

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06480

研究課題名(和文) シングルセル解析による活性化B細胞の多様な応答機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of diverse response mechanisms of activated B cells by single cell analysis

研究代表者

武藤 哲彦 (MUTO, Akihiko)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80343292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞は抗原で活性化されると複数の細胞運命から選択して応答する。細胞運命決定の多様性は外的要因と細胞の内的要因が統合されて制御される。しかし、内的調節因子は確定されておらず、協調的に機能は不明である。分化に伴って遺伝子発現が変化することから転写因子が内因に想定されてきた。しかしシングルセルレベルでは如何に制御するのか不明である。レポーターマウスの解析からBach2の確率的な発現が内因として働き個々のB細胞の不均質性をうむことを示した。シングルセルPCR解析ではBach2の発現レベルがB細胞の運命決定の可能性に影響することがわかった。本研究で活性化B細胞運命決定の制御メカニズムの一端を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫応答を担うBリンパ球(B細胞)は、抗原で活性化されると抗体を分泌する形質細胞へ分化するのか、抗体のアイソタイプをデフォルトのIgMからIgGやIgAもしくはアレルギーの原因となるIgEに変更するクラススイッチをおこなうのか、免疫記憶を担うメモリーB細胞に分化するのか、さらに抗体の抗原に対する結合能(親和性)を上げるために胚中心B細胞に分化するのかという複数の細胞運命から選択する。しかし、この細胞運命決定がどのようなメカニズムで規定されるのかは不明であった。本研究では転写因子Bach2が確率的に決定される細胞運命の細胞自身の内的要因である可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In B cell immune response, antigen-activated B cells select their cell fate from multiple outcomes. The heterogeneity in cell fate decisions is regulated by the integration of extrinsic and intrinsic factors. However, specific intrinsic regulators and their coordinated functions are unclear. Several transcription factors have been implicated as intrinsic regulators, and one major unanswered question is how these factors regulate cell fate decision at the single-cell level. Flowcytometric analysis of reporter mice, which indicate Bach2 expression via RFP fluorescence, demonstrate that stochastic expression of Bach2 works as a cell intrinsic factor providing heterogeneity to individual B cells. Single cell PCR analysis indicate that Bach2 expression levels can influence the probability for B cell fate decision. Our study reveals an intrinsic molecular mechanism for the regulation of activated B cell fate decision.

研究分野：分子生物学

キーワード：B細胞 Bach2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

未感作 B 細胞 (ナイーブ) が抗原により活性化された後の免疫応答では、B 細胞にさまざまな細胞運命の選択肢がある。それは、IgM クラスの抗体を分泌する形質細胞への分化、クラススイッチ応答を実行後に IgG または IgA などの抗体にアイソタイプを変更した形質細胞への分化、免疫記憶に関わるメモリー B 細胞への分化、そして、抗原に対して抗体の親和性を上昇する胚中心 B 細胞への分化である。たとえ、等しく細胞を刺激しても B 細胞集団は全細胞での均一な応答はおこなわず、個々の細胞は異なる応答を示す。この現象を踏まえて、免疫応答の多様性を生み出すメカニズムは何かという「問い」に挑戦しようとした。なぜなら細胞増殖と分化のバランスが破綻すると病態に直結することが報告されているため、リンパ球の分化の制御メカニズムを解明し、免疫応答の統合的な理解を目指すこととした。

B 細胞応答の多様性は、外的要因である抗原刺激の強度とヘルパー T 細胞とのコンタクトや分泌するサイトカインなどの共役刺激との組み合わせによって調節される。これらの環境からの刺激の種類と強度が、細胞増殖の程度と分化の頻度を規定する。一方、環境からの刺激に応答する B 細胞自身の内的要因が確率的な運命決定に寄与すると考えられていたが、この実態は未解明であった。ここで、細胞の活性化状態が個々の細胞で異なるのは、細胞ごとの遺伝子発現の違いが一因と考えられる。したがって、転写調節因子が、細胞の内的要因である可能性が最も高い。

2. 研究の目的

申請者は、転写因子 Bach2 が B 細胞の活性化応答の過程で、形質細胞への分化を抑制し、「クラススイッチを実行する B 細胞」への運命決定に必須であることをマウス遺伝学的手法で解明していた。その後、個々の B 細胞における Bach2 の発現量の違いが、活性化 B 細胞の運命決定に影響を及ぼす可能性を見出していた。予備的な実験からは、Bach2 の発現量が多い B 細胞は、クラススイッチを実行する傾向があるというデータを得ていた。しかしながら、Bach2 単独では細胞運命決定に至らず、他の転写因子との協働で細胞運命が決まると予想された。そこで、本研究では、活性化 B 細胞が段階を経て分化する過程で、Bach2 を中心とした遺伝子制御ネットワークの挙動 (ダイナミクス) を単一細胞 (シングルセル) レベルで解析し、細胞運命決定の多様性を生み出す分子基盤 (メカニズム) の解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、B 細胞の活性化応答を制御する遺伝子ネットワークを構成因子および因子間のつながりのダイナミクスをシングルセルレベルで検証した。そのために以下の実験をおこなった。

(1) 活性化 B 細胞におけるシングルセル PCR による遺伝子発現パターンの検討。

B 細胞分化の IgM 分泌形質細胞への分化および、クラススイッチ応答ののち IgG1 分泌形質細胞への分化は、体外 (ex vivo) 培養系で再現することが可能である。そこで、この ex vivo 細胞分化誘導系を活用し、個々の B 細胞の遺伝子発現変化をシングルセル PCR で検出し、統計的に解析する。このシングルセル PCR での重要な点は、解析対象とする「細胞の選定」および「遺伝子リストの作成」にある。本研究では B 細胞の運命決定の分子基盤の理解を目的とするため、解析の対象とする細胞は、未分化な B 細胞とする。そこで、培養系で活性化した B 細胞のうち、分化を遂げた IgM 分泌形質細胞および IgG1 にクラススイッチをした B 細胞は、分化後の指標となる基準サンプルとして用いた。解析対象の未分化細胞は Bach2 遺伝子の発現を RFP の蛍光に置き換えてモニターできるレポーターマウスの脾臓 B 細胞を培養系で活性化したもののうち、Bach2 の発現量を基準としてフローサイトメトリー (FACS) でシングルセルを分取する。その際に、Bach2 の発現の高い細胞と低い細胞を RFP 蛍光の蛍光強度に基づいて分取し、シングルセル PCR の解析対象とした。解析の対象とする遺伝子リストは、文献から B 細胞分化に関わる転写因子を主にリストアップした。データ解析ではクラスタリング解析を用いて遺伝子発現のダイナミクスに基づいて分化に伴う細胞系譜を推定することで、未分化 B 細胞が活性化し、分化の方向性を確定する過程を捉える。

(2) Bach2 と協働する因子の機能の検証

シングルセル解析の結果、未分化な細胞集団は、分化の進行に沿って幾つかの亜集団に分けることができる可能性がある。その亜集団を特徴づける遺伝子に関しては、ノックダウンおよび過剰発現させ、B細胞の運命決定において、どのような役割を担うのかを検証する。

4. 研究成果

(1) B細胞の運命を決定する内的要因は何かを調べるため、はじめに Bach2 の遺伝子発現を RFP の蛍光量に置き換えてモニターできるマウス (Bach2RFP レポーターマウス) と形質細胞分化のマスター転写因子である Blimp-1 の遺伝子発現を GFP の蛍光量に置き換えてモニターできるマウス (Blimp-1GFP レポーターマウス) を交配してダブルレポーターマウスを得た。Bach2 の mRNA 発現量と RFP の蛍光量を比較したところ正の相関性があることがわかった。次に、クラススイッチの実行に必須の酵素である AID をコードする遺伝子 (Aicda 遺伝子) と形質細胞分化のマスター転写因子である Blimp-1 遺伝子の発現を調べたところ、Bach2 の発現と Aicda 遺伝子の発現は正の相関を示し、Blimp-1 遺伝子の発現は逆相関を示した。したがって、Bach2 の発現レベルは、活性化 B 細胞の異なる分化状態をあらわすと考えられた。

(2) 活性化 B 細胞の発現量が分化状態と相関するのか ex vivo 培養 4 日目にシングルセルレベルで調べた。IgG1 陽性のクラススイッチした B 細胞では Bach2 の発現が高く形質細胞分化を示す Blimp-1GFP 陽性細胞では Bach2RFP の蛍光量が低いことがわかった。Bach2 の発現量は ex vivo で培養している期間に徐々に減少する。そこで、Bach2 の発現量は B 細胞の分化状態とどのように関連するのかを経時的に調べた。すると解析した全ての日で同様の結果を得た。

(3) クラススイッチを実行した、もしくは、形質細胞分化した B 細胞の頻度は、細胞分裂回数に伴って増加することが知られている。すなわち細胞分裂の進行は成熟状態を反映する。そこで、ex vivo 培養下で分裂回数と Bach2RFP の蛍光強度との関係を FACS で調べた。すると分裂回数に伴って RFP の蛍光強度は段階的に減少することがわかった。時系列の変化を調べた 2) の実験と同様に、全ての分裂回数で IgG1 陽性 B 細胞は Bach2RFP の発現が高く、Blimp-1GFP 陽性細胞では Bach2RFP の蛍光量が低かった。たとえば 6 回分裂した B 細胞は 2 回分裂 B 細胞よりも Bach2 の発現量が低い。これは形質細胞の頻度が多いからとは言い切れない。なぜならクラススイッチした IgG1 陽性細胞の頻度も増えるためである。Bach2 が B 細胞の成熟度を反映した分裂回数ごとに分化の閾値になっている可能性がある。

(4) Bach2 の発現量がナイーブ B 細胞の運命決定に影響するのかを調べた。そのため、培養前の脾臓 B 細胞を Bach2RFP の発現量に基づいて高い細胞と低い細胞 (各々 Bach2 高発現細胞と Bach2 低発現細胞) の 2 分画にわけ、培養数日後に FACS 解析をおこなった。すると、クラススイッチした細胞の頻度は Bach2 低発現細胞に比べて Bach2 高発現細胞で高いという結果を得た。一方、形質細胞へ分化した細胞の頻度は、逆に、Bach2 高発現細胞に比べて Bach2 低発現細胞で高いという結果を得た。したがって、初めの Bach2 の発現レベルは、未感作 B 細胞 (ナイーブ B 細胞) において B 細胞運命決定に影響することがわかった。

(5) 細胞分化は初めの活性化刺激によって駆動され、分化過程で継続的な要素によって修正されることが提唱されている。そこで、Bach2 が分化途上に継続的に細胞運命決定に影響する内因として機能し続けるのかを調べた。そこで、数日培養した活性化 B 細胞を Bach2 の発現量に基づいて 2 分画にわけ、再度独立して培養した後に FACS 解析をおこなった。すると、クラススイッチした細胞の頻度は Bach2 低発現細胞に比べて Bach2 高発現細胞で高いという結果を得た。一方、形質細胞へ分化した細胞の頻度は、逆に、Bach2 高発現細胞に比べて Bach2 低発現細胞で高いという結果を得た。したがって、Bach2 は活性化した B 細胞の運命決定にも持続的に寄与していることを明らかにした。

(6) Bach2 の発現が高い細胞を取り分けても全ての細胞がクラススイッチするわけではなく、一定の割合で形質細胞へ分化する細胞が存在する。そこで、5) の実験で 2 分画に分けた集団の Bach2 の発現のダイナミクスを検証した。Bach2 の発現が高い細胞と明確に低い細胞を取り分けても、数日培養すると Bach2 の発現量がオーバーラップする様子が観察された。すなわち、Bach2 の細胞内の発現量は時間に伴って変化する「ゆらぎ」が生じていることを示唆する。このことから、B 細胞の運命決定に貢献する Bach2 の発現量がゆらぐことが、B 細胞の活性化応答

の不均一性もしくは多様性を生む装置になっていると考えられる。

(7) 分化誘導刺激をした *ex vivo* 培養を続けてもクラススイッチを実行する B 細胞もしくは形質細胞の前駆細胞となる未分化 B 細胞が終始存在する。Bach2 の発現の「ゆらぎ」なかで高発現に達することに加えて、さらに他の転写因子の発現が活性化するという条件が整うことが、クラススイッチを実行するのに必要なのではないかと考えられた。転写因子 Pax5 は Aicda 遺伝子の発現を活性化する転写因子であることから、Pax5 が Bach2 に加えた内因になるのかを検証した。そこで、細胞内の Bach2 と Pax5 の発現量を FACS 解析した。すると IgG1 陽性細胞では Pax5 は高い発現を示した。一方、IgG1 発現の有無に関わらず Bach2 と Pax5 の発現は正の相関を示した。したがって、この結果から、Bach2 の高発現細胞集団のなかから、Pax5 を発現する細胞が出現し、その細胞が優先的にクラススイッチを実行しているわけではないと考えられた。

(8) 次に転写因子 IRF4 と Bach2 の発現の関係を調べた。IRF4 はナイーブ B 細胞では発現が低く、活性化に伴い発現が上昇する。活性化 B 細胞のなかで IRF4 低発現の細胞はクラススイッチを実行し、IRF4 高発現の細胞は形質細胞へ分化することが知られている。FACS 解析の結果、Pax5 と同様に IgG1 の発現の有無に関わらず、IRF4 と Bach2 は正の相関性を示したため、IRF4 も Pax5 と同様に Bach2 高発現細胞集団内で、クラススイッチを実行するトリガーにはならないと考えられた。ただし Bach2 低発現細胞集団には IRF4 強陽性の細胞集団が観察された。この細胞集団には Blimp-1 の発現がある細胞とない細胞が含まれていた。したがって、この結果から Bach2 の発現が低い細胞のなかから IRF4 を高発現する細胞が出現して形質細胞分化に方向性が決定され、その後 Blimp-1 の発現が上昇して形質細胞として成熟するという段階を辿って分化が進行すると考えられる。

(9) IgG1 も Blimp-1 も発現していない B 細胞のうち、Bach2 を高発現する B 細胞集団内にクラススイッチの特徴を示す細胞が含まれるのかを調べるため、シングルセル PCR によって遺伝子発現パターンを検証した。このとき、Bach2 高発現細胞に加えて、Bach2 低発現細胞も検証し、さらに IgG1 陽性細胞および形質細胞も分化した細胞の指標として併せて比較した。そして、得られた遺伝子発現のデータを用いてクラスター解析を実施した。その結果、Bach2 低発現細胞集団は形質細胞と同じクラスターに分類された。一方、Bach2 高発現細胞集団は IgG1 陽性細胞と同じクラスターに分類された。さらに Bach2 高発現細胞クラスターを精査するとふたつの転写因子によって特徴づけられる可能性が見出された。これらふたつの転写因子の発現は排他的であり、Bach2 高発現細胞集団のおおむね半数で発現が観察された。また、これらふたつの転写因子は形質細胞では発現が検出されなかった。

(10) これらふたつの転写因子の B 細胞活性化応答での機能を明らかにするため、*ex vivo* 培養分化誘導系でノックダウン実験を実施した。その結果、両方の転写因子は Blimp-1 遺伝子発現を抑制する可能性を見出した。この作用は、Bach2 の機能と協調的に働くと考えられる。一方で、Aicda 遺伝子の発現は片方の転写因子のみで活性化に寄与する可能性を見出した。したがって、Bach2 高発現細胞集団のうち、この転写因子を発現している細胞集団がクラススイッチの準備段階にある細胞である可能性がある。

以上の結果から、ナイーブ B 細胞からクラススイッチする B 細胞もしくは形質細胞へ分化の運命決定では、細胞が刺激を受けた時点での細胞の内因である Bach2 の発現量に影響を受けることを明らかにした。そして、形質細胞への分化およびクラススイッチの実行に段階を経て分化が進むことの一部を示唆する実験結果を得た。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nishizawa Hironari, Matsumoto Mitsuyo, Chen Guan, Ishii Yusho, Tada Keisuke, Onodera Masafumi, Kato Hiroki, Muto Akihiko, Tanaka Kozo, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-021-03613-y	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武藤哲彦
2. 発表標題 活性化B細胞の多様な応答機構のシングルセル解析
3. 学会等名 19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武藤哲彦
2. 発表標題 転写因子の発現量のゆらぎに基づく細胞運命決定メカニズム
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武藤哲彦
2. 発表標題 The activated B cell fate decision is regulated by fluctuated expressions of Bach2
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武藤哲彦
2. 発表標題 Induction of essential trace element transporter influences B cell immune response
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学医学系研究科・生物化学分野（教授・五十嵐和彦） http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/
--

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

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
---------	---------