

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07254

研究課題名(和文)アロ応答による成熟B細胞の動態と抗体産生機序の解明

研究課題名(英文)Kinetics of B cell subset for antibody production in alloresponse

研究代表者

北沢 祐介 (Kitazawa, Yusuke)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00467581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脾臓の成熟B細胞には、濾胞B細胞(FOB)と辺縁帯B細胞(MZB)が存在し、共に液性免疫を誘導する上で重要な細胞です。しかし、アロ応答においては不明です。そこで、MZB または FOB 優位な反応が起こる動物モデルを構築し、免疫組織化学染色を用いてアロB 応答の動態パターンを比較しました。その結果、アロ応答はT細胞応答を誘発し(T-依存性)、GCの形成などFOB優位な増殖応答を示した。さらにAFCにおいては、MZB応答のような早期でのAFC誘導を示さず、FOB応答の特徴(誘導時期、動態パターン、特性)に類似する結果を示した。よって现阶段では、アロ応答は、FOB応答優位な反応を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、アロT細胞移入後の宿主脾臓outer PALS領域にて独特なB細胞動態を発見した。それは、胚中心(GC)形成前に辺縁帯B細胞(MZB)由来と考えられるAFC応答が起こり、GC形成後に濾胞B細胞(FOB)由来のAFC応答を示したことである。さらに脾摘した宿主に、アロT細胞移入後の宿主血中のドナー抗体価を測定すると、正常(脾臓有り)に比べアロIgM抗体産生が顕著に低下していた。本研究は、アロB応答は、MZBとFOBが混在した独特の動態を示し、脾臓特有のMZBが記憶免疫に関与するとういう新しい学説になるという意義がある。

研究成果の概要(英文)：There are two major subgroups of mature B cells in the spleen: follicular B cells (FOB) and marginal zone B cells (MZB), both of which are important cells for inducing humoral immunity. However, their behavior in alloreaction has not been reported. Therefore, we set up an animal model in which MZB or FOB-dependent responses occur, and the dynamic patterns of the AlloB reaction were compared using immunohistochemical staining. The result, alloresponses induced T cell responses (T-dependent) and showed FOB-dominant proliferative responses, such as GC formation associated with FOB responses. Furthermore, antigen-specific AFCs did not show early induction into AFCs as in MZB responses, and showed characteristics similar to those of FOB responses (induction time, kinetic pattern, properties). Therefore, at this stage, it is suggested that alloresponses are FOB-dominant reactions.

研究分野：移植免疫学

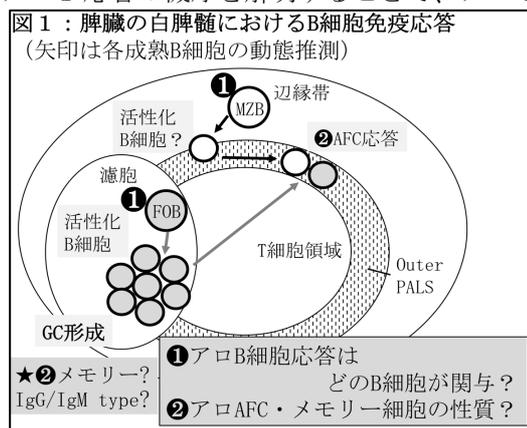
キーワード：アロ抗体産生応答 辺縁帯B細胞 濾胞B細胞 FITC-Ficoll FITC-KLH FITC-Allo T cell FITC-AFCs 形質細胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脾臓の成熟 B 細胞には 2 大亜群である濾胞 B 細胞 (FOB) と辺縁帯 B 細胞 (MZB) があり、共に液性免疫を誘導する極めて重要な細胞である。特に MZB は脾臓特有の細胞であるので、脾摘患者での脾臓摘出後重症感染症 (OPSI) の発症との関与が注目されている。両 B 細胞の抗原認識の形式は、FOB が胸腺依存型、MZB が胸腺非依存型であると言われているが、アロ応答の報告例は未だにない。一方、成熟 B 細胞からの分化細胞であるメモリー B 細胞は、記憶免疫において IgM 型メモリー B 細胞が主であり、それが 2 次感作によって IgM から IgG にクラススイッチし、IgG-抗体産生細胞に分化して IgG を産生することがわかっている。しかし、MZB と FOB のどちらが抗体産生細胞 (AFC) やメモリー B 細胞へ分化しているかについては未だ不明である。そこで、研究代表者は、アロ T 細胞を移入したアロ成熟 B 細胞応答 (アロ B 応答) 誘導動物モデルを用い、MZB と FOB 応答、AFC とメモリー B 細胞を解析し、アロ B 応答の機序を解明することで、アロ T 細胞ベクターワクチン開発を目指す。

研究代表者は、アロ T 細胞移入後の宿主脾臓 outer PALS 領域にて独特な B 細胞動態を発見した。それは、胚中心 (GC) 形成前に MZB 由来と考えられる AFC 応答が起こり、GC 形成後に FOB 由来の AFC 応答を示したことである。さらに脾摘した動物を宿主とし、アロ T 細胞移入後の宿主血中のドナー抗体価を測定すると、正常 (脾臓有り) に比べアロ IgM 抗体産生が顕著に低下していた。そこで、応募者は、①アロ B 細胞応答は、MZB と FOB が混在した独特の動態を示すのでは？ ②脾臓特有の細胞である MZB がメモリー B 細胞の誘導に関与しているのでは？ という、新しい学説につながる問いを考案した (図 1)。



2. 研究の目的

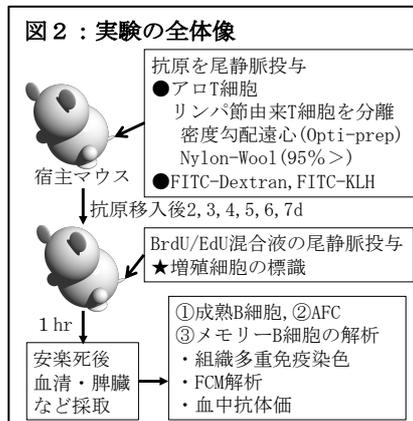
治療のために脾臓を摘出した患者は、脾臓摘出後重症感染症 (OPSI) を発症しやすい。感染症予防のための脾摘前ワクチン接種は、メモリー B 細胞を誘導するため不可欠である。それゆえ脾臓の B 細胞応答の解明は重要であり、その研究成果が予防としてのワクチン開発につながる。応募者は、同種異系 (アロ) 血液中で、T 細胞が宿主脾臓で効率よくアロ抗体産生を誘導することを発見した。さらに、アロ T 細胞に FITC などのハプテン抗原を標識してから投与すると、その抗原に対する抗体応答も誘導でき、細胞ベクターワクチンとして有効であることを示した。その結果を踏まえ、応募者は、アロ T 細胞移入後の宿主にてアロ B 細胞応答を解析することは、効率的な細胞ベクターワクチン療法の開発につながると思った。今回はアロ T 細胞移入後の宿主脾臓について、応募者が考案した EdU による多重免疫染色を駆使した形態学的解析と定量的解析による免疫応答解析を同時に行い、脾臓の成熟 B 細胞 (濾胞 B 細胞、辺縁帯 B 細胞) の動態とアロ抗体産生細胞の性質を明らかにする。さらに再感作 (2 次感作) によるメモリー B 細胞の性質を明らかにし、アロ B 細胞応答の機序を解明することで、ハプテン抗原を標識したアロ T 細胞の細胞ベクターワクチンとしての有用性を示す。

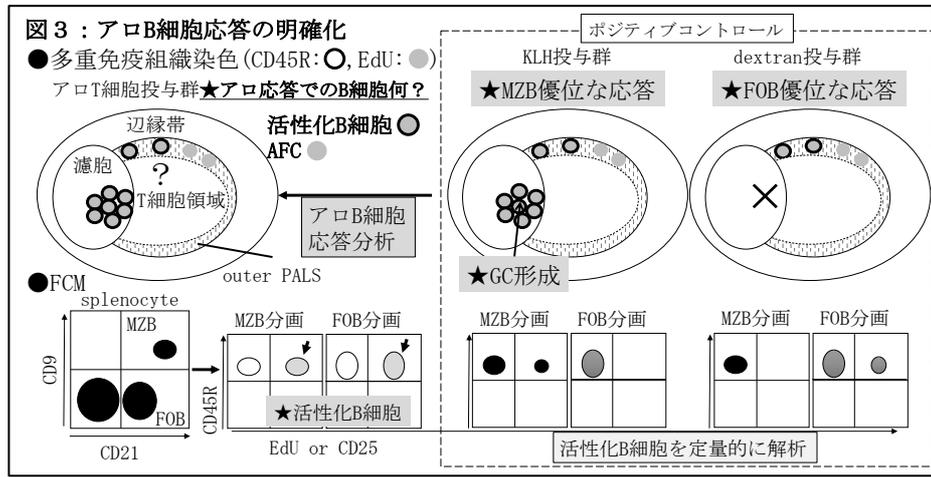
3. 研究の方法

(1) アロ成熟 B 細胞応答の明確化

初めにアロ T 細胞移入後の宿主マウス脾臓にて経時的に脾臓を摘出し、蛍光 4 重染色 (CD9: MZB マーカー, CD45R: B 細胞マーカー, Type IV collagen: 組織構築, EdU: 増殖細胞, CD25: 活性化マーカー) を用い、活性化 B 細胞の動態や優位性を免疫組織染色 (IHC) と FCM により解析する。全採血致死 1 時間前に EdU/BrdU を尾静脈投与し、増殖細胞の標識を行う (図 2)。次に、FITC 標識 dextran (MZB 優位) または FITC 標識 KLH (FOB 優位) を単独で投与し同様の解析を行い、この結果を MZB と FOB 応答のコントロールとし、アロ B 細胞の細胞動態を解析する。

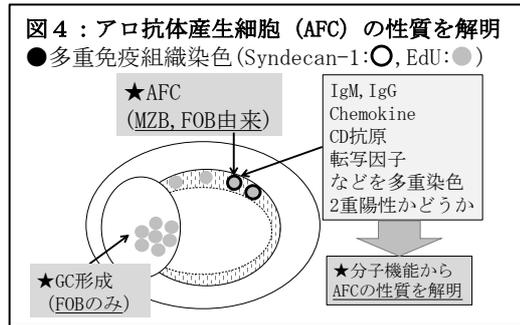
予想としては、(1) FITC 標識 dextran は、MZB 応答を誘導し、GC 形成なしで活性化 B 細胞 (EdU⁺, CD25⁺) に分化、(2) FITC 標識 KLH は、FOB 応答を誘導し、活性化 B 細胞を含め GC が形成される (図 3)。これによりアロ B 細胞への MZB と FOB の関与の有無と動態が明らかになる。





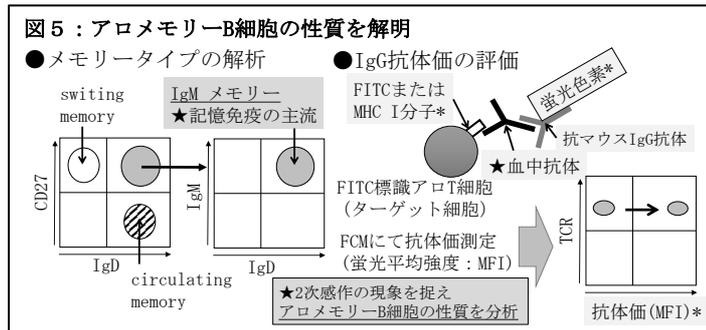
(2) AFCの性質を解明

(1)の組織をAFCの性質を示す機能分子を含めた蛍光4重IHC (Syndecan-1:AFCマーカー, Type IV collagen:組織構築, Edu:増殖細胞, 機能分子:細胞内外分子等)を行い、AFCの性質を解析する。予想としてAFCは、MZB依存적であればGC形成なしで早期に、FOB依存적であればGC形成後にouter PALSに出現する(図4)。AFCの性質は、AFC特異的マーカー上での機能分子の染色有無にて明らかになる。



(3) メモリーB細胞の性質を解明

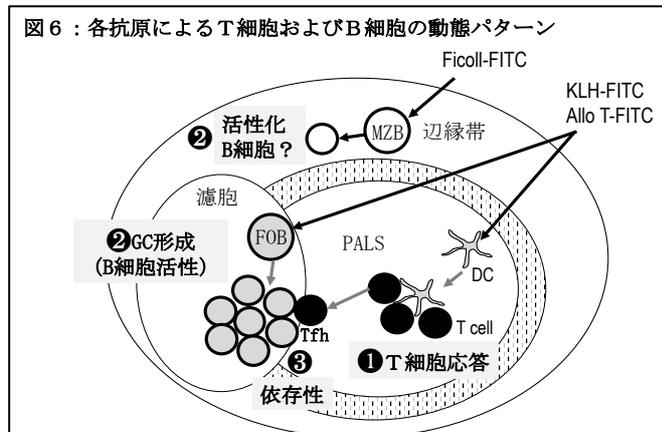
2次感作の宿主にて、アロメモリーB細胞由来のAFC応答を解析する(図5)。アロメモリーB細胞のタイプや生存期間を特定するため、1次感作からのtime lagを設け、2次感染前後でのIgG/IgMメモリー細胞の解析と血中抗体を解析する。これによりアロメモリーB細胞の性質が明らかになる。



4. 研究成果

(1) アロ成熟B細胞応答の明確化

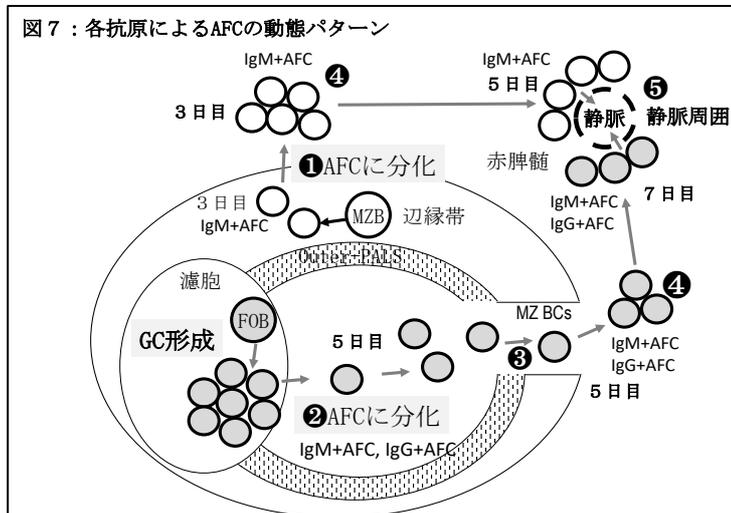
アロ成熟B細胞応答を解析するために、初めにFITC標識FicollおよびFITC標識KLHを単独で投与し、宿主の脾臓におけるPALS内のT細胞応答、MZ領域内のMZB応答およびLF領域内のFOB応答の解析を行った。免疫組織染色の解析では、Ficoll投与群は、PALS領域内でのT細胞増殖応答 (BrdU⁺CD3⁺ cells) はなく、MZ領域内においても顕著なMZBの増殖応答 (BrdU⁺CD45R⁺ cells) は見られなかった。またリンパ濾胞 (低濃度のみ) での増殖応答、胚中心 (GC) の形成も見られなかった。KLH投与群は、投与3日目にT細胞増殖応答を示し(図6①)、4日目からリンパ濾胞にてFOBとみられる増殖応答 (BrdU⁺CD45R⁺ cells) を示した(図6②)。リンパ濾胞の増殖応答時、CD25分子の発現は検出できなかったが、GC形成時の活性化マーカーであるGL7分子の発現がみられた。さらにGC形成付近において濾胞T細胞 (Tfh) と思われる活性化T細胞 (BrdU⁺CD3⁺ cells) が濾胞とPALS境界付近に存在し、T細胞依存性を示す動態も確認された(図6③)。よって、Ficoll投与群では目立った増殖応答は見られなかったが、KLH投与群では、T細胞応答の依存性を、リンパ濾胞での



FOB 増殖応答および GC の形成を示す FOB 特有の動態パターンを見つけることができた。フローサイトメトリー (FCM) では、成熟 B 細胞が活性化に伴い成熟 B 細胞マーカー (CD9, CD21 など) が欠損、そのため特定細胞のマーカーによる定量解析はできなかったが特にアロ応答の解析には問題ない。ただし、切片上でも定量解析は可能であるので将来的にはアプローチする予定である。そこで次に、アロ T 細胞投与群でのアロ応答解析を行い、動態パターンを解析した。その結果、KLH 投与群と同様な増殖応答を示し、アロ成熟 B 細胞応答が FOB 優位な応答であることがわかった。

(2) AFC の性質を解明

FITC 標識をした Ficoll, KLH およびアロ T 細胞を投与後、宿主の脾臓について AFC (CD138⁺ cells) および標識した FITC ハプテン抗原に対する抗ハプテン抗体を産生する細胞 (α FITC⁺ cells) について解析を行った。Ficoll 投与群では、投与 3 日目に辺縁帯 (MZ) とその付近の赤脾髄 (図 7 ①④)、投与 5 日目に赤脾髄の髄索の静脈周囲に確認された (図 7 ⑤)。KLH およびアロ T 細胞投与群では、投与 5 日目において PALS から赤脾髄 (RP) に向けて点在し (図 7 ②③④)、ラットのような Outer PLAS での極端な局在性は見られなかった。



おそらくマウスとラットでの白脾髄の構造 (PALS と隣接するリンパ濾胞の割合) による違いではないかと考えられる。さらに、その点在した動態が MZ bridging channels (MZ BCs) を通過している動態も確認した (図 7 ③)。投与 7 日目では、Ficoll 投与群と同様に髄索の静脈周囲に確認された (図 7 ⑤)。よって、 α FITC⁺ 抗体産生細胞が、Ficoll 投与群では早期にかつ MZ に、KLH およびアロ T 細胞投与群では Ficoll 投与群より共に遅れた時期 (GC の形成時) に PALS から MZ BCs を通過して赤脾髄に向かう AFC の動態パターンが得られた。

次に AFC の性質として、産生される α FITC⁺ の Ig ハプロタイプ (IgM, IgG) について解析を行った。免疫組織染色では、Ficoll 投与群において、投与 3 日目の MZ とその付近の赤脾髄 (図 7 ①④) および 5 日目 (図 7 ⑤) の髄索の静脈周囲に IgM 陽性細胞のみが確認された。一方、KLH およびアロ T 細胞投与群では、投与 5 日目の PALS から赤脾髄に向けて点在 (図 7 ②③④)、投与 7 日目の髄索の静脈周囲に IgM 陽性細胞、IgG 陽性細胞が確認された (図 7 ⑤)。フローサイトメトリー (FCM) では、抗 FITC IgM 抗体を産生する AFC (α FITC+IgM+AFCs)、抗 FITC IgG 抗体を産生する AFC (α FITC+IgG+AFCs) を多重染色にて捉え、経時的に定量解析することに成功した。すると、アロ T 細胞投与群は、Ficoll 投与群に比べ、遅れて α FITC+IgM+AFCs だけでなく α FITC+IgG+AFCs も誘導した。また誘導した α FITC+IgM+AFCs の数は少なかった。一方、KLH 投与群との対比では、同じ時期で AFC を誘導するが、アロ T 細胞投与群の方が共に AFC の数は多かった。よってアロ抗体産生応答により誘導された AFC は、MZB 優位な応答を示す Ficoll 投与群より遅れて出現し、KLH 同様の動態パターンが見られた。また、AFC の性質として FITC 抗原特異的な IgM および IgG を産生する AFC であった。また、FOB 優位な応答として、KLH 投与群との対比だけではあるが、アロ T 細胞投与群が多くの特異的な抗体産生細胞が誘導できたことは、我々が現在まで行ってきたワクチンベクターとしてアロ T 細胞が、効率的に獲得免疫を誘導できるツールであることを示唆している。

(3) メモリー B 細胞の性質を解明

FITC 標識をした Ficoll, KLH およびアロ T 細胞を投与後、同じ抗原で再度刺激し脾臓での α FITC+IgM+AFCs, α FITC+IgG+AFCs を解析した。その結果、特に KLH およびアロ T 細胞を投与群では、FITC 特異的な AFC 誘導が 1 次免疫よりも早期に確認されたが非常に少なかった。さらに、再刺激前後に CD27 分子を含めた組織染色および FCM 解析を行った。その結果、顕著な差が見られず、かつ CD27 陽性細胞が多いため、メモリー細胞として断定する分子として困難であることがわかった。現段階では、メモリー B 細胞に特異的な細胞膜上の発現分子が無いことから、今後は先行研究にて明らかになりつつある転写因子などの細胞内分子を含めて新たに解明する予定である。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueta Hisashi, Xu Xue-Dong, Yu Bin, Kitazawa Yusuke, Yu Enqiao, Hara Yoshiaki, Morita-Nakagawa Miwa, Zhou Shu, Sawanobori Yasushi, Ueha Satoshi, Rokutan Kazuhito, Tanaka Toshiya, Tokuda Nobuko, Matsushima Kouji, Matsuno Kenjiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Suppression of liver transplant rejection by anti-donor MHC antibodies via depletion of donor immunogenic dendritic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 261 ~ 272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa076	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北沢祐介
2. 発表標題 Involvement of FOB and MZB cell in alloresponse
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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