

令和 2 年 5 月 15 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：17K08883

研究課題名(和文) 高親和性プラズマ細胞の選択および生存維持を担う分子機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying selection and maintenance of high affinity plasma cells

研究代表者

伊勢 渉 (Ise, Wataru)

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：70323483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1) 胚中心B細胞の中からプラズマ細胞の前駆細胞を同定した。この細胞の誘導にはT細胞からのCD40L-CD40を介した強いシグナルと持続的な接着が必要であった。また胚中心B細胞のfate mapping実験を行い、プラズマ細胞は免疫初期・後期の胚中心から継続的に産生されることが明らかとなった。2) Tet2, Tet3欠損B細胞はプラズマ細胞分化に障害があること、転写因子IRF4を高発現できないことを明らかにした。IRF4遺伝子座にプラズマ細胞特異的かつTet2/3依存性に脱メチル化される領域を見出した。この領域のDNA脱メチル化がIRF4の高発現とプラズマ細胞分化に必要であることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体分子は生体に侵入してくるウイルスなどの外来異物を排除するのに必要不可欠な分子である。中でも高親和性の抗体はウイルスなどの中和活性が高く、高親和性抗体をいかに誘導するかがワクチンの成否を握ると考えられている。しかし高親和性抗体を生み出す仕組みは理解されていなかった。本研究では、高親和性抗体が生み出される場である胚中心におけるB細胞・プラズマ細胞の選択機構を明らかにすることができた。またエピジェネティック変化がプラズマ細胞分化を制御する機構も明らかにできた。本研究で得られた成果は効率の良いワクチン開発に重要な知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：1) We identified plasma cell precursors (Bcl6<sup>lo</sup>IRF4<sup>hi</sup>CD69<sup>hi</sup> cells) in germinal center (GC). The generation of these cells requires strong help from T cells via CD40 and sustained interaction with T cells. Fate mapping of GC B cells revealed that in contrast to memory B cells, plasma cells are generated from early to late GCs continuously. 2) We demonstrated that DNA demethylase Tet2 and Tet3 are required for plasma cell generation. Tet2/3-deficient B cells were not able to express high IRF4, which is essential for plasma cell generation. We found the CpG sites in Irf4 locus that are demethylated specifically in plasma cells in Tet2/3-dependent manner. These results suggest that DNA demethylation in these sites are required for high IRF4 expression and subsequent plasma cell generation.

研究分野：免疫学

キーワード：抗体 プラズマ細胞 胚中心 転写因子 B細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の生体に侵入してくるウイルスなどの外来異物の排除に抗体分子は不可欠である。抗体はB細胞から分化したプラズマ細胞によって産生される。プラズマ細胞は二つの経路から誕生する。胚中心非依存的経路と胚中心を経由する経路である。胚中心非依存的に誕生したプラズマ細胞は感染に反応して速やかに抗体を産生するが、その親和性は低く、抗体のクラスはIgM型が主である。一方胚中心を経由して誕生したプラズマ細胞は、親和性が高いものがほとんどで、IgGへとクラススイッチしたものが主となる。したがって胚中心からいかにプラズマ細胞を効率良く誘導するか、そしてそれを維持するかがワクチンの成否を握ると考えられる。しかし胚中心からプラズマ細胞が選択される機構や、産生されたプラズマ細胞を長期に渡って維持する機構は不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では 1) 胚中心から高親和性プラズマ細胞が誕生する分子機構を明らかにすること、2) 胚中心からプラズマ細胞が誕生する kinetics や骨髄への移動速度を明らかにすること、3) プラズマ細胞が長期生存を果たす機構を明らかにすること、そして 4) プラズマ細胞分化にエピジェネティック制御が与える影響を解明すること、を目的とした。

3. 研究の方法

- 1) マウスに抗原タンパク質として NP-CGG を免疫し、胚中心 (Germinal center; GC) を誘導した。NP 特異的 GC B 細胞の遺伝子発現、細胞表面分子発現、抗原に対する親和性を解析した。さらに濾胞性ヘルパーT細胞 (Tfh細胞) との接着を解析した。
- 2) GC B細胞 fate mapping システム (S1pr2-ERT2cre Tg x Rosa-LSL-tdTomato マウス) を利用して、リンパ節 GC からプラズマ細胞が産生される kinetics や骨髄プラズマ細胞プールへの寄与を解析した。
- 3) 転写因子 zbtb20 のプラズマ細胞の長期生存に果たす役割を解析するため、zbtb20 flox マウスを Rosa-LSL-ERT2cre マウスと交配した。マウスを NP-CGG で免疫後十分に時間が経過した後、タモキシフェンを投与することで誘導的に zbtb20 を欠失させ、プラズマ細胞の挙動を解析した。
- 4) プラズマ細胞分化にエピジェネティック修飾が与える影響を解析する目的で、DNA 脱メチル化酵素である Tet2 および Tet2 を誘導的に欠失するマウスを作製した。すなわち Tet2 flox Tet3 flox マウスを Rosa-LSL-ERT2cre マウスと交配した。これにタモキシフェンを投与し、Tet2 および Tet3 を欠失する B 細胞を得た。この Tet2/3 欠損 B 細胞のプラズマ細胞分化や DNA メチル化を解析した。

4. 研究成果

1) NP 特異的 GC light zone B細胞には Bcl6<sup>lo</sup>IRF4<sup>hi</sup>CD69<sup>hi</sup> 細胞 (フラクシオン1)、Bcl6<sup>hi</sup>IRF4<sup>lo</sup>CD69<sup>hi</sup> (フラクシオン2)、Bcl6<sup>hi</sup>IRF4<sup>lo</sup>CD69<sup>lo</sup> 細胞 (フラクシオン3) が存在した。これらの細胞の抗原に対する親和性を測定したところ、フラクシオン1が最も親和性が高く、そのB細胞抗原レセプターのレパトアはプラズマ細胞のレパトアと最も近いことが判明した。次にGC B細胞フラクシオンの網羅的遺伝子発現解析を行い、フラクシオン1はGC B細胞のアイデンティティを失いつつあること、またプラズマ細胞と似た遺伝子発現パターンを示すことが明らかになった。これらの結果からフラクシオン1はGC内のプラズマ細胞の前駆細胞であると考えられた(図1)。次にプラズマ細胞前駆細胞がどのようなシグナルで誘導されるかを解析し、Tfh細胞からの強いヘルプ、特に強いCD40シグナルが必要であること、IRF4が必要であることを明らかとした。また接着分子 ICAM-1 や SLAM を介した Tfh細胞との持続的な相互作用が必要であることも見出した(図2)。

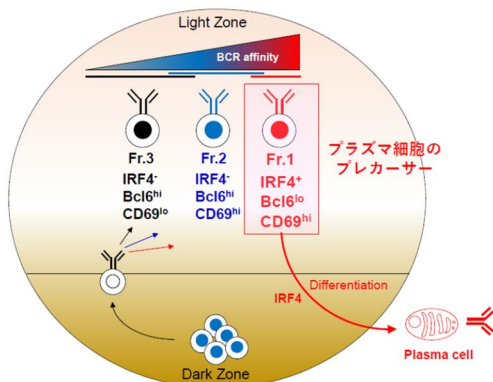


図1 GC B細胞フラクシオン

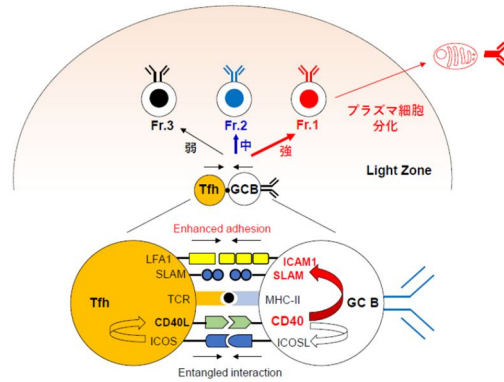


図2 GC B細胞とTfh細胞の相互作用

2) S1pr2-ERT2cre Tg x Rosa-LSL-tdTomato マウスを用いて、GC に由来するプラズマ細胞やメモリーB細胞の産生 kinetics を解析した。メモリーB細胞が主に初期（免疫後2週間以内）のGCからしか産生されないのに対し、プラズマ細胞は免疫初期のGCに加えて、後期（免疫後1か月あるいはそれ以降）のGCからも産生された。またGCの時期に関わらず、産生されたプラズマ細胞は骨髄のプラズマ細胞プール内に検出された。以上のことから、GCの機能は免疫後の経過時間により変化し、高親和性プラズマ細胞を産生し続けることが示唆された。

3) 転写因子 zbtb20 はプラズマ細胞の長期生存に重要な機能を果たすことが報告されていた。しかしその詳細なメカニズムは不明であった。そこで zbtb2flox x Rosa-LSL-ERT2cre マウスを抗原で免疫し、特異的抗体産生応答（血中抗体価、プラズマ細胞数）がプラトーに達した後でタモキシフェンを投与し、zbtb20 を誘導性に欠失させた。予想とは異なりプラズマ細胞の生存はzbtb20 が欠失しても全く影響を受けなかった。このことから zbtb20 はプラズマ細胞の生存そのものには必須でない可能性が考えられ、プラズマ細胞の生存制御機構を見直す必要があることが示唆された。

4) DNA 脱メチル化酵素である Tet2 および Tet3 を欠損する B 細胞（Tet2/3 欠損 B 細胞）をマウスに移入し、抗原の免疫で誘導されるプラズマ細胞分化を解析した。その結果 Tet2/3 欠損 B 細胞は NP-CGG や NP-Ficol1 免疫に対してプラズマ細胞へ分化できないことが判明した。プラズマ細胞分化に必須の転写因子 IRF4 の発現を解析したところ、Tet2/3 欠損 B 細胞の IRF4 発現レベルは中程度でとどまり野生型 B 細胞のように高レベルに発現することはなかった。そこでレトロウイルスを用いて Tet2/3 B 細胞に IRF4 を導入したところ、プラズマ細胞への分化が誘導された。このことから Tet2/3 欠損 B 細胞のプラズマ細胞分化障害は十分に IRF4 を発現できないことが原因であると考えられた。次に Tet による IRF4 発現制御を明らかにするために、IRF4 遺伝子座の DNA メチル化の状態を解析した。その結果プラズマ細胞特異的に、かつ Tet2/3 依存性に高度に脱メチル化される領域（転写開始点から 16 kb あるいは 1.0-1.4 kb 上流の領域）を発見した（図3）。このことからこれらの領域に含まれる CpG DNA の脱メチル化によって IRF4 が高発現し、それによってプラズマ細胞分化が誘導されることが示唆された。

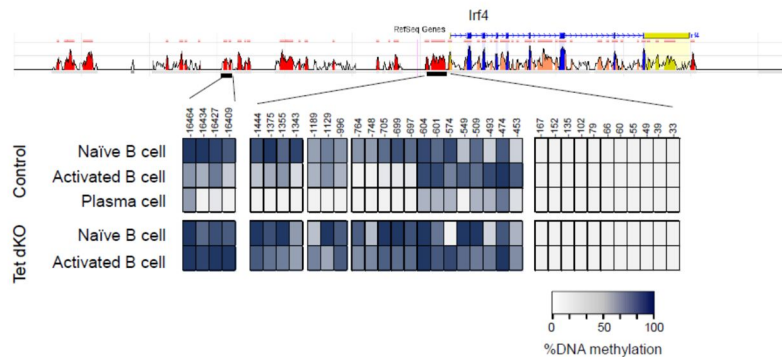


図3 IRF4遺伝子座のDNAメチル化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wataru Ise, Kentaro Fujii, Katsuyuki Shiroguchi, Ayako Ito, Kohei Kometani, Kiyoshi Takeda, Eiryo Kawakami, Kazuo Yamashita, Kazuhiro Suzuki, Takaharu Okada and Tomohiro Kurosaki	4. 巻 48
2. 論文標題 T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 702-715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.immuni.2018.03.027	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 -
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
1. 著者名 Wataru Ise and Tomohiro Kurosaki	4. 巻 1254
2. 論文標題 Regulation of Plasma Cell Differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 63-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-15-3532-1_6	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 -
1. 著者名 Wataru Ise and Tomohiro Kurosaki	4. 巻 288
2. 論文標題 Plasma cell differentiation during the germinal center reaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunological Review	6. 最初と最後の頁 64-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imr.12751	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊勢 涉
2. 発表標題 The heightened T-B interaction associates with plasma-prone germinal center B cells
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊勢 涉
2. 発表標題 液性記憶免疫応答を担うB細胞の分化とその選択機構
3. 学会等名 日本食品免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊勢 涉
2. 発表標題 Regulation of plasma cell differentiation from germinal center
3. 学会等名 日本免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2019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