

氏名	孫 琳		
学位の種類	博士( 理学 )		
学位記番号	博甲 第	8556	号
学位授与年月日	平成 30年 3月 23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Role of Surrogate Light Chain in Antibody Repertoire Formation  (抗体レパトア構築における代替軽鎖の役割に関する研究)		
主査	筑波大学教授(連携大学院)	理学博士	大西 和夫
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治
副査	筑波大学教授	博士( 理学 )	中田 和人
副査	筑波大学准教授	理学博士	坂本 和一

## 論 文 の 要 旨

審査対象論文は、抗体システムの形成過程に関する問題に、抗体産生B細胞分化初期に発現する代替軽鎖分子の観点から検討を加えたものである。本論文では、次世代シーケンサーを用いた先進的な手法を改良して抗体レパトアを網羅的に解析することにより、抗体システム構築過程のユニークな分子機構を明らかにしている。

獲得免疫系で主要な役割を果たす抗体は多様な抗原認識特異性を持ち、個体に発現する多様性は10の9乗程度と計算される。個体内免疫系を構成する抗体産生B細胞クローンの総体は「抗体レパトア」と呼ばれ、その動態は生体防御反応と密接に関連しているが、これまでの解析技術ではその全体像の把握は困難であった。骨髄で分化するB細胞は抗体遺伝子再構成を行い、新生した抗体H鎖は代替軽鎖とともにプレB細胞受容体 (preBCR) を形成して、B細胞分化シグナルを送る。代替軽鎖遺伝子欠損マウスの骨髄ではB細胞分化が著しく阻害されるが、末梢には少数のB細胞 (漏洩B細胞) が存在する。この漏洩B細胞はpreBCR非依存的に発生したB細胞群であり、そのレパトアを調べれば、抗体システム構築における代替軽鎖の役割を明らかに出来ると考えられた。

第一章では、次世代シーケンサーを用いた抗体レパトア全体像の解析手法の改良について述べられている。マウス免疫系器官・分取細胞からRNAを調製し、5'-RACE法を応用して抗体遺伝子をPCR増幅した後、NGS解析により10の6乗レベルの抗体レパトア配列を取得することができた。これは、従来の解像力を100倍程度上げたことになる。

第二章と第三章では、本論文の中核となる研究が述べられている。まず著者は、漏洩B細胞の動態解析について、代替軽鎖遺伝子欠損 (KO) をヘテロにもつマウス同士を交配し、同腹子の野生型とKOホモ個体のB細胞群を比較した。KOホモ個体においてはB細胞の発生が著しく阻害されているが、4週目から

漏洩B細胞が検出されはじめ、25週目で野生型マウスの1/5まで回復することが明らかになった。PreBCRシグナル欠如による分化阻止を逃れた漏洩B細胞の抗体レパトア解析を行った結果、KOマウスでは野生型と異なるH鎖レパトア形成が確認された。このことは、preBCRによるB細胞分化制御が抗体レパトア形成に主要な役割を果していることを、レパトア全体像の俯瞰から明らかにする初めての知見となった。また、漏洩B細胞に優勢に発現する少数のL鎖クローンは検出されなかったこと、および、漏洩B細胞H鎖レパトアはB1-B細胞のそれと類似していなかったことがクラスター分析から明らかになった。これ等の結果は、漏洩B細胞がpreBCR非依存的な偶発的L鎖遺伝子再編成や胎児肝由来B1-B細胞から発生する可能性を否定した。骨髄におけるB細胞発生直後の抗体レパトアを解析した結果、1) クラスター分析により漏洩B細胞が骨髄由来であることが示唆され、2) レパトア配列の主成分分析から漏洩B細胞で高頻度に使用されている特徴的な相補性決定領域3 (CDR3) の存在が明らかになった。これ等のCDR3ループの中央部には陽性電荷をもつアルギニンが存在する。代替軽鎖のCDR3相当領域には進化的に複数のアルギニンが保存され、preBCRの分化シグナル形成に関与すること知られており、漏洩B細胞CDR3領域の特徴的なアルギニンが代替軽鎖類似のメカニズムでB細胞分化を促進することが強く示唆された。この特徴的なCDR3配列は骨髄から末梢に移行する過程で負の選択を受けており、抗体レパトアの偏倚矯正メカニズムの過程を捉えることにも成功した。

## 審 査 の 要 旨

本学位論文において孫琳氏は、抗体レパトア全体像を俯瞰する新規解析手法を用いて抗体システム構築における代替軽鎖の役割を検討した結果、代替軽鎖遺伝子欠損マウスに出現する漏洩B細胞の抗体レパトアは特徴的であり、特に抗体H鎖CDR3ループ中央部にアルギニンが高頻度に出現することを初めて明らかにした。このことは、漏洩B細胞の発生においても、PreBCR様構造が形成されて分化シグナルを送っていることを示唆し、この分化シグナルがB細胞分化の重要なチェックポイントとして働いていることを示した。本研究は、最新の解析手法を改良して抗体レパトアの全体像を俯瞰し、レパトア形成過程の分子機構を理解する上で重要な知見を得る事に世界で初めて成功した点で極めて学術的価値が高い。

平成30年1月29日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。