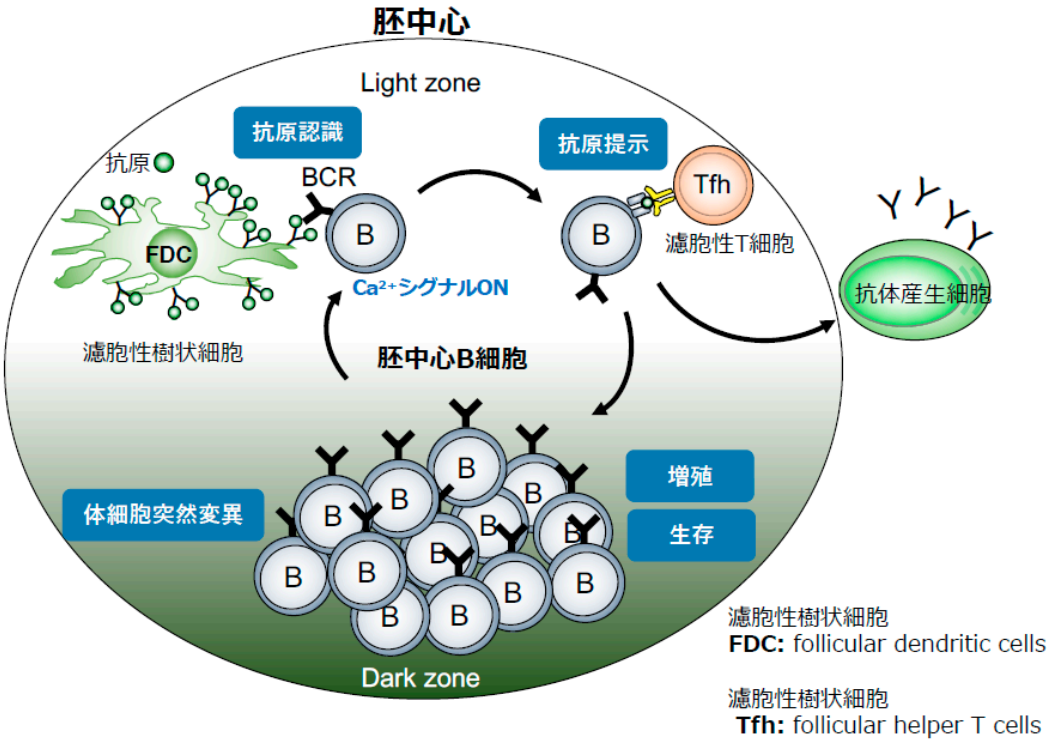
60　胚中心B細胞の活性化・維持の分子基盤	馬場　義裕

【目的】我々は常に細菌やウイルスなどの病原体の脅威に晒されているが、B 細胞が分泌する抗体により、多くの感染症から身を守られている。よって、どのようにして品質の良い抗体が産生されるのかという問いは感染防御の観点からみて極めて重要である。この課題にアドレスするためには、抗原に対して親和性の高い B 細胞レセプター（BCR）を発現する胚中心 B 細胞の活性化・維持のメカニズムの解明が必要不可欠である。しかし、濾胞性樹状細胞上での B 細胞の抗原認識がどういう役割を果たしているのかは未解決課題として残されている。抗原認識した B 細胞の主要な反応として細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が知られているが、胚中心 B 細胞におけるカルシウムシグナルの重要性は未だ不明である。そこで、本研究ではカルシウムシグナルを基軸に「高親和性 BCR を発現する胚中心 B 細胞の抗原認識の重要性」を解明し、胚中心 B 細胞の活性化・維持の仕組みを理解することを目的とした。

【方法】小胞体カルシウムセンサーSTIM1／STIM2 が BCR 依存的なカルシウム流入に必須であることを報告していることから、胚中心 B 細胞特異的な *STIM1／STIM2* 欠損マウスや NP 反応性 B 細胞のみをもつノックインマウスを利用し、NP-CGG 免疫で誘導される胚中心 B 細胞の産生を検討した。また、高親和性 BCR による細胞内カルシウム上昇はカルシウム指示薬 Indo1 を用いて検出した。

【結果】*STIM1／2* 欠損 B 細胞では胚中心 B 細胞が著減することが判明した。さらに、BCR の親和性とカルシウムシグナル強度に相関がみられ、高親和性 BCR 誘導カルシウム動員には STIM1／STIM2 が重要であることが確認された。さらに、競合移入実験により、*STIM1／STIM2* が欠損すると高親和性 BCR を有する胚中心 B 細胞の産生に障害ができることが明らかになった。

胚中心 B 細胞における BCR 依存的カルシウムシグナルの役割は？



60. 胚中心 B 細胞の活性化・維持の分子基盤

馬場　義裕

九州大学 生体防御医学研究所 分子機能制御学部門 免疫ゲノム生物学分野

Key words：B 細胞，胚中心，STIM，親和性成熟，カルシウム

緒　言

我々は常に細菌やウイルスなどの病原体の脅威に晒されているが、B 細胞が分泌する抗体により、多くの感染症から身を守られている。よって、どのようにして品質の良い抗体が産生されるのかという問いは感染防御の観点からみて極めて重要である。この課題にアドレスするためには、抗原に対して親和性の高い B 細胞レセプター（BCR）を発現する B 細胞の活性化・維持のメカニズムの解明が必要不可欠である。リンパ組織の胚中心では、B 細胞が抗原刺激を受けて活性化し、抗体の親和性を高めていくことから、胚中心の形成は抗体が効率良く病原体を排除するために必須のプロセスである。胚中心 B 細胞が活性化されるには、まず、BCR を介して濾胞性樹状細胞上に存在する抗原を認識し、BCR シグナルを受ける必要がある。その後、B 細胞は濾胞性 T 細胞に抗原提示することにより、その濾胞性 T 細胞から生存シグナルを受けて維持、増殖し、さらに、BCR の体細胞突然変異により親和性を高めるチャンスを得る。そして、また、濾胞性樹状細胞上の抗原を認識できた B 細胞が活性化される［1〜3］。この過程において、T 細胞に対する抗原提示が高親和性 B 細胞の選択に重要であることが示唆されているが、一方、濾胞性樹状細胞上での B 細胞の抗原認識がどういう役割を果たしているのかは未解決課題として残されている。抗原認識した B 細胞の主要な反応として細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が知られているが［4］、胚中心 B 細胞におけるカルシウムシグナルの重要性は未だ不明である。そこで、本研究ではカルシウムシグナルを基軸に「高親和性 BCR を発現する胚中心 B 細胞の抗原認識の重要性」を解明し、胚中心 B 細胞の活性化・維持の仕組みを理解することを目的とした。小胞体カルシウムセンサーSTIM1／2 が BCR 依存的なカルシウム流入に必須であることを報告していることから［5, 6］、*STIM1／2* 欠損による胚中心 B 細胞分化維持への影響を検討したところ、STIM1／2 が胚中心 B 細胞形成に重要な役割があることが明らかになった。

方　法

1.　胚中心 B 細胞特異的 *STIM1／STIM2* 欠損マウスと混合骨髄キメラの作製および免疫

胚中心 B 細胞特異的 *STIM1／STIM2* 欠損マウス（Stim1$^{f/f}$Stim2$^{f/f}$Aicd$^{Cre/+}$）を作製した。混合骨髄キメラの作製 B 細胞欠損マウス μMT を 800 cGy の X 線照射（致死量）を行い、翌日、CD45.1^{+}*Aicd*$^{Cre/+}$骨髄細胞と CD45.2^{+}*Stim1*$^{f/f}$*Stim2*$^{f/f}$*Aicd*$^{Cre/+}$骨髄細胞を等量（1：1）で混合したものを静脈血投与した。キメラマウスは骨髄再構築後、8 週間以降に実験に用いた。胚中心を形成させるために、NP-CGG in alum を腹腔内投与し、免疫後 Day7、14、28 で脾臓を回収し、胚中心 B 細胞をフローサイトメーターで解析した。

2.　NP 反応性 B 細胞のカルシウム測定

B1-8hi、germline、B1-8low マウス、および、B1-8hi *Stim1*$^{f/f}$*Stim2*$^{f/f}$*Mb1*$^{Cre/+}$から脾臓細胞を回収し、カルシウム指示薬 Indo-1AM でラベルした。NP-Ficol で刺激前後の細胞内カルシウム上昇はフローサイトメトリーを用いて検出した。B 細胞は抗 B220 抗体で gate した。

3. NP 特異的高親和性 BCR 陽性 B 細胞の競合移入実験

CD45.2 B1-8hi *Stim1*$^{f/f}$*Stim2*$^{f/f}$*Mb1*$^{Cre/+}$と CD45.1 *Mb1*$^{Cre/+}$マウス由来脾臓 B 細胞を単離し、1：1 の割合で混合したものを、CD45.2／ CD45.1 レシピエントマウスに静脈血投与した。移入 24 時間後、NP-CGG in alum で免疫し、Day7、14 で脾臓の胚中心 B 細胞をフローサイトメーターで解析した。

結果および考察

1. 胚中心 B 細胞における STIM1／STIM2 の役割

致死量の X 線を照射した B 細胞欠損マウスに、胚中心 B 細胞特異的 *STIM1／STIM2* 欠損マウス（Stim$^{f/f}$Stim2$^{f/f}$Aicd$^{Cre/+}$）およびコントロールマウス（Aicd$^{Cre/+}$）から単離した骨髄細胞を 1：1 で移入し、骨髄混合キメラマウスを作製した後、NP-CGG in alum で免疫した際に誘導される胚中心 B 細胞を検討した。その結果、B 細胞の全体数に変化がないものの、胚中心 B 細胞の数は STIM1／STIM2 の欠失により著減することが判明した（図 1A）。抗原特異的（NP 反応性）胚中心 B 細胞および IgG1 陽性 B 細胞においても、STIM1／STIM2 の重要性が確認された（図 1B）。

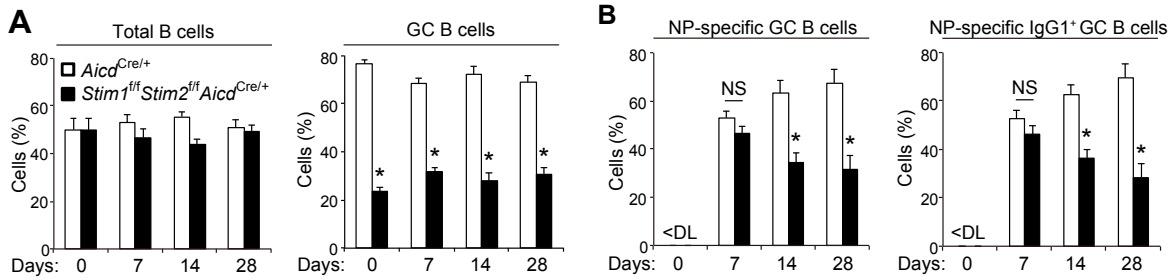


図 1. 胚中心 B 細胞形成における STIM1／STIM2 の役割

A) Aicd$^{Cre/+}$と Stim1$^{f/f}$Stim2$^{f/f}$Aicd$^{Cre/+}$の骨髄混合キメラマウスにおける脾臓 B 細胞および胚中心 B 細胞の割合

B) A）における脾臓 NP 特異的胚中心 B 細胞および IgG1 陽性胚中心 B 細胞の割合

Days は NP-CGG で免疫してからの日数。

NS：not significant、*：$P < 0.05$ versus Aicd$^{Cre/+}$cells（Student's t-test）

2. 親和性の違いによる BCR 依存的カルシウム動員

胚中心 B 細胞の BCR 親和性の違いによりカルシウムシグナルの要求性が異なるのかどうかを検証した。NP に結合する BCR を発現するノックインマウスである B1-8 B 細胞を用いた。B1-8 は親和性の高い BCR をもつ B1-8hi、と生理的な germline、そして、低親和性の B1-8lo の B 細胞を単離し、NP-Ficol による BCR 刺激を行い、細胞内カルシウム上昇を測定した（図 2A、B）。B1-8hi が最も強くカルシウム応答をしたことから、BCR の親和性の強さとカルシウム流入の度合いが相関することが示唆された。さらに、高親和性の B1-8hi BCR を抗原した際にみられるカルシウムシグナルは *STIM1／2* 欠損 B 細胞で減弱することも判明した（図 3A、B）。

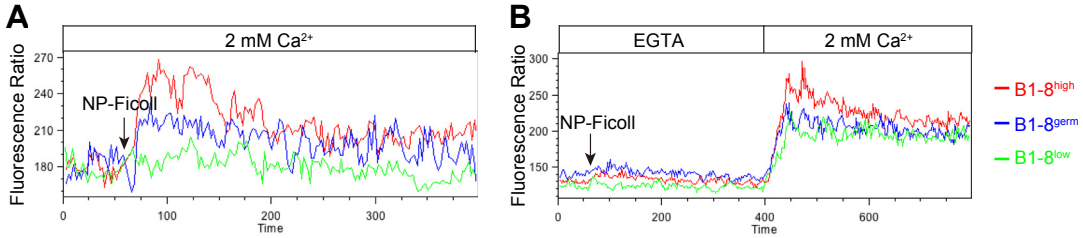


図 2. BCR の親和性の違いによるカルシウム応答

A) 2mM Ca^{2+}存在下における B1-8hi、germline、low B 細胞のカルシウム上昇

B) B1-8hi、germline、low B 細胞のストア作動性カルシウム流入

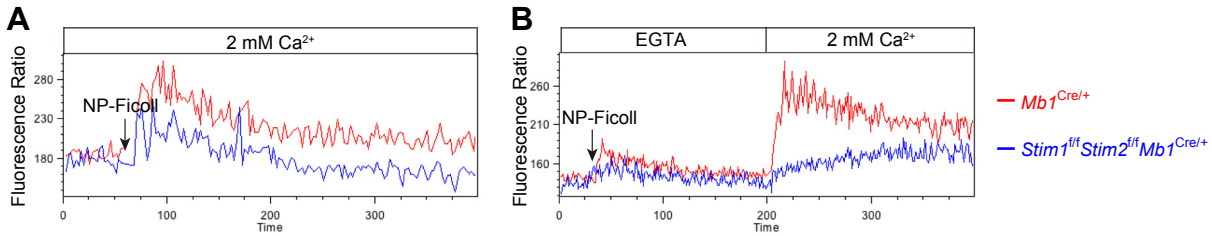


図 3. 高親和性 BCR カルシウム動員における STIM1／STIM2 の重要性

A) B1-8hi *Stim1*$^{f/f}$ *Stim2*$^{f/f}$ *Mb1*$^{Cre/+}$および B1-8hi *Mb1*$^{Cre/+}$マウス由来 B 細胞の NP-Ficol 刺激後の細胞内カルシウム上昇

B) B1-8hi *Stim1*$^{f/f}$ *Stim2*$^{f/f}$ *Mb1*$^{Cre/+}$および B1-8hi *Mb1*$^{Cre/+}$マウス由来 B 細胞の NP-Ficol 刺激後のストア作動性カルシウム流入

3. 高親和性 BCR を有する胚中心 B 細胞産生におけるカルシウム流入の役割

BCR 親和性が高い胚中心 B 細胞の産生や維持にカルシウムシグナルが関与するのかを検証するために、CD45.2 B1-8hi *Stim1*$^{f/f}$ *Stim2*$^{f/f}$ *Mb1*$^{Cre/+}$と CD45.1 *Mb1*$^{Cre/+}$マウス由来脾臓 B 細胞を単離し、1：1 の割合で混合したものを、CD45.2/ CD45.1 レシピエントマウスに移入し、NP-CGG in alum 免疫で誘導される胚中心 B 細胞を解析した。図 4 のように、*STIM1／STIM2* 欠損 B 細胞では高親和性 BCR 陽性胚中心 B 細胞が減少することが判明した。カルシウムシグナルが胚中心 B 細胞の産生または維持、生存に寄与することが示唆される。今後、この分子機序を明らかにすることが、高親和性抗体が作り出される仕組みの謎を解く、鍵となると期待される。

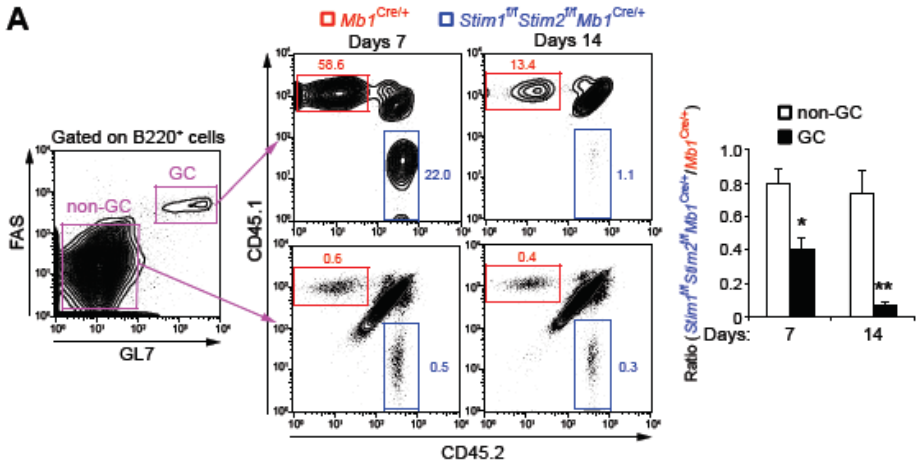


図 4. 高親和性 BCR 陽性胚中心 B 細胞における STIM1／STIM2 の重要性

CD45.2B1-8hi *Stim1*$^{f/f}$ *Stim2*$^{f/f}$ *Mb1*$^{Cre/+}$および CD45.1 B1-8hi *Mb1*$^{Cre/+}$マウス由来 B 細胞の競合解析。NP-Ficol 刺激後の胚中心 B 細胞の数を示した。

*：$P < 0.05$、**：$P < 0.001$ versus non-GC B cells（Student's t-test）

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は大阪大学免疫学フロンティア研究センター免疫応答ダイナミクス研究室の鈴木一博教授である。

文 献

1) De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. Nat Rev Immunol. 2015 Mar;15(3):137-48. Epub 2015 Feb 6. Review. PMID: 25656706; DOI: 10.1038/nri3804.

2) Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. Nat Rev Immunol. 2009 Dec;9(12):845-57. PMID: 19935804. DOI: 10.1038/nri2637.

3) Vinuesa CG, Linterman MA, Goodnow CC, Randall KL. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. Immunol Rev. 2010 Sep;237(1):72-89. PMID: 20727030. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00937.x.

4) Baba Y, Kurosaki T. Impact of Ca2+ signaling on B cell function. Trends Immunol. 2011 Dec;32(12):589-94. Epub 2011 Oct 13. PMID: 22000665. DOI: 10.1016/j.it.2011.09.004.

5) Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, Watarai H, Wakamori M, Numaga T, Mori Y, Iino M, Hikida M, Kurosaki T. Coupling of STIM1 to store-operated Ca2+ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 7;103(45):16704-9. Epub 2006 Oct 30. PMID: 17075073. DOI: org/10.1073/pnas.0608358103.

6) Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. Immunity. 2011 May 27;34(5):703-14. Epub 2011 Apr 28. PMID: 21530328. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.03.016.