

令和元年6月10日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05206

研究課題名(和文) エフェクターとしての記憶B細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of memory B cells as the effector cells

研究代表者

北村 大介 (Kitamura, Daisuke)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：70204914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞依存性免疫応答において形成される記憶B細胞は抗原の再侵入に際して大量の高親和性抗体を産生する、いわゆる想起応答を担っている。我々は記憶B細胞の一部がIL-9というサイトカインを産生し、想起応答時にIL-9受容体を発現する記憶B細胞自身に作用して増殖と抗体産生を促進すると同時に、ICOSリガンドの発現を抑制することにより胚中心形成を抑制していることを見出した。また、想起応答時の記憶B細胞におけるIL-9の発現増強はCD40を介した刺激によると考えられた。我々は、記憶B細胞がエフェクター細胞として免疫応答を制御する役割をもつことを提唱する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワクチンによって免疫記憶が形成され維持されることの実態は記憶B細胞が産生され維持されることである。記憶B細胞は元の病原体に出会うと増殖し、大量に抗体を産生することで病原体を排除する。記憶B細胞はそれだけでなく、サイトカインを介して記憶B細胞の免疫応答を制御するエフェクター細胞としての役割を果たすことを我々は見出した。長期間生存する抗原特異的な記憶B細胞はエフェクター細胞として、想起応答のみならず自己免疫やアレルギーといった慢性免疫疾患の発症や病態をも制御している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Memory B (Bm) cells are generated during the T-cell-dependent primary response and crucial in the antibody recall response in which they expand and produce a large amount of high-affinity antibody against re-invaded antigens. We have found that a fraction of Bm cells produce a cytokine IL-9 and facilitate the antibody recall response of Bm cells that express IL-9-receptor, and also suppress ICOS-ligand expression on Bm cells and thus regulate germinal-center formation by Bm cells. Our data suggested that IL-9 production by Bm cells is augmented at the recall response by stimulation through CD40. From these data, we propose a new role of Bm cells as the effector cells that regulate immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶 胚中心 免疫応答 エフェクター細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫記憶を担う記憶 B 細胞は主に T 細胞依存性 (TD) 免疫応答の過程で胚中心において形成され、典型的には、IgG にクラススイッチした高親和性の抗原受容体を発現する長期生存 B 細胞と定義される。胚中心における免疫グロブリン (Ig) V 領域遺伝子の体細胞超突然変異の結果、抗原に高親和性となった B 細胞が選択され (親和性選択)、記憶 B 細胞あるいは長期生存形質 (LP) 細胞へと分化する。記憶 B 細胞は同じ抗原に再び遭遇すると自己複製の後、直ちに形質細胞に分化して高親和性 IgG 抗体を大量に産生する (想起応答)。一方、LP 細胞は高親和性抗体を長期間産生し続ける。マウスにおいて記憶 B 細胞の数は脾臓あたり数千個と非常に少なく、形質細胞 (CD138⁺) と異なり、特異的マーカーがない。よって実験が容易でなく、記憶 B 細胞の特性や遺伝子・蛋白発現プロファイル、増殖分化の制御機構は未だ明らかでない。

想起応答の際に記憶 B 細胞は形質細胞に分化して抗体を産生するだけでなく、新たに胚中心を形成し、さらに親和性の亢進した記憶 B 細胞として再生することも知られている。最近、この 2 方向性の反応をする主に 2 種類の記憶 B 細胞サブセットが同定された (Zuccarino-Catania et al., *Nat. Immunol.* 2014, 15:631)。また近年、IL-10 を産生する制御性 B 細胞や、Th2 応答において出現する IL-4 産生 B 細胞が見出され、抗体産生・抗原提示に加えて、エフェクター細胞としての B 細胞機能にも注目が集まっている。長期に維持される抗原特異的な記憶 B 細胞にも何らかのエフェクター機能をもつ新たなサブセットが存在すると仮定すると、想起応答への関与のみならず自己免疫やアレルギーといった慢性炎症性疾患の発症や病態制御のメカニズムにも新たな可能性が生まれてくる。

記憶 B 細胞の解析を加速するために、CD40L と BAFF を発現させたフィーダー細胞 (40LB) 上で B 細胞を培養し、胚中心様 B (iGB) 細胞を大量に作製し、これをマウスに移入して多数の記憶細胞様 (iMB) 細胞を作る方法を開発した (野島ら *Nat. Commun.* 2011, 2:465)。そして、iMB 細胞に比較的多く発現する膜受容体遺伝子として *IL9Ra* を同定した。*IL9Ra* は共通 γ 鎖とともに IL-9 受容体 (IL-9R) を形成し、マスト細胞を始めいくつかの細胞に発現しており、それらの活性化と増殖を促進するとされていたが、B 細胞の免疫応答に関する報告はなかった。*IL9Ra* mRNA は記憶 B 細胞や後期胚中心 B 細胞で高く発現していたが、当時はフローサイトメトリー (FCM) に使える抗マウス IL-9R 抗体がなく、細胞表面に IL-9R を発現する B 細胞種の詳細は不明であった。

免疫応答における IL-9R の役割を解明するために、IL-9R 欠損マウスを導入し、TD 抗原で免疫し解析したところ、想起応答における記憶 B 細胞の増殖および抗体産生が有意に抑制されていた。また、キメラマウス実験より、この異常が B 細胞内因性であることが分かった。さらに、単離した記憶 B 細胞や iMB 細胞を 40LB 上で培養する際に IL-9 を添加すると細胞増殖と抗体産生が IL-9R 依存的に増強された。以上より、TD 免疫応答において IL-9 は記憶 B 細胞の想起応答を促進すると考えられた (高塚ら *Nat. Immunol.* 2018, 19:1025)。

2. 研究の目的

B 細胞免疫応答を制御する IL-9 の産生細胞を同定するために、TD 抗原で免疫後長期経過したマウスの脾臓を FCM にて解析したところ、IL-9 は記憶 T 細胞、胚中心 B 細胞には検出されず、驚いたことに IgG1⁺ 記憶 B 細胞の数%が IL-9 を産生していた。さらに、2 次免疫後 3 日目にはそれが 20%程度にまで増加した。また、1 次免疫後 2 週目にはすでに IL-9⁺ 記憶 B 細胞が検出された。さらに、記憶 B 細胞や上記 iMB 細胞を 40LB 上で培養すると、上澄中に IL-9 が検出された。一方、脾臓の未感作 B・T 細胞その他の血球系細胞は IL-9 陰性であった (高塚ら 2018)。以上より、記憶 B 細胞の一部は IL-9 を産生し、記憶 B 細胞自身の想起応答を促進するだけでなく、IL-9R を発現する後期胚中心 B 細胞や他の細胞に作用し、免疫応答を制御する役割を担う可能性が示された。また、もしアレルギーや自己免疫に特異的な記憶 B 細胞が形成され得るとすると、それらは、抗原が存在する組織において IL-9 を介してマスト細胞等の細胞を刺激し、アレルギーや自己免疫を誘発・促進するエフェクターとして働く可能性がある。本研究では、IL-9 を発現する記憶 B 細胞を Bm9 細胞と呼ぶこととし、Bm9 細胞のこのようなエフェクター機能を *in vivo* 系で解明することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、エフェクター記憶 B 細胞の分類と各サブセットの特性・形質を解析する。TD 免疫応答において形成される IgG1⁺ 記憶 B 細胞の中で、表面分子や産生するサイトカインの違いにより記憶 B 細胞サブセットの分類を試みる。また、IL-9 を発現する Bm9 細胞が特定の記憶 B 細胞サブセットに属するかどうかを調べる。Bm9 細胞に選択的に発現する表面受容体が分かった場合は、その受容体に対する阻害抗体を 2 次免疫の際に同時に投与し、想起応答において記憶 B 細胞の IL-9 の発現を促進する因子を同定する。さらに、記憶 B 細胞あるいは iMB 細胞を 40LB 上で培養する際に、抗原や種々のサイトカイン・刺激因子を与え、IL-9 の発現を増強するものを探索する。さらに、B 細胞免疫応答における Bm9 細胞の新たなエフェクター機能を探る。T 細胞依存性免疫応答における免疫細胞を FCM で詳細に解析し、正常マウスと比較して IL-9R 欠損マウスにおいて異常を示す細胞を探索する。

4. 研究成果

我々は IL-9 が一次免疫後 2 週目以降に一部の記憶 B 細胞から産生され、想起応答時により多くの記憶 B 細胞から産生されるようになることを示した。他のグループは一次免疫応答早期に濾胞 T ヘルパー (T_{FH}) 細胞が IL-9 を産生し、記憶 B 細胞の形成を促進していると報告した (Wang et al. *Nat. Immunol.* 2017, 18:921) が、私達の解析では免疫 1 週後の T_{FH} 細胞の中に IL-9 を産生する細胞はほとんど検出できず、また、記憶 T 細胞の中にも見られなかった。したがって、免疫記憶細胞の中では IL-9 は記憶 B 細胞に選択的に発現すると考えられた。

また、免疫 4 週および 10 週後の記憶 B 細胞の数に IL-9R 欠損マウスと正常マウスとで有意差がないことが分かった。記憶 B 細胞は、想起応答において主に形質細胞に分化する CD80^{high} 細胞と、主に胚中心を形成する CD80^{low} 細胞に大別できるが (Zuccarino-Catania et al. 2014)、CD80^{high} 細胞の割合も両マウスで有意差はなかった。さらに、*in vitro* で記憶 B 細胞や胚中心 B 細胞を IL-9 の有無で培養したが、両細胞の生存に差は見られなかった (高塚ら 2018)。以上より、IL-9 は記憶 B 細胞の形成や長期生存には関与しないと考えられた。一方、記憶 B 細胞の中で CD80^{high} 細胞と CD80^{low} 細胞を比較すると、IL-9R は CD80^{high} 細胞の方に高く発現していた。このことは CD80^{high} 細胞が想起応答において形質細胞に分化しやすいことの原因のひとつと考えられた。

T 細胞依存性抗原で免疫して 4 週後のマウスの脾臓細胞を種々の細胞表面抗原および IL-9 に対する抗体で染色し、フローサイトメトリー (FCM) で解析し、記憶 B 細胞サブセットのさらなる分類を試みた。その結果、すでに報告されている、CD80、PD-L2、CD73 の発現により分類されたもの以外に新たなサブセットは見出せなかった。また、IgG1⁺ 記憶 B 細胞の中で、IL-9⁺ (Bm9) 細胞と IL-9 細胞で発現の異なる細胞表面抗原を探索したが、FCM で検出できる程の違いを示す抗原は見出せなかった。

想起応答の際に記憶 B 細胞における IL-9 の発現を促進する因子を見出すために、記憶 B 細胞に相当する iMB 細胞を 40LB フィーダー上で培養する際に、様々なサイトカイン・刺激因子を加え IL-9 の発現を FCM で調べた。しかし、フィーダー細胞上で培養するだけで IL-9 の発現が誘導され、それ以上に増強する因子は見出せなかった。このことから、Bm9 細胞を誘導するのは何らかのサイトカインではなく、CD40 を介した強いシグナルではないかと考えられた。

B 細胞免疫応答における Bm9 細胞の新たなエフェクター機能を探索する中で、まず、IL-9 が *in vitro* で記憶 B 細胞上の ICOS リガンドの発現を選択的に抑制することを見出した。また、IL-9R 欠損マウスの想起応答では胚中心 B 細胞の産生が増強していた。これは、IL-9R 欠損記憶 B 細胞上に抑制されずに高発現した ICOS リガンドを介してより強く記憶 T 細胞が活性化され、そのため胚中心 B 細胞への分化が促進されたものと考えられた。このことは ICOS リガンドに対する阻害抗体の *in vivo* 投与によって証明された。よって、Bm9 細胞は IL-9 を介して記憶 B 細胞から胚中心 B 細胞への分化を抑制する機能を持っていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Litzler, L.C., Zahn, A., Meli, A.P., Hébert, S., Patenaude, A., Methot, S.P., Sprumont, A., Bois, T., Kitamura, D., Costantino, S., King, I.L., Kleinman, C.L., Richard, S. and Di Noia, J.M. PRMT5 is essential for B cell development and germinal center dynamics. *Nat. Commun.* 10: 22, 2019. DOI: 10.1038/s41467-018-07884-6. (査読有)
- ② Dascani, P., Ding, C., Kong, K., Tieri, D., Hu, X., Zhang, H., Kitamura, D., Bolli, R., Rouchka, E.C. and Yan, J. Transcription Factor STAT3 Serves as a Negative Regulator Controlling IgE Class Switching in Mice. *ImmunoHorizons* 2: 349-362, 2018. DOI: 10.4049/immunohorizons.1800069. (査読有)
- ③ Takatsuka, S., Yamada, H., Haniuda, K., Saruwatari, H., Ichihashi, M., Renauld, J.-C. and Kitamura, D. IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses. *Nat. Immunol.* 19: 1025-1034, 2018. DOI: 10.1038/s41590-018-0177-0. (査読有)
- ④ Le Gallou, S., Zhou, Z., Thai, L.H., Fritzen, R., de Los Aires, A.V., Mégret, J., Yu, P., Kitamura, D., Bille, E., Tros, F., Nassif, X., Charbit, A., Weller, S., Weill, J.C. and Reynaud, C.A. A splenic IgM memory subset with antibacterial specificities is sustained from persistent mucosal responses. *J. Exp. Med.* 215: 2035-2053, 2018. DOI: 10.1084/jem.20180977. (査読有)
- ⑤ Li, X., Gadzinsky, A., Gong, L., Tong, H., Calderon, V., Li, Y., Kitamura, D., Klein, U., Langdon, W.Y., Hou, F., Zou, Y.R. and Gu, H. Cbl ubiquitin ligases control B cell exit from the germinal-center reaction. *Immunity* 48: 530-541, 2018. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.006. (査読有)
- ⑥ Jiménez-Alcázar, M., Rangaswamy, C., Panda, R., Bitterling, J., Simsek, Y.J., Long, A.T., Bilyy, R., Krenn, V., Renné, C., Renné, T., Kluge, S., Panzer, U., Mizuta, R., Mannherz, H.G., Kitamura, D., Herrmann, M., Napirei, M. and Fuchs, T.A. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* 358: 1202-1206, 2017. DOI: 10.1126/science.aam8897. (査読有)
- ⑦ Le Gallou, S., Nojima, T., Kitamura, D., Weill, J.C. and Reynaud, C.A. The AID-Cre-ERT2 model: A tool for monitoring B cell immune responses and generating selective hybridomas. *Methods Mol. Biol.* 1623: 243-251, 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-7095-7_19. (査読無)

- ⑧ Haniuda, K., Nojima, T. and Kitamura, D. In vitro-induced germinal center B cell culture system. *Methods Mol. Biol.* 1623: 125-133, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-7095-7_11. (査読無)
- ⑨ Kuraoka, M., Snowden, P.B., Nojima, T., Verkoczy, L., Haynes, B.F., Kitamura, D. and Kelsoe, G. BCR and endosomal TLR signals synergize to increase AID expression and establish central B cell tolerance. *Cell Rep.* 18:1627-1635, 2017. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.01.050. (査読有)
- ⑩ Lee, P., Zhu, Z., Hachmann, J., Nojima, T., Kitamura, D., Salvesen, G. and Rickert, R.C. Differing requirements for MALT1 function in peripheral B cell survival and differentiation. *J. Immunol.* 198:1066-1080, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1502518. (査読有)
- ⑪ Haniuda, K., Fukao, S., Kodama, T., Hasegawa, H. and Kitamura, D. Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. *Nat. Immunol.* 17: 1109-1117, 2016. DOI: 10.1038/ni.3508. (査読有)
- ⑫ Domeier, P.P., Chodiseti, S.B., Soni, C., Schell, S.L., Elias, M.J., Wong, E.B., Cooper, T.K., Kitamura, D. and Rahman, Z.S. IFN- γ receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 213: 715-732, 2016. DOI: 10.1084/jem.20151722. (査読有)

[学会発表] (計 31 件)

- ① Daisuke Kitamura: Mechanisms for Memory B-Cell Formation and Function: Possible Implications for Vaccination. The 3rd Annual Chiba University-UCSD Symposium on Mucosal Immunology, Allergy and Vaccines. 2019年
- ② Hana Ebiko, Kei Haniuda, Kei Kato and Daisuke Kitamura. Regulation of B cell memory formation and metabolism by IgE-BCR. 第47回日本免疫学会学術集会、2018年
- ③ 北村大介: B細胞による獲得免疫応答とその制御メカニズム. 第4回川島カンファレンス、2018年
- ④ Daisuke Kitamura: IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses. 2nd International Innovation Dialogue on Genome Engineering Animal Models and Biomedical Research Symposium. 2018年
- ⑤ Daisuke Kitamura: Regulatory Mechanisms for Memory B Cell Development and Function. KEYSTONE SYMPOSIA, B Cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity. 2018年
- ⑥ 北村大介: B細胞クローン法のヒトB細胞への応用. 第45回日本臨床免疫学会総会、2017年
- ⑦ Daisuke Kitamura: A mechanism how IgE memory is prevented. 第45回日本免疫学会学術集会、2016年
- ⑧ Takuya Koike, Shu Horiuchi, Kei Haniuda, Daisuke Kitamura: The quantity of CD40 signaling in pre-GC phase determine the differentiation into functionally distinct memory B cell subsets via Mef2b expression. 第45回日本免疫学会学術集会、2016年
- ⑨ Daisuke Kitamura: How do different classes of B cell receptors signal differently? Mechanisms of Molecular and Cellular Immunity 1964-2016. 2016.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: B細胞集団の製造方法、及びそれを用いたモノクローナル抗体の製造方法
 発明者: 北村大介, 馬渡達也, 中石智之, 北寛士, 北野光昭
 権利者: 学校法人東京理科大学、株式会社カネカ
 種類: 特許
 番号: 特許願 2017-004860 号
 出願年: 2017 年
 国内外の別: 国内
- ② 名称: 特定抗原特異的抗体を産生する細胞のスクリーニング方法
 発明者: 馬渡達也, 中石智之, 北寛士, 吉田慎一, 北野光昭, 北村大介
 権利者: 学校法人東京理科大学、株式会社カネカ
 種類: 特許
 番号: 特許願 2018-235794 号
 出願年: 2018 年
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等: <https://dai3kitamura.jimdofree.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：羽生田 圭

ローマ字氏名：(HANIUDA, kei)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。