抗原の情報が免疫系に記憶され、その結果、同じ抗原が再侵入した際に速やかに IgG や IgE 抗体が産生される。これが抗体産生の記憶と呼ばれる現象であり、このとき産生された抗体分子により感染防御効果やアレルギー反応が成立する。そのため、抗体産生の記憶応答を適切にコントロールすることは、感染症の制圧やアレルギーの抑制に大きく寄与し QOL の改善につながる。

抗体産生の記憶は、初回の抗原刺激により産生された記憶 B 細胞と呼ばれる B 細胞サブセットにより成立する (図 1)。そのため、抗体産生の記憶を制御する技術開発には、記憶 B 細胞に発現する機能分子の同定が大きな鍵となる。しかし、記憶 B 細胞の存在が 50 年以上前に報告されて以来、記憶 B 細胞の表現型や発現分子の情報はほとんど得られていない。その大きな要因として、記憶 B 細胞を区別する細胞表面マーカーの欠如と、その存在頻度の低さ (0.01%以下) が挙げられる。

そこでわれわれのグループでは、五つの異なる表面抗原の組み合わせを利用した新しい戦略を考案し、これによってマウス記憶 B 細胞を高純度で精製することに世界に先駆けて成功した。さらに、精製した記憶 B 細胞を *in vitro* で培養し、抗体産生細胞へと分化誘導する技術開発にも成功している。本受賞講演では、われわれが開発した記憶 B 細胞の純化・精製技術と、抗体産生分化の誘導技術の概略を紹介するとともに、この技術を用いてこれまで明らかにした記憶 B 細胞の機能制御分子について紹介させていただきたい。さらに、発現分子から予想される記憶 B 細胞のユニークな性質について、現在われわれが考えているモデルを紹介する。

1. 記憶 B 細胞の純化・精製技術と抗体産生分化の誘導技術の開発

ある特定の抗原に反応するマウス記憶 B 細胞は、免疫成立時においても、その頻度は脾臓細胞 10,000 個中に 1 個の割合でしか存在しない。さらに、記憶 B 細胞を他の B 細胞と明確に区別する細胞表面マーカーが欠如していることから、記憶 B 細胞を高純度で精製することは長年不可能とされてきた。

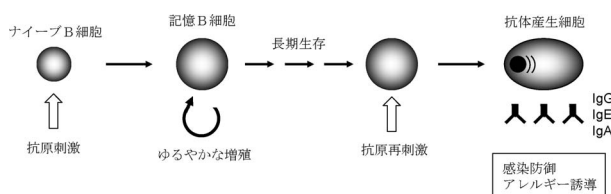


図 1 抗体産生の記憶応答にかかわる B 細胞分化の流れ

そこでわれわれは、モデル抗原として解析の進んでいる NP ハプテンのシステムを利用し、NP ハプテン抗原での免疫に応答した NP 特異的な B 細胞を 8 種類の表面抗原 (NP, IgG1, B220, CD38, CD5, CD11b, CD43, CD90) の発現パターンに基づき、複数の B 細胞サブセットに分画した。その結果、その中の一つの分画 (NP⁺IgG 1^{high} B220⁺ CD38⁺ CD5⁻ CD11b⁻ CD43⁻ CD90⁻) を同系のマウスに移入すると、抗体産生の記憶応答がレシピエントマウスに再構築されることを見いだした。さらに、その抗体遺伝子の塩基配列を調べた結果、記憶 B 細胞のマーカーである体細胞突然変異が蓄積されており、この細胞が記憶 B 細胞であることが証明された。さらに、ギムザ染色により記憶 B 細胞の形態を観察したところ、これまでリンパ球サブセットでは報告のない樹状突起が約 3 分の 1 の細胞に存在していることを明らかにした。これは、樹状細胞と同様に、一部の記憶 B 細胞は強い抗原提示能力を保有する可能性を示唆するものであり、抗原提示細胞としての機能的側面を初めて示す興味深い結果である。

一般的に、B 細胞は T 細胞と異なり *in vitro* での培養が非常に困難とされ、マイトジェンを加えることなく B 細胞を抗原依存的に分化誘導することは不可能とされてきた。われわれは、抗原依存的に記憶 B 細胞が抗体産生細胞へと分化する過程を *in vitro* で再現するため、記憶 B 細胞を IL-2, IL-4, IL-5 という T 細胞由来のサイトカインの存在下で、T 細胞非依存的タイプ II 抗原である NP-Ficoll を使用して刺激したところ、抗体産生細胞への分化誘導を行うことに初めて成功した。そこでこれらの技術を使用し、記憶 B 細胞に発現増強する機能分子の同定を次に試みた。

2. 記憶 B 細胞で発現増強する遺伝子の網羅的解析

最初にわれわれは、高度に純化・精製した記憶 B 細胞を使用して、記憶 B 細胞で発現増強する遺伝子の単離を試みた。方法として、DNA チップとサブトラクション法を使用し、抗原未感作のナイーブ B 細胞と比較して発現の増加する遺伝子をスクリーニングした結果、新規のものを含む 20 個以上の遺伝子を単離した。さらに、他の B 細胞サブセットやリンパ球サブセットでの発現比較を行い、その発現が記憶 B 細胞により限定された遺伝子を選択したところ、アポトーシス制御分子である CD95 や神経細胞の生存促進因子である SMN、抗原レセプターのシグナル調節因子である Ras 活性化因子を見いだすことに成功した。記憶 B 細胞は、他の B 細胞と比較してより長寿命であること、さらに、抗原レセプターからのシグナルに迅速に反応して抗体産生細胞に分化することが知られている。CD95 や SMN といった細胞の生存にかかわる因子は、記憶 B 細胞の長期生存を制御し、Ras 活性化因子は抗原シグナルに対する抗体産生分化の制御に関与している可能性が考えられたため、この点を遺伝子操作マウスを用いて検討した。

3. 記憶 B 細胞の長期生存を制御する分子の同定

CD95 分子の発現が阻害された *lpr* 変異を有するマウスでは、加齢とともに B 細胞の異常な活性化と自己抗体の増加が観察される。われわれは、若齢の *lpr* マウスに NP ハプテン抗原を免疫し、NP 特異的な記憶 B 細胞数の経時的变化ならびにこれを同系のマウスに移入した後の生存期間の変化を調べた。すると、*lpr* 変異を有し CD95 を発現しない記憶 B 細胞の数は、免疫後一定期間をおくと正常マウスの記憶 B 細胞数と比較して 4 倍以上に増加すること、さらに CD95 欠損記憶 B 細胞を同系マウスに移入すると、コントロールの記憶 B 細胞と比較して生存期間が有意に延長されることが判明した。これらの結果から、CD95 分子は記憶 B 細胞生存のネガティブな制御因子であることが明らかとなった。

SMN 欠損マウスは胎生期致死であり、B 細胞応答を解析することはできない。これを回避する目的で、Cre 組換え酵素/*loxP* システムを利用し、IgG1 陽性 B 細胞選択的に SMN を欠損した変異マウスを作製し、記憶 B 細胞数の変化を調べた。すると、NP ハプテン抗原免疫後に記憶 B 細胞数を経時的に測定したところ、記憶 B 細胞数が 10 分の 1 以下に減少することがわかり、SMN は記憶 B 細胞の生存をポジティブに制御する因子である可能性が示唆された。

4. 記憶 B 細胞の抗体産生分化を制御する分子の同定

記憶 B 細胞では複数の Ras 活性化因子が発現増強していることから、Ras 分子を介したシグナル伝達経路が記憶 B 細胞の抗原シグナルの下流に位置し、これが迅速な抗体産生分化にかかわる可能性が示唆される。これを検証するため、Ras 分子の機能を阻害する dominant negative Ras 変異体を B 細胞に過

剰発現したトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを NP ハプテン抗原で免疫したところ、記憶 B 細胞は正常に産生され、またその生存率にも変化は認められなかった。しかし、トランスジェニックマウスから Ras 不全記憶 B 細胞を精製し、*in vitro* 培養系にて抗体産生細胞へと分化誘導したところ、正常記憶 B 細胞と比較し、抗体産生分化能が約 50 分の 1 まで著しく低下していることが明らかとなった。この結果から、抗原シグナルの下流に位置する Ras シグナル経路は、記憶 B 細胞の抗体産生分化に必須であることが判明した。

5. 発現分子からみた記憶 B 細胞のユニークな特徴

記憶 B 細胞は、幹細胞のように緩やかに複製をしながら長期間生体内に維持され、抗原刺激を受け取ると速やかに抗体産生細胞へと最終分化する。このユニークな細胞学的性質の基盤となる分子機構は不明であったが、他の B 細胞サブセットには存在しない分子メカニズムを使用しているのではないかと長年推察されてきた。実際、われわれが記憶 B 細胞の生存を制御する分子として同定した SMN は、脊髄モーターニューロンの生存維持に必須と考えられ、リンパ球の生存に機能することは全く予想されていなかった分子である。また SMN 以外にも、リンパ球系での機能が全く報告されていない分子が記憶 B 細胞で発現増強することを見いだしており、記憶 B 細胞はそのユニークな特徴を維持するために、神経細胞など他の細胞で使用されている分子システムを取り入れた可能性が示唆される。今後、記憶 B 細胞の長期生存と抗体産生分化にかかわる制御分子の単離を進めることで、抗体産生の新たな制御技術の開発に有用な分子ターゲットの同定を目指していきたい。