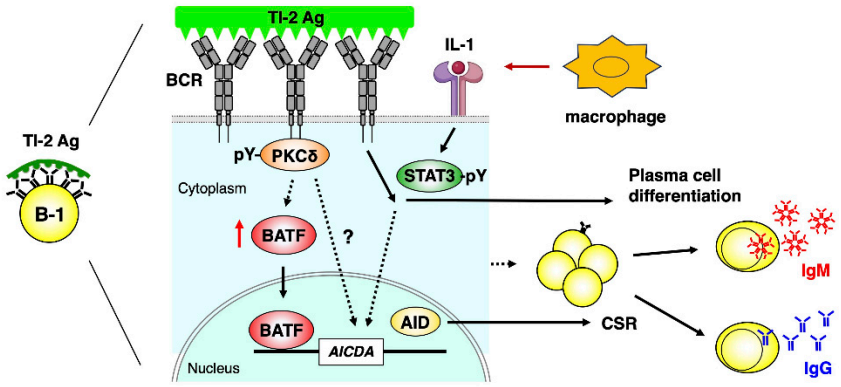
23　T細胞非依存性2型応答におけるB細胞のIgG産生誘導機構	北村　大介

【目的】肺炎球菌やサルモネラ菌に対する液性免疫応答は主にT細胞非依存性2型（TI-2）応答であり、その感染防御に重要である。TI-2応答は莢膜多糖体のような多価抗原によるB細胞受容体（BCR）の高度な架橋により引き起こされるとされていたが、私たちが確立した*in vitro*のTI-2応答系により、TI-2抗原に加えてIL-1の共刺激が抗体産生に必要であることを見出した。また、TI-2応答において抗原刺激によりリン酸化されるPKCδがBATFを介してAIDの発現、クラススイッチ組換え（CSR）、IgG産生を誘導することを明らかにした。しかし、AIDの十分な発現にはBATF以外の因子が関与することも分かった。AIDの発現およびCSRの誘導にはIL-1の共刺激が必要であったため、この共刺激シグナルの作用機序の解明を目的として研究を行った。

【方法】TI-2応答においてB細胞上のIL-1受容体やSTAT3が必要かどうかを検証するために、IL-1RAcP欠損マウスおよびB細胞特異的STAT3欠損マウス（$CD19^{Cre/+}STAT3^{f/f}$）の解析を行った。また、それらの腹腔B細胞あるいは脾臓辺縁帯B細胞を、卵白アルブミン特異的BCRのみ有するHy10マウスあるいはB細胞を欠損するμMTマウスに移入した後、NP-Ficollを腹腔あるいは静脈より免疫し、その後、経時的に採血してNP特異的IgMおよびIgGをELISA法により測定した。*In vitro*の実験系では、主にNP特異的BCRのみを発現する*B1-8-ki Igk* $^{-/-}$マウスの脾臓または腹腔のB細胞を用い、NP-Ficoll単独あるいはNP-Ficollに腹腔マクロファージやIL-1αを追加して培養した後、シグナル伝達分子についてはウェスタンブロット法により解析し、抗体産生については上清中のIgM・IgGをELISAで測定し、B細胞の増殖・分化については予めCell Trace Violetで染色しておいたB細胞を培養後に各種抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。腹腔内あるいは培養後のマクロファージにおけるIL-1の産生についてはフローサイトメトリーにより調べた。

【結果】IL-1Rを構成するIL-1RAcPを欠損するマウスの腹腔B細胞を移入したマウスにNP-Ficollを腹腔免疫した結果、NP特異的IgMおよびIgGが産生されなかった。また、IL-1RAcP欠損辺縁帯B細胞を移入したマウスにNP-Ficollを経静脈的に免疫した場合はIgG産生のみ有意に低下した。以上より、B-1細胞あるいは辺縁帯B細胞がIL-1の刺激を受けることがそれぞれの*in vivo*でのTI-2応答に重要であることが分かった。また、TI-2応答において腹腔マクロファージがIL-1α/IL-1βの供給源であり、腹腔マクロファージを除去するとNP-Ficoll腹腔免疫による抗体産生が強く抑制された。さらに、TI-2抗原にIL-1を加えてB細胞を刺激するとSTAT3のチロシンリン酸化が選択的に誘導され、その阻害剤により形質細胞分化と抗体産生が抑制された。STAT3を欠損する腹腔B細胞あるいは辺縁帯B細胞はそれぞれ移入先のマウスにおいてNP-Ficoll免疫による抗体産生が障害されていた。以上の結果より、TI-2応答において腹腔B-1細胞のIgM・IgG産生と脾臓辺縁帯B細胞のIgG産生にはIL-1による共刺激とそれにより活性化されるSTAT3が必要であることが明らかになった。

T細胞非依存性抗原とIL-1によるクラススイッチと抗体産生の誘導



23. T 細胞非依存性 2 型応答における B 細胞の IgG 産生誘導機構

北村　大介

東京理科大学 生命医科学研究所 がん生物学部門

Key words：T 細胞非依存性免疫応答，抗体産生，IL-1，STAT3

緒　言

肺炎球菌やサルモネラ菌の莢膜多糖体のように高度な繰り返し構造を持つ多価抗原は B 細胞抗原受容体（BCR）を高度に架橋し、T 細胞からの補助刺激なしで B 細胞の活性化、増殖、形質細胞への分化と抗体産生を誘導する。このような免疫応答は T 細胞非依存性 2 型（TI-2）応答と呼ばれ、肺炎球菌等に対する感染防御に重要であり、ワクチンに応用されている。また、核酸や細胞膜リン脂質のような繰り返し構造に対する自己抗体が自己免疫疾患の原因として知られるが、TI-2 応答は記憶 B 細胞を誘導することから［1］、このような自己抗体の産生誘導にも関わっている可能性がある。今後、多様な病原体に対する有効なワクチンを開発する上で、また、自己免疫疾患の病因解明のためにも、TI-2 応答機構を理解することは極めて重要であるが、未だほとんど分かっていない。私たちは、TI-2 応答における B 細胞の活性化から抗体産生誘導に至る細胞内分子機構の全容を理解することを目標として研究に取り組んできた。

B 細胞は BCR を介したシグナルに加えて、T 細胞依存性（TD）抗原の場合は CD40 やサイトカイン受容体から、T 細胞非依存性 1 型（TI-1）抗原の場合は Toll 様受容体（TLR）からの補助刺激を受けて活性化する。一方、TI-2 抗原の場合は架橋された BCR からのシグナルのみにより活性化・増殖し、形質細胞へ分化するとされてきた（図 1）。実際、TD 応答と異なり、TI-2 応答には BCR シグナル伝達の最上流に位置するチロシンキナーゼ Btk やアダプタータンパクである BLNK、CIN85 などが必要である。しかし、その下流のシグナル経路はよく分かっていなかった。これまでに私たちはこれらの謎の一部を解明した。

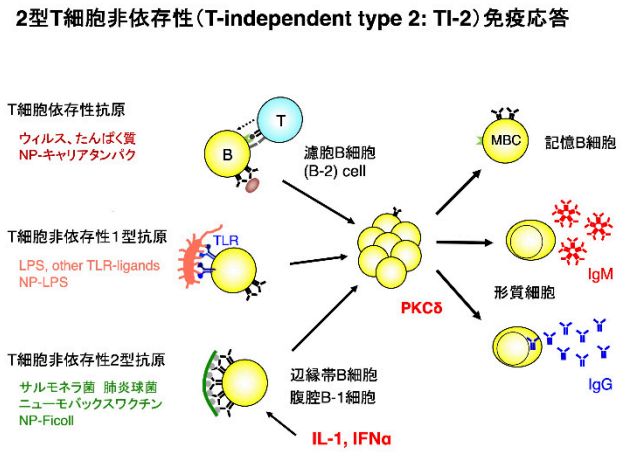


図 1. T 細胞依存性および非依存性抗原による B 細胞の抗体産生応答

ハプテン NP に特異的な BCR を発現するノックインマウス（*B1-8-ki Igk* $^{-/-}$）の B 細胞を用いて、TI-2 抗原である NP-Ficoll の刺激で PKC δ のチロシン（Y311）リン酸化が持続的に増強されることを見出した。それは、同じ NP を結合させた TD 抗原である NP-CGG で刺激した場合は弱く一過性であった。B 細胞特異的 PKC δ 欠損マウス（*Cd19* $^{Cre/+}$ *Prkcd* $^{f/f}$：PKC δ-BKO）は TI-2 抗原（NP-Ficoll、肺炎球菌莢膜多糖 PPS3）の免疫に対し、正常に IgM を産

生したが、IgG3 を全く産生しなかった。また、正常マウスでは恒常的に腸内常在細菌に対する IgG3 が産生されて全身の細菌感染防御に寄与するが、PKCδ-BKO マウスでは同居対照マウスと比べて腸内細菌に結合する血清 IgG3 が消失しており、デキストラン硫酸の短期投与により粘膜バリアを障害すると、血中移行した細菌がより増加し、マウスの生存率は著しく低下した。一方、TD 免疫応答はほぼ正常であった。以上より、PKCδは TI-2 応答における IgG3 産生に不可欠であることを見出した［2］。

そのメカニズムとして、PKCδが TI-2 応答における B 細胞の IgG3 へのクラススイッチに、さらに、クラススイッチ組換え（CSR）誘導因子 AID の遺伝子（*AICDA*）の発現誘導に必要であることを見出した。また、PKCδ欠損 B 細胞では、*AICDA* の発現制御に関わる転写因子 BATF の発現が低く、BATF をノックダウンした B 細胞では *AICDA* の発現と IgG3 へのクラススイッチが強く抑制されていた［2, 3］。以上の結果から、BCR の下流で PKCδにより BATF の発現上昇、それによる AID の発現、IgG3 への CSR が誘導されると考えられた。しかし、PKCδ欠損 B 細胞に BATF を導入して移入したマウスの TI-2 応答では *AICDA* の発現や IgG3 へのクラススイッチの回復は PKCδを戻した場合の半分程度であったので、PKCδの下流で BATF 以外の因子も *AICDA* 発現を促進していると思われた［2］。

NP 特異的 B 細胞を用いた *in vitro* の系では、NP-Ficoll 単独の刺激は B 細胞増殖と僅かな IgM 産生を誘導したが、IgG 産生を誘導しなかった。そこで、様々なサイトカインを NP-Ficoll に加えて培養したところ、IL-1 あるいは IFNα を加えると著しい IgM 産生の増強と（図 2）、IgG3 産生が誘導された。また、IL-1 や IFNα の添加により、*AICDA* の発現と *IgG3* 遺伝子の CSR が誘導された。一方、IL-1 や IFNα単独の刺激ではこれらを誘導できず、NP-Ficoll 刺激による PKCδのチロシンリン酸化や BATF 発現をさらに増強することもなかった［2］。したがって、PKCδ-BATF 経路とは別に、IL-1 や IFNα等の共刺激シグナルは抗体産生や CSR に関わる BCR シグナルを著しく増強する役割を果たすと考えられた。本課題ではこの共刺激シグナルの作用機序の解明を目的とした。

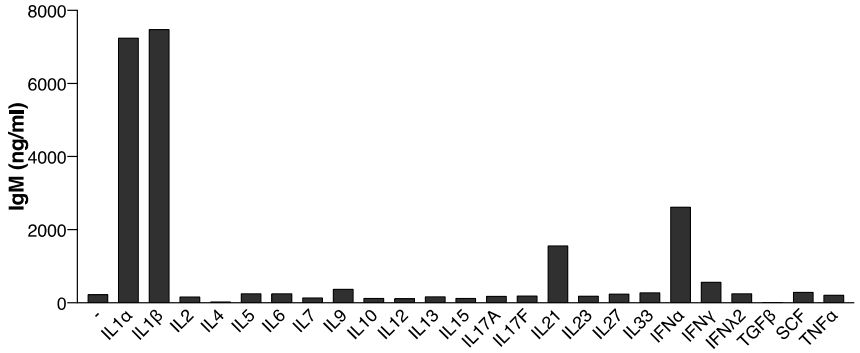


図 2. TI-2 抗原と共役して抗体産生を増強するサイトカインの探索
NP 特異的 BCR ノックインマウスの脾臓 B 細胞を NP-Ficoll と様々なサイトカインを加えて培養し、4 日目の培養上清中の IgM を ELISA にて定量した。

方法および結果

1. TI-2 応答では腹腔マクロファージが産生する IL-1 が B 細胞に作用することが必要である

TI-2 抗原を経静脈投与した場合には主に脾臓の辺縁帯 B 細胞が応答するが、腹腔内投与した場合には主に腹腔内の B-1 細胞が応答して抗体を産生する。まず、腹腔内免疫による TI-2 応答において、B-1 細胞上の IL-1 受容体（IL-1R）が必要かどうかを検証した。IL-1R を構成する IL-1RAcP を欠損するマウスの腹腔内において、B-1 細胞のサブセットである B-1a、B-1b 細胞および骨髄由来の B2 細胞の比率は正常マウスと同等であった。IL-1RAcP 欠損マウスあるいは正常マウスの腹腔 B 細胞を、卵白アルブミン特異的 BCR のみ有する Hy10 マウスに移入し、NP-Ficoll を腹腔に免疫した。その結果、IL-1RAcP 欠損 B 細胞を移入したマウスでは NP 特異的 IgM および IgG が産生されなかった（図 3）。IL-1RAcP 欠損辺縁帯 B 細胞を移入したマウスに NP-Ficoll を経静脈的に免疫した場合は IgG 産生のみ有意

に低下した。よって、*in vitro* での結果と一致して、B-1 細胞あるいは辺縁帯 B 細胞が IL-1 の刺激を受けることがそれぞれの *in vivo* での TI-2 応答に重要であることが確認された。

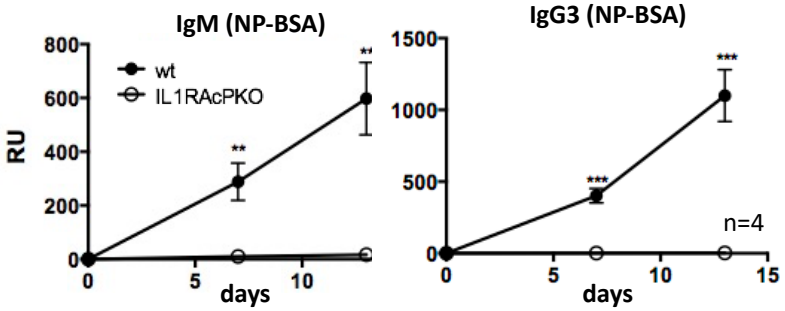


図 3. 腹腔 B 細胞の TI-2 応答には B 細胞上に発現する IL-1 受容体が必要である
IL-1RAcP 欠損マウス（IL1RAcPKO）あるいは正常（WT）マウスの腹腔 B 細胞（1×10^6）を、Hy10 マウス（n＝4）の腹腔内に移入し、NP-Ficoll を腹腔に免疫した。免疫前と免疫後 7 日および 14 日に採血し、血清中の NP 特異的 IgM と IgG を ELISA により測定した。統計処理は two-tailed unpaired Welch's t-test で行った（***P*＜0.01、****P*＜0.001）。

次に腹腔において IL-1 を供給する細胞を調べた。NP-Ficoll で腹腔免疫した 3 日後のマウスの腹腔細胞をフローサイトメトリー（FCM）にて解析したところ、マクロファージが IL-1α と IL-1β を産生していることが分かった。また、腹腔の NP 特異的 B 細胞に NP-Ficoll を加えて培養する系において、腹腔マクロファージを加えると IgM および IgG の産生が有意に増加した。この培養 3 日後のマクロファージから IL-1α/IL-1β が産生されていることも FCM で確認された。さらに、この IL-1α/IL-1β 産生はマクロファージ単独の培養では起こらず、腹腔 B 細胞との相互作用が必要であることも分かった。*In vivo* においても、クロドロン酸含有リポソームの投与により腹腔内マクロファージを除去しておくと、NP-Ficoll 免疫による NP 特異的 IgM および IgG の産生が著しく抑制された。以上の結果から、腹腔内の TI-2 応答においては腹腔マクロファージが産生する IL-1 が不可欠であることが明らかになった。

2. TI-2 応答における IL-1 の B 細胞に対する作用機序

B 細胞が NP-Ficoll に反応する際の IL-1 の作用機序を解明するために、NP 特異的脾臓 B 細胞を NP-Ficoll とともに IL-1α の有無で培養し、2 日後までのシグナル伝達因子の活性化状態を比較した。まず、IL-1α の有無で細胞増殖には差がなく、NF-κB p65 および mTOR のリン酸化には変化はなかった。また、形質細胞分化を誘導する転写因子 IRF1 は時間経過と共に増加したが、IL-1α の有無で差は見られなかった。しかし、STAT3 のチロシン（Y705）リン酸化が IL-1α の添加によって培養 1 日後から増強することを見出した。また、NP 特異的腹腔 B 細胞を用いた場合は NP-Ficoll 単独では若干の、IL-1 との共刺激により著しい STAT3 のチロシンリン酸化が誘導された（図 4）。一方、STAT3 のセリン（S727）リン酸化やタンパク量は IL-1α の添加により変化しなかった。そこで、脾臓 B 細胞培養系に STAT3 の Y705 リン酸化の阻害剤を加えると、培養 3 日目と 4 日目の細胞増殖には大きな変化はなかったが、IL-1α を添加した際の形質細胞への分化は阻害剤量依存的に抑制され、その後 6 日目の IgG 産生も強く抑制された。*In vivo* においても、B 細胞特異的 STAT3 欠損マウスの脾臓辺縁帯 B 細胞を Hy10 マウスに移入し、NP-Ficoll で経静脈的に免疫したところ、NP 特異的 IgG の産生が強く抑制されていた。さらに、同じマウスの腹腔 B-1 細胞を B 細胞欠損（μMT）マウスに移入し、NP-Ficoll で腹腔内免疫したところ、NP 特異的 IgM および IgG の産生が強く抑制された。以上の結果より、脾臓辺縁帯 B 細胞と腹腔 B-1 細胞では TI-2 抗原と IL-1 の共刺激により STAT3 のチロシンリン酸化が起こり、この STAT3 は脾臓辺縁帯 B 細胞の場合は IgG 産生に、腹腔 B-1 細胞の場合は IgM と IgG の両方の産生に必要であると考えられた。

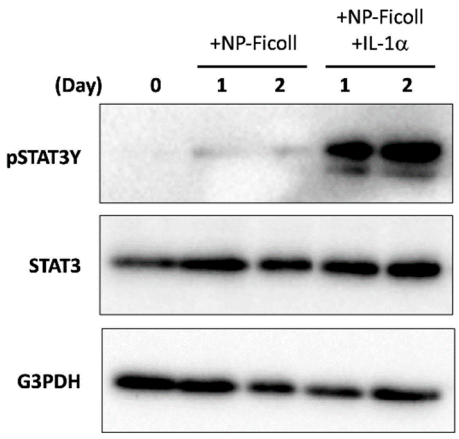


図 4. IL-1 刺激による STAT3 のチロシンリン酸化の誘導

NP 特異的腹腔 B 細胞を NP-Ficoll とともに IL-1α の有無で培養し、培養前、培養後 1 日目と 2 日目の細胞溶解液を SDS-PAGE により泳動し、Western blot 法により、STAT3 pY705（pSTAT3Y）、STAT3 および対照として G3PDH をそれぞれに対する抗体を用いて検出した。

考　察

TI-2 免疫応答は古くから知られている現象であるが、その B 細胞活性化機構はよく分かっていない。*In vitro* では TI-2 抗原の代替として抗 IgM 抗体で BCR を架橋する手法で BCR シグナル伝達機構が研究されてきたが、筆者らの NP-Ficoll で NP 特異的 B 細胞を刺激する系では抗 IgM 抗体に比べて数十～数百倍の増殖が誘導された。よって、抗 IgM 抗体を用いた過去の BCR シグナル伝達に関する知見が TI-2 応答に適用できるとは限らないと思われる。これまでに私達は NP 特異的 B 細胞を用いた系で、B 細胞の TI-2 抗原刺激による抗体産生が IL-1 との共刺激により著しく増強することを見出した。本研究ではさらに、IL-1 が腹腔 B 細胞および辺縁帯 B 細胞の TI-2 免疫応答（辺縁帯 B 細胞の場合は IgG 産生のみ）に不可欠であることを明らかにした。また、腹腔内 TI-2 応答において IL-1 を供給している細胞が腹腔マクロファージであり、このマクロファージが抗体産生に必要であることを見出した。

さらに、TI-2 抗原刺激に加えて IL-1 の刺激は腹腔 B 細胞（および、脾臓の恐らく辺縁帯 B 細胞）における STAT3 のチロシンリン酸化を誘導し、STAT3 のチロシンリン酸化特異的阻害剤により、これら B 細胞の形質細胞分化および抗体産生が抑制された。しかし、B 細胞増殖にはこの阻害剤はほとんど影響しなかった。一方、STAT3 活性全体の阻害剤は TI-2 抗原単独刺激においても IL-1 添加の条件でも腹腔 B 細胞の増殖と形質細胞分化を強く抑制した。IL-1 の添加は TI-2 抗原刺激による腹腔 B 細胞の増殖に影響しないことから、STAT3 は TI-2 抗原による BCR シグナル伝達そのものに中心的な役割を果たしており、それにクロストークする形で IL-1R からのシグナルが STAT3 のチロシンリン酸化を誘導し、それが抗体産生およびクラススイッチを誘導すると考えられる（図 5）。STAT3 の形質細胞分化誘導機構および AID 遺伝子発現誘導における BATF との協調作用について、今後さらに研究を進めていきたい。

上述の結果と一見矛盾するが、B 細胞特異的に STAT3 が欠損するマウスにおいて、腹腔内免疫による TD 応答は IgG 抗体産生が選択的に障害されるが、TI-2 応答において IgM・IgG3 産生は正常であると報告されている［4］。また、私たちの実験で、IL-1RAcP 欠損マウスとμMT マウスの骨髄キメラマウス（すなわち、骨髄由来 B 細胞のみ IL-1R を欠損するマウス）においても TI-2 応答はやや減弱傾向を示したが有意な変化はなかった。これらと上述の結果を合わせると、NP-Ficoll に反応し得る B 細胞が B-1 細胞あるいは辺縁帯 B 細胞しか存在しない細胞移入実験系では、その TI-2 応答に IL-1R–STAT3 経路が必要であることが見えるが、B-1 細胞・辺縁帯 B 細胞以外の B 細胞による TI-2 応答は IL-1R–STAT3 経路非依存的であるため、全 B 細胞を有するマウスの TI-2 応答では IL-1R–STAT3 経路の必要性が見えないと解釈できる。実際、濾胞 B 細胞は IFNα の共刺激により TI-2 応答が可能となると報告されている［5］。

最後に、TI-2 抗原刺激により活性化される PKC δ の基質を同定することを試みた。NP-Ficoll あるいは NP-CGG で NP 特異的 B 細胞を刺激した後、BCR に結合した蛋白を質量分析により解析した結果、NP-Ficoll 特異的に BCR に結合するタンパクを同定した。その遺伝子を抗 NP-BCR を導入した B 細胞株でノックダウンすると、NP-Ficoll 刺激による PKC δ のチロシンリン酸化が強く抑制された。しかし、ノックダウンにより B 細胞が生存できなくなり、それ以上の機能的解析ができなかった。このタンパクが PKC δ の基質であるかについては今後の検証が必要である。

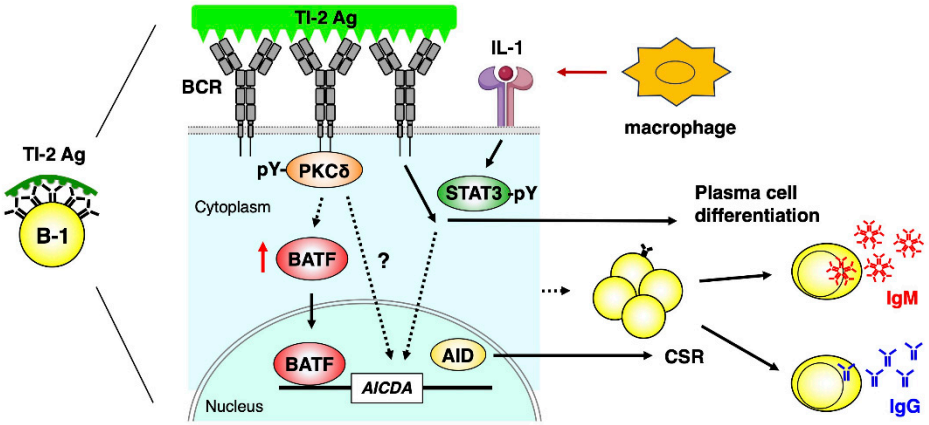


図 5. TI-2 応答における IL-1-STAT3 経路の役割

TI-2 抗原刺激による BCR シグナルは PKC δ のチロシンリン酸化、BATF 発現上昇、AID 遺伝子（*AICDA*）発現、CSR を誘導する。*AICDA* の発現誘導には BATF 以外の因子も関わっていると思われる［2］。一方、腹腔マクロファージから産生される IL-1 は B-1 細胞および辺縁帯 B 細胞を刺激し、STAT3 のチロシンリン酸化を誘導する。この STAT3 は BCR シグナルによる形質細胞分化を著しく増強する。また、IL-1 受容体シグナルは *AICDA* の発現誘導と CSR にも必要であるが、STAT3 が BATF と共役している可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京理科大学大学院生命医科学研究所がん生物学部門の天野麻理、深尾紗央里、會本裕子、畠美幸、加藤圭、梅津巧、唐旭洋である。これらの人々に感謝の意を表する。

文　献

1) Obukhanych TV, Nussenzweig MC. T-independent type II immune responses generate memory B cells. J Exp Med. 2006 Feb 20;203(2):305-10. PMID: 16476769 DOI: 10.1084/jem.20052036

2) Fukao S, Haniuda K, Tamaki H, Kitamura D. Protein kinase Cδ is essential for the IgG response against T-cell-independent type 2 antigens and commensal bacteria. eLife. 2021 Oct 25;10:e72116. PMID: 34693907 DOI: 10.7554/eLife.72116.

3) Ise W, Kohyama M, Schraml BU, Zhang T, Schwer B, Basu U, Alt FW, Tang J, Oltz EM, Murphy TL, Murphy KM. The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. Nat Immunol. 2011 Jun;12(6): 536-43. PMID: 21572431 DOI: 10.1038/ni.2037.

4) Fornek JL, Tygrett LT, Waldschmidt TJ, Poli V, Rickert RC, Kansas GS. Critical role for Stat3 in T-dependent terminal differentiation of IgG B cells. Blood. 2006 Feb 1;107(3):1085-91. PMID: 16223771 DOI: 10.1182/blood-2005-07-2871.
5) Swanson CL, Wilson TJ, Strauch P, Colonna M, Pelanda R, Torres RM. Type I IFN enhances follicular B cell contribution to the T cell-independent antibody response. J Exp Med. 2010 Jul 5;207(7):1485-500. PMID: 20566717 DOI: 10.1084/jem.20092695.