

39. 抗体の機能的差異を生み出す分子機構の解析

菅井 学

福井大学 医学部 分子遺伝学

Key words : ミトコンドリア, クラススイッチ組換え, 形質細胞分化, アフィニティー成熟

緒 言

活性化した B 細胞がクラススイッチ組換えを経ずに形質細胞に分化すると IgM クラスの抗体を分泌する。また、活性化した B 細胞がクラススイッチしてから形質細胞に分化した場合には、クラススイッチしたクラスの抗体 (IgG、IgE、IgA など) を分泌する。このように分泌される抗体の質の多様性は、活性化 B 細胞の分化経路を変化させることによって形成されることが知られている。この抗体の質の変化に関わる活性化 B 細胞で起こる二つのイベント「クラススイッチ組換え」と「形質細胞への分化」は相互排他的な過程であり、それぞれに必要な転写因子の多くは既に同定されているにも関わらず、分化の方向を決定する初期過程に関する知見はほとんど無い。一般に細胞の分化は instructive な (方向付け) シグナルと細胞内の確率的な現象によって決定されることが知られているが、多くの場合このシグナルの実態は明らかになっていない。活性化 B 細胞の分化においても同様な機構の存在が示されている^{1,2)}が、『形質細胞に分化するのか? クラススイッチ組換えを誘導するのか?』を決定している確率的变化や方向付けシグナルの実態は、今のところ明らかにはなっていない。

私たちは、活性化 B 細胞に起こる様々な変化を調べた結果、活性化 B 細胞はミトコンドリアの機能的相違によって、クラススイッチしやすい細胞集団と、形質細胞に分化しやすい細胞集団に事前に区別できることを見出した³⁾。すなわち、ミトコンドリア活性の高い細胞ではクラススイッチ組換えが誘導され、低い細胞では形質細胞への分化が誘導されることが明らかになった。このミトコンドリア機能の変化は、ミトコンドリアで発生する活性酸素量の違いを生み、発生した活性酸素はミトコンドリアでのヘム合成を抑制することも見出した。この時、活性化 B 細胞で合成されたヘムは、クラススイッチに必要な転写因子 Bach2 の機能を抑制することによって、形質細胞への分化を促進することも明らかになった。しかしヘムだけでは、これらの一連の実験で観察されたすべての現象を説明することは難しく、ミトコンドリア活性に依存して変化する因子の中に、活性化 B 細胞の分化を制御する未知の重要な因子が存在する可能性が想定された。

そこで私たちは、この細胞集団をさらに詳細に調べることによって、活性化 B 細胞の分化決定プログラムの初期過程を明らかにすることを目指した。In vitro にて、クラススイッチ (形質細胞分化) 誘導した脾臓 B 細胞から、ミトコンドリア機能の違い (ミトコンドリア量・ミトコンドリア膜電位とも高い細胞集団 P1 と、ミトコンドリア量・ミトコンドリア膜電位とも低い細胞集団 P2) によって分取した細胞を用いて、RNA 発現量、タンパク発現量などを調べることによって、「クラススイッチ組換え」と、「形質細胞」への分化を決定する初期因子の同定を試みた。

方法、結果および考察

活性化 B 細胞分化過程

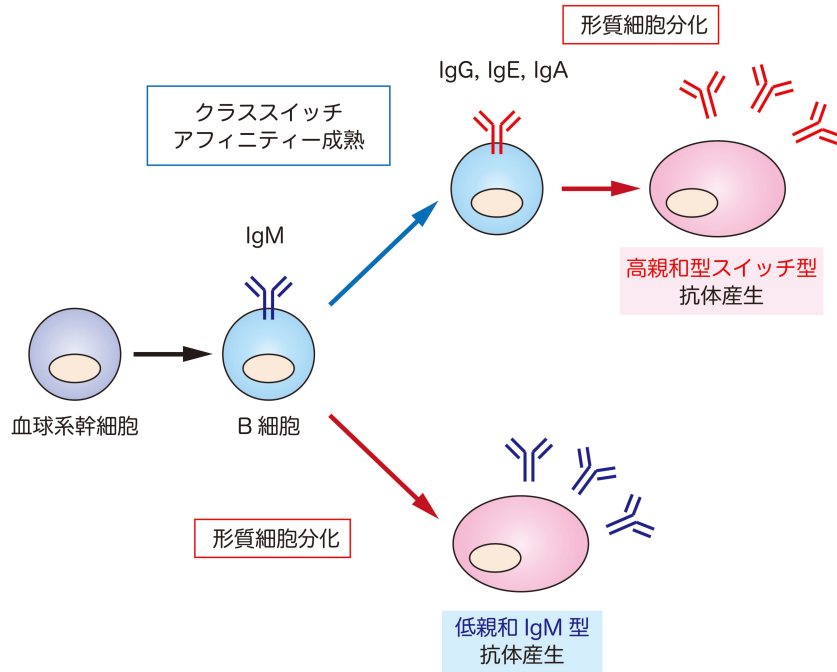


図 1. 活性化 B 細胞分化過程の模式図

活性化した B 細胞は、クラススイッチ組換えやアフィニティー成熟に向かう細胞と、形質細胞に分化する細胞とに分類される。どちらの運命をたどるかによって、最終的に作られる抗体の質が変化する。

CD43-細胞を MACS にて精製した脾臓ナイーブ B 細胞を、*in vitro* にて Lipopolysaccharide (LPS) と Interleukin-4 (IL-4) 刺激にて (クラススイッチ組換えと形質細胞への分化) 誘導を行う。誘導二日目の細胞を用いてクラススイッチしやすい細胞集団 (P1) と形質細胞に分化しやすい細胞集団 (P2) をセルソーターで分離した。それぞれの細胞で発現している RNA を DNA アレイで調べ、それぞれの細胞で発現しているタンパク質を iTRAQ 法を用いたショットガン解析で調べた (図 2)。DNA アレイで得られたデータの M-A plot を図 3 に示す。

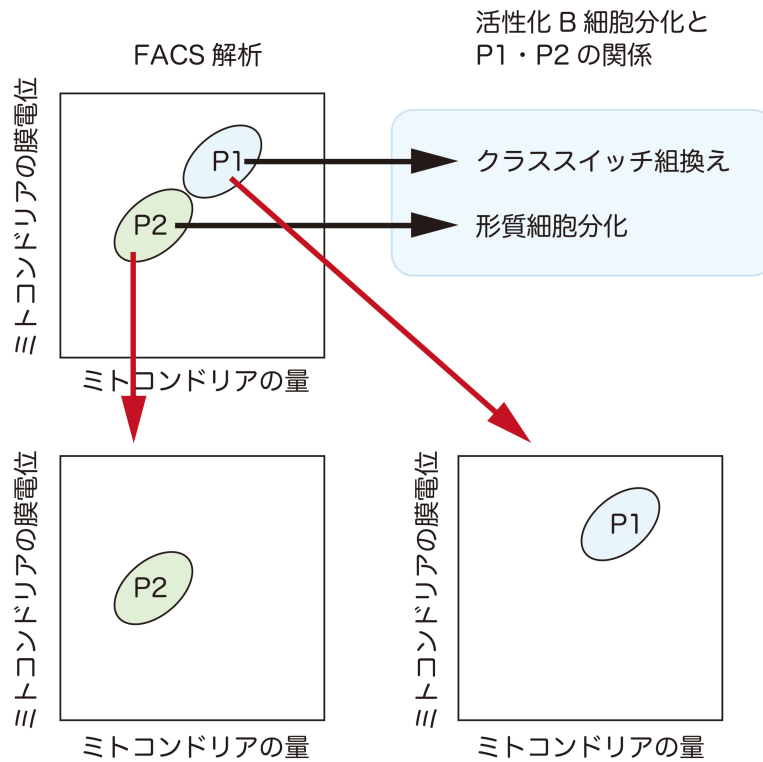


図 2. 活性化 B 細胞のミトコンドリア状態の FACS 解析

In vitro で活性化した B 細胞を、ミトコンドリア量、ミトコンドリア膜電位をモニターできる蛍光色素で染色し FACS 解析した。ミトコンドリア状態の違いによって大きく二つの細胞集団に分けられ、それぞれの分布する領域ごとに P1、P2 と名付けた。解析の結果 P1 はクラススイッチしやすい細胞集団であり、P2 は形質細胞に分化しやすい細胞集団であった。これらの二つの細胞集団の機能的な違いを生み出す背景となる遺伝子発現の違いを検索する目的にて、それぞれの細胞集団をソートし、RNA とタンパク質の発現を調べた。

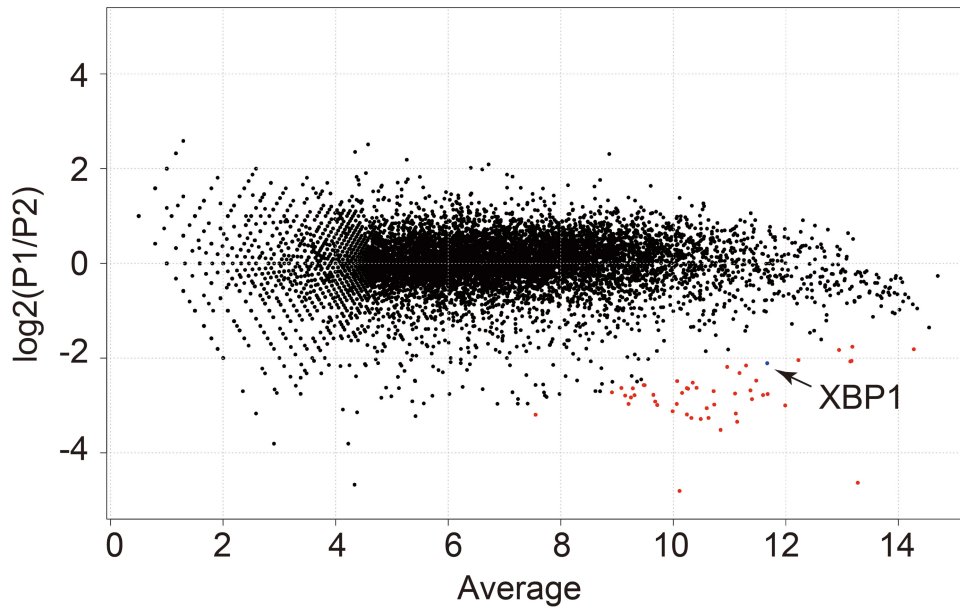


図3. P1 対 P2 の M-A plot

P1 と P2 のアレイデータから発現変動の大きい遺伝子の上位 50 位を赤で表示した。
このうち形質細胞分化に重要な転写因子 Xbp1 は青で表示した。

表1. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) による上位 20 位までの解析結果

Rank	Pathway enriched in P1	Rank	Pathway enriched in P2
1	RNA degradation	1	Protein export
2	Spliceosome	2	Ribosome
3	Homologous recombination	3	Aldosterone regulated sodium reabsorption
4	Cysteine and Metionine metabolism	4	Regulation of autophagy
5	One carbon pool by polate	5	Lybosome
6	Butanoate metabolism	6	N glycan biosynthesis
7	ABCTransporters	7	Methabolism of xenobiotics by cytochrome P450
8	Citrate cycle TCA cycle	8	Autoimmune thyroid disease
9	Viral myocarditis	9	Intestinal immune network for IgA production
10	Pentose phosphate pathway	10	T cell receptor signaling pathway
11	Aminoacyl tRNA biosynthesis	11	Snare interactions in vesicular transport
12	Glycolysis gluconeogenesis	12	Leukocyte transendothelial migration
13	DNA replication	13	Cell adhesion molecules cams
14	Galactose metabolism	14	Natural killer cell mediated cytotoxicity
15	Mismatch repair	15	Vibrio cholerae infection
16	NOD like receptor signaling pathway	16	Drug metabolism cytochrome P450
17	RNA polymerase	17	Leishmania infection
18	Lysine degradation	18	Glycosaminoglycan degradation
19	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	19	Drug metabolism other enxymes
20	Nucleotide excision repair	20	Antigen processing and presentation

P1 と P2 のアレイデータを用いて GSEA を行った。

左に P1 で発現の高い遺伝子群、右に P2 で発現の高い遺伝子群を示す。

さらに Gene sets enrichment 解析により、最も発現に差のある遺伝子セットを調べた。ミトコンドリア活性の高い細胞（クラススイッチしやすい細胞）では、信頼性の高い順に①RNA 分解、②スプライソソーム、③相同組換え に関する遺伝子の発現が高いことが明らかになった。ミトコンドリア活性の低い細胞（形質細胞に分化しやすい細胞）では、信頼性の高い順に①タンパク輸送、②リボソーム、③ナトリウム再吸収、に関する遺伝子の発現が高いことが明らかになった。これに続く遺伝子セットとしては④オートファジー制御、⑤リソソーム なども上がってきている。④⑤は既に形質細胞分化との関連が報告されている。しかし、これらの発現解析データとタンパク質の発現解析データでは、結果の一致しない因子も多く、もう少しサンプル数を増やすことによって、データの信頼性を高める必要がある。

上記解析に加え、もう少し個々の遺伝子の発現変化を詳細に調べることによって、ミトコンドリア活性と相関の高い遺伝子を見出す作業を行う必要がある。ミトコンドリア活性に依存して変化する真の細胞分化制御因子を同定するためには、上記遺伝子発現の解析に加えて、同様の細胞（ミトコンドリア活性の高い細胞 P1 と、低い細胞 P2）を用いたメタボローム解析を行うことも必要である。遺伝子発現データとメタボローム解析で得られたデータを合わせて総合的に判断することによって初めて、ミトコンドリア活性に依存して変化する細胞分化を制御する候補因子を絞り込むことが可能になる。このように、今後今回得られたデータを発展させて活性化 B 細胞分化過程の理解を深めたい^{3,4)}。

最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Ochiai K, Maienschein-Cline M, Simonetti G, Chen J, Rosenthal R, Brink R, Chong AS, Klein U, Dinner AR, Singh H, Sciammas R. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity*. 2013 May 23;38(5):918-29. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.009. Epub 2013 May 16. PubMed PMID: 23684984; PubMed Central PMCID: PMC3690549.
- 2) Duffy KR, Wellard CJ, Markham JF, Zhou JH, Holmberg R, Hawkins ED, Hasbold J, Dowling MR, Hodgkin PD. Activation-induced B cell fates are selected by intracellular stochastic competition. *Science*. 2012 Jan 20;335(6066):338-41. doi: 10.1126/science.1213230. Epub 2012 Jan 5. PubMed PMID: 22223740.
- 3) Jang KJ, Mano H, Aoki K, Hayashi T, Muto A, Nambu Y, Takahashi K, Itoh K, Taketani S, Nutt SL, Igarashi K, Shimizu A, Sugai M. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. *Nat Commun*. 2015 Apr 10;6:6750. doi: 10.1038/ncomms7750. PubMed PMID: 25857523; PubMed Central PMCID: PMC4403446.
- 4) Keating R, Hertz T, Wehenkel M, Harris TL, Edwards BA, McClaren JL, Brown SA, Surman S, Wilson ZS, Bradley P, Hurwitz J, Chi H, Doherty PC, Thomas PG, McGargill MA. The kinase mTOR modulates the antibody response to provide cross-protective immunity to lethal infection with influenza virus. *Nat Immunol*. 2013 Dec;14(12):1266-76. doi: 10.1038/ni.2741. Epub 2013 Oct 20. PubMed PMID:24141387; PubMed Central PMCID: PMC3883080.