

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16288

研究課題名(和文) B-1細胞における制御性B細胞および自己抗体産生細胞への分化機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of mechanism of differentiation of regulatory B cells and autoantibody-producing cells from B-1 cells

研究代表者

畑野 晋也 (Hatano, Shinya)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：90834929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当初予定していた胎児におけるB細胞の運命追跡システムの確立が至らなかったため、既に確立している成体マウスB細胞の運命追跡システムを用いて、長期間B細胞として生き続けている集団(老化長寿B細胞)に着目し、老齢マウスで増加し自己抗体産生に関与することが報告されている特殊なB細胞(加齢性B細胞)研究に取り組んだ。その結果、若齢B細胞と比較して、老化長寿B細胞にて発現が高い遺伝子X(未発表のためここでは遺伝子Xとする)の同定に成功した。また遺伝子Xのタンパク質発現は若齢B細胞では見られず、老化B細胞において検出できたことから、加齢性B細胞サブセットを規定する新規マーカー遺伝子とな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

B細胞は生体防御の中でも抗体産生など液性免疫の要となる細胞であるが、老化により液性免疫応答が低下することが報告されており、その原因は不明な点が多い。近年、加齢に伴い増加する特殊なB細胞サブセットであり、自己抗体産生に関与する加齢性B細胞が報告されたが、加齢性B細胞を規定するマーカーは詳細に同定されていない。本研究成果により、加齢性B細胞の新規マーカーとなりうる遺伝子Xの同定に成功した。この研究成果は今後の加齢性B細胞の機能や性状、自己免疫疾患への関与、そして老化による液性免疫応答低下メカニズムの詳細な解明に繋がる可能性があり、超高齢化社会における健康寿命の延長に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Because I couldn't establish the originally planned B cell fate tracking system for fetuses, I used the the already established adult mouse B cell fate tracking system and I worked on the study of Age-Associated B Cells that were reported to increase in aged mice and are involved in autoantibody production. As a result, I identified gene X, which is highly expressed in long-lived B cells of aged mice as compared to B cells of young mice. In addition, the protein expression of gene X was not observed in B cells of young mice and was detected in B cells of aged mice. These results suggested that gene X is a novel marker that defines a subset of Age-Associated B Cells.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞 加齢性B細胞 自己抗体 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患において B-1 細胞は自己抗体産生細胞に分化後、自己免疫疾患の発症や病態増悪に関与することが知られているが、自己反応性 B-1 細胞の分化機序や自己抗体産生の仕組みはよくわかっていない。さらに、老化により液性免疫応答が低下すること、そして老化により自己免疫疾患が増大することが報告されているが、加齢に伴う B 細胞の自己免疫疾患増大への関与に関して、不明な点が多い。

2. 研究の目的

B 細胞の自己免疫疾患制御への関与を解明することを目的とし、B-1 細胞由来の制御性 B 細胞、また自己抗体産生に関わる B-1 細胞の解析を研究開始の当初に予定していた。しかし、B-1 細胞は主に胎児肝臓の造血幹細胞から分化するが、予定していた胎児 B 細胞の運命追跡システムの確立が本研究期間中に至らなかった。そこで、自己免疫疾患病態制御における B 細胞の役割解明という本研究の研究目的を遂行するため、また老化による液性免疫応答の低下の機序を解明するため、既に確立している成体マウスにおける B 細胞の運命追跡システムを用いて、老化に伴い出現と増加し、自己抗体産生に関与することが報告されている加齢性 B 細胞に着目して研究に取り組んだ。加齢性 B 細胞は、未だにそのサブセットを規定するマーカーが詳細に同定されておらず、加齢性 B 細胞の機能や性状、BCR の多様性、また加齢性 B 細胞の自己抗体産生細胞への分化機構など不明な点が多い。そこで、老化に伴って増加する B 細胞をさらに B 細胞の寿命に着目することで、加齢性 B 細胞サブセットを規定する新規マーカーの同定を試み、加齢性 B 細胞の機能や性状、BCR の多様性、また加齢性 B 細胞の自己抗体産生細胞への分化機構と自己免疫疾患への関与の詳細を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 国内外の免疫老化における研究は、加齢の影響を大きく受ける臓器が胸腺であることから、T 細胞老化の研究が精力的に行われている一方で、液性免疫を司る B 細胞に関する知見は極めて乏しい。老化 B 細胞研究がこれまで進展してこなかった理由として、老化個体における B 細胞が多様であり、従来の老化個体に存在する B 細胞を解析する方法では、個体の老化と B 細胞そのものの老化を区別することが困難であったことが考えられる。実際、B 細胞は造血幹細胞から絶えず分化発生することから、たとえ個体が老化しても B 細胞は新しく作られ続ける。そこで申請者は、老化個体には老化に伴い新たに出現または増加する B 細胞が存在するが、そのなかでも長期間 B 細胞として生き続けている集団 (老化長寿 B 細胞) が含まれていることに着目し、B 細胞そのものの寿命に焦点を当て、時期および B 細胞特異的に細胞を不可逆的にラベルする運命追跡システム (B 細胞特異的 Mb1-CreERT2 と ROSA-loxp-stop-loxp-YFP レポーターマウスを交配し、タモキシフェンを一過性に投与することで B 細胞のみ YFP が不可逆的にラベルされる) を樹立した。このシステムにおける老化マウスでは、YFP を指標として老化長寿 B 細胞解析が可能となる (図 1)。本研究では、この成体マウス B 細胞運命追跡システムを用いて、若齢 B 細胞 (若齢個体の B 細胞)、老化 B 細胞 (老齢個体の B 細胞)、老化長寿 B 細胞を脾臓より単離し、RNA-seq と single cell (sc) RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行い、若齢 B 細胞と比較して老化 B 細胞や老化長寿 B 細胞で発現が高い遺伝子の同定し、加齢性 B 細胞サブセットを規定する新規マーカーの同定を試みる。

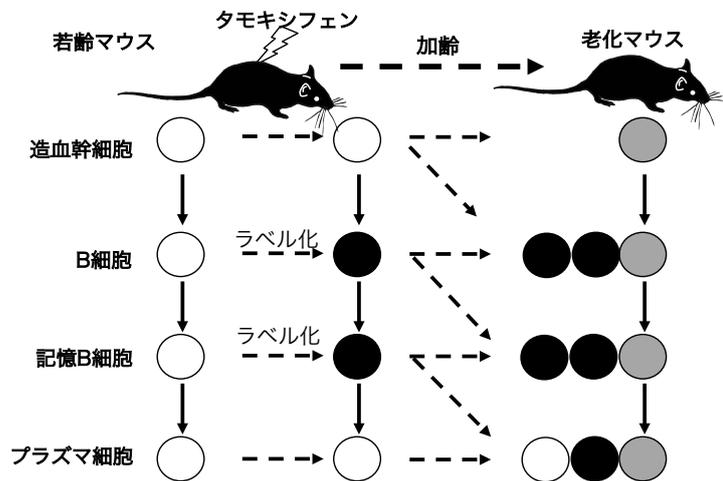


図1. B細胞運命追跡システム
Mb1-CreERT2 x ROSA-YFPマウスにタモキシフェン投与時にB細胞のみYFPが不可逆的にラベルされる。若年期にタモキシフェンを一過性に投与しておくことで、老年期において YFP を指標に生き続けているB細胞が検出可能となる。

(2) (1)で同定できた遺伝子が規定するタンパク質が、若齢マウスと比較して老齢マウス脾臓の B 細胞で発現しているか調べるため、タンパク質に対する特異抗体を用いたフローサイトメトリーにより解析する。

(3) 細胞受容体(BCR)は老化に伴いその多様性が減少する可能性が示唆されており、自己反応性 BCR を持つ B 細胞が自己抗体を産生し、炎症を惹起するリスクが増大することが知られている。そこで成体マウス B 細胞の運命追跡システムを用いて、脾臓より単離した若齢 B 細胞、老化 B 細胞、老化長寿 B 細胞の BCR 多様性を調べるため、BCR レパトア解析を行なう。

4. 研究成果

(1) 本研究期間中に運命システム追跡マウスにタモキシフェン投与して 1.5 年後の YFP 陽性老化長寿 B 細胞を観察することができた(未発表、図2)。このモデルを用いて脾臓の若齢 B 細胞と老齢 B 細胞、そして老化マウスで長期間 B 細胞として生き続けている老化長寿 B 細胞を単離し、RNA-seq と scRNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。scRNA-seq の結果、若齢 B 細胞では見られない老化長寿 B 細胞特異的な遺伝子クラスターが存在することが明らかとなった(未発表、図3)。また、網羅的遺伝子発現解析の結果、若齢 B 細胞と比較して、老化 B 細胞と特に老化長寿 B 細胞にて発現が高い遺伝子を複数同定した(未発表)。

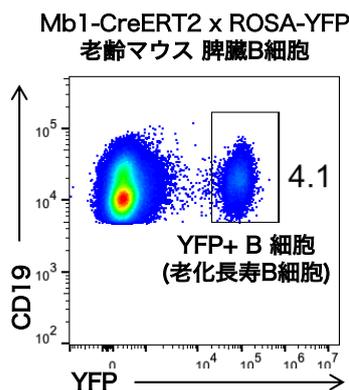


図2. タモキシフェンを投与して 1.5年後の脾臓B細胞のYFP発現

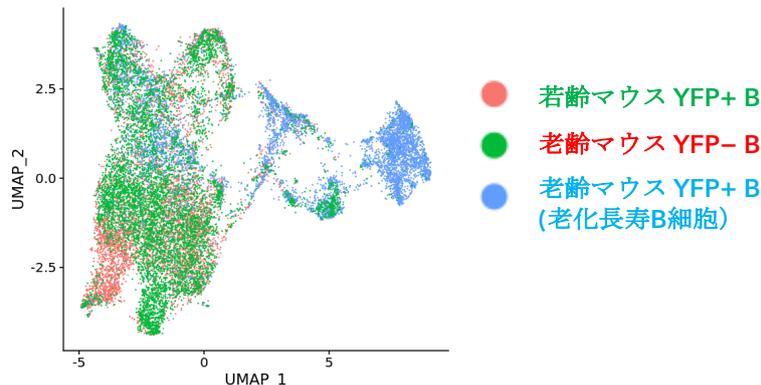


図3. 若齢と老化B細胞のscRNA-seq クラスター解析
老化長寿B細胞の特異的なクラスターが存在する。

(2) (1) で同定に成功した複数の遺伝子中で、特に遺伝子 X (未発表のためここでは遺伝子 X とする) に着目した。遺伝子 X は本来 B 細胞には発現しないとされており、炎症に関するシグナル伝達を制御する可能性があると考えたためである。申請者はタンパク質レベルの発現をフローサイトメトリーによって解析した結果、遺伝子 X が規定するタンパク質 X は老齢マウスの脾臓 B 細胞特異的に発現することを確認できた。(未発表、図4)。さらに、これまで言われてきた加齢性 B 細胞 (CD19⁺ CD93⁻ CD21⁻ CD23⁻) に特異的に発現し、なおかつ、加齢性 B 細胞を細分化できることを見出した(未発表)。

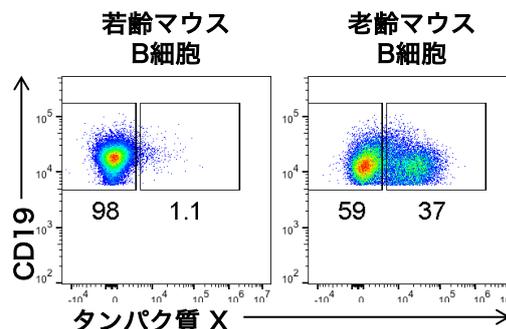


図4. 若齢および老齢マウスの脾臓 B細胞におけるタンパク質Xの発現

(3) 脾臓より単離した若齢 B 細胞、老化 B 細胞、老化長寿 B 細胞の BCR レパトア 解析を行なった結果、若齢 B 細胞と老化 B 細胞の BCR は多様性に富んでいたが老化長寿 B 細胞では偏りが生じており、特に特定の BCR は老化長寿 B 細胞において全体の約 3 割を占めていることが明らかとなった。

以上の本研究の成果により、老化長寿 B 細胞の特徴を見出し、さらに加齢性 B 細胞の新規マーカー遺伝子の候補を複数同定した。特に老化 B 細胞研究において遺伝子 X に着目し研究・発表された論文は現時点で存在せず、老化 B 細胞を特徴付ける遺伝子 X の同定は世界初の知見である。本研究成果は、今後の加齢性 B 細胞の機能や性状の詳細な解明への貢献が示唆される。そしてそれらの貢献は、加齢性 B 細胞の自己抗体産生細胞への分化機構と自己免疫疾患への関与の解明に寄与、そして老化による免疫低下を引き起こす機序を B 細胞の視点からの解明につながる可能性があり、超高齢化社会における健康寿命の延長に寄与することが期待される。今後の展望として、遺伝子 X を主として本研究で同定した加齢性 B 細胞新規マーカー遺伝子を指標に新規加齢性 B 細胞サブセットの同定を試みる。そして、同定した遺伝子が規定するタンパク質マーカーにより新規加齢性 B 細胞サブセットを単離して *in vitro* の機能解析実験、また B 細胞特異的に本研究で同定した遺伝子欠損マウスを樹立し、加齢性 B 細胞におけるそれら遺伝子の生理的役割の解明を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------