

氏名	岡澤 貴裕
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第3650号
学位授与の日付	平成20年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科機能分子化学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Analysis of B cell selection in the germinal center reaction during a T-dependent antibody response at a single cell level (T細胞依存性抗体応答における单一細胞レベルでの胚中心B細胞選択機構の解析)
論文審査委員	教授 大森 齋 教授 酒井 裕 教授 虎谷 哲夫 准教授 金山 直樹

学位論文内容の要旨

免疫系において、B細胞は抗原に特異的な抗体を產生し抗原を排除する。抗原に感作されると、一部の抗原特異的なB細胞は、多様な抗原特異性を持つB細胞集団の中からクローン選択され、抗体產生細胞へと分化し初期の免疫応答を担う。一方、その他の抗原特異的B細胞は、抹消リンパ組織に形成される胚中心へと移行し、親和性成熟と呼ばれる過程を経て抗原に対する親和性を向上させ、高親和性抗体產生細胞や記憶細胞へと分化し、より効率よく抗原を排除する。B細胞の胚中心への移行や、胚中心反応での選択機構には、B細胞レセプター(BCR)からのシグナル強度が重要であると考えられている。これまで、抗原への親和性の強さに依存するBCRシグナルが、B細胞分化に与える影響について様々な方法で研究が行われているが、すべてが同じ結論ではなく、より精密な解析が必要である。また、胚中心へ移行した抗原特異的B細胞がどのように多様化し、高親和性クローンが選択されるのかという胚中心でのB細胞選択機構には不明な点が多い。

抗体の親和性成熟過程での選択機構を解析するには、特定の抗原特異性を持つB細胞の胚中心での選択過程を直接解析する必要があると考えられる。そこで、本研究は、抗原特異性の限定されたB細胞集団を持つquasimonoclonal(QM)マウスを用いて、特定のB細胞の親和性成熟を経時的かつ单一細胞レベルで解析可能な実験系を確立し、BCRシグナルの強度の違いが胚中心応答におけるB細胞選択に与える影響について解析することを目的とした。

<①QMマウスにおける胚中心B細胞選択を单一細胞レベルで解析可能な実験系の確立>

QMマウスは、特定の抗体重鎖遺伝子($V_{H}T$)の導入により、B細胞の集団が主に $V_{H}T/\lambda 1$ と $V_{H}T/\lambda 2$ の2種類に限定されたマウスである。これまでに、QMマウスへのp-nitrophenylacetyl(pNP)化抗原の免疫では、pNPに対して初期親和性が高い $V_{H}T/\lambda 2$ のみが親和性成熟し、 $V_{H}T/\lambda 2$ 抗体のpNPへの親和性の向上には、 $V_{H}T$ への特定の変異(T313A変異)が重要であることが示唆されている。そこで、pNP免疫後のQMマウスの胚中心B細胞を、セルソーターを用いて单一細胞に単離し、 $V_{H}T^{+}$ B細胞の数、 $V_{H}T$ への変異導入頻度、 $V_{H}T^{+}$ B細胞の使用軽鎖($\lambda 1$ または $\lambda 2$)について单一細胞レベルで高感度にPCRで検出する方法を確立した。2段階のPCRで正確性を高めることで、重鎖 $V_{H}T$ 、軽鎖 $\lambda 1$ または $\lambda 2$ 、T313A変異の導入を、PCRによって極めて厳密に検出可能であった。

<②QMマウス親和性成熟機構における单一細胞レベルでの胚中心B細胞選択の解析>

免疫後0(非免疫)、7、10、16日後のQMマウスの膝下リンパ節の胚中心B細胞をセルソーターで単離し、確立した条件で解析を行った。その結果、免疫応答初期でpNPに対する親和性が高い $V_{H}T/\lambda 2$ B細胞は優先的に胚中心へ移行しており、その割合は免疫後経時に増加していた。また、 $V_{H}T/\lambda 2$ B細胞は、 $V_{H}T/\lambda 1$ B細胞に比べてより多くの変異が導入されており、T313A変異がほぼ独占的に導入されている事から、胚中心において優先的に多様化している傾向が観察された。

本研究により、解析が不可能であった特定の抗原特異性を持つB細胞の胚中心での選択機構を極めて精密に解析可能な実験系が確立され、BCRシグナル強度の違いは、B細胞の胚中心への移行だけでなく、その後の親和性成熟過程においても重要な役割を果たしている事が示唆された。

論文審査結果の要旨

生体内での高親和性抗体の產生(親和性成熟)は、抹消リンパ組織に形成される胚中心へ移行したB細胞の高頻度突然変異による多様化と、高親和性を獲得したクローンの厳密な選択で行われる。しかし、抗原刺激によるB細胞レセプター(BCR)からのシグナル強度が、B細胞の胚中心への移行に与える影響や、胚中心へ移行した抗原特異的B細胞の胚中心内での多様化と高親和性クローンの選択機構については不明な点が多い。本研究では、抗原特異性の限定されたB細胞集団を持つquasimonoclonal(QM)マウスを用いて、特定のB細胞の親和性成熟を経時的かつ単一細胞レベルで解析可能な実験系を確立し、BCRシグナルの強度の違いが胚中心におけるB細胞選択に与える影響の解析を目的とした。QMマウスは、特定の抗体重鎖遺伝子($V_{H}T$)の導入により、B細胞の集団が主に $V_{H}T/\lambda 1$ と $V_{H}T/\lambda 2$ の2種類に限定されたマウスである。*p*NP免疫後のQMマウスの胚中心B細胞を、セルソーターを用いて単一細胞に単離し、 $V_{H}T^+$ B細胞の数、 $V_{H}T$ への変異導入頻度、 $V_{H}T^+$ B細胞の使用軽鎖 ($\lambda 1$ または $\lambda 2$) について単一細胞レベルで高感度にPCRで検出する方法を確立した。免疫したQMマウスの膝下リンパ節の胚中心B細胞を経時にセルソーターで単離し、確立した条件で解析を行った結果、免疫応答初期で*p*NPに対する親和性が高い $V_{H}T/\lambda 2$ B細胞は優先的に胚中心へ移行しており、その割合は免疫後経時に増加していた。また、 $V_{H}T/\lambda 2$ B細胞は、 $V_{H}T/\lambda 1$ B細胞に比べてより多くの変異が導入されており、*p*NPへの親和性の向上に重要なT313A変異がほぼ独占的に導入されている事から、胚中心において優先的に多様化している傾向が観察された。以上のことから、BCRシグナル強度の違いは、B細胞の胚中心への移行だけでなく、その後の親和性成熟過程においても重要な役割を果たしていることが示めされた。

この研究は、抗体の親和性成熟という免疫系における最も重要な過程の一つを、極めて精密な実験系で詳細に解析したものであり、学術的意義は大きいと考えられる。したがって本研究は博士（工学）の学位に十分値するものと判定される。