

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08882

研究課題名(和文) Bach2による記憶B細胞産生制御機構の解明

研究課題名(英文) Function of Bach2 during memory B cell differentiation

研究代表者

井上 毅 (Inoue, Takeshi)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：80466838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：記憶B細胞の産生・分化機構を解明することは、獲得免疫系による生体防御機構の理解、そして効果的なワクチン開発のために極めて重要であるが、胚中心B細胞から記憶B細胞への分化メカニズムについて、その分子機構は未解明の点が多い。申請者は記憶B細胞産生に必須の転写因子Bach2に着目してその機能解析を行った。各種遺伝子改変マウスを用いた実験より、胚中心B細胞の低親和性に伴う低代謝状態が、増殖・代謝が活発な胚中心からquiescentな記憶B細胞へ分化するための重要な要因の一つであることが示され、Bach2は記憶B細胞分化に伴う代謝制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、HIVウイルス、インフルエンザウイルス、新型コロナウイルス等のウイルスに対して長期間有効で、更に変異ウイルスに対しても効果的なワクチンの開発が待望されている。このためには、記憶B細胞がどのようなメカニズムで産生されるのか、どの記憶B細胞サブセットをターゲットにしてワクチン開発をおこなえばいいのか、どの細胞系列がワクチン長期有効性に重要なのか、等の基礎的理解が不可欠である。Bach2標的遺伝子とその制御メカニズムを明らかにすることで、記憶B細胞を人為的に効率よく誘導することができれば、Bach2を標的としたワクチンや免疫疾患の創薬開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Clarifying the molecular mechanisms how memory B cells generate from the germinal center is essential for the understanding of humoral immune responses and effective vaccine design strategy, but little is known about its mechanisms. As we previously reported that Bach2 is essential for memory B cell generation, here I tried to understand how Bach2 is involved in this process. I found that the lower mTORC1 activity in proliferative germinal center B cells is favorable for efficient generation of quiescent memory B cells, and Bach2 has an important role in metabolic change during this process.

研究分野：免疫学

キーワード：記憶B細胞 Bach2 胚中心 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

記憶 B 細胞の産生・分化機構を解明することは、獲得免疫系による生体防御機構の理解、そして効果的なワクチン開発のために極めて重要である。しかしながら、胚中心 B 細胞から記憶 B 細胞への分化メカニズムについて、その分子機構は未解明の点が多い。例えば、抗体産生細胞(プラズマ細胞)や胚中心 B 細胞のアイデンティティを司るマスター転写因子として、それぞれ Blimp1 や Bcl6 が知られているが、記憶 B 細胞にそのような因子が存在するのかが不明である。胚中心 B 細胞から記憶 B 細胞への分化誘導機構を解析するために、申請者らは胚中心から生成してすぐの記憶 B 細胞を検出するマウス (S1pr2-ERT2cre × Ai14 マウス) を開発した。このマウスとモデル抗原 (NP ハプテン) を用い、B 細胞抗原受容体の体細胞高頻度突然変異を解析することで、申請者らは、記憶 B 細胞は胚中心形成後すぐの、親和性成熟が十分に起こる前の胚中心 B 細胞から誘導されやすいことを明らかにした。さらに、抗原親和性の高い胚中心 B 細胞と低い胚中心 B 細胞の遺伝子発現プロファイル比較から、親和性の低い細胞において転写因子 Bach2 が高い発現量を示すこと、また誘導的な Bach2 遺伝子欠損マウス (Bach2-flox × ERT2cre マウス) を用いた解析から、記憶 B 細胞の産生には Bach2 が必須であり、胚中心において Bach2 の発現量が高く維持されている細胞群が記憶 B 細胞に分化しやすいことを明らかにした (Shinnakasu R et al., *Nat Immunol*, 2016、Inoue T et al., *Immunol Rev*, 2018)。

2. 研究の目的

本申請研究ではこれらの知見を基に、記憶 B 細胞分化誘導において Bach2 がどのような役割を果たしているのか、その分子基盤を明らかにしていく。機能的胚中心の生成やそこからの記憶 B 細胞の分化は in vivo でしか再現されないことから、遺伝子改変マウスを用いた解析が必須である。申請者はすでに誘導的な Bach2 欠損マウス (Bach2-flox × ERT2cre)、胚中心 B 細胞特異的 Cre マウス (S1pr2-ERT2cre)、Bach2 の mRNA 発現レポーターマウス (Bach2-tdRFP)、FLAG-Bach2 融合タンパク質ノックインマウスの作製を完了しており、Bach2 の機能をマウス生体内において多面的に解析するための実験材料を有している。Bach2 標的遺伝子とその制御メカニズムを明らかにすることで、記憶 B 細胞を人為的に効率よく誘導することができれば、Bach2 を標的としたワクチンや免疫疾患の創薬開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) Bach2 欠損胚中心 B 細胞の細胞状態の解析

フローサイトメトリー解析により、Bach2 欠損胚中心 B 細胞の細胞状態を解析する。特にヌクレオチドアナログのパルス投与による増殖・細胞周期解析や、active caspase 染色による細胞死・アポトーシスの解析を行う。

(2) 胚中心 B 細胞における Bach2 転写制御標的遺伝子の探索、同定

Bach2-flox × ERT2cre マウスを用いて、Bach2 欠損胚中心 B 細胞のトランスクリプトームを RNA-seq 法により解析する。

(3) Bach2 転写制御標的遺伝子の機能解析

Bach2 による記憶 B 細胞産生に関わると考えられた機能的 Bach2 標的因子について、胚中心 B 細胞における機能を明らかにし、記憶 B 細胞分化誘導において Bach2 が胚中心で果たしている役割についてその分子基盤を解明する。

(4) Bach2 欠損と標的因子二重変異マウスの解析

Bach2 欠損マウスを用いて、標的因子の機能阻害を行い記憶 B 細胞産生を解析することで、Bach2 による標的因子制御の記憶 B 細胞産生における生理的意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Bach2 欠損胚中心 B 細胞は Dark zone に偏り過活性状態にある

Bach2 は Blimp1 の転写を抑制している。そのため Bach2 シングル欠損マウスは、Blimp1 の発現亢進により胚中心の形成を著しく阻害することから、本研究には Bach2/Blimp1 の二重欠損マウス

ス (*Bach2^{fl/fl} Prdm1^{fl/fl} ERT2cre B1-8^{hi}*) を用いた。コントロールには野生型あるいは *Blimp1* のシングル欠損マウス (*Prdm1^{fl/fl} ERT2cre B1-8^{hi}*) を用いた。Adoptive transfer 実験により、in vivo で誘導的に *Bach2* を欠損させたところ、胚中心 B 細胞は細胞増殖が亢進し、Dark zone に偏ることが分かった。また、c-Myc の発現上昇および phospho-S6 protein の発現上昇が認められ、細胞代謝が亢進していることも示唆された(図 1)。これらのことから、*Bach2* 欠損胚中心 B 細胞は過活性化状態にあることが分かった。

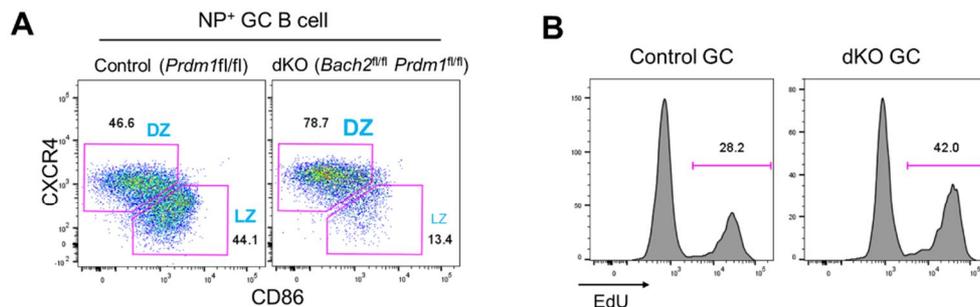


図1. *Bach2*欠損胚中心の解析

A. *Bach2*/*Blimp1*二重欠損胚中心B細胞は、DZの割合が上昇している。

B. *Bach2*/*Blimp1*二重欠損胚中心B細胞はパルス標識されたEdUの取り込みが多いことから、細胞増殖が亢進している。

(2) *Bach2* 欠損胚中心 B 細胞は代謝関連遺伝子群の発現が上昇している

Bach2^{fl/fl} Prdm1^{fl/fl} ERT2cre B1-8^{hi} B 細胞 adoptive transfer、NP-八ブテンタンパク質抗原免疫の後、タモキシフェン投与により *Bach2*/*Blimp1* の二重欠損を誘導した胚中心 B 細胞をセルソーターにより単離し、RNA を抽出、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。コントロールの *Prdm1^{fl/fl} ERT2cre B1-8^{hi}* マウスと比較したところ、(1)で解析した細胞表現型から予測された通り、*Bach2* 欠損に伴って mTORC1 シグナリング、糖代謝、酸化的リン酸化といった代謝関連遺伝子群の発現上昇が認められた (図 2)。

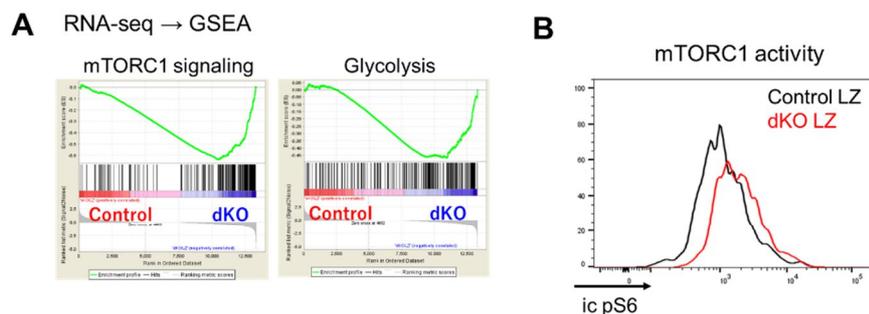


図2. *Bach2*欠損胚中心の代謝亢進

A. 胚中心B細胞のRNA-seq、GSEA解析。*Bach2*/*Blimp1*二重欠損ではmTORC1 signaling, Glycolysis関連遺伝子の発現が上昇している。

B. phospho-S6 proteinのFACS解析。*Bach2*/*Blimp1*二重欠損胚中心B細胞ではmTORC1活性が亢進している。

(3) 胚中心 B 細胞における mTORC1 活性は記憶 B 細胞分化を制御する

そこで、次に記憶 B 細胞産生における胚中心 B 細胞の代謝制御の役割を明らかにするため、mTORC1 阻害剤であるラパマイシン耐性マウス (*Mtor^{F2108L}*) を導入した (Ersching J et al, *Immunity*, 2017)。このマウスをレシピエントに、ラパマイシン感受性の野生型 B 細胞をドナーに用いた adoptive transfer 実験を行うと、ラパマイシン投与による B 細胞特異的な in vivo mTORC1 機能阻害が可能になる(図 3)。ラパマイシン感受性 B 細胞とラパマイシン耐性 B 細胞を 1:1 の比で混合し、ラパマイシン耐性マウスに移入、抗原免疫の後、ラパマイシンを投与した。その結果、記憶 B 細胞産生の割合が野生型 B 細胞において顕著に増加した。このことから、胚中心 B 細胞における mTORC1 活性低減は記憶 B 細胞分化を亢進させることが示唆された。抗原親和性の低い胚中心 B 細胞は、濾胞ヘルパー T 細胞への抗原提示が少なく、結果として B 細胞が受け取るサイトカイン等の T 細胞ヘルプが少なくなるため、mTORC1 活性は低くなることが予測される。すなわち本研究結果は、以前申請者らが提示した「低親和性胚中心 B 細胞が記憶 B 細胞へ分化しやすい」というモデルと合致する (Inoue T et al., *Immunol Rev*, 2018)。

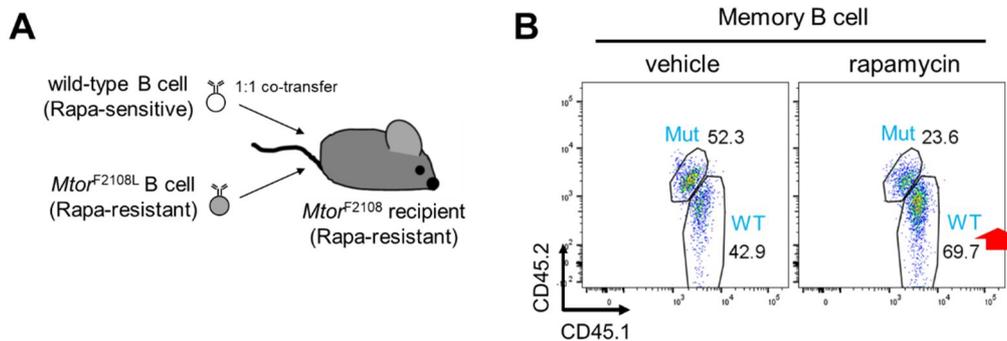


図3. ラパマイシン耐性マウスを用いたB細胞特異的*in vivo* mTORC1阻害実験

A. 野生型(ラパマイシン感受性)およびMtor変異(ラパマイシン耐性) B細胞を1:1で混合し、Mtor変異マウスに移入した。免疫後、ラパマイシン投与により野生型B細胞特異的にmTORC1活性を阻害することができる。
 B. 記憶B細胞産生のFACS解析。ラパマイシン投与により野生型(WT)の割合がMtor変異(Mut) B細胞と比較して顕著に増加した。

(4) ラパマイシン投与は Bach2 欠損マウスにおける記憶 B 細胞産生異常を解除する

Bach2 欠損マウスにおける記憶 B 細胞産生異常の原因の一つが mTORC1 過活性化に伴う代謝亢進であることが明らかにするため、*Bach2^{fl/fl} Prdm1^{fl/fl} ERT2cre B1-8^{hi}* B細胞をラパマイシン耐性マウスに移入し、同様に免疫とラパマイシン投与を行った。その結果、亢進した phospho-S6 protein レベルの正常化に伴い、胚中心 B 細胞の Dark zone への偏りが低減され、記憶 B 細胞産生が部分的に回復した(図 4)。

以上の結果より、胚中心 B 細胞の低親和性に伴う低代謝状態が、増殖・代謝が活発な胚中心から quiescent な記憶 B 細胞へ分化するための重要な要因の一つであることが示され、Bach2 は記憶 B 細胞分化に伴う代謝制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

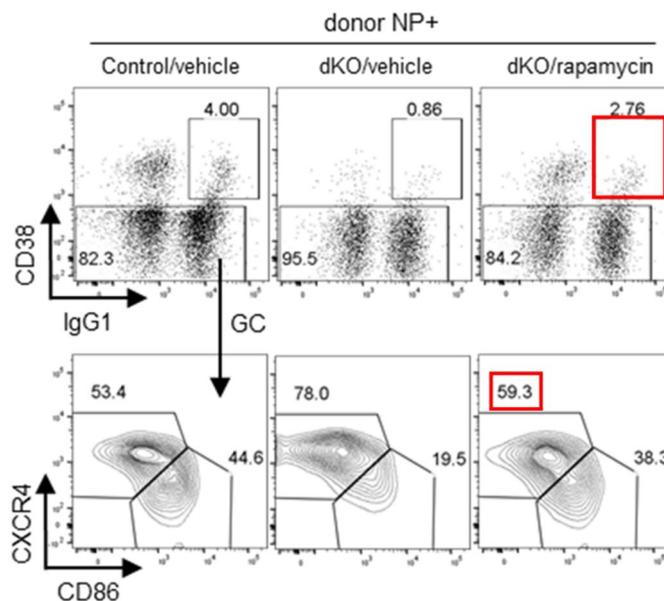


図4. ラパマイシン投与によるBach2欠損マウスにおける記憶B細胞産生異常の解除

Bach2/Blimp1二重欠損B細胞にラパマイシン投与によりmTORC1活性阻害を行うと、IgG1+記憶B細胞産生が部分的に回復した。また、胚中心B細胞のdark zoneへの偏りも部分的に解除された。

< 引用文献 >

Shinnakasu R et al., *Nat Immunol.* 2016 Jul;17(7):861-9. doi: 10.1038/ni.3460.

Inoue T et al., *Immunol Rev.* 2018 May;283(1):138-149. doi: 10.1111/imr.12640.

Ersching J et al., *Immunity* 2017 Jun 20;46(6):1045-1058.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshi Inoue, Imogen Moran, Ryo Shinnakasu, Tri Giang Phan, Tomohiro Kurosaki	4. 巻 1
2. 論文標題 Generation of memory B cells and their reactivation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 138-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.12640	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Dietmar Herndler-Brandstetter, Harumichi Ishigame, Ryo Shinnakasu, Valerie Plajer, Carmen Stecher, Jun Zhao, Melanie Lietzenmayer, Lina Kroehling, Akiko Takumi, Kohei Kometani, Takeshi Inoue, Yuval Kluger, Susan M. Kaech, Tomohiro Kurosaki, Takaharu Okada, Richard A. Flavell	4. 巻 48
2. 論文標題 KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 716-729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2018.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 James Badger Wing, Yohko Kitagawa, Michela Locci, Hannah Hume, Christopher Tay, Takayoshi Morita, Yujiro Kidani, Kyoko Matsuda, Takeshi Inoue, Tomohiro Kurosaki, Shane Crotty, Cevayir Coban, Naganari Ohkura, and Shimon Sakaguchi	4. 巻 114
2. 論文標題 A distinct subpopulation of CD25 ⁻ T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E6400-E6409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1705551114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeshi Inoue, Ryo Shinnakasu, Wataru Ise, Chie Kawai, Takeshi Egawa, and Tomohiro Kurosaki	4. 巻 214
2. 論文標題 The transcription factor Foxo1 controls germinal center B cell proliferation in response to T cell help	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1181-1198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20161263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 3件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takeshi Inoue
2. 発表標題 Germinal center-mediated memory B cell development is driven by cooperation of metabolic fitness and survival
3. 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Inoue, Tomohiro Kurosaki
2. 発表標題 mTORC1 and BCR signal regulate the formation of memory precursors in the germinal center
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Inoue, Tomohiro Kurosaki
2. 発表標題 B cell fate decision during germinal center reaction
3. 学会等名 Rising Stars in Cutting Edge Immunology Research(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Inoue
2. 発表標題 B cell fate decision during germinal center reaction
3. 学会等名 U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----