

## 活性化 B 細胞分化制御による免疫反応調整機構の解析

菅井 学

福井大学医学部 生命情報医科学講座 分子遺伝学領域

### 【研究の背景】

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(Duffy ら Science 2012, Ochiai ら Immunity 2013)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変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いたしました。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。

### 【目的】

申請者は、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が、ミトコンドリアの機能的相違によって事前に区別出来ることを見いたしました。この細胞集団を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す。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。これらの data をもとに鍵となる分化制御因子の候補を絞り、活性化 B 細胞分化制御機構を明らかにすることを目指す。

### 【方 法】

CD43<sup>-</sup>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発現する RNA を DNA アレイで調べ、

発現するタンパク質を iTRAQ 法を用いたショットガン解析で調べる。

## 【結 果】

DNA チップで得られたデータの 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ている。④⑤は既に形質細胞分化との関連が既に報告されている。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。

## 【考 察】

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、同様の細胞を用いたメタボローム解析を行うことが必要である。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。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

一般的なワクチン開発では、「抗原に対する親和性の高い、クラススイッチした抗体」を誘導することによって、ウイルス除去を効率的に行う免疫反応を誘導する手法の開発を目指す。しかし最近、インフルエンザウイルスワクチンを接種する際、親和性の高い抗体の産生を抑制することによって、別のインフルエンザウイルスによる致死性感染を予防できることが示された(交差予防免疫 McGargill ら Nat. Immunol. 2014)。これらのことから考えると、「活性化 B 細胞をどのような方向に分化させるか」をコントロールすることによって、それぞれの病態に適した抗体産生を誘導することが可能になる。そのための基盤となる知見が得られることが期待される。

## 【参考・引用文献】

- Jang, K-J., Mano, H., Aoki, K., Hayashi, T., Muto, A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, SL., Igarashi, K., Shimizu, A. and Sugai, M.  
Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates  
*Nat. Commun.* 6:6750 (2015)
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A.S., Klein, U., Dinner A.R., Singh, H. and Sciammas R.  
Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of Irf4  
*Immunity* 23; 38(5):918-29 (2013)
- Duffy, KR., Wellard, CJ., Markham, JF., Zhou, J-HS., Holmberg, R., Hawkins, ED., Hasbold J., Dowling MR. and Hodgkin PD.  
Activation-induced B cell fates are selected by intracellular stochastic competition

平成 27 年度 血液医学分野 一般研究助成 研究成果報告書

*Science* 335(6066): 338-341 (2012)