

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07622

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスにおける抗DNA B細胞の親和性増大とその制御

研究課題名(英文) Affinity maturation of anti-DNA B cells in systemic lupus erythematosus

研究代表者

榊原 修平 (Sakakibara, Shuhei)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門准教授

研究者番号：10618838

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)：全身性エリテマトーデスでは、低親和性抗ssDNA前駆B細胞が体細胞変異を経て、病原性抗dsDNA抗体産生細胞へ進化する。本研究では、生体でのこの前駆B細胞に受ける制御を明らかにする為、患者由来抗dsDNA抗体のgermline配列をIg遺伝子座に挿入したKIマウス G9gl を作製した。このマウスでは、レセプター編集によって大部分のG9gl B細胞が除去された。末梢に逃れたG9gl B細胞は、アナジーに陥っており、様々な条件で誘導した自己抗体産生経路に参加することができなかった。従って、抗ssDNA前駆B細胞は、多階層免疫寛容チェックポイントにて制御され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

自己反応性BCR KIマウスを用いた先行研究は多くあるが、それらは、自己抗原に対し高親和性を呈し、ヒト自己免疫疾患での自己抗体産生細胞の前駆B細胞を反映している訳ではなかった。本研究では、SLE患者由来の高親和性dsDNA抗体の抗体遺伝子配列を用いて、低親和性ssDNA BCR KIマウスを作製し、病原性自己抗体産生細胞の前駆B細胞の性状を調べた。この研究から、SLE発症においては、高親和性自己抗体産生に先んじて、B細胞免疫寛容の破綻が起こり、低親和性抗ssDNA前駆B細胞の分化・活性化が制限されない環境が作られることが示唆された。今回得られた知見は、新たな治療戦略の構築に有用である。

研究成果の概要(英文)：In systemic lupus erythematosus patients, low-affinity anti-ssDNA precursor B cells evolve into high-affinity anti-dsDNA antibody-secreting cells through somatic hypermutation. We attempted to unveil regulation of such precursor B cells in vivo. To this end, we generated G9gl KI mouse line which carries unmutated germline sequences from a lupus patient-derived pathogenic anti-dsDNA antibody. In the KI mice, a large proportion of B cells underwent receptor editing. In the periphery, escapee cells from receptor editing exhibited anergic phenotypes and failed to differentiate into germinal center B cells and antibody-producing cells. Collectively, multiple tolerance checkpoints prevent low-affinity precursors of pathogenic anti-dsDNA B cells from undergoing clonal expansion and affinity maturation.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 全身性エリテマトーデス 抗dsDNA抗体 自己抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)患者では、様々な自己抗体が産生される。特に、血清での抗 dsDNA 抗体の力価は疾患活動性に関連している。これまでの先行研究では、体細胞長変異が抗 dsDNA 抗体の抗原反応性に貢献していることが示されている。我々のこれまでの研究から、抗 dsDNA 抗体は、親和性の低い ssDNA 反応性の前駆 B 細胞から、親和性成熟とクローン拡大を経て、SLE 患者体内で産生されていることが分かってきた。

2. 研究の目的

これまでの既報や我々の先行研究から、低親和性抗 ssDNA を有する前駆 B 細胞は、免疫寛容維持機構によって抑制されるのか、という疑問が出てきた。その疑問を明らかにすべく、我々は SLE 患者由来抗 dsDNA 抗体クローン 121G9gI の germline 可変領域配列を免疫グロブリン遺伝子座に組み込んだノックインマウス G9gI を作製し、生体における低親和性抗 ssDNA B 細胞の表現系や活性化状態を解析した。

3. 研究の方法

SLE 患者から分離した抗 dsDNA 抗体 121G9 に由来する germline 抗体 121G9gI は弱い抗 ssDNA 反応性を呈する。Crsper/Cas9 システムを用いて 121G9gI の可変領域を免疫グロブリン遺伝子座へノックインした G9gI KI マウスを作製した。この KI マウスについて、末梢 B 細胞における G9gI KI 免疫グロブリン遺伝子の発現、各 B 細胞サブセットの割合、抗体産生、各種条件における自己抗体産生と G9gI BCR 発現細胞の割合、分化、体細胞変異獲得などを評価した。

4. 研究成果

(1) G9gI ヘテロ KI マウスでは、VH replacement によるレセプター編集により大部分の B 細胞が除去される

G9gI ヘテロマウスでは、B 細胞の減少が顕著で、脾臓 B 細胞の約 27%のみが G9gI BCR を発現していた(図1)。残りの B 細胞は、ノックイン遺伝子を持たない H 鎖アレル由来の免疫グロブリン遺伝子、あるいは、ノックイン遺伝子座からマウス VH と G9gI H 鎖が融合した BCR を発現していた。免疫グロブリン遺伝子座の配列解析などから、G9gI ヘテロマウスでは、H 鎖におけるレセプター編集が起こっていることが分かった。

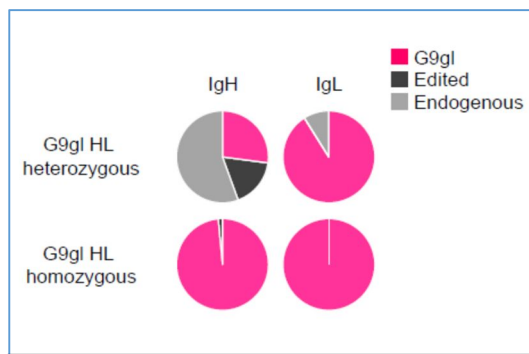


図1. G9gI KI マウス 脾臓濾胞 B 細胞における G9gI BCR 発現の検出。各マウスの脾臓から濾胞 B 細胞を単一細胞レベルで分取し、発現している BCR H 鎖 L 鎖を RT-PCR にて増幅の後、配列決定した。

(2) 末梢において G9gl B 細胞は、部分的なアナジーに陥り、容易にアポトーシスする

G9gl ホモマウスでは、ほぼ全ての成熟ナイーブ B 細胞が KI Ig H 鎖 L 鎖の両方を発現していた。この B 細胞は、細胞表面 IgM 及び IgD の発現量が低く、これまでに報告されたアナジー B 細胞の表現型を示した。DNA に対する反応性を細胞質カルシウム流入で計測すると、G9gl B 細胞は、dsDNA には全く反応しなかったものの、ssDNA に対しては、即座にカルシウムイオンの細胞質流入が起こった(図2)。このことから、G9gl B 細胞が高親和性抗 dsDNA B 細胞の前駆体のモデルとなることが確認された。*in vitro* における培養では、抗 CD40 抗体と IL4、IL5 存在下で、コントロールと同等に細胞増殖とクラススイッチをすることが分かった。抗体産生細胞への分化と IgM 産生は、コントロールと同等であったが、IgG 産生については、G9gl B 細胞では著しく低かった。

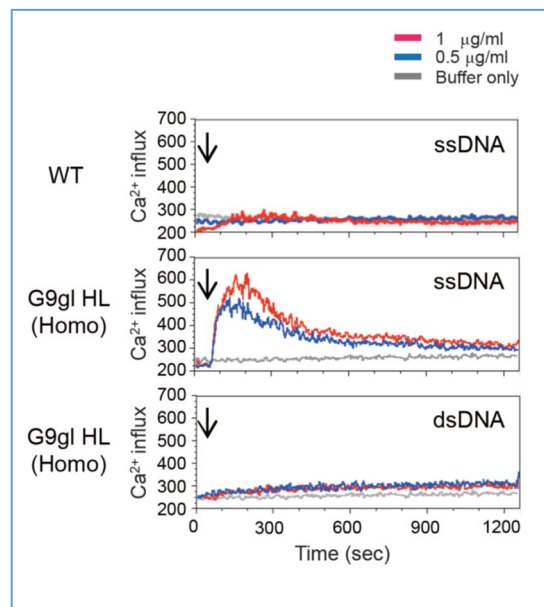


図2. G9gl B 細胞は、ssDNA に対して応答する。コントロール及び、G9gl KI ホモマウス脾臓から分取した濾胞 B 細胞を ssDNA、又は dsDNA で刺激し、細胞内カルシウム流入をフローサイトメトリーで検出した。

さらに詳細な表現型解析を行うため、コントロールと G9gl KI ホモマウスの脾臓成熟濾胞 B 細胞を分取し、遺伝子発現を RNAseq にて調べた。G9gl B 細胞ではコントロールに比べて、分化・増殖・活性化因子の発現上昇が認められた。その一方で、AKT1 遺伝子の大幅な発現減少やアポトーシス関連遺伝子の増加が認められた。実際に G9gl B 細胞を培養すると、コントロール B 細胞に比べて、生存率の半減期が約 60%短いことが分かった。以上の結果から、G9gl B 細胞は、低親和性 ssDNA 反応性を有し、ユニークなアナジーに陥っており、細胞死を起こしやすい形質を持っていることが判明した。

(3) 代替自己抗原の免疫によって、G9gl B 細胞はメモリー B 細胞へと分化する

BSA をコンジュゲートしたバクテリア DNA を免疫すると、G9gl KI ヘテロマウスは自己抗体を産生した。この免疫下では、胚中心が形成されるが、胚中心分画において G9gl B 細胞は検出されなかった。一方、Boost した後の switched メモリー B 細胞では、約 20%の割合で G9gl B 細胞が存在した。その一方、形質芽細胞分画では、G9gl B 細胞はほとんど検出できなかった。

以上の結果から、抗 dsDNA 抗体産生細胞の前駆 B 細胞である低親和性抗 ssDNA B 細胞の親和性成熟とクローン拡大は多層性免疫寛容チェックポイントにおいて、負の制御を受けることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Sakakibara Shuhei, Yasui Teruhito, Jinzai Hideyuki, O'Donnell Kristy, Tsai Chao-Yuan, Minamitani Takeharu, Takeda Kazuya, Belz Gabrielle T, Tarlinton David M, Kikutani Hitoshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Self-reactive and polyreactive B cells are generated and selected in the germinal center during -herpesvirus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 27～38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz057	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 Tanaka Shinya, Ise Wataru, Inoue Takeshi, Ito Ayako, Ono Chisato, Shima Yoshihito, Sakakibara Shuhei, Nakayama Manabu, Fujii Kentaro, et al	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 Shimizu Mikito, Okuno Tatsusada, Kinoshita Makoto, Sumi Hisae, Fujimura Harutoshi, Yamashita Kazuya, Sugimoto Tomoyuki, Sakakibara Shuhei, Sakakibara Kaori, Koda Toru, Tada Satoru, Ishikura Teruyuki, Murata Hisashi, Beppu Shohei, Shiraishi Naoyuki, Sugiyama Yasuko, Nakatsuji Yuji, Kumanogoh Atsushi, Mochizuki Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Mitochondrial DNA enhance innate immune responses in neuromyelitis optica by monocyte recruitment and activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70203-x	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 Tsuji Hideaki, Ohmura Koichiro, Jin Hui, Naito Ryota, Arase Noriko, Kohyama Masako, Suenaga Tadahiro, Sakakibara Shuhei, Kochi Yuta, Okada Yukinori, Yamamoto Kazuhiko, Kikutani Hitoshi, Morinobu Akio, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi	4. 巻 74
2. 論文標題 Anti-Double Stranded DNA Antibodies Recognize DNA Presented on HLA Class II Molecules of Systemic Lupus Erythematosus Risk Alleles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 105～111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.41897	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 El Hussien Marwa Ali, Tsai Chao-Yuan, Satouh Yuhkoh, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Ikawa Masahito, Kikutani Hitoshi, Sakakibara Shuhei	4. 巻 34
2. 論文標題 Multiple tolerance checkpoints restrain affinity maturation of B cells expressing the germline precursor of a lupus patient-derived anti-dsDNA antibody in knock-in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 207 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab111	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 Onodera Taishi, Kita Shunsuke, Adachi Yu, Moriyama Saya, Sato Akihiko, Nomura Takao, Sakakibara Shuhei, Inoue Takeshi, et al	4. 巻 54
2. 論文標題 A SARS-CoV-2 antibody broadly neutralizes SARS-related coronaviruses and variants by coordinated recognition of a virus-vulnerable site	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 2385 ~ 2398.e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2021.08.025	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 Shinnakasu Ryo, Sakakibara Shuhei, Yamamoto Hiromi, Wang Po-hung, Moriyama Saya, Sax Nicolas, Ono Chikako, Yamanaka Atsushi, Adachi Yu, Onodera Taishi, Sato Takashi, Shinkai Masaharu, Suzuki Ryosuke, Matsuura Yoshiharu, Hashii Noritaka, Takahashi Yoshimasa, Inoue Takeshi, Yamashita Kazuo, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 218
2. 論文標題 Glycan engineering of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicits neutralizing antibodies for SARS-related viruses cross-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20211003.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211003	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 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ali El Hussien, S Sakakibara et al
2. 発表標題 Multiple tolerance checkpoints suppress generation and activation of B cells producing low-affinity germline precursors of SLE patient-derived high-affinity anti-dsDNA antibody in BCR knock-in mice
3. 学会等名 日本免疫学会
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
研究協力者	エル フシエン マルワ アリ (El-Hussien Marwa Ali)		
研究協力者	菊谷 仁 (Kikutani Hitoshi)		
研究協力者	伊川 正人 (Ikawa Masahito)		
研究協力者	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke)		

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