

令和 3 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2020

課題番号：18KK0227

研究課題名（和文）新規レポーターマウスを用いた長寿命プラズマ細胞の可視化とその動態解析

研究課題名（英文）Analysis of cellular dynamics of long-lived plasma cells identified by using a novel reporter mouse system

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） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：プラズマ細胞を特異的にかつ誘導性に蛍光ラベルできる実験系を構築することで、長期生存プラズマ細胞の同定に成功した。この長期生存プラズマ細胞を分離し、遺伝子発現の解析、細胞表面マーカーの同定、さらにシンガポール免疫ネットワークとの国際共同研究により骨髄内ライブイメージング系を樹立し、これまで不明であった長期生存プラズマ細胞の特徴を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス禍で社会的にも認知が進んだように、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。抗体分子を産生するプラズマ細胞を以下に長期に渡って生存させるか、その生存機構を明らかにすることはワクチン開発を考えるうえで非常に重要な課題である。本研究で行った、長期生存プラズマ細胞の同定と動態解析は、インフルエンザウイルスや新型コロナウイルスへの免疫応答の理解、ワクチン開発に大きな貢献をするものである。

研究成果の概要（英文）：We have established the experimental system in which plasma cells can be specifically and inducibly labeled with fluorescent protein. This system allowed us to identify and isolate genuine long-lived plasma cells. We analyzed gene expression profile of long-lived plasma cells and identified their cell surface markers. Furthermore, we were able to perform intra-bone marrow live imaging of fluorescent-labeled, short-lived or long-lived plasma cells for the first time and found the difference in their dynamics in bone marrow, which may be related to their longevity.

研究分野：免疫学

キーワード：プラズマ細胞 寿命 抗体 イメージング

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。抗体分子の半減期が数日～数週程度であるのに対し、感染・ワクチン接種後に抗体産生応答が時に数十年と持続する。これは抗体を産生するプラズマ細胞の一部が骨髄で長期に渡って生存し続けるからだと考えられてきた。実際にヒトの骨髄内に 50 年前に感染したと考えられる麻疹に対する抗体を作り続けるプラズマ細胞が検出できた例が報告されている。したがってこのような長寿命なプラズマ細胞の生存を支える分子細胞基盤を明らかにすることは効率の良いワクチン開発のためにも必須である。

末梢リンパ組織で誕生したプラズマ細胞は大部分が数日から一週間以内で死滅するが、その一部が骨髄に移動し、生存因子が供給される **niche** で長期生存が支持されると考えられてきた。しかし骨髄プラズマ細胞は **heterogeneous** な集団であり必ずしも全ての骨髄プラズマ細胞が長寿命ではない可能性を指摘する報告もなされた。骨髄プラズマ細胞の生存を支える分子基盤を明らかにするためには、まず機能的に長寿命なプラズマ細胞を識別・分離可能にする実験系を構築すること、それをを用いて骨髄内プラズマ細胞の生存、動態の追跡と遺伝子・分子レベルでの変化を明らかにすることが不可欠であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、プラズマ細胞を特異的にかつ誘導性に蛍光ラベルできる新規マウスモデル系を用いて、**1)** プラズマ細胞の生存を追跡することで、真に長期生存を果たしたプラズマ細胞を同定すること、**2)** 長期生存プラズマ細胞（長寿命プラズマ細胞）の遺伝子発現プロファイルを明らかにすること、**3)** 長期生存プラズマ細胞のライブイメージング系を確立し、その動態を明らかにすること、を目的とした。

3. 研究の方法

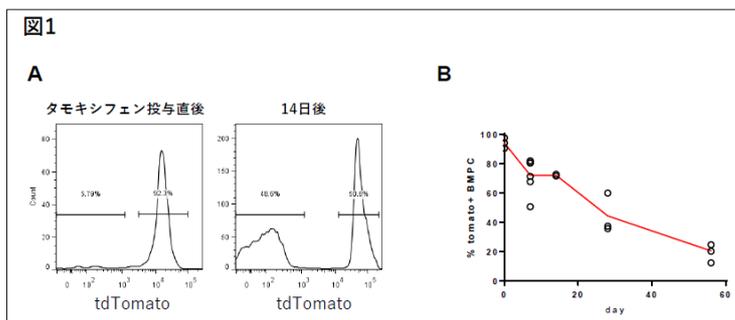
1) プラズマ細胞特異的遺伝子である Blimp-1 の下流に ERT2-cre を挿入した Blimp-1-ERT2cre マウスと Rosa-Stop-tdTomato マウス (Ai14 マウス) を交配した。この Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスにタモキシフェンを投与すると体内のプラズマ細胞が tdTomato で不可逆的に蛍光ラベルされる。またタモキシフェンの投与をやめると、その後に de novo に誕生したプラズマ細胞は蛍光ラベルされない。この実験系において、タモキシフェンを 3 日間投与し全身のプラズマ細胞を tdTomato でラベルした後、タモキシフェン投与を中断した。7、14、28、56 日後に骨髄細胞を回収し、蛍光ラベルされたプラズマ細胞の割合や細胞表面分子の発現を解析した。

2) タモキシフェン投与直後、28、56 日後に生存している tdTomato 陽性骨髄プラズマ細胞を分離し、RNA シークエンス解析を行った。

3) シンガポール免疫ネットワークの Dr. Ng とともに骨髄プラズマ細胞のライブイメージングを行った。Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスにタモキシフェンを投与した後、頭頂骨内に存在するプラズマ細胞の観察を二光子顕微鏡下で行った。またハプテン NP 特異的 B 細胞レセプターを発現する B1-8 マウスを Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスと交配し、得られたマウスの B 細胞を野生型マウスに移入した。これにタモキシフェンを投与し、NP 特異的プラズマ細胞を tdTomato でラベルした。二光子顕微鏡下で NP 特異的プラズマ細胞の挙動を解析した。

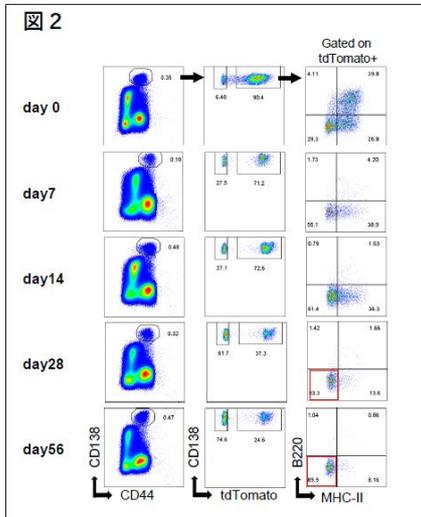
4. 研究成果

1) Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスへのタモキシフェンの投与直後にはほぼ全ての骨髄プラズマ細胞が tdTomato 陽性であった。しかしタモキシフェン投与を中止して 7 日目には骨髄内に tdTomato 陰性プラズマ細胞が検出されはじめ、14 日目には tdTomato 陽性プラズマ細胞の割合は 50%にまで低下した (図 1A)。骨髄プラズマ細胞中の tdTomato 陽性プラズマ細胞の割合は時間とともに減少し、56 日目には約 20%程度まで低下した (図 1B)。tdTomato 陽性細胞の割合はその後ほとんど変わらなかったことから、骨髄流入から 2 か月生存したプラズマ細胞は長寿命を獲得していると考えられた。



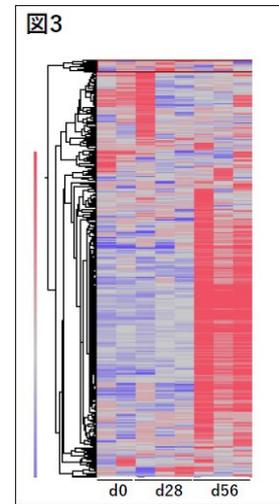
次に長寿命プラズマ細胞を簡便に識別できる表面マーカーを同定する目的で、骨髄プラズマ細胞を蛍光ラベルした後に細胞表面分子の発現パターンの変化を経時的に観察した。ここでは B 細胞マーカーである B220 と

MHC クラス II (MHC-II) の発現を解析した。蛍光ラベル直後のプラズマ細胞は、B220+MHC-II+、B220-MHC-II+、B220-MHC-II- の 3 つのポピュレーションで構成されていた。しかし時間の経過とともに B220+MHC-II+および B220-MHC-II- の割合が減少し、56 日後に生存していたプラズマ

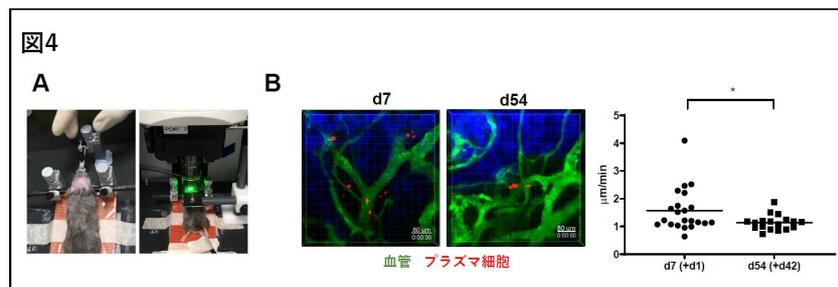


細胞のほとんどは B220-MHC-II- であった (図 2)。各ポピュレーションの細胞数の変化を元に、半減期を算出したところ、B220+MHC-II+ は 2.4 日、B220-MHC-II+ は 49.3 日、B220-MHC-II- は 102.9 日であった。細胞表面マーカーの変動をより正確にとらえるために、B 細胞の移入実験も行った。ハプテン NP 特異的 B 細胞レセプターを発現する B1-8 マウスを Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスと交配し、得られたマウスの B 細胞を野生型マウスに移入した。抗原で免疫後、タモキシフェンを投与し、B1-8 プラズマ細胞を蛍光ラベルした。免疫後骨髄に現れた B1-8 プラズマ細胞は B220+MHC-II+ のみであった。しかし時間の経過とともに表現型が変化し、1 か月後に生存していた B1-8 プラズマ細胞はほぼ B220-MHC-II- となっていた。以上の結果から、骨髄に流入した B220+MHC-II+ プラズマ細胞はその 70-80% が死滅するが、残りは B220-MHC-II- として長期生存することが明らかとなった。

2) プラズマ細胞の生存や機能を制御している内的因子を同定する目的で、タモキシフェン投与直後、28、56 日後に生存している tdTomato 陽性骨髄プラズマ細胞を分離し、RNA シークエンス解析を行った (図 3)。得られた遺伝子発現データを元にクラスター解析などを行ったところ、長寿命プラズマ細胞では増殖や細胞周期に関わる遺伝子群の発現が低下していることが判明し、quiescent な状態にあることが示唆された。また長期生存プラズマ細胞に高発現する多くの遺伝子が見出された一方で、有意に増加するパスウェイはほとんど見つけられなかった。



3) シンガポール免疫ネットワークの Dr. Ng とともに骨髄内プラズマ細胞のライブイメージングを行った。Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスにタモキシフェンを投与してプラズマ細胞を蛍光ラベルした後に、麻酔下で頭頂骨から二光子顕微鏡により骨髄内プラズマ細胞のイメージングを行うことができた (図 4A)。抗原特異的プラズマ細胞のイメージングを可能にするために、先に述べた B1-8 B 細胞の移入系を用いた。骨髄に到着したのプラズマ細胞 (免疫 7 日目) と骨髄で長期生存を果たしたプラズマ細胞 (免疫 2 か月後) の動態を解析したところ、免疫 7 日目の骨髄内抗原特異的プラズマ細胞には著しく動いている細胞が含まれるのに対し、免疫 2 か月後の骨髄内抗原特異的プラズマ細胞のほとんどは静止していた (図 4B)。このことから骨髄内抗原特異的プラズマ細胞の動態は生存・滞在時間に伴い変化することが示唆された。またこれらプラズマ細胞上の接着分子 (インテグリンなど) の発現パターンを解析したところ、免疫 7 日目と 2 か月後では発現パターンが変化する分子の存在が明らかになった。したがって長期生存プラズマ細胞は骨髄内環境 (niche) に親和性が高くなっており、環境から生存因子の供給をより強く受けている可能性が考えられた。



そこで長期生存プラズマ細胞がコンタクトしている細胞を同定する目的で、Blimp-1-ERT2cre マウスと光変換タンパク質 (Photoactivatable-GFP) 発現マウスを交配した。このマウスを用いることで長期生存プラズマ細胞の近傍に位置する細胞を光照射により標識することが可能となる。長期生存プラズマ細胞の近傍を光照射することにより標識された細胞を回収し、フローサイトメトリーにより解析したところ、長期生存プラズマ細胞の周囲に存在する細胞種は、ランダム照射により回収された細胞種とは異なることが判明した (データ省略)。これより、長期生存プラズマ細胞の生存は特殊な niche によって支えられている可能性が考えられた。現在、長期生存プラズマ細胞の周囲に存在する細胞の性質を明らかにするためにより詳細な解析を進めているところである。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujii K, Tanaka S, Hasegawa T, Narazaki M, Kumanogoh A, Koseki H, Kurosaki T, Ise W.	4. 巻 32
2. 論文標題 Tet DNA demethylase is required for plasma cell differentiation by controlling expression levels of IRF4.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 683-690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa042.	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 Tanaka S, Ise W, Inoue T, Ito A, Ono C, Shima Y, Sakakibara S, Nakayama M, Fujii K, Miura I, Sharif J, Koseki H, Koni PA, Raman I, Li QZ, Kubo M, Fujiki K, Nakato R, Shirahige K, Araki H, Miura F, Ito T, Kawakami E, Baba Y, Kurosaki T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Tet2 and Tet3 in B cells are required to repress CD86 and prevent autoimmunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 950-961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-020-0700-y.	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 Ise W, Kurosaki T	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 Ise W, Kurosaki T	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 Immunol Rev.	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

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
研究分担者	安達 悠 (Adachi Yu) (40749016)	国立感染症研究所・免疫部・主任研究官 (82603)	
研究分担者	黒崎 知博 (Kurosaki Tomohiro) (50178125)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授（常勤） (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
シンガポール	シンガポール免疫ネットワーク		