

高齢者の感染症予防に向けたマウス B 細胞での *Zizimin2* の解析 (30-41)

主任研究者 坂本 明彦 国立長寿医療研究センター 研究開発研究員

研究要旨

B 細胞はワクチンの接種により活性化し、抗体産生細胞やメモリーB 細胞へ分化する。私たちは、免疫老化への関与が示唆される *Zizimin2* 遺伝子をクローニングし、定常状態における B 細胞の分化や抗体産生などへの関与を明らかにしてきた。本研究ではさらに踏み込んで、B 細胞の免疫応答における *Zizimin2* の関与を明らかにすることにした。*Zizimin2* が欠失した B 細胞を *in vitro* 刺激すると、B 細胞受容体の下流シグナルが亢進し、活性化マーカーCD86 の誘導が抑制された。このような活性化の異常は、多糖抗原に対して抗原特異的な B-1b 細胞の増殖が抑制される形で反映された。また、タンパク質抗原に対しては、濾胞性ヘルパーT 細胞と濾胞性制御 T 細胞の分化がともに抑制され、IgG1 陽性の胚中心 B 細胞のうち抗原特異的な細胞の増殖が抑制されることが分かった。このように、*Zizimin2* は多糖、タンパク質抗原のいずれに対しても、抗原特異的な B 細胞が選択的に増殖するのに重要なことが分かった。

主任研究者

坂本 明彦 国立長寿医療研究センター 研究開発研究員

A. 研究目的

B 細胞はワクチンの接種により活性化し、抗体産生細胞やメモリーB 細胞へ分化する。これらの細胞は、長期的に生体を防御するのに重要な免疫細胞である。私たちは、タンパク質抗原の投与により活性化したマウスの B 細胞から *Zizimin2* 遺伝子をクローニングした。*Zizimin2* は、グアニンヌクレオチド交換因子として GTP 加水分解酵素の CDC42 を活性化し、細胞骨格の再構成を誘導する。また、他の *Zizimin* ファミリータンパク質と違って免疫組織特異的に発現しており、その発現量は加齢とともに低下する。そこで *Zizimin2* ノックアウトマウスを作った結果、*Zizimin2* が定常状態における B 細胞の分化や抗体産生などに関わることが分かった。本研究ではさらに踏み込んで、B 細胞の免疫応答における *Zizimin2* の関与を明らかにすることにした。

B. 研究方法

1. B細胞の *in vitro* 刺激に対する免疫応答における *Zizimin2* の関与

B細胞の表面にはB細胞受容体やToll様受容体、CD40などが発現しており、それぞれが個別に外部から刺激を受け取る。そこで、C57BL/6系統の野生型と*Zizimin2*ノックアウトマウスの脾臓から磁気ビーズでB細胞を分離し、*in vitro* でB細胞受容体やToll様受容体、CD40を刺激して、活性化マーカーCD86の発現やシグナルタンパク質のリン酸化をフローサイトメトリーで解析した。

2. B細胞の多糖抗原に対する免疫応答における *Zizimin2* の関与

合成多糖のFicollは、直接B細胞を活性化する。*Zizimin2* floxマウスと*Cd19-Cre*マウスを交配して、B細胞特異的に*Zizimin2*が欠失したマウスを作製した。このマウスの腹腔内にFicollを投与し、腹腔内の細胞を回収して、抗原特異的なB細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

3. B細胞のタンパク質抗原に対する免疫応答における *Zizimin2* の関与

タンパク質抗原は、T細胞依存的にB細胞を活性化する。B細胞特異的に*Zizimin2*が欠失したマウスの腹腔内に、ニワトリガンマグロブリンやフィコエリスリンを投与した。脾臓の細胞を回収し、抗原特異的なB細胞の割合とT細胞の分化をフローサイトメトリーで解析した。B細胞が活性化すると、一部はIgG1を発現する。*Zizimin2* floxマウスと*Cy1-Cre*マウスを交配して、IgG1陽性のB細胞でのみ*Zizimin2*が欠失したマウスを作製した。このマウスの腹腔内にニワトリガンマグロブリンを投与し、脾臓を回収して、抗原特異的なB細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は、国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験安全委員会から承認を得た上で、その規程に従って実施した。動物実験は、国立長寿医療研究センターの動物実験倫理委員会から承認を得た上で、その規程に従って実施した。

C. 研究結果

1. B細胞の *in vitro* 刺激に対する免疫応答における *Zizimin2* の関与

野生型と*Zizimin2*ノックアウトマウスからB細胞を分離し、B細胞受容体、Toll様受容体、CD40を*in vitro* 刺激した。活性化マーカーCD86の発現をフローサイトメトリーで調べた結果、*Zizimin2*ノックアウトマウスのB細胞では、いずれの刺激に対してもCD86の誘導が抑制されることが分かった。そこで、B細胞受容体を*in vitro* 刺激し、B細胞内のシグナルタンパク質のリン酸化をフローサイトメトリーで調べた。その

結果、*Zizimin2* ノックアウトマウスの B 細胞では、SYK、BTK、AKT、ERK のリン酸化が亢進することが分かった。

2. B 細胞の多糖抗原に対する免疫応答における *Zizimin2* の関与

B 細胞特異的に *Zizimin2* が欠失したマウスと対照の *Cd19-Cre* マウスに多糖抗原の Ficolin を投与し、腹腔内の B 細胞をフローサイトメトリーで解析した。対照の *Cd19-Cre* マウスでは抗原特異的な B 細胞が増加し、その大部分が B-1b 細胞であることがわかった。一方、B 細胞特異的に *Zizimin2* が欠失したマウスでは、抗原特異的な B-1b 細胞の増殖が抑制された (図 1)。

3. B 細胞のタンパク質抗原に対する免疫応答における *Zizimin2* の関与

B 細胞特異的に *Zizimin2* が欠失したマウスと対照の *Cd19-Cre* マウスにタンパク質抗原のニワトリガンマグロブリンやフィコエリスリンを投与し、脾臓の B 細胞をフローサイトメトリーで解析した。B 細胞が活性化すると、胚中心 B 細胞に分化する。対照の *Cd19-Cre* マウスでは IgG1 陽性の胚中心 B 細胞のうち $29 \pm 3\%$ が抗原特異的だったのに対し、B 細胞特異的に *Zizimin2* が欠失したマウスでは $17 \pm 2\%$ が抗原特異的だった (図 1)。一方、IgG1 陽性の B 細胞でのみ *Zizimin2* が欠失したマウスでは、対照の *Cy1-Cre* マウスと同程度の IgG1 陽性の胚中心 B 細胞が抗原特異的だった。

タンパク質抗原特異的な B 細胞は、T 細胞に依存して増殖する。そこで、B 細胞特異的に *Zizimin2* が欠失したマウスと対照の *Cd19-Cre* マウスにニワトリガンマグロブリンを投与し、脾臓の T 細胞をフローサイトメトリーで解析した。その結果、B 細胞特異的に *Zizimin2* が欠失したマウスでは、濾胞性ヘルパー T 細胞と濾胞性制御 T 細胞の分化がともに抑制されることが分かった。

D. 考察と結論

本研究では、B 細胞の免疫応答における *Zizimin2* の関与を、*in vitro* と *in vivo* のレベルで検討した。*Zizimin2* が欠失した B 細胞を *in vitro* 刺激すると、B 細胞受容体の下流シグナルが亢進し、活性化マーカー CD86 の誘導が抑制された。このような活性化の異常は、多糖抗原に対して抗原特異的な B-1b 細胞の増殖が抑制される形で反映された。また、



図 1 抗原特異的 B 細胞の *Zizimin2* に依存した選択的増殖

タンパク質抗原に対しては、濾胞性ヘルパーT細胞と濾胞性制御T細胞の分化がともに抑制され、IgG1陽性の胚中心B細胞のうち抗原特異的な細胞の増殖が抑制されることが分かった。このように、Zizimin2は多糖、タンパク質抗原のいずれに対しても、抗原特異的なB細胞が選択的に増殖するのに重要なことが分かった。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 坂本明彦、丸山光生 Involvement of DOCK11 in B-cell responses against T

cell-independent type 2 antigens 第45回日本免疫学会学術集会 2018年12月

10日 福岡

2) 丸山光生、坂本明彦、森田悠治、高岡晃教 免疫の老化：感染防御と栄養介入の最

前線 日本薬学会第139年会 2019年3月21日 千葉

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。