

胚中心における新規な B 細胞選択機構の解明

足田 正喜
(岡山大学・工学部)

1. 研究のねらい

生体は、体内に侵入してきた無数の外来抗原に対応するために、様々な結合特異性を持つ抗体を産生する B 細胞を生成している。古典的には、個々の B 細胞が持つ抗原結合性は、体細胞突然変異による親和性上昇を除き、いったん骨髄中で決められてしまうと、末梢のリンパ組織中で変化することはないと考えられてきた。しかし、近年、抗体可変部を構成する遺伝子断片の組換えを行う recombination activating gene (RAG) -1、2 の遺伝子産物の発現が、末梢のリンパ組織中でも認められた。このことから、抗体可変部遺伝子の再々構成とも考えられる、receptor revision と呼ばれる現象の存在が示唆されている。本研究においては、receptor revision により、抗体可変部の構造が変化する B 細胞分化過程があることを示し、その現象にどのような生理的な意義があるのかを明らかにすることを目標として、以下のような検討を行った。

2. 研究結果及び自己評価

(1) Quasi-monoclonal マウスを利用した抗体産生応答の解析

野生型のマウスにおいては、B 細胞が様々な抗原特異性を有しており、ある一つの B 細胞に注目した場合、その細胞の抗原特異性が、骨髄中で獲得した抗原特異性が変化したものかどうかを明らかにすることは極めて困難である。そこで、本研究では、均一な抗原特異性の細胞集団を有する quasi-monoclonal (QM) マウスを使用して、抗原特異性の变化を調べることにした。

このマウスでは、4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP) ハプテンに対して結合性を有することが知られている VDJ 再構成後の抗体可変部遺伝子 (VHT) を、野生型マウスの抗体重鎖可変部遺伝子をコードしている染色体領域に組み込んである。そのため、80% 以上の B 細胞が VHT を重鎖の抗原結合部位に使用しており、比較的、均一な集団を形成している。

さらに、交配によりこのマウスと野生型マウスの F1 を作製し (QBF1 マウス) 種々の検討を行ったところ、QM マウスと同様、大多数の B 細胞が重鎖の抗原結合部位に VHT を使用していた。一方、軽鎖については、大部分の細胞が鎖を使用していた。そのため、QBF1 マウスにおいては、VHT 陽性鎖陽性細胞が主な B 細胞集団を形成していることが明らかとなった。

このような QBF1 マウスに、VHT に対して比較的低い親和性しか持たない pNP-nitrophenylacetyl (pNP) ハプテンを結合したニワトリ IgG (CGG) を免疫したところ、VHT を保持していない少数の細胞集団が抗原刺激に反応して、IgG 抗体産生細胞に分化することが明らかとなった。また、pNP-CGG 免疫後に流入リンパ節細胞の解析およびそれらの細胞から作製したハイブリドーマの解析を行った結果、以下のようなことが明らかとなった。1) 流入リンパ節中で RAG の発現が認められる。2) まったく同じ重鎖遺伝子を持つハイブリドーマであっても、鎖陽性ハイブリドーマは pNP に対して低親和性であり、鎖陽性ハイブリドーマは高親和性である。3) 免疫後の親和性成熟に伴って、血中抗体価に占める鎖陽性の抗 pNP 抗体の割合が減り、鎖陽性抗体の割合が上昇する。4) 流入リンパ節中で、鎖の V-J 領域における新規の組換えに伴って切り出される遺伝子断片が検出され、鎖可変部における切断点の存在も PCR 法によって明らかとなった。

これらの結果は、免疫に伴ってリンパ節中で RAG が発現し、鎖において新たな V-J 組換えが行われた結果、低親和性の鎖陽性細胞が高親和性の鎖陽性細胞に変化し、pNP に対して高親和性の抗体を産生ようになったことを強く示唆している。

(2) RAG の発現抑制が抗体の親和性成熟に及ぼす影響に関する解析

QBF1 マウスに抗原投与と同時に抗 IL7 レセプター抗体を投与し、末梢リンパ組織での RAG の産生を抑制すると、リンパ節中での鎖の新規な組換えが抑制されていた。そこで、流入リンパ節細胞からハイブリドーマを作製し、抗体軽鎖の定常部を調べたところ鎖陽性細胞の生成が著しく抑制されており、鎖陽性細胞が主要な応答集団を形成していた。さらに、血中抗体の pNP に対する親和性を経時的に測定したところ、抗 IL7 抗体未投与のマウスで観察された pNP に対する抗体の親和性成熟が強く抑制されていることが明らかとなった。

同様の現象が、鎖陽性 B 細胞を移入したリンパ球欠損マウスでも観察されたことから、骨髄にお

けるB細胞新生とは独立の機構で、流入リンパ節において抗原刺激に依存した鎖から鎖への組換えが起きていると考えられる。さらに、このような末梢リンパ組織中での抗体可変部の再組換えが、抗原に対する親和性成熟に重要な役割を果たしている場合があることが明らかとなった。

(3) V(D)J 組換え細胞の可視化方法の確立

従来の分子生物学的な手法では、どの細胞がRAGを発現し組換えを行ったのかを、QBF1マウスなどの特殊な実験材料を使用しない限り、簡単には検出・単離できない。そこで、新たに、V(D)J組換えが起こった細胞を、選択的に蛍光で標識する方法の開発を試みた。

レトロウイルスベクター中に、赤色蛍光タンパクであるDsREDの遺伝子をプロモーターに対して正方向に配置し、緑色蛍光タンパクGFPの遺伝子を逆方向に配置した。さらに、これらの遺伝子の両側にRAGの組換え認識配列を挿入し、RAGによる組換えが行われた場合にはDsREDとEGFPの遺伝子の方向が逆転するようにベクターを設計した。このレトロウイルスベクターを胸腺薄片に感染させたところ、皮下直下のV(D)J組換えを行っている細胞集団で緑色蛍光を観察することができた。そこで、免疫したマウスの脾臓薄片にも感染させたところ、免疫に伴って形成された胚中心でも、胸腺と同様に緑色の蛍光が観察された。このことは、少なくとも末梢リンパ組織中で、V(D)J組換えを行った細胞が胚中心に存在しており、抗原に対する免疫応答に参加していることを示している。

自己評価

本研究の当初計画において、B細胞の抗原結合性の変化に関するin vivoの検討は、比較的単純な遺伝子組換え反応にのみ制御されていると予想していた。しかし、抗体遺伝子を組み込んだマウスを用いた検討の結果、実際の免疫応答では、B細胞の抗原特異性は、何種類かの免疫反応に複合的に制御されており、従来の学説では説明できない複雑な調節を受けている点を明らかに出来た点を評価できる。

3. 領域総括の見解

通説では、個々のB細胞が示す抗原結合性は一旦骨髄中で決定されると、末梢リンパ組織では変化しないとされている。しかし、末梢リンパ組織中でも遺伝子組換え機能が認められ、抗体可変部遺伝子の再々構成が示唆されていた。本研究者はこの疑問に対し、特殊なマウスあるいは組換え検出ベクターを使用した実験で、いずれも抗体可変部遺伝子の再々構成を支持する結果を得、免疫遺伝子の再々構成が行なわれることがより確実となった。その組換え機構が明らかになれば、自己免疫の予防が可能となるであろう。

4. 主な論文

1. Kanayana, N., Fukue, C., Magari, M., Ohtani, K., Hikida, M., Yamada, M., Matsuda, S., and Ohmori, H. (2001). Use of secondarily revised VH genes in IgE antibodies produced in mice infected with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunol. Lett.* 3, 181-186.