

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03503

研究課題名(和文) プラズマ細胞の長期生存と免疫調節機能を支える分子基盤の解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying long-term survival and immune-modulatory function of plasma cells

研究代表者

伊勢 渉 (ISE, Wataru)

大阪大学・感染症総合教育研究拠点・教授

研究者番号：70323483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：プラズマ細胞の運命追跡モデルを用いて骨髄、脾臓、腸管に存在するプラズマ細胞の長期生存能を解析した。その結果、骨髄が最も効率よくプラズマ細胞の生存を支持できること、抗体アイソタイプによっても寿命が異なる可能性が示唆された。また長寿命プラズマ細胞はB220I α MHC-II α であること、胚中心を經由したプラズマ細胞と經由せずに形成されたプラズマ細胞では細胞固有の半減期に差はないこと、長寿命プラズマ細胞は骨髄生存ニッチで静止していることも明らかにした。骨髄生存ニッチへの移動機構も解析し、転写因子KLF2依存性にインテグリン β 7陽性細胞が選択的に末梢リンパ組織から骨髄へ移動することも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラズマ細胞の長期生存を支える分子機構を解明することは、ワクチン開発のみならず、アレルギーや自己免疫疾患の治療法開発にも重要である。本研究ではプラズマ細胞の生存ニッチとしての骨髄の重要性を確認すると同時に、長寿命プラズマ細胞の骨髄移動の分子メカニズムを初めて明らかにした。また長寿命プラズマ細胞を識別可能なマーカーの同定にも成功した。本研究の成果は、抗体産生応答の持続性に優れたワクチン開発に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：We analyzed long-term survival of plasma cells in bone marrow, spleen, or gut by using plasma cell fate mapping system. We found that plasma cells survive in bone marrow better than in other tissues with isotype-dependent half-lives. Furthermore, we demonstrated that long-lived plasma cells are B220I α MHC-II α and are immobilized in the BM environment. Unexpectedly, there was no significant difference in the longevity between pre-GC and post-GC plasma cells. Finally, we analyzed molecular mechanisms by which plasma cells generated in lymphoid tissues migrate to bone marrow and found that the transcription factor KLF2 is required for integrin β 7 positive plasma cells to migrate to bone marrow.

研究分野：免疫学

キーワード：抗体 プラズマ細胞 長期生存 インテグリン

1. 研究開始当初の背景

プラズマ細胞から産生される抗体はウイルスや細菌の排除に必要不可欠である。プラズマ細胞の一部は骨髄などで長期に渡って生存し、抗体を産生し続けることから、プラズマ細胞の生存を支える分子基盤を明らかにすることはワクチン開発やアレルギー、自己免疫疾患の治療法開発にも重要である。しかしながら従来の研究は、抗原特異的プラズマ細胞数を測定するだけの古典的な実験方法に依存したものが主であり、プラズマ細胞の長期生存を追跡可能な実験系が存在しなかったために、長期生存の分子機構、抗体クラスによる生存・局在・機能の違いなどは一切明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

プラズマ細胞の生存を支える分子基盤を明らかにすることはワクチン開発やアレルギー、自己免疫疾患の治療法開発に重要である。本研究では、プラズマ細胞の fate-mapping システムを駆使して、以下のことを目的とする。1) 長期生存プラズマ細胞の特異的マーカーの同定、2) プラズマ細胞の長期生存能獲得機構の解明、3) 抗体のクラスや分化経路に依存したプラズマ細胞の生存メカニズムの解明、4) 長期生存ニッチにおける生存制御機構、5) 生存ニッチへのエントリー機構の解明。

3. 研究の方法

- 1) Blimp1-creERT2 マウスと Rosa-stop-tdTomato マウス (Ai14 マウス) を交配することによって、タモキシフェン投与と依存的に任意の時期に生存していたプラズマ細胞を誘導性かつ不可逆的に蛍光色素 tdTomato でラベル可能な実験系を構築した。この実験系を用いて、プラズマ細胞の生存を1年に渡って追跡した。
- 2) CD138-DTR マウス由来骨髄細胞を X 線照射マウスに移植することによって血球系細胞が CD138-DTR マウス細胞に由来する骨髄キメラマウスを作製した。このマウスにジフテリア毒素 (DT) を投与することで、"pre-existing" プラズマ細胞を消去した。
- 3) 胚中心由来プラズマ細胞の生存を追跡するために、胚中心由来細胞を誘導性かつ特異的にラベル可能な S1p2-creERT2 トランスジェニックマウス (Tg マウス) を使用した。S1p2-creERT2 Tg x Ai14 マウスを作製した。
- 4) プラズマ細胞の骨髄移動を制御する可能性があるインテグリンβ7 および Klf2 の flox マウスを作製した。これらのマウスは Rosa-creERT2 マウスと交配し、タモキシフェン投与によって誘導性に遺伝子ノックアウトを行った。

4. 研究成果

1) プラズマ細胞の長期生存追跡

プラズマ細胞の寿命を測定可能な Blimp1-creERT2 x Ai14 マウスにタモキシフェンを投与することでプラズマ細胞を tdTomato 陽性にし、1年に渡ってその生存を追跡した。骨髄、脾臓、小腸粘膜固有層 (Lamina Propria; LP) に存在する IgM、IgG、IgA 陽性プラズマ細胞を解析した。その結果、組織や抗体アイソタイプに関わらず、蛍光ラベルされたプラズマ細胞の割合は2週間ではほぼ半減すること、1年後にも生存しているプラズマ細胞の割合は20%以下であることが明らかになった。アイソタイプ別にプラズマ細胞の絶対数測定を行ったところ、IgM 陽性細胞の生存率が最も高く、IgG 陽性細胞と IgA 陽性細胞の生存率は同程度であった。3つの組織を比較した結果、抗体アイソタイプに関わらず、骨髄が最もプラズマ細胞の生存率が高かったことから、プラズマ細胞を効率よく骨髄ヘリクルートすることの重要性が示唆された。以降の実験では骨髄プラズマ細胞に焦点をあてることにした。

2) 長寿命プラズマ細胞の同定

上記実験において、骨髄プラズマ細胞プールには常に新しいプラズマ細胞が末梢から流入していることから、骨髄滞在歴には heterogeneity があることが示唆された。そこで pre-existing のプラズマ細胞を一度全て除去し、骨髄ヘントリーしたばかりのプラズマ細胞から生存を追跡するために、CD138-DTR マウスを用いた。Blimp1-creERT2 x Ai14 x CD138-DTR 骨髄キメラマウスを作製し、このマウスに DT を投与することで、その時点で存在していたプラズマ細胞を全て除去した。その後新たに誕生し、骨髄にエントリーしてくるプラズマ細胞を蛍光ラベルし、そのフェノタイプの変化と生存を追跡した。その結果骨髄に新たにエントリーしたプラズマ細胞の大部分は B220^{hi}MHC-II^{hi} というフェノタイプを示した。これは時間経過とともに B220^{lo}MHC-II^{hi}、B220^{lo}MHC-II^o と変化していき、3か月生存しているプラズマ細胞はほぼ一様

に B220^oMHC-II^o であった。Blimp1-creERT2 x Ai14 マウスを用いた解析においても、アイソタイプや局在組織に関わらず、B220^oMHC-II^o フェノタイプのプラズマ細胞は 1 年に渡ってその数がほぼ減少しなかった。以上より、長期生存プラズマ細胞は B220^oMHC-II^o であることが明らかになった。

3) pre-GC、post-GC プラズマ細胞の生存能の比較

骨髄には抗原で誘導された高親和性プラズマ細胞が蓄積しているという知見から、胚中心を経て形成されたプラズマ細胞 (post-GC プラズマ細胞) は、胚中心を経ずに形成された低親和性プラズマ細胞 (pre-GC プラズマ細胞) よりも寿命が長いとされてきた。しかしこれまでにしっかりと実験的に検証されたことはなかった。そこで胚中心 B 細胞の運命追跡が可能な、S1pr2-creERT2 Tg x Ai14 マウスを用いて、胚中心由来プラズマ細胞の生存を解析した。胚中心を経由しないプラズマ細胞は Blimp1-creERT2 x Ai14 マウスを用いて、胚中心が形成されるよりも早い段階で蛍光ラベルを誘導し、生存を解析した。その結果、pre-GC プラズマ細胞と post-GC プラズマ細胞では半減期に差は認められず、どちらの細胞も同じ効率で長寿命プラズマ細胞プールに入ることが明らかとなった。

4) 長寿命プラズマ細胞の骨髄内挙動

Blimp1-creERT2 x Ai14 マウスを用いて、骨髄にエンターしたばかりの短寿命プラズマ細胞と、骨髄滞在歴が長い長寿命プラズマ細胞の骨髄内挙動のライブイメージング解析を行った。その結果、短寿命プラズマ細胞は骨髄内で動き回っているのものが多いのに対し、長寿命プラズマ細胞は骨髄内でほとんど動かさず静止状態にあることが明らかになった。これより、プラズマ細胞は骨髄にエンターした後に、ニッチ (細胞) への結合性が上昇し、これが生存能を亢進させる可能性が示唆された。

5) 骨髄移動性プラズマ細胞の同定

末梢リンパ組織で誕生したプラズマ細胞が骨髄へ移動する分子機構は不明である。抗原の免疫で誘導されたプラズマ細胞の様々な接着分子の発現を解析したところ、骨髄にエンターしたばかりのプラズマ細胞や血液中に検出されるプラズマ細胞のほとんどがインテグリンβ7 陽性であるのに対し、脾臓やリンパ節のプラズマ細胞にはインテグリンβ7 陽性と陰性細胞が存在した。遺伝子発現や抗体遺伝子の比較解析の結果、脾臓・リンパ節のインテグリンβ7 陽性細胞はβ7 陰性細胞と比べて、有意に骨髄プラズマ細胞と共通性があることが判明した。このことから脾臓やリンパ節のインテグリンβ7 陽性細胞が選択的に骨髄へ移動する可能性が考えられた。

6) プラズマ細胞の骨髄移動を制御する分子機構

これまでリンパ球のインテグリンβ7 発現を制御する転写因子として KLF2 が報告されていた。そこで KLF2 がプラズマ細胞の骨髄移動に果たす役割を解析するために、Klf2 flox マウスを Rosa-creERT2 マウスと交配し、免疫後にタモキシフェンを投与することで誘導性にプラズマ細胞の KLF2 発現を欠失させたところ、Klf2 欠損プラズマ細胞は脾臓で正常に誘導されるものの、血液内や骨髄内にはほとんど認められなかった。したがって転写因子 KLF2 が抗原特異的プラズマ細胞の骨髄移動に必須の重要分子であることが明らかとなった。この時 Klf2 欠損プラズマ細胞はインテグリンβ7 発現を失っていたことから、インテグリンβ7 がマーカーとしてだけでなく、機能的にも骨髄移動に必要である可能性が考えられた。そこでインテグリンβ7 flox マウスを独自に作成し、Rosa-creERT2 マウスと交配し、免疫後にタモキシフェンを投与することで誘導性にプラズマ細胞のインテグリンβ7 発現を欠失させた。その結果、予想に反して、インテグリンβ7 欠損プラズマ細胞は正常に血液内そして骨髄へと移動することが可能であることが判明した。以上より、末梢リンパ組織に存在する骨髄移動性プラズマ細胞はサロゲートマーカーとしてインテグリンβ7 を発現すること、転写因子 KLF2 はインテグリンβ7 以外の分子を制御することによってプラズマ細胞の骨髄移動に寄与することが示唆された。

引用文献

Koike T, Fujii K, Kometani K, Butler NS, Funakoshi K, Yari S, Kikuta J, Ishii M, Kurosaki T, Ise W. Progressive differentiation toward the long-lived plasma cell compartment in the bone marrow. *J Exp Med*. 2023 Feb 6;220(2):e20221717. doi: 10.1084/jem.20221717.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Koike Takuya, Fujii Kentaro, Kometani Kohei, Butler Noah S., Funakoshi Kenji, Yari Shinya, Kikuta Junichi, Ishii Masaru, Kurosaki Tomohiro, Ise Wataru	4. 巻 220
2. 論文標題 Progressive differentiation toward the long-lived plasma cell compartment in the bone marrow	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20221717	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 Itahashi Kota, Irie Takuma, Yuda Junichiro, Kumagai Shogo, Tanegashima Tokiyoshi, Lin Yi-Tzu, Watanabe Sho, Goto Yasushi, Suzuki Jun, Aokage Keiju, Tsuboi Masahiro, Minami Yosuke, Ishii Genichiro, Ohe Yuichiro, Ise Wataru, Kurosaki Tomohiro, Suzuki Yutaka, Koyama Shohei, Nishikawa Hiroyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 BATF epigenetically and transcriptionally controls the activation program of regulatory T cells in human tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciimmunol.abk0957	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 Tsao Hsiao-Wei, Kaminski James, Kurachi Makoto, Barnitz R. Anthony, Dilorio Michael A., LaFleur Martin W., Ise Wataru, Kurosaki Tomohiro, Wherry E. John, Haining W. Nicholas, Yosef Nir	4. 巻 7
2. 論文標題 Batf-mediated epigenetic control of effector CD8+ T cell differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciimmunol.abi4919	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 Wataru, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Plasma cell generation during T-cell-dependent immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 797 ~ 801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab071	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 Shinya, Ise Wataru, Baba Yoshihiro, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 307
2. 論文標題 Silencing and activating anergic B cells*	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 43 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.13053	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 Lee Michelle S.J., Inoue Takeshi, Ise Wataru, Matsuo-Dapaah Julia, Wing James B., Temizoz Burcu, Kobiyama Kouji, Hayashi Tomoya, Patil Ashwini, Sakaguchi Shimon, Simon A. Katharina, Bezbradica Jelena S., Nagatoishi Satoru, Tsumoto Kouhei, Inoue Jun-Ichiro, Akira Shizuo, Kurosaki Tomohiro, Ishii Ken J., Coban Cevayir	4. 巻 219
2. 論文標題 B cell-intrinsic TBK1 is essential for germinal center formation during infection and vaccination in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211336	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, Pandelakis K, 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 Fujii Kentaro, Tanaka Shinya, Hasegawa Takanori, Narazaki Masashi, Kumanogoh Atsushi, Koseki Haruhiko, Kurosaki Tomohiro, Ise Wataru	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 International Immunology	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 -

〔学会発表〕 計2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 長寿命プラズマ細胞の分化と生存の制御
3. 学会等名 第7回日本骨免疫学会 冬期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊勢涉
2. 発表標題 B細胞に発現するTet2/Tet3による全身性自己免疫寛容の制御
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本食品免疫学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 492
3. 書名 食品免疫学事典	

〔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
---------	---------