

学位論文

T 細胞依存性免疫応答における
高親和性 IgM 記憶 B 細胞の解析

平成 29 年 9 月

原 泰志

目次

略称	-----	2
要約	-----	3
序論	-----	5
方法	-----	9
結果	-----	13
考察	-----	20
謝辞	-----	24
引用文献	-----	25
図	-----	31

略称

AID: Activation-Induced (Cytidine) Deaminase

APC: Allophycocyanin

BCR: B cell receptor

CGG: Chicken- γ -globulin

CH: heavy chain constant domain

CDR: complementarity determining region

CSR: class switch recombination

DH: heavy chain diversity

FACS: fluorescence activated cell sorter

GC: germinal center

GCB: germinal center B cell

γ 1CT: γ 1 chain circular DNA transcripts

IgH: immunoglobulin heavy chain

IgL: immunoglobulin light chain

Ig λ : immunoglobulin lambda chain

JH: heavy chain joining

Ka: association constant

NP: (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl

MBC: memory B cell

O.D.: optical density

PALS: periaarterial lymphatic sheath

SHM: somatic hypermutation

SRBC: sheep red blood cells

VH: heavy chain variable domain

VL: light chain variable domain

要約

T 細胞依存性免疫応答において、B 細胞は増殖しクラススイッチや体細胞高頻度突然変異によって抗原への特異性を増加させる胚中心を形成する。こうした抗体の親和性を上げる現象は親和性の成熟 (Affinity Maturation) とよばれ、抗原特異性を変えずに抗原への結合能力を上げ、抗体による効率的な外来抗原の排除を促進する。B 細胞は、この過程を通して記憶 B 細胞及び抗体産生細胞へと分化すると考えられている。これらは、クラススイッチを終了した IgG⁺ B 細胞の解析で得られた知見に基づいており、免疫応答の起点である IgM⁺ B 細胞については明らかにされてこなかった。近年、体細胞高頻度突然変異をもつ IgM⁺ 記憶 B 細胞の存在が明らかになり免疫応答のプロセスにおいて重要な役割を果たしていることが分かってきたが、抗体の親和性成熟過程における役割については明らかにされていない。

野生型マウスにハプテン(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP)を T 細胞依存性抗原 Chicken- γ -globulin (CGG)に結合させた NP-CGG を免疫し脾臓における NP 特異的な B 細胞の解析をおこなった。NP に対する結合能力を識別するために蛍光色素蛋白質 Allophycocyanin に異なる数の NP を結合させ親和性を識別することができる NP_{hi}-APC、NP_{med}-APC を用いて、これらに結合する NP 特異的 IgM⁺ 及び IgG⁺ B 細胞の H 鎖 V186.2 遺伝子の変異解析を行なったところ、NP 特異的な IgM⁺ 及び IgG⁺ 胚中心 B 細胞は抗原投与後 14 日目までに体細胞高頻度突然変異が入っており、この頻度は時間依存的に同じ割合で増加していた。一方、IgG⁺ / IgM⁺ 胚中心 B 細胞の比率は変化しなかったことからクラススイッチは抗原投与後 7 日目までにはほぼ完了し、その後胚中心内では抑制されていることが明らかになった。また記憶 B 細胞は、V186.2⁺ IgM⁺ B 細胞において時間経過とともに体細胞高頻度突然変異の蓄積が起こり親和性の成熟が起こるものと、変異が入らない 2 つの集団が存在していることが明らかとなった。胚中心 B 細胞では全ての V186.2 遺伝子に変異が確認されたことから、変異のある記憶 B 細胞は胚中心から由来し、また変異のない記憶 B 細胞は胚中心を経由しないで形成された細胞と考えられる。この 2 種類の記憶 B 細胞の V186.2 遺伝子を調べたところ、胚中心を経由してきたものは、Germline の段階で NP の特異性が高いも

のが選ばれていることが明らかになり、B 細胞が胚中心を経由する選択に抗体の親和性が影響していたことが示唆された。

序論

免疫応答における胚中心の役割

T 細胞依存性免疫応答は、ナイーブ B 細胞が抗原に結合し脾臓やリンパ節、またはパイエル板等の二次免疫器官へ移動し、T 細胞エリアで CD4⁺ T 細胞からの刺激によって活性化される(Jacob and Kelsoe, 1992; McHeyzer-Williams et al., 1993; Okada et al., 2005; Pape et al., 2007; Pereira et al., 2010; Kerfoot et al., 2011)。活性化した B 細胞は時間の経過とともに次の 3 つの運命をたどる。(1) 一次抗体を分泌する短期寿命の抗体産生細胞(Ho et al., 1986)へ分化し、胚中心が形成されるまでの間の抗原の除去を行う。(2) 活性化後の B 細胞が B 細胞エリアへ移動し、早期の記憶 B 細胞へ分化する。(Dogan et al., 2009; Pape et al., 2011; Taylor et al., 2012)

(3) 胚中心を形成し、その後、記憶 B 細胞、骨髄で長期生存する抗体産生細胞へと分化する (Manz et al., 1998; Blink et al., 2005; Paus et al., 2006; Radbruch et al., 2006) (図 1)。胚中心は、クラススイッチや体細胞高頻度突然変異が起こるばとしており、これらは Activation-Induced (Cytidine) Deaminase (AID) (Muramatsu et al., 2000)によって触媒されて起こることが明らかにされている。しかしながらこれらの両方が抗原刺激の後に起こるにもかかわらず(Chan et al., 2009)、B 細胞の分化が、BCR からのシグナルに依存しているのか、クラススイッチによって生じるアイソタイプによるものかは明らかになっていない。いくつかの研究において IgG⁺ 記憶 B 細胞のみが高い親和性を有しているため、クラススイッチした B 細胞において体細胞高頻度突然変異が優先的に誘導され、記憶 B 細胞に分化すると考えられている(Smith et al., 1997; Takahashi et al., 1998; Nishimura et al., 2011)。

抗体の多様性

液性免疫応答において生体外の物質が生体内へ侵入すると抗原として認識され血液中にある抗体や補体によって免疫応答を引き起こすことで、単一の親和性と抗原特異性をもった多くの異なる抗体分子を誘導する。抗体の特異性は、ヒトやマウスでは、重鎖可変領域で VH 遺伝子部分に約 50 の遺伝子、DH 遺伝子部分に約 30 の遺伝子、JH 遺伝子部分に約 6 種類あり、軽鎖可変領域で VL 遺伝

子部分に約 35 の遺伝子、JL 遺伝子部分に約 5 つの遺伝子がありこの中からそれぞれ 1 種類の組み合わせを使い約 150 万種類以上という膨大な多様性を持つことで様々な抗原に対し結合することが知られている、これを V(D)J 遺伝子再構成といい(Hozumi and Tonegawa,1976 ; Tonegawa, 1983 ; Bassing et al., 2002)、この V, D, J 遺伝子の相補の塩基による結合は、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT) によるヌクレオチドの付加やエキソヌクレアーゼによる切断によって行われる(Benedict et al., 2000)。

クラススイッチの開始と Circle Transcript の関係

B 細胞におけるアイソタイプクラススイッチが抗原活性化後の T 細胞からのシグナルにより、抗体分子の定常部を DNA 再結合により変化させる事象である。クラススイッチに伴う DNA 鎖切断は抗体重鎖遺伝子座、各アイソタイプをコードする I プロモーター、スイッチ (S) 領域、重鎖定常領域 (C) 遺伝子と呼ばれる繰り返し配列周辺で起きることが分かっている。この DNA 鎖切断には、AID タンパク質の発現と S 領域が転写される 2 つの条件が必須である。IgM から IgG1 へのクラススイッチは、AID の発現により I μ 、I γ 1 プロモーターが始動し S μ 領域及び S γ 1 領域上での転写が誘導され 2 つの S 領域にはさまれた DNA がループ上になり、S μ と S γ 1 の間が環状 DNA として切り出され、染色体上には V-D-J 配列の次に C γ 1 遺伝子が並ぶ構造ができる。相反組換え産物としての環状 DNA 上には、5'側に S γ 配列、3'側に S μ 配列が結合したループ構造が形成される。Circle transcript はこの環状 DNA が形成されたときの転写産物でありクラススイッチの指標とされている。

抗(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP)抗体にみられる親和性の成熟

C57BL/6 (B6) マウスの(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) ハプテンに対する免疫応答によって作られた抗 NP 抗体を産生するハイブリドーマは、主に H 鎖 (IgH) に V186.2、DFL16.1、JH2、L 鎖 (IgL) については V λ 1 および J λ 1 の遺伝子が選択的に使われることが知られている(Bothwell et al., 1981; Cumano and Rajewsky, 1986)。B 細胞の免疫応答で特有に起こる抗体の親和性の成熟は、V186.2 遺伝子の体細胞突然変異を解析することで親和性との関係が明らかにされ、親

和性の成熟を観察研究する上で古くから知られている有用な系である。この他に抗 NP 抗体は、J558(V186.2 群)ファミリーの V23、V124、及び J558 ならびに DH 遺伝子の DQ52 及び DFL16.2 といった、VH や VD 遺伝子の使用も観察される(Weiss and Rajewsky, 1990; Gu et al., 1991; Jacob and Kelsoe, 1992; McHeyzer-Williams et al., 1993)。体細胞突然変異における親和性の上昇は、相補性決定領域(complementarity determining region : CDR)の CDR1 と CDR2 に高頻度に変異が入ることで起こる。V186.2 においては、CDR1 の 33 番目のアミノ酸残基が Trp から Leu へ変異することで Germline 抗体と比較して親和性が 10~100 倍程度高くなることが知られており、この位置をホットスポットと呼ばれている。この変異の特徴としては、V186.2-DH 接合の境界に相当する 95 番目 (Kabat et al., 1991; Hofle et al., 2000) のアミノ酸残基が Tyr (以後 Tyr95 型)であることが明らかになっている(Furukawa et al., 1999)。また SHM の蓄積によって、Germline 抗体より最終的に 1000~10000 倍も抗原への親和性を高まることが分かっており、ここでは CDR1 の 33 番目のアミノ酸残基の変異はなく、95 番目のアミノ酸残基が Gly となることに加えて(Gly95 型)100 番目のアミノ酸残基が His (この研究では Gly95(H)型) となることが Furukawa et al. (1999)によって明らかにされている (図 2 A)。

一方、抗体遺伝子のリアレンジメントにより決まる V186.2 と DH の 95 番目(CDR3)は、抗体の親和性に変化をもたらすことが分かっている。Murakami et al. (2010) は 95 番目のアミノ酸を 20 種類の異なったアミノ酸に置換し抗体の親和性を測る実験をおこない、抗体の初期親和性だけでなく、SHM 後に得られる親和性にも大きな影響を及ぼすことを実証した。

IgM 記憶 B 細胞

高親和性抗体を発現する B 細胞の出現は、胚中心内で体細胞高頻度突然変異の誘導及び親和性の成熟に依存する。B 細胞はクラススイッチをせず胚中心に入り、IgM⁺ 記憶 B 細胞 (Shinall et al., 2000; Dogan et al., 2009) に分化することができるが、これらの細胞が実際に高親和性の VH を有するか否かいまだ議論できていない。実際、Pape et al. (2007) らは、IgM⁺ 記憶 B 細胞が IgG⁺ 記憶 B 細胞に比べて劣った親和性成熟を示したと報告した。

従来、記憶 B 細胞はクラススイッチした BCR と体細胞高頻度突然変異の蓄積

がマーカーとして考えられており、IgG⁺ B 細胞では体細胞高頻度突然変異が頻繁に確認されるものの IgM⁺ B 細胞では発見されてこなかったことから IgM⁺ 記憶 B 細胞は親和性の成熟が起こらないと考えられてきた。しかしながら、近年、Jenkins のグループ (Pape et al., 2011) により頻度は低いものの IgM⁺ の VH に体細胞高頻度突然変異が入る記憶 B 細胞の存在が報告された。一方、血中に産生される IgM 抗体が低い親和性を保っている報告もあり (Murakami et al., 2015)、液性免疫応答における IgM⁺ 記憶 B 細胞の形成機構や VH の親和性、さらに抗体産生細胞から分泌される IgM 抗体や IgG⁺ 記憶 B 細胞との関係についてはいまだ不明な点が多く残されている。本研究は、IgM⁺ 胚中心 B 細胞及び記憶 B 細胞において親和性の成熟が起こっているのかを明らかにすることを目的とする。

方法

NP 複合体タンパク及び抗 NP 抗体

ハプテンである(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetic acid (NP) を Dimethyl Sulphoxid (DMSO) (Wako, Osaka, Japan)で溶解し、Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Wako)と N-Hydroxysuccinimide ester (OSu) (WAKO)を混合し、室温で 1~2 時間反応させ、NP をサクシイミド化した(NP-OSu)。NP-OSu を 0.1M 炭酸水素ナトリウムバッファーに溶解した CGG (Wako) 又は APC (FAR EAST BIO-TEC)に結合させ、過剰な NP-OSu や副生成物を Sephadex G-25 column(GE Healthcare)に通し、又は、透析することで取り除き、PBS へ置換した (Azuma et al., 1987)。CGG 当たりの NP のモル比は、NP について 430nm の OD および CGG について 280nm の OD を使用して計算し、下付き文字 (例えば、NP₄₀-CGG) として表した。NP-APC は、Nishimura et al. (2011) によって樹立したものをを使用した。NP の価数測定は、APC による吸収が強く測定の妨げになるため、NP-OSu のモル比に基づいて、NP_{med}-APC 及び NP_{hi}-APC と区別した。抗 NP 抗体を産生するハイブリドーマ、B2 は当研究室にて樹立し (Azuma et al., 1987)、N1G9 は K. Rajewsky 博士によって提供された。

マウスと免疫

6 - 10 週齢の雌の野生型 C57BL / 6 (B6)マウス (日本クレア) を購入し、東京理科大学 生命医科学研究所内部にある無菌環境下の動物飼育施設で飼育した。AID 欠損マウスは、本庶博士によって提供された。NP₄₀-CGG を AlK(SO₄)₂ に吸着させて Alum 化し B6 マウスの腹腔内に 100 μ g 投与した。二次免疫応答においては、49 日目に PBS 中の NP₄₀-CGG を 100 μ g 腹腔内に投与した。

フローサイトメトリー

マウスの脾臓を摘出し単一細胞の懸濁液に調製し、5mM EDTA PBS 溶液で処理し、細胞内の非内在性 IgM 抗体の B 細胞への結合を減少させた。細胞は 3×10^7 を FACS 緩衝液 (1%BSA PBS) で懸濁し氷上で反応させた。NP-APC を 1 時間反応させた後、次の抗体を実験に応じて 30 分間染色した。FACS

CantoII (BD Biosciences)を用いた解析 : rat anti-mouse CD16/CD32 (2.4G2, BD Pharmingen), rat anti-mouse Igλ1-Biotin (R11-153, BD Pharmingen), rat anti-mouse CD45R/B220-PE-Cy7 (RA3-6B2, BD Pharmingen), rat anti-mouse GL7-FITC(GL7, BD Pharmingen), rat anti-mouse IgG1-PE (A85-1, BD Pharmingen), rat anti-mouse IgM-PerCP/Cy5.5 (RMM-1, BioLegend), and Streptavidin-eFluor450 (eBioscience). FACS Aria II (BD Biosciences) を用いた細胞分離 : rat anti-mouse CD16/CD32 (2.4G2, BD Pharmingen), rat anti-mouse Igλ1-Biotin (R11-153, BD Pharmingen), rat anti-mouse CD45R/B220-PE-Cy7 (RA3-6B2, BD Pharmingen), rat anti-mouse GL7-FITC (GL7, BD Pharmingen), and Streptavidin- PE (eBioscience)。データは、Diva (BD Biosciences) ソフトウェアを使用して測定、取得し、FlowJo ソフトウェア (Tree Star) を用いて解析した。

cDNA 合成およびシーケンシング

200μl の TRIzol (Invitrogen) を分注したチューブに細胞を直接回収した。その後、TRIzol 試薬添付プロトコールに従って Total RNA の分離と精製を行った。得られた total RNA を鋳型とし、Oligo(dT) primer と逆転写酵素 Prime Script Reverse Transcriptase (Takara)を用いて cDNA の合成を行った。PCR による抗 NP 抗体の可変領域遺伝子の増幅は Prime STAR HS DNA ポリメラーゼ (Takara)と、以下のプライマーを用いて 35 サイクルで行った。

Vh186.2-F2: F 5'-tctagaattcaggtccaactgcagcagcc-3';

CH-mu-cloning-R1: R 5'-ggccaccagattcttatcagacaggg-3';

Mus-Cgamma1-CH1-R: R 5'-ggaaatagcccttgaccag-3 '

増幅断片は、1.5%アガロースゲル電気泳動で分離してから切り出し Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega)を用いて DNA を精製した。精製した DNA は、pBlueScriptII SK(+) に EcoRV で切断したプラスミドに Ligation High II (TAKARA)を用いてライゲーションを行い、コンピテントセル DH10B にエレクトロポレーションで遺伝子導入を行い、アンピシリンを含む LB アガロースプレートにてセレクションを行った。次に、プラスミドがインサートされた大腸菌にアンピシリンを含む LB 培地で培養したのち、EZ-10 Spin Colum

Plasmid DNA Kit (BIO BASIC, Inc) で精製し、これをテンプレートとして GenomeLab DTCS-Quick start kit (BECMAN COULTER)を用いて塩基配列決定用 PCR 反応を行い Beckman Coulter ACE-2000XLE sequencer で配列を決定した。配列データは、NCBI/IGBLAST で解析をし、日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録した (アクセッション番号 : AB854753- AB855646)。

SHM assay

NP に結合する B 細胞をフローサイトメトリーで分離した後、cDNA を調製し、V/C μ 又は V/C γ 遺伝子にハイブリダイズしたプライマーを用いて RT-PCR により増幅した。C μ 及び C γ プライマーはそれぞれ IgM 及び IgG1, 2b、2c、H 鎖遺伝子特異的にハイブリダイズし、VH プライマーは V186.2 及びその類似体 V23、J558.55、J558.67.1、V124 にハイブリダイズした (Weiss and Rajewsky 1990)。得られた VH 遺伝子配列を V186.2⁺及びその他を Vanalog⁺に分けた。V186.2 配列は、95 番目のアミノ酸に基づいて Tyr95、Gly95 (H) 又は X95 にさらに細分され、X95 は Phe、Ser、Ala、又は Gly (His100 を含まない) など、他のアミノ酸が含まれる。

AID及びスイッチサークルトランスクリプト (γ 1CT) の検出

回収した細胞をcDNAの合成し、Ex-Taq-HSポリメラーゼ (Takara Bio) を用いてPCRを行った。以下のPCRプライマーを使用した。

Actin: F 5'-gtggggcgccccaggcacca-3'

Actin: R 5'-ctccttaatgtcacgcacgattt-3'

AID: F 5'-gttctctacgctacatctc-3'

AID: R 5'-atcacgtgtgacattccaggag-3'。

γ 1CT 第1の増幅

I γ 1: F 5'-ggccctccagatctttgag-3'

C μ : R 5'-aatggtgctgggcaggaagt-3'

γ 1CT 第2の増幅ネステッドPCR

C μ int: R 5'-ccatggccaccagattctta-3'

I γ 1int: F 5'-catcctatcacgggagattg-3'。

増幅条件は以下の通りであった：95°C/2分変性;96°C/30秒、55°C/30秒、68°C/1分、30サイクル。γ1CTの産生は、上記のヌクレオチド配列決定によって確認した。

結果

抗 NP 抗体の親和性をフローサイトメトリーによって識別するシステム

本実験では、Nishimura et al. (2011)によって樹立されたフローサイトメトリーによって抗 NP 抗体の親和性の違いを識別するシステムを用いる。親和性が確立している抗 NP 抗体を産生するハイブリドーマの μ heavy chain と $\lambda 1$ light chain の遺伝子をマウス B cell lymphoma K46 細胞にトランスフェクトし細胞表面上に発現させた。ハイブリドーマクローンの N1G9 ($K_a, 5.5 \times 10^5 M^{-1}$)は V186.2 の体細胞高頻度突然変異の蓄積がない Germline で Tyr95 型であり、同じくクローンの B2 ($K_a, 3.4 \times 10^6 M^{-1}$)は CDR1 33 番目のアミノ酸残基が Trp から Leu に変異したホットスポットがある Tyr95 型で N1G9 より親和性が 10 倍高いことが明らかになっている (図 2 A)。細胞表面上に発現させた K46N1G9 μ 細胞と K46B2 μ 細胞を NP に対する結合能力を識別する NP_{hi}-APC、NP_{med}-APC にそれぞれ反応させフローサイトメトリーで検出したところ、NP_{hi}-APC は、K46N1G9 μ 細胞、K46B2 μ 細胞に結合し、NP_{med}-APC は K46N1G9 μ 細胞には結合しないものの K46B2 μ 細胞に結合することが明らかになった (Nishimura et al., 2011)。これらの結果は NP_{hi}-APC は Germline の親和性を認識し、NP_{med}-APC はこれより 10 倍以上高い親和性を認識することを示している (図 2 B)。

IgM⁺ B 細胞の体細胞高頻度突然変異は IgG⁺ B 細胞と同様に胚中心内で誘導される

T 細胞依存性抗原 NP₄₀-CGG を Alum と共に B6 マウスに免疫し、脾臓よりリンパ球を得た。次に NP-APC に結合し B220 及び $\lambda 1$ Light chain が発現している B 細胞を選別し、GL-7 を胚中心マーカーとしてフローサイトメトリーによって解析をおこなった (図 3 A)。NP_{hi}-APC に結合する B 細胞は 2 つの集団として NP_{hi}^{bright} と NP_{hi}^{dull} が存在する。蛍光強度が高くなる NP_{hi}^{bright} B 細胞は K46N1G9 μ より高いか同等の親和性を持ち、NP_{hi}^{dull} B 細胞の分画は、K46N1G9 μ 細胞より低い親和性を持つと考えられた。K46N1G9 μ 細胞は、単一 BCR を発現する細胞であるため NP_{hi}^{bright}、NP_{hi}^{dull} ゲートに対応するような分画は存在しない (図 2 B)。NP_{hi}^{bright}、NP_{hi}^{dull} 集団それぞれの分画に分取し RT-PCR に

よって cDNA を作製し、V186.2 及びその類縁体（以降、V186.2 以外の J558 ファミリー遺伝子群を Vanalog と呼ぶ）とハイブリダイズするプライマーを用いて遺伝子解析をおこなった。NP_{med}-APC は、K46B2 μ 以上に高い親和性を持つ VH に結合するが、この高親和性 B 細胞の NP_{med}^{dull} に対応する集団からは遺伝子が増幅しなかったため NP_{med}^{bright} のみとした（以降 NP_{med} と表記）。また NP が付加していない APC (NP₀) に結合する B 細胞は観察されなかった（データ未掲載）。

免疫後 7、14、28、及び42日目のGL7⁺B220⁺ 及びIg λ 1⁺B細胞におけるNP_{hi}-APCに結合するV186.2⁺ IgM⁺ cDNA , 157クローン (NP_{hi}^{bright} : 95、 NP_{hi}^{dull} : 62) , V186.2⁺ IgG⁺ cDNA, 156クローン (NP_{hi}^{bright} : 113、 NP_{hi}^{dull} : 43) の体細胞高頻度突然変異 (Somatic Hypermutation: SHM) を調べた (図 3 B, C) 。 NP_{hi}-APCに結合するGL7⁺ IgM⁺ B細胞はVH領域にてSHMを起こし、その頻度は免疫後とともに増加した (図 3 B) 。 7日目には、IgM⁺ B細胞の30%が突然変異を有しており、SHM誘導のための機構が早期の時点で活性化しており、14日目では、90%以上に増加していることを示した。同様にGL7⁺ IgG⁺ B細胞も7日目にSHMを起こしており (図 3 C) 、クラススイッチがSHM誘導前に起こり、SHM⁻ 細胞がプレ胚中心B細胞あるいは胚中心B細胞のいずれかであることを示唆する結果となった。基本的に、全てのGL7⁺ B細胞は14日目までにSHMが入っており、突然変異の頻度は時間依存的に増加した (Takahashi et al., 1998; Nishimura et al., 2011) 。また、NP_{hi}^{bright}とNP_{hi}^{dull} B細胞の間でSHMの頻度に有意差がないことを見出した。

SHM誘導の動的な変化は、IgM⁺ 及びIgG⁺ B細胞において本質的に同じであった。 SHMの頻度は時間とともに増加し、42日目までに全てのV186.2⁺ 胚中心B細胞がSHMを獲得し、このことからGL7⁺はV186.2⁺ B細胞の胚中心に存在しているマーカーとして使用できることを示唆した。全てのV186.2⁺胚中心B細胞は、免疫後14日目にSHMが入っており、V186.2⁺ IgM⁺ B細胞が42日という期間においてクラススイッチを起こさず高い頻度でSHMや胚中心を形成していたことは、驚くべきことであった。また、NPに対する免疫応答に新たに補充されたナイーブIgM B細胞の流入はなかった。しかしSHM⁺ 記憶B細胞の胚中心への再移入が起こっている可能性は考えられる (図 3 B及びC) 。

次に、高親和性NP_{med}-APCに結合する胚中心B細胞の分析をおこなった(図3D及びE)。7日目ではほとんど確認できなかったが、14日後のIgM⁺及びIgG⁺B細胞の両方に現れており、親和性成熟はクラススイッチとは別であることを示唆した。NP_{med}-APCに結合することができる全てのB細胞はV186.2によってコードされたものであり、Vanalogによってコードされたものは確認されなかった。

Vanalog⁺B細胞におけるSHMの頻度は、V186.2⁺B細胞よりも低い

NP_{hi}-APCに結合したB細胞のcDNA遺伝子解析により、V186.2遺伝子の類似体であるVanalog⁺B細胞がIgG⁺GL7⁺分画よりもIgM⁺GL7⁺分画に多く存在することが明らかとなった(図4A及びB)。さらに、Vanalog⁺BCRを有するIgM⁺B細胞は、低親和性NP_{hi}^{dull}フローサイトメトリーゲートで頻繁に観察された(Dal Porto et al., 2002)(図4B)。興味深いことに、Vanalog⁺B細胞は、免疫後の時点とは無関係に検出され続け、胚中心内において低い親和性にもかかわらずVanalog⁺B細胞を除去されなかったことを示した(図4A)。

次に、GL7⁺B細胞のVanalog⁺におけるSHMの頻度を調べた。V186.2⁺の大部分がSHM⁺である条件下で、Vanalog⁺IgM⁺の約50%がSHMを含まないままであり(図4C)、SHMは胚中心内のB細胞の必須プロセスではないことを示唆した。SHMの誘導はBCR親和性に依存し、SHM⁻Vanalog⁺はこの親和性閾値に達しなかったと考えられる。

CSRは、胚中心形成前の段階で誘導される

図3Bに示すように、免疫後42日目においてもSHM⁺V186.2⁺IgM⁺B細胞は胚中心内に存在したが、7日目には多数のSHM⁻V186.2⁺IgG⁺胚中心B細胞が存在した(図3C)。これらの結果より、SHMの誘導前にクラススイッチが始まることが示唆されたことから、NP_{hi}-APCに結合(NP_{hi}^{bright}+NP_{hi}^{dull}ゲート)B220⁺Igλ1⁺IgM⁺及びIgG1⁺B細胞の頻度における時間依存的変化をフローサイトメトリーにより測定した(図5A)。この解析により、3日目にNP特異的なIgM⁺B細胞が検出され、NP特異的なIgG1⁺B細胞との割合は時間とともに低下し、NP特異的なIgG1⁺B細胞が増加し始めた7日目に急激に低下した(図5B)。この結果は、3日目の時点でクラススイッチが誘導されたことを示唆しており、これま

での知見と同様の結果となった (Pape et al., 2003; Chan et al., 2009)。しかしながら胚中心活性の変化を反映するNP特異的なGL7⁺/GL7⁻ B細胞の比率は、14日目にピークとなり、その後徐々に減少した (図 5 C)。これらの結果は、胚中心の反応が最大に達する前にクラススイッチが完了したことを示唆する結果となった。次に胚中心が形成された7日目以降のNP特異的なIg λ1⁺ GL7⁻ B細胞のBCRアイソタイプを調べたところ、IgM⁺ B細胞 (60 - 70%) を主に存在し、IgG1⁺ B細胞はマイナーな分画 (10 - 20%) であり最小の時間依存的変化を伴うものであった (図 5 D)。対照的に、NP特異的なIg λ1⁺ GL7⁺ B細胞は7日目においても大部分がIgG1を発現し、IgM⁺ B細胞はマイナー分画 (10 - 20%) であった。この場合もやはり、いずれのアイソタイプにおいても時間依存的変化は最小限であった (図 5 E)。これらの結果は、IgG1⁺ 胚中心B細胞の優性が、胚中心におけるクラススイッチの誘導によるものではなく、IgM⁺ B細胞の胚中心への侵入を制限していることを示唆していると考えられる。

この時間依存的に変化するSHMの平均とNP特異的なIg λ1⁺ IgG1⁺ / IgM⁺胚中心B細胞の割合を比較すると、図 3 B, CよりV186.2⁺ SHMは胚中心内のIgM⁺ 及びIgG⁺ B細胞の両方で28日まで同じ割合で活発に誘導されており (図 6 A)、また図 5 EよりNP特異的なIg λ1⁺ 胚中心B細胞はIgG1⁺とIgM⁺が約5対1で相対的に一定のまま維持していた (図 6 B)。これらの結果は、胚中心内でIgMからのクラススイッチが抑制されているとともに、クラススイッチ及びSHMが共にAIDによって触媒されているものの、同時に誘導されないことを示す結果となった。

次にクラススイッチが誘導される時点のより正確な情報を得るために、IgG⁺ B細胞におけるγ1環状DNA (γ1CT) 転写物を検出することを試みた。これはクラススイッチが起こっていることを示す厳密なマーカーであるが、環状DNAよりもクラススイッチ時の発現が低く検出しにくいことが知られている (Kinoshita et al., 2001)。今回、検証をおこなったB細胞集団のフローサイトメトリーデータを図 6 Cで示した。ネガティブコントロールとして、AID欠損マウス由来のIgM⁺ B細胞及び未免疫マウス由来のナイーブIgM⁺ B細胞, IgG⁺ B細胞、クラススイッチが起こることが予期される免疫後5日目のマウス由来のNP⁺ IgM⁺ B細胞, IgG⁺ B細胞、及び免疫後5日目又は7日目のマウス由来のIg λ1⁺ IgG⁺ B細胞、さらには胚

中心が最大に達した14日目のGL7⁺ Fas⁺の細胞を単離しcDNAサンプルを作製した。AID転写物は容易に検出されたが（図6D中段）、B細胞によるcDNAから γ 1CTを検出することができなかった。したがって、ネステッドPCR（Ueda et al., 2007）を用いてさらに遺伝子の増幅を試みたところ、免疫後5日目のNP⁺ IgG⁺ B細胞、免疫後5日目及び7日目のIg λ 1⁺ IgG⁺ B細胞で γ 1CTを検出したが、5日目のNP⁺ IgM⁺ B細胞とネガティブコントロールの非免疫とAID欠損マウスでは検出されなかった（図6D）。このことからクラススイッチは、プレ胚中心B細胞の段階で誘導されたことが示唆された。 γ 1CTは14日目の胚中心B細胞でも検出されたが、これについて胚中心B細胞によって合成されたものか、あるいはプレ胚中心B細胞で合成されたかは不明であるが、この結果はPeakman and Maizels (1998)によって得られたものと一致している。この実験は2日目から12日目までの遺伝子転写物をT細胞エリア及び胚中心を囲む領域をin situハイブリダイゼーションによって観察した。

IgM⁺ 記憶B細胞は、胚中心依存性および非依存性の経路を介して生成される

次に記憶B細胞の解析を行った。SHM⁺ GL7⁻ NP 特異的 IgM⁺ B細胞は時間と共に増加し、28日目に最大~30%に達した。しかし、大部分にSHMが起らない細胞が残り、GL7⁻ IgM⁺ B細胞の70%以上が42日目においてもSHMを有していなかった（図7A）。もし全て胚中心B細胞から移ってきた記憶B細胞であれば、全ての細胞にSHMが誘導されているはずである、またナイーブB細胞が混ざっている可能性の点では、非免疫マウスではNP_{hi}-APC結合B細胞は観察されない（データ未掲載）ことから、どちらの可能性も当てはまらない。従ってこの結果からGL7⁻ B細胞は、SHMの有無による2つの記憶B細胞の集団からなりSHM⁺ B細胞が胚中心依存性経路を介して生成された記憶B細胞（以後Germinal Center Memory B cell : MBC^{GC}と略す）に対応し、SHM⁻ B細胞は胚中心を経由しない経路で形成された記憶B細胞に対応すると考えられる（以後Extra Memory B cell : MBC^{ext}と略す）。このMBC^{GC}に比べてMBC^{ext}が過剰に出現することがIgM⁺記憶B細胞の親和性の成熟をこれまで不明瞭にしていたと考えられる。次に、NP_{med}-APCを用いてGL7⁻コンパートメント中のNP_{med}-APCに結合する高親和性成熟IgM⁺記憶B細胞を検索した。その結果、

NP_{med} GL7⁻ B細胞はすべて V186.2 遺伝子を使用し SHM を有しているのを確認した (図 7 C)。

次に、NP_{hi}-APCに結合するIgG⁺ GL7⁻ B細胞におけるSHMを分析したところ、42日目までSHMの頻度が時間依存的に増加していることが明らかにした (図 7 B)。また、NP_{hi}-APCに結合するSHM⁻ IgG⁺ B細胞は7日目をピークに減少し42日目では確認されなかった。このことからGL7⁻の分画は、IgG⁺ MBC^{ext}は殆ど存在せず、プレ胚中心B細胞から胚中心を介して記憶B細胞への変化を反映している (Coffey et al., 2009)。またNP_{med}-APCでは、IgM⁺と同様に、高親和性親和性成熟IgG⁺記憶B細胞を同定することができた (図 7 D)。

B細胞運命を決定する初期BCRの親和性の影響

これまでの結果より抗体のアイソタイプとSHMに基づいて分類された3種類の記憶B細胞、IgG⁺ MBC^{GC}、IgM⁺ MBC^{GC}、及びIgM⁺ MBC^{ext}を同定することができたことから、95番目のアミノ酸とこれらの記憶B細胞の間には何らかの関係があるかどうかを調べた。SHMを有さないプレ胚中心B細胞による混入を排除するために、IgM⁺ SHM⁻ プレ胚中心B細胞がほとんど存在しない28日目及び42日目のB細胞を分析した (図 8)。GL7⁻ V186.2⁺ IgM⁺ B細胞は、SHMに基づいてMBC^{ext}又はMBC^{GC}に区別した。その結果、V186.2⁺ IgM⁺ MBC^{ext}におけるNP_{hi}^{bright} ではTyr95型 B細胞が大部分であり、NP_{hi}^{dull} ではX95型 B細胞 (P_(fisher) = 0.002) が優位であること、また前者のB細胞が後者よりも高い親和性BCRを有することをが分かった。またNP_{hi}^{dull}ゲートでは、Vanalog⁺ IgM⁺ GL7⁺ B細胞の分布が観察されており (図 4)、IgM⁺記憶B細胞の中でVanalog⁺ やV186.2⁺ X95型などのBCRの親和性の低いB細胞が豊富であることが示唆された。次に、V186.2⁺ IgG⁺ MBC^{GC}においてはNP_{hi}^{bright}とNP_{hi}^{dull}ゲートでどちらも優位にTyr95型でありゲートによる違いは見られなかったことから優位に親和性の高いことを示した。V186.2⁺ IgG⁺ MBC^{ext}は、NP_{hi}^{bright}とNP_{hi}^{dull} 合わせて3つのクローンしか得られなかったため、図としては示したが評価はしなかった。

二次免疫後の記憶B細胞の分析

NP₄₀-CGG免疫化マウスを49日目に追加免疫し7日目に結合する NP_{hi}^{bright}及びNP_{hi}^{dull}ゲート中のGL7⁻ B細胞からSHM⁻ 及びSHM⁺ IgM⁺ B細胞を検出した。SHM⁻ V186.2⁺ B細胞の頻度は、MBC^{ext}が免疫前の42日目で72%存在していたが、追加免疫後32%に減少しており、MBC^{ext}が再刺激後に胚中心に入りMBC^{GC}になったことを示唆する結果となった。一次免疫でも観察されたように、NP_{med}-APCに結合したIgM⁺及びIgG⁺ 記憶B細胞は全てV186.2⁺ SHM⁺であった（図9 A）。一方、NP_{hi}-APCに結合するIgM⁺ B細胞のVHはV186.2及びV_{analog}によってコードされていた。V_{analog}を用いたこれらの細胞の頻度は23%であり（図9 B）一次免疫応答と似た結果となった。IgG⁺ B細胞のVHは、V186.2遺伝子だけであった。したがってこれらの記憶B細胞は、長期生存型 SHM⁺記憶B細胞として生存している可能性が高い。

免疫応答における記憶B細胞形成の流れ

以上のことから、IgG⁺ B細胞はすでに胚中心を形成する前にクラススイッチを完了し、胚中心B細胞へ移行した後のクラススイッチは抑制していることが示された。また、IgM⁺ 記憶B細胞においては、クラススイッチが達成した後に胚中心に入りSHMを起こすも記憶B細胞（MBC^{GC}）と胚中心に入らずSHMを起こさない記憶B細胞（MBC^{ext}）の2つの記憶B細胞集団を残すことで、次への免疫応答に対応できるようなシステムを形成していると考えられる。一方、IgG⁺ B細胞においてはMBC^{ext}が、胚中心の形成とともに消失していることからほとんど存在していないと考えられる。以上の結果を総合すると、IgM⁺ MBCが、IgG⁺ MBCとは免疫応答において、異なった記憶形成を担っている可能性が考えられる（図10）。

考察

本実験において、NPに結合するB細胞のVHレパートリーの多様性が、V186.2/J558ファミリー遺伝子群 (Vanalog) によって構成されるという古典的な知見を確認した (Weiss and Rajewsky, 1990; Gu., 1991; Jacob and Kelsoe, 1992; McHeyzer-Williams, 1993; Dal Porto, 1998, 2002; Anderson, 2009)。またV-D接合部に対応する95番目の多様なアミノ酸が親和性の成熟やB細胞の運命に結びつくことも見出した。我々は以前V-D接合部の違いが、VHの親和性の変化に寄与すること、そしてVHの親和性に基づくNP特異的B細胞を順位付けすることで、Vanalog⁺ やV186.2⁺ X95型よりV186.2⁺ Tyr95, Gly95(H)型が高い親和性を有することを明らかにした。さらに、NP_{med}-APCは、V186.2⁺ B細胞のみ選択されSHMに起因してBCRの親和性が増大したもののみが結合すること、そしてT細胞依存性抗原NP₄₀-CGGによる免疫後にV186.2⁺ IgM⁺ B細胞の親和性成熟がV186.2⁺ IgG⁺ B細胞の親和性成熟と同様に進行することを示した。この実験における最も顕著な知見の1つは、NP特異的IgG⁺ 及びIgM⁺ B細胞の両方が、免疫応答を通じてほぼ5対1の割合で胚中心に存在し、同様の頻度および動態でSHMを獲得していたことであった (図 6 A, B)。一定比でのIgM⁺ 及びIgG⁺ 胚中心B細胞の両方の発生は、SRBCを免疫したマウスの解析で報告されている (Shinall., 2000)。これらの著者は、新しいIgM⁺ B細胞の胚中心への流入および胚中心からのIgG⁺ B細胞の流出が一定のIgG⁺とIgM⁺ 比を維持する「定常状態モデル」を提案した。しかし、本実験では、V186.2⁺ IgM⁺ 及びIgG⁺ 胚中心B細胞は、14日後にすべてSHMを示しており (図 3 B及びC)、このような連続的な流入/流出モデルを説明することができない。また、14日目以降も突然変異を蓄積し続け、SHM⁻ B細胞が消失することから、新しいNP特異的IgM⁺ B細胞は胚中心に入っていないことが示された。以上のことから胚中心の形成の前にクラススイッチが起こったと考え、V186.2⁺ IgM⁺ 及びIgG⁺ B細胞が胚中心に入りSHMが誘導されるが、クラススイッチはダウンレギュレーションしていると考えた。この可能性は、免疫後3~5日目にクラススイッチがT細胞エリアで発生し、12日目に胚中心でダウンレギュレーションされているという知見に合致するものである (Peakman and Maizels., 1998; Jacob and Kelsoe., 1992; Pape et al., 2003; Chan et al., 2009)。しかし、一方で

Liu et al., (1996)らはPCRによる環状DNAおよびgermline転写物の検出によって、ヒト扁桃胚中心においてSHMがIgM⁺ Centroblastを生じ、その後、Centrocytでクラススイッチが起こることを提案している。Liu et al. (1996)は、慢性的な感染や炎症反応によって外科的に除去した扁桃腺を用いており、無菌で免疫学的に静止している状態である実験室におけるマウスの脾臓を用いた実験とは比較対象とはならず更なる検討を必要とする。

胚中心B細胞において、全てのV186.2⁺ はSHMを受けIgM⁺とIgG⁺との間に有意差がないことを示した。このことから、重鎖 μ および γ 細胞内尾部の構造的差異が、SHM及び抗原選択にほとんど影響しないことを示唆している(Kaisho et al., 1997; Weiser et al., 1997; Wakabayashi et al., 2002; Kometani et al., 2013)。しかしながら、IgM⁺ 記憶B細胞におけるSHMの頻度は、IgG⁺ 記憶B細胞で観察されたものよりもはるかに低いことが以前より報告されている (Dogan., 2009; Pape., 2011; Taylor., 2012)。これは、解析されているIgM⁺ B細胞が、IgG⁺ B細胞よりも低い親和性であることに起因している可能性がある。事実、IgG⁺ 胚中心B細胞分画よりも多くのV_{analog}⁺ IgM⁺ B細胞が観察されたが、胚中心への侵入を達成した半数しかSHMを獲得しなかった。このV_{analog}⁺ IgM⁺ B細胞におけるクラススイッチ、及びSHMの欠如は、BCR親和性がAID活性化に必要な閾値以下であったため、AIDがこれらのB細胞において不活性であることを示唆している。したがって低親和性BCRを有するB細胞は、IgM⁺ B細胞エリアに留まる傾向があり、このことからIgG⁺ B細胞と比較してSHMが低い頻度であり、またBCRの親和性が低いという点で説明することができる。一方、V186.2⁺ IgM⁺ 胚中心B細胞ではSHMがほぼ100%誘導されたにもかかわらず、V186.2⁺ IgM⁺ 記憶B細胞では、多数のSHM⁻ 非胚中心B細胞を見出した。これらのB細胞は未免疫マウスでは観察されていなかったことから、胚中心非依存性経路を介して生成された記憶B細胞であると説明される(Dogan et al., 2009; Pape et al., 2011; Taylor et al., 2012)。このモデルに基づいてIgM⁺ B細胞の1つのグループは、胚中心への進入を獲得し、親和性の成熟を経てMBC^{GC}になり、またもう1つのIgM⁺ SHM⁻ B細胞のグループは胚中心に入らず代わりにMBC^{ext}になることが示唆された。後者の存在は、圧倒的に多くまたSHM⁻ 及び低い親和性を有していた。そしてNP_{med}-APCを用いることによりこのIgM⁺記憶B細胞集団に存在する比較的少ない高親和性V186.2⁺

IgM⁺ SHM⁺記憶B細胞を単離することができた。また、28日目のGL7⁻ V186.2⁺ IgG⁺ B細胞集団の中のSHM⁻ 細胞の相対的頻度がわずか8%であったという事実から判断すると、IgG⁺ MBC^{ext}はまれであると考えられる(Kaji et al., 2012)。高親和性IgM⁺ 記憶B細胞の生理的な意味は、本実験では明らかにできなかったが、クラススイッチを起こした記憶B細胞と比較してIgM⁺ 記憶B細胞は長寿命とされていることから、2次免疫応答において必要なアイソタイプにスイッチするための備えを果たしていると考えられる(Pape et al., 2011)。

7日目のGL7⁻ 分画におけるNP特異的なIgλ1⁺IgM⁺B細胞の存在は、NP特異的なIgλ1⁺IgG⁺B細胞の3倍以上であったが(図5D)、GL7⁺分画では、NP特異的なIgλ1⁺IgG⁺B細胞が優勢で約5倍であった(図5E)。このことから免疫後NP特異的なIgλ1⁺IgM⁺とIgG⁺B細胞では、胚中心へのB細胞が入るためのチェックポイントがあり、限られた数のIgM⁺B細胞のみ入ることが許されていると考えられる。しかし、Vanalog⁺IgM⁺B細胞が、胚中心内において頻繁に観察されたことから最初のチェックポイントはBCRの親和性とは考えられない。しかしNP_{hi}-APCに結合するIgG⁺胚中心B細胞ではまれであったことから(図4B)。NP_{hi}-APCに結合するIgM⁺及びIgG⁺胚中心B細胞の間のVanalog⁺B細胞の頻度の差は、胚中心に入るための選択によるものではなく、むしろクラススイッチに必要な親和性の閾値によるものであり、V186.2⁺の親和性と同等の親和性は、AIDのクラススイッチ活性の誘導に必要であると考えられる。

BCR親和性とB細胞の運命との関係は、ノックイン又はトランスジェニックマウスを用いて広範に研究されている(Dal Porto., 2002; Shih., 2002; Chanら、2009)。B細胞の運命は、Bcl6による胚中心B細胞の形成及びBlimp-1による抗体産生細胞への分化にそれぞれ重要な因子として決定されるが(Shapiro-Shelef., 2003; Kallies., 2004; Crotty., 2010)、本研究において、これらの因子の発現に関するデータ解析はおこなっていない。しかしながら、野生型マウスにおいてクラススイッチ及びSHMの両方で、V186.2⁺を有するB細胞が効率的に記憶B細胞を誘導されることを見出した(図7)。特に初期の親和性によるクラススイッチはAIDによる触媒と密接に関連していることを示唆した。しかしながら、高い親和性を有するV186.2⁺ Tyr95, Gly95(H)型B細胞及び低い親和性を有するVanalog⁺B細胞

は、クラススイッチなしでMBC^{ext}として保存されたことも明らかであった。そのような高親和性B細胞をMBC^{ext}として保存する機構は、いまだ明らかにされていない (Schwickert et al., 2011)。

AIDは、遺伝子の不安定性を誘発し、時には染色体の転座および癌遺伝子の突然変異を引き起こす (Shen et al., 1998; Pasqualucci et al., 2001)。その活性は、mRNAの安定性、核の分解、核の輸出、及びリン酸化 (Nagaoka et al., 2010) といった制限された発現を含むいくつかのメカニズムによって厳密に制御されている。これらの機序の中で、リン酸化の調節が、AIDの機能に大きく寄与することが示唆されている (Basu et al., 2005)。本研究では、胚中心依存性経路を介してAID酵素活性がSHMではアップレギュレートされ、一方でクラススイッチはアップレギュレートされず、SHMに起因する高親和性のIgM⁺ 記憶B細胞が効率的に生成されることを示した。このことは、AIDの2つの重要なリン酸化活性、Ser 38とThr 140に寄与していることが示唆されるが、その制御機構は明らかではなく (McBride et al., 2008)。今後、胚中心B細胞におけるAIDのリン酸化状態を明らかにすることは重要であると考えられる。

謝辞

本研究の主論文を構成するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、安部良 教授、東隆親教授に深く感謝いたします。

また、論文を作成するにあたり、**High affinity IgM⁺ memory B cells are generated through a germinal center-dependent pathway. Molecular Immunology** (2015 年 12 月) について、東隆親教授、実験の指導及びサポートをしていただいた、村上明一先生、西村深雪先生、田代泰之先生、論文投稿にあたり清水健之先生、久保允人先生、**Peter D. Burrows** 先生には大変お世話になり厚く御礼申し上げます。

M-COPA suppresses endolysosomal Kit-Akt oncogenic signalling through inhibiting the secretory pathway in neoplastic mast cells. PLoS ONE (2017 年 4 月) について、安部良教授、実験の指導及びサポートをしていただきました、小幡裕希先生、堀川哲太様、実験材料を提供いただいた椎名勇先生及び研究室の皆様には大変お世話になり厚く御礼申し上げます。

最後に、生命科学研究科修士課程を卒業し 1999 年 4 月より共通機器の管理者として現在にいたりますが、これまでの間、研究の場や機会を与えていただいた、生命医科学研究所の皆様方に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Anderson, S.M., Khalil, A., Uduman, M., Hershberg, U., Louzoun, Y., Haberman, A.M., Kleinstein, S.H., Shlomchik, M.J., 2009. Taking advantage: high-affinity B cells in the germinal center have lower death rates, but similar rates of division, compared to low-affinity cells. *J. Immunol.* 183, 7314–7325.
- Azuma, T., Sakato, N., Fujio, H., 1987. Maturation of the immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl (NP) haptens in C57BL/6 mice. *Mol. Immunol.* 24, 287–296.
- Bassing, C. H., Swat, W., and Alt, F. W. 2002. The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination. *Cell.* 109:S45
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., Alt, F.W., 2005. The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438, 508–511.
- Benedict, C.L., Gilfillan, S., Thai, T.-H., Kearney, J.F., 2000. Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunol. Rev.* 175, 150–157.
- Blink, E.J., Light, A., Kallies, A., Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., 2005. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J. Exp. Med.* 201, 545–554.
- Bothwell, A.L.M., Paskind, M., Reth, M., Imanishi-Kari, T., Rajewsky, K., Baltimore, D., 1981. Heavy chain variable region contribution to the NPb family of antibodies: somatic mutation evident in a gamma 2a variable region. *Cell* 24, 625–637.
- Chan, T.D., Gatto, D., Wood, K., Camidge, T., Basten, A., Brink, R., 2009. Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J. Immunol.* 183, 3139–3149.
- Coffey, F., Alabyev, B., Manser, T., 2009. Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles. *Immunity* 30, 599–609.
- Crotty, S., Johnston, R.J., Schoenberger, S.P., 2010. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat. Immunol.* 11, 114–120.

- Cumano, A., Rajewsky, K., 1986. Clonal recruitment and somatic mutation in the generation of immunological memory to the hapten NP. *EMBO J.* 5, 2459–2468.
- Dal Porto, J.M., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J., Kelsoe, G., 1998. Antigen drives very low affinity B cells to become plasmablasts and enter germinal centers. *J. Immunol.* 161, 5373–5381.
- Dal Porto, J.M., Haberman, A.M., Kelsoe, G., Shlomchik, M.J., 2002. Very low affinity B cells form germinal centers, become memory B cells, and participate in secondary immune responses when higher affinity competition is reduced. *J. Exp. Med.* 195, 1215–1221.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Megret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., Weil, J.-C., 2009. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 10, 1292–1299.
- Furukawa, K., Akasako-Furukawa, A., Shirai, H., Nakamura, H., Azuma, T., 1999. Junctional amino acids determine the maturation pathway of an antibody. *Immunity* 11, 329–338.
- Gu, H., Tarlinton, D., Muller, W., Rajewsky, K., Forster, I., 1991. Most peripheral B cells in mice are ligand selected. *J. Exp. Med.* 173, 1357–1371.
- Ho, F., Lortan, J.E., MacLennan, I.C.M., Khan, M., 1986. Distinct short-lived and long-lived antibody producing cell populations. *Eur. J. Immunol.* 16, 1297–1301.
- Hofle, M., Linthicum, D.S., Ioerger, T., 2000. Analysis of diversity of nucleotide and amino acid distributions in the VD and DJ joining regions in Ig heavy chains. *Mol. Immunol.* 37, 827–835.
- Hozumi N, Tonegawa S. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73, 3628-32.
- Jacob, J., Kelsoe, G., 1992. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J. Exp. Med.* 176, 679–687.
- Kabat, E.A., Reed-Miller, M., Perry, H.M., Gottesman, K.S., 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Department of Health and Human Services, Public

- Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- Kaisho, T., Schwenk, F., Rajewsky, K., 1997. The roles of gamma 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* 276, 412–415.
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohra, O., Rajewsky, K., Takemori, T., 2012. Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J. Exp. Med.* 209, 2079–2097.
- Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D.M., Dietrich, W., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Nutt, S.L., 2004. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in Blimp-1 expression. *J. Exp. Med.* 200, 967–977.
- Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H., Haberman, A.M., 2011. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34, 947–960.
- Kinoshita, K., Harigai, M., Fagarasan, S., Muramatsu, M., Honjo, T., 2001. A hallmark of active class switch recombination: transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12620–12623.
- Kometani, K., Nakagawa, R., Shinnakasu, R., Kaji, T., Rybouchkin, A., Moriyama, S., Furukawa, K., Koseki, H., Takemori, T., Kurosaki, T., 2013. Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation. *Immunity* 39, 136–147.
- Liu, Y.J., Malisan, F., de Bouteiller, O., Guret, C., Lebecque, S., Banchereau, J., Mills, F.C., Max, E.E., Martinez-Valdez, H., 1996. Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity* 4, 241–250.
- Manz, R.A., Lohning, M., Cassese, G., Thiel, A., Radbruch, A., 1998. Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int. Immunol.* 10, 1703–1711.
- McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Schwickert, T.A., Chait, B.T., Nussenzweig, M.C., 2008. Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J. Exp. Med.* 205, 2585–2594.
- McHeyzer-Williams, M.G., McLean, M.J., Lalor, P.A., Nossal, G.J.V., 1993. Antigen-

- driven B cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 178, 295–307.
- Murakami, A., Takahashi, Y., Nishimura, M., Shimizu, T., Azuma, T., 2010. The amino acid residue at position 95 and the third CDR region in the H chain determine the ceiling affinity and the maturation pathway of an anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl antibody. *Mol. Immunol.* 48, 48–58.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.
- Nagaoka, H., Tran, T.H., Kobayashi, M., Aida, M., Honjo, T., 2010. Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity. *Int. Immunol.* 22, 227–235.
- Nishimura, M., Murakami, A., Hara, Y., Azuma, T., 2011. Characterization of memory B cells responsible for affinity maturation of anti- (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl (NP) antibodies. *Int. Immunol.* 23, 271–285.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O’Garra, A., Cahalan, M.D., Cyster, J.G., 2005. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol.* 3, 1047–1061.
- Pape, K.A., Catron, D.M., Itano, A.A., Jenkins, M.K., 2007. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26, 491–502.
- Pape, K.A., Kouskoff, V., Nemazee, D., Tang, H.L., Cyster, J.G., Tze, L.E., Hippen, K.L., Behrens, T.W., Jenkins, M.K., 2003. Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. *J. Exp. Med.* 197, 1677–1687.
- Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., Jenkins, M.K., 2011. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* 331, 1203–1207.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Changanti, R.S., Kuppers, R., Dalla-Favera, R., 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341–346.

- Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., Brink, R., 2006. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* 203, 1081–1091.
- Peakman, M.-C., Maizels, N., 1998. Localization of splenic B cells activated for switch recombination by in situ hybridization with γ 1 switch transcript and Rad51. *J. Immunol.* 161, 4008–4015.
- Pereira, J.P., Kelly, L.M., Cyster, J.G., 2010. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *Int. Immunol.* 22, 413–419.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G., Dorner, T., Hiepe, F., 2006. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 741–750.
- Schwickert, T.A., Victora, G.D., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Mugnier, M.R., Gitlin, A.D., Dustin, M.L., Nussenzweig, M.C., 2011. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J. Exp. Med.* 208, 1243–1252.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., Calame, K., 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607–620.
- Shen, H.M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X., Storb, U., 1998. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280, 1750–1752.
- Shih, T.A.Y., Meffre, E., Roederer, M., Nussenzweig, M.C., 2002. Role of BCR affinity in T cell-dependent antibody responses in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 570–575.
- Shinall, S.M., Gonzalez-Fernandez, M., Noelle, R.J., Waldschmidt, T.J., 2000. Identification of murine germinal center B cell subsets defined by the expression of surface isotypes and differentiation antigens. *J. Immunol.* 164, 5729–5738.
- Smith, K.G.C., Hewitson, T.D., Nossal, G.J.V., Tarlinton, D.M., 1997. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur. J. Immunol.* 26, 444–448.
- Takahashi, Y., Dutta, P.R., Cerasoli, D.M., Kelsoe, G., 1998. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. V. Affinity maturation

- develops in two stages of clonal selection. *J. Exp. Med.* 187, 885.
- Taylor, J.J., Pape, K.A., Jenkins, M.K., 2012. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* 209, 597–606.
- Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 302:575
- Ueda, Y., Liao, D., Yang, K., Patel, A., Kelsoe, G., 2007. T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J. Immunol.* 178, 3593–3601.
- Wakabayashi, C., Adachi, T., Wienands, R., Tsubata, T., 2002. A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor. *Science* 298, 2392–2395.
- Weiser, P., Muller, R., Braun, U., Reth, M., 1997. Endosomal targeting by the cytoplasmic tail of membrane immunoglobulin. *Science* 276, 407–409.
- Weiss, U., Rajewsky, K., 1990. The repertoire of somatic antibody mutants accumulating in the memory compartment after primary immunization is restricted through affinity maturation and mirrors that expressed in the secondary response. *J. Exp. Med.* 172, 1681–1689.

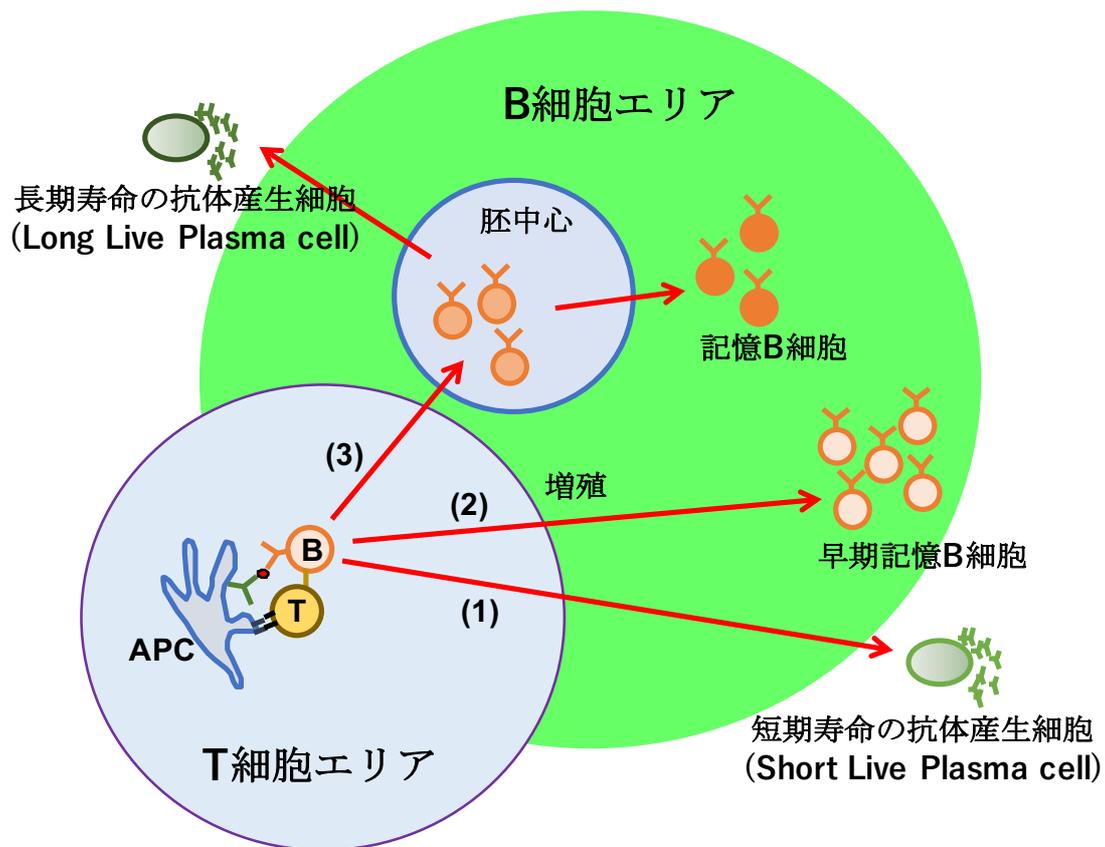


図1 免疫応答における B 細胞の運命

T 細胞依存性免疫応答は、ナイーブ B 細胞が抗原に遭遇し、T 細胞エリアで CD4⁺T 細胞からの刺激によって活性化されたときに始まる。次いで、B 細胞は 3 つの運命 (1) 一次抗体を分泌する短寿命の抗体産生細胞への分化、(2) B 細胞エリアへ移行及び増殖し早期の記憶 B 細胞の分化、(3) 胚中心の形成後、記憶 B 細胞、及び骨髄で持続する長期生存形の抗体産生細胞へ分化する。この T 細胞依存性免疫応答では、胚中心内において B 細胞はクラススイッチによるアイソタイプの変化及び抗体遺伝子における体細胞突然変異がおこり、その結果、抗体の親和性の増大が起こる。

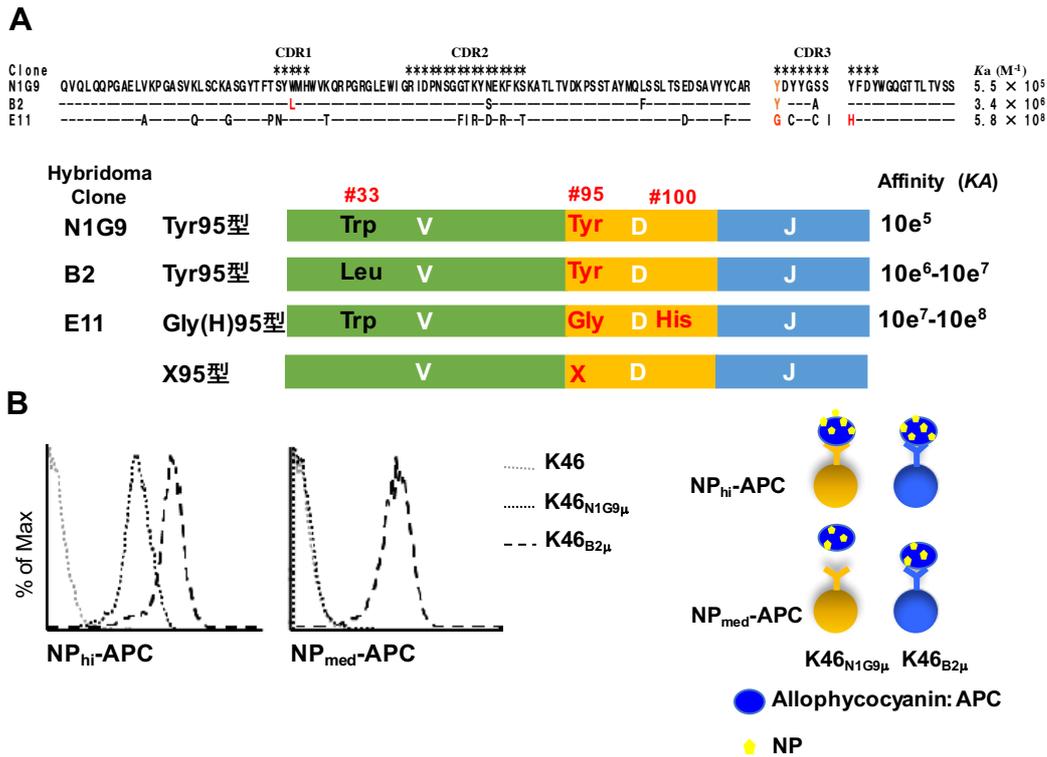


図2 抗 NP 抗体の親和性の特徴と結合能力を識別するシステム

(A) 抗 NP 抗体を産生するハイブリドマクローンによる重鎖 V186.2 遺伝子と可変領域を構成する V 遺伝子と D 遺伝子の結合部位及びその結合能力 (K_a) と 95 番目のアミノ酸残基と親和性をまとめた図を示す。Germline 型であるクローン N1G9 は、V186.2-DH 接合の境界位置 95 番目のアミノ酸残基が Tyr (Tyr95 型) であり、クローン B2 は、CDR1 の 33 番目のアミノ酸残基が Trp から Leu へ変異することで N1G9 と比較して親和性が 10 倍程度高くなる。また、Germline 抗体より 1000 倍高い親和性を持つクローン E11 は、95 番目のアミノ酸残基が Gly (Gly95 型) に加えて 100 番目のアミノ酸残基が His (Gly95(H)型) である。しかし、CDR1 33 番目の Leu への変異は起こらない。この Gly95(H)型は、免疫後 8 週までの出現頻度は非常に低く親和性は低い (Furukawa et al. 1999)。X は、Tyr、Gly (H) 以外のアミノ酸残基を表す。(B) 抗 NP 抗体の親和性をフローサイトメトリーによって検出する能力を示す。マウス B cell lymphoma K46 細胞に $\lambda 1$ light chain と共に、クローン N1G9 及び B2 の μ heavy chain の遺伝子を導入し細胞表面上に BCR を発現させた $K46_{N1G9\mu}$ 、 $K46_{B2\mu}$ を作製した (Nishimura et al., 2011)。次に、NP に対する結合能力を識別するために APC に異なる価数の NP を結合させた NP_{hi} -

APC、NP_{med}-APC を作製した。これらを反応させたところ NP_{hi}-APC は、K46N1G9 μ 、K46B2 μ に結合し Germline 型と同等以上の親和性を有していることを確認した。一方、NP_{med}-APC は、K46B2 μ に結合し K46N1G9 μ へは結合しない結果をしめし、Germline 型より 10 倍高い親和性を識別できることを示した (Nishimura et al., 2011)。

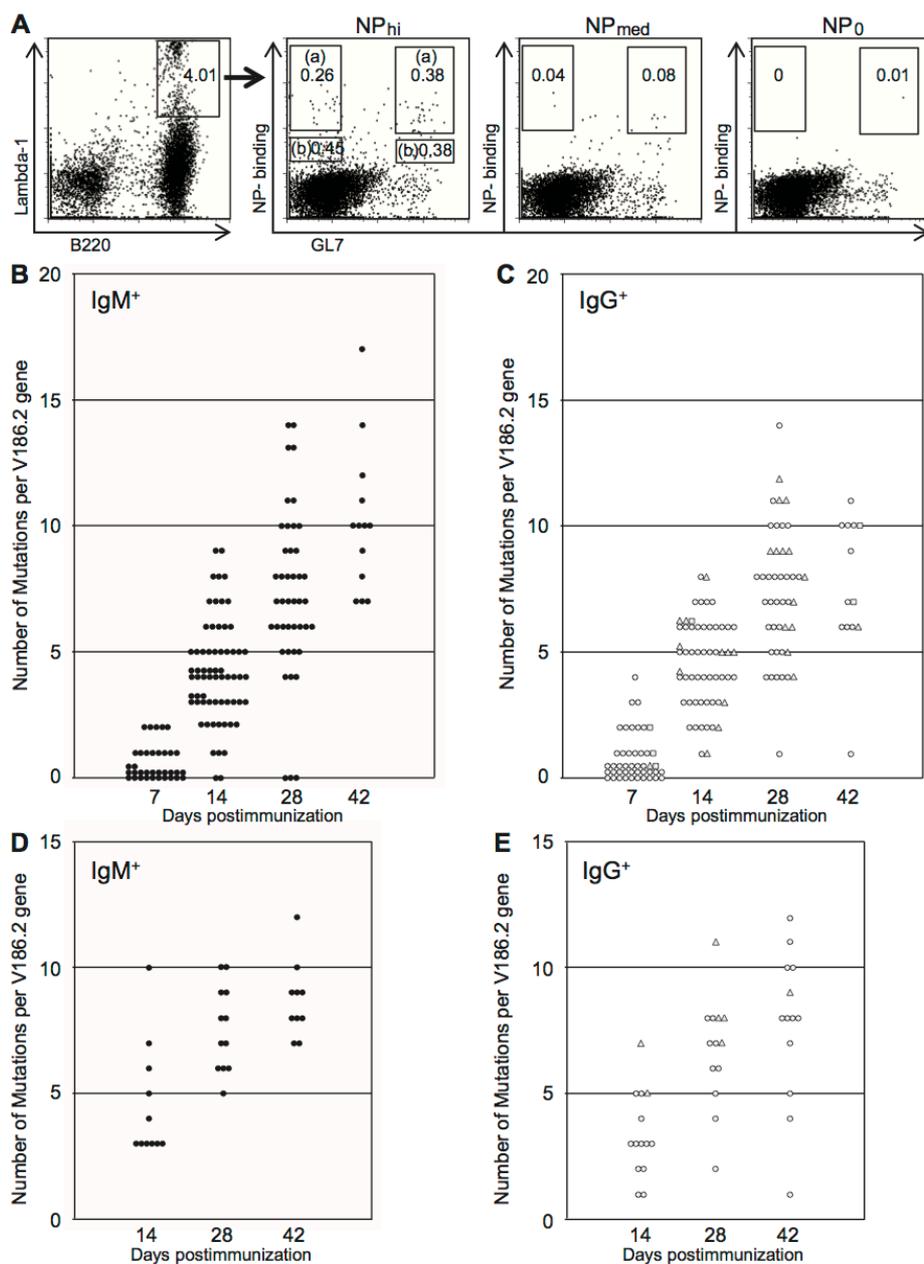


図3 フローサイトメトリーによる NP 特異的脾臓 B 細胞の単離および GCB における SHM 頻度の分析

(A) NP₄₀-CGG で免疫化したマウスの脾臓細胞を 5mM EDTA の PBS で処理し、続いて NP_{hi}-APC、NP_{med}-APC 又は NP₀-APC (NP を付加していない APC) と反応させた。示したゲートから B220⁺ Igλ1⁺ 分画中の抗原に結合した B 細胞を GL7⁺ 及び GL7⁻ に分類し、ヌクレオチド配列解析を行なった。NP_{hi}-APC 結合細胞を NP_{hi}^{bright} 及び NP_{hi}^{dull} ゲート【図中(a)及び(b)として示す】にそれぞれ

れ分類した。NP_{med}-APC 結合 B 細胞については、本質的に NP_{hi}:dull ゲートに対応する B 細胞は観察されなかったため、単一のゲートのみが選別で使用された。また NP₀-APC に結合する細胞はほとんど存在しない。(B) NPhi-APC に結合する IgM⁺ GL7⁺ B 細胞の V186.2 コード領域における SHM 数の変化を示す。各ドットは、NP 特異的クローンを示す。NP_{hi}:bright 及び NP_{hi}:dull ゲートの両方における GL7⁺ B 細胞の VH 領域のヌクレオチド配列を分析し、V186.2 コード領域における遺伝子変異の数を、NP₄₀-CGG による免疫後の時間とともにプロットした。(C) NPhi-APC に結合する IgG⁺ GL7⁺ B 細胞の V186.2 コード領域における SHM 数の変化を示す。各ドットは、NP 特異的クローン：○、IgG1; △、IgG2b; □、IgG2c。NP_{hi}:bright 及び NP_{hi}:dull ゲートの両方における GL7⁺ B 細胞の VH 領域のヌクレオチド配列を分析し、V186.2 コード領域における SHM 数を、NP₄₀-CGG による免疫後の時間とともにプロットした。(D 及び E) NP_{med}-APC に結合する GL7⁺ B220⁺ Igλ1⁺ B 細胞を B 及び C に示したものと同一の分析を行い、時間をプロットした V186.2 コード領域の SHM 数を示す IgM⁺ (D) 及び IgG⁺ (E) B 細胞については、図に示す各時点で 3 匹のマウス (n=3) の群を用いた少なくとも 3 回の独立した実験を行いプールしたデータを示す (A～E)。

ラフとして示す。また各群で分析された VH 配列の数を中央に示す。各 Vanalog⁺ 遺伝子はアルファベット順に : a, V23; b, J558.67.166; c, J558.2.88; d, J558.55.149; e, J558.59.155 と示し、各 VH 遺伝子の割合を示す。 (C) IgM⁺ (●) 及び IgG⁺ B 細胞 (○) の Vanalog 遺伝子コード領域における突然変異の数を免疫後の時間に対してプロットする。各実験で 3 匹のマウスをプールして解析した群を少なくとも 3 回行なったデータを示す (A~C)。

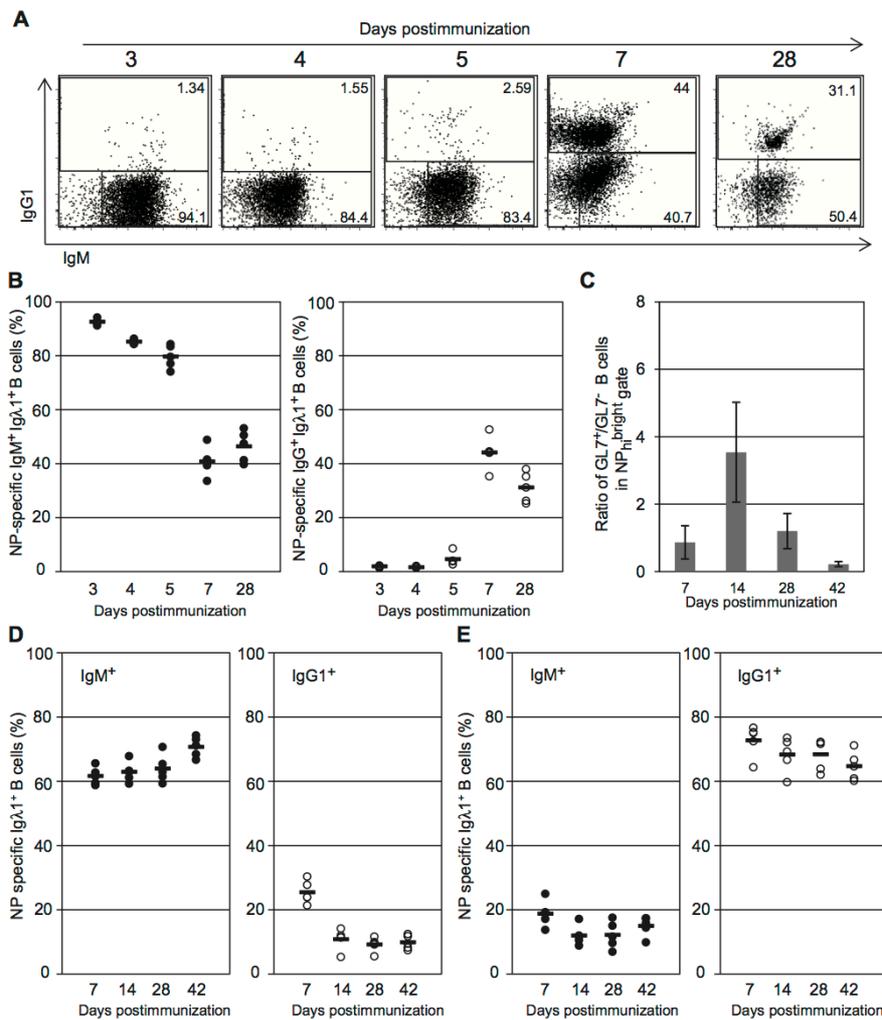


図5 免疫後のクラススイッチの変化をフローサイトメトリーで解析した

(A) 抗 IgM 及び抗 IgG1 抗体で染色し、NP_{hi}-APC に結合する B220⁺ Igλ1⁺ 分画における脾臓細胞のフローサイトメトリー像を示す。IgM⁺ 及び IgG1⁺ B 細胞は、免疫後、時間とともに出現する。(B) B220⁺ Igλ1⁺ 分画中の NP 特異的 IgM⁺ (●) 及び IgG1⁺ (○) B 細胞の割合 (%) の時間依存的変化をプロットした。水平線は各時点の平均値を示す (n=5)。(C) NP_{hi}^{bright} ゲートにおける GL7⁺/GL7⁻ B 細胞の免疫後における比率の変化 (n=5)。(D) NP 特異的 GL7⁻λ1⁺ B 細胞 (n=5) における IgM⁺ 及び IgG1⁺ 分画比の時間依存的変化 (n=5)。水平線は各時点の平均値を示す。(E) NP 特異的 GL7⁺ Igλ1⁺ B 細胞における IgM⁺ 及び IgG1⁺ 分画比の時間依存的変化 (n=5)。水平線は各時点の平均値を示す。

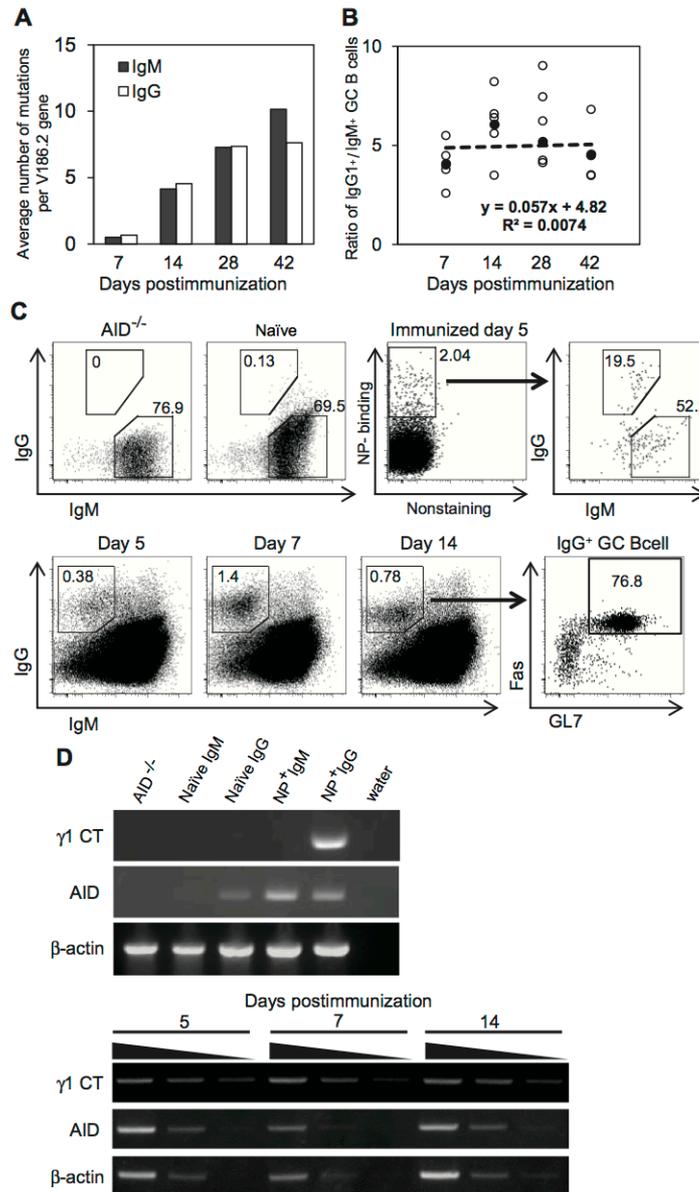


図6 クラススイッチは胚中心の形成前に誘導される。

(A) 図3(B,C)より IgM⁺ (■) 及び IgG⁺ (□) 胚中心 B 細胞における V186.2 遺伝子あたりの SHM の平均数を免疫後の時間とともにプロットした。平均値は、図4に示すデータから得た。(B) 図5(E)より NP 特異的な IgG1⁺/IgM⁺ 胚中心 B 細胞の比率をプロットした (○)。●は、それぞれの時点における平均値であり、破線は $y = 0.057x + 4.82$ を用いた近似直線を表す。(C) AID 欠損 (AID^{-/-}) マウスから IgM⁺ B 細胞、非免疫から単離した (ナイーブ IgM, ナイーブ IgG B 細胞)、 NP₄₀-CGG で免疫後 5 日目の NP⁺ IgM⁺ と NP⁺ IgG⁺ B 細胞、 NP₄₀-

CGG で免疫後 5 日目及び 7 日目の B220⁺ Igλ1⁺ IgG⁺ B 細胞と 14 日目の GL7⁺ Fas⁺ IgG⁺ 胚中心 B 細胞をフローサイトメーターにより単離した。(D)、(C) で単離した B 細胞からの cDNA を用いてγ1CT を解析した。AID 及びβ-アクチンの転写産物を標準的な PCR によって分析し、γ1CT はネステッド PCR によって分析した。AID 欠損 (AID -/-) マウスおよび非免疫化マウス由来の IgM⁺ B 細胞からの cDNA の調製物をネガティブコントロールとして使用した。

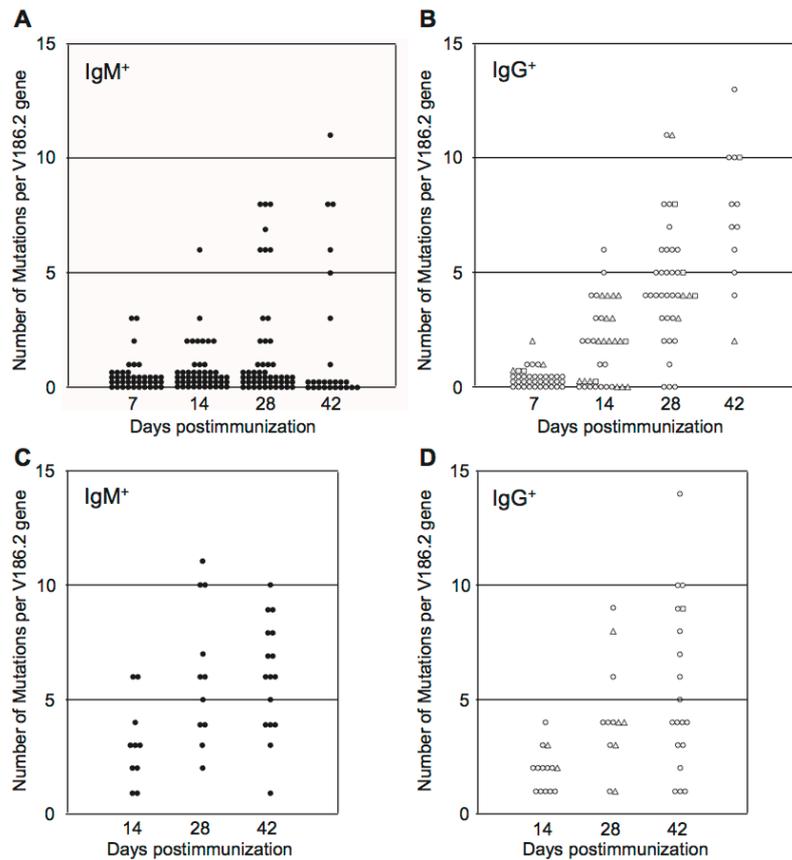


図7 NP 特異的 GL7⁻ B 細胞の BCR における SHM 頻度の分析

図3 (A) より、GL7⁻ B220⁺ Igλ1⁺ B 細胞の分画から単離した cDNA を用いて解析をおこなった。(A) NP_{hi}^{bright} 及び NP_{hi}^{dull} ゲートの両方における V186.2 コード領域における IgM⁺ を増幅し VH 領域のヌクレオチド配列の SHM の数を、NP40-CGG による免疫化後の時間とともにプロットした。(B)、(A) より単離した cDNA から V186.2 コード領域における IgG⁺ を増幅し VH 領域のヌクレオチド配列の SHM の数を示す。各ドットは、NP 特異的クローン：○, IgG1; △, IgG2b; □, IgG2c を示す。(C) NP_{med} ゲート分画から単離した cDNA から V186.2 コード領域における IgM⁺ を増幅し VH 領域のヌクレオチド配列の SHM の数を、NP40-CGG による免疫化後の時間とともにプロットした。(D) (C) の分画より単離した cDNA から V186.2 コード領域における IgG⁺ を増幅し VH 領域のヌクレオチド配列の SHM の数を示す。各ドットは、NP 特異的クローン：○, IgG1; △, IgG2b; □, IgG2c を示す。

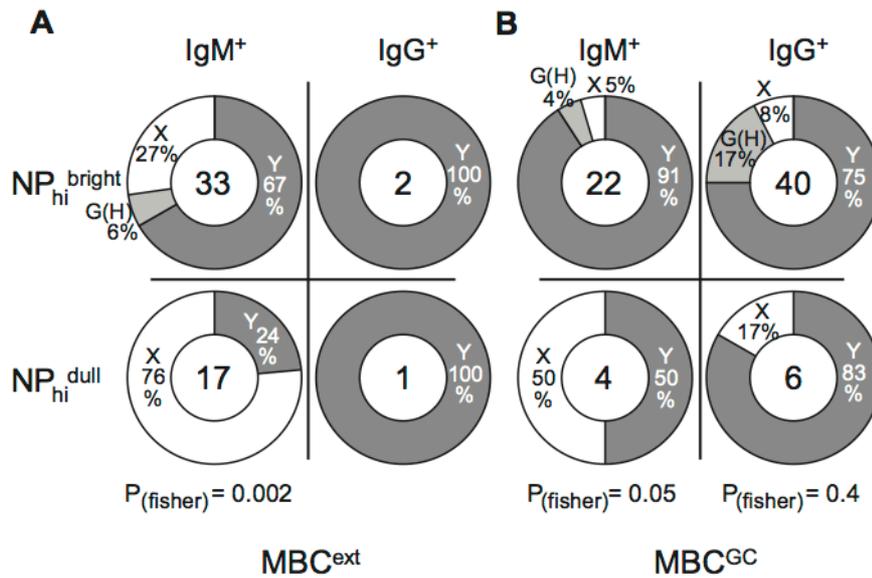


図8 NP_{hi}^{bright} 及び NP_{hi}^{dull} ゲート中の記憶 B 細胞における V186.2⁺ 95 アミノ酸の分布

28 日目及び 42 日目の NP_{hi}^{bright} 及び NP_{hi}^{dull} GL7⁻ B220⁺ Igλ1⁺ 記憶 B 細胞における Tyr95、Gly95(H) 又は X95 型を Y、G (H) 及び X として 3 つのグループに分類し、それぞれを分画比として円グラフで示す。MBC^{ext} 及び MBC^{GC} は、V186.2⁺ SHM のデータ図 7 A, B より区別し解析した。VH 配列の数は中央に示す。(A) NP_{hi}^{bright} 及び NP_{hi}^{dull} ゲートにおける MBC^{ext} の 95 アミノ酸グループの割合を示し fisher 検定を用いて統計的有意性を決定した。IgG⁺ MBC^{ext} はほとんど存在していなかったため確認できなかった (n=3) ため、MBC^{ext} における IgM⁺ と IgG⁺ の統計的有意差は評価できなかった。(B) NP_{hi}^{bright} 及び NP_{hi}^{dull} ゲートにおける MBC^{GC} の 95 アミノ酸グループの割合を示し fisher 検定を用いて統計的有意性を決定した。

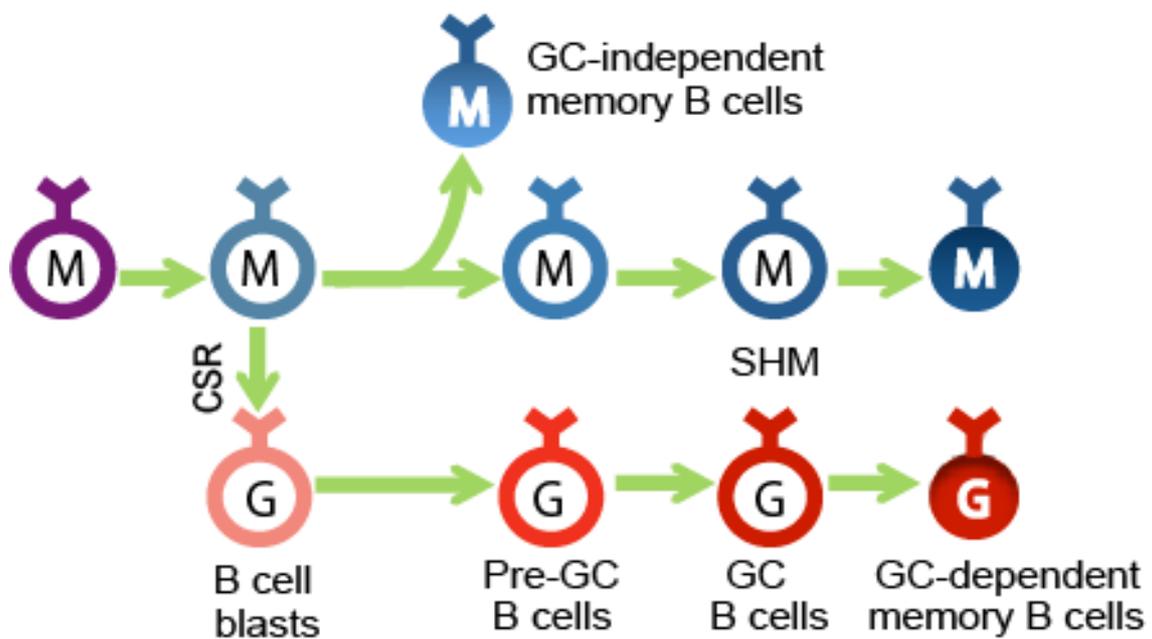


図 1 0 免疫応答におけるMBC形成の流れ

IgG⁺ B 細胞は胚中心を形成する前にクラススイッチを完了し胚中心 B 細胞へ移行する。また、記憶 B 細胞においては、胚中心内に移行しない GC-independent memory B cells (MBC^{ext})と胚中心内に移行し SHM が入る GC-dependent memory B cells (MBC^{GC}) の 2 つの記憶 B 細胞を残すことで、次への免疫応答に対応できるようなシステムが存在する。