

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02740

研究課題名(和文) 変異インフルエンザウイルス感染防御に有効な記憶B細胞活性化機構の解明

研究課題名(英文) Activation mechanism of memory B cell for protection against variant influenza virus infection

研究代表者

新中須 亮 (Shinnakasu, Ryo)

愛媛大学・学術支援センター・准教授

研究者番号：00451758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザパンデミックへの初期防御ではHA stem認識メモリーB細胞が重要である。感染履歴のあるマウスについて、変異ウイルス株による免疫誘導時の細胞動態を評価したところ、主に活性化している細胞はstem認識メモリー細胞由来であり、特にプラズマ細胞への分化は1次メモリー細胞のもつレパトアから万遍なく、GC細胞では親和性の比較的低いと推測される一部のメモリー細胞から誘導されていることが明らかとなった。また、2次GC内では親和性成熟の新たな誘導を示唆する結果も得られた。また、免疫応答に影響を与える要素については、既存メモリーB細胞の多寡、既存抗体の存在が重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの変異インフルエンザ防御機構に関する基礎的研究については、断片的な研究成果は存在していたものの、1) 変異ウイルス感染防御へのメモリーB細胞の重要性、2) メモリーB細胞の生成・維持および活性化されるメカニズム、という根源的課題にアプローチする研究は実験系構築の難しさから進んでこなかった。申請者はこの問題を解決するため、新規の実験モデルやマウスモデルを独自に構築し本課題にとりかかった。プロジェクト自体は未完で継続中ではあるが、これまでに得られ知見および今後の研究結果から得られる知見は、今後のパンデミック発生に対する予防・治療法開発において生かされていくことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：HA stem specific memory B cells are important for the initial defense against influenza pandemics. In mice with a history of infection, we evaluated the cellular dynamics during immune induction by mutant virus strain and found that the cells that were mainly activated were derived from stem specific memory cells, and in particular, differentiation into plasma cells was induced from the wide range of repertoire in the primary memory cells and into GC cells was induced from some repertoires in the primary memory cells which are presumed with relatively low affinity. And also the results suggest a new induction of affinity maturation within secondary GCs. Regarding the factors that could influence the immune response, the amount of existing memory B cells and the presence of existing antibodies were found to be important.

研究分野：感染免疫

キーワード：免疫記憶B細胞 変異インフルエンザウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ワクチン接種により予防対策が行なわれている代表的なものとしてインフルエンザ感染が挙げられるが、液性免疫の観点ではウイルス表面に発現する HA に対しての抗体誘導が最も重要である。HA の Head 領域は変異を起こしやすく、そのため、その領域を認識する抗体やメモリーB細胞は、多くが各ウイルス株に特異的である。一方、Stem 領域は変異が起こりづらく、多くが HA の型を超えて広域的に認識できる。実際に、この Stem 領域を認識する抗体、その中でも特に、既存の抗体ではなく、メモリーB細胞由来の抗体が、抗原ドリフト・シフトにより急速にゲノム変異を生じたパンデミック感染のようなケースで非常に重要である。

そのため現在では、この Stem 特異 B 細胞を標的としたユニバーサル(万能)ワクチン開発研究が盛んに行われている。しかしながら、Stem 特異的 B 細胞を標的としたワクチンによる免疫誘導効率は非常に悪く、未だ実用化に至っていない。その理由としては、HA 全領域を抗原とした場合、stem 部位エピトープが立体障害などによりサブドミナントになってしまうこと、また、stem 領域のみを抗原にした場合、抗原性が非常に低いこと、反応できる細胞側も自己反応性でもあるためアナジー状態にあるケースが多いこと、などが可能性として考えられている。また、ヒトの場合、一般的に、3 歳頃までには最初のインフルエンザ抗原への感作(感染やワクチン接種)が終わっており、その時に誘導された抗体等による抗原原罪(OAS)もワクチンの感受性に負の影響を及ぼしている可能性も考えられる。こういった状況・環境の中で、ワクチン接種(免疫)により、質の高い stem 特異的 B 細胞を中心としたメモリーコンパートメントを構築するためには、その基になる細胞をいかに胚中心(GC)に誘導し成熟させることができるかが最も重要である。しかしながら現在のところ、1) ワクチン接種時にどのような免疫応答が組織レベルで起きているのか、2)その状況を作り出す要素は何か、などの基礎的理解が必要不可欠にも関わらず、実験の難しさからほとんど進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、過去にウイルス抗原により感作された状況を想定した条件での、メモリーB細胞を中心とした Stem 特異的 B 細胞が変異ウイルス抗原により活性化される際の免疫応答の仕組みについて、1)活性化誘導される細胞の特徴と生体内での動態を評価し、さらに、2)それらに影響を与えるうる要素とそのメカニズムについてマウスレベルで検証し、stem 領域特異的細胞を中心としたメモリーコンパートメントが効率良く形成できない原因の解明と、さらには、その問題解決に繋がる効率的な形成誘導法の探索を目的とする。

3. 研究の方法

(1)「メモリーB細胞を中心とした Stem 特異的 B 細胞が変異ウイルス抗原により活性化される際の生体内での動態やメモリーコンパートメント形成に関わる細胞群の特徴評価」

インフルエンザ 1 次感染で誘導された Stem 特異的メモリーB細胞とその後、変異ウイルス株によるワクチン接種時にナイーブやメモリーB細胞から誘導される Stem 特異的 GC B細胞ならびにそこから誘導されるメモリーB細胞、プラズマ細胞について、まず始めに、フローサイトメトリーや血清 ELISA 解析を用いた経時的な挙動検証を行った。さらに、それぞれ誘導された細胞分画について単細胞分離を行い、単細胞レベルでの BCR レパトア解析およびクローニング後の抗体特性評価を実施し、それぞれの抗体(BCR)の特徴、1)VH/Vk gene usage、2)親和性、3)HA 型の交差反応性、について評価をおこなった。なお、本項目では GC および GC 由来 1 次メモリーB細胞をラベリングするシステムを用いて、ナイーブ B 細胞と 1 次メモリーB細胞を区別した。

(2)「変異抗原によるワクチン接種後の免疫応答に影響を与えるうる要素の評価ならびにメカニズム解明」

ヒトの場合、それぞれ個人の免疫履歴が、インフルエンザワクチン反応性に大きな影響(OAS)を及ぼすことがよく知られているが、その実態は完全には明らかにされていない。可能性として、存在するメモリーB細胞の性質や量による影響、1 次感染や 2 次感染時に誘導された抗体によるウイルス抗原マスキング効果による抗体フィードバック機構の影響、等が考えられる。本研究ではそれぞれの項目について以下に示す方法で研究・評価を行った。

存在する 1 次メモリーB細胞の量による影響についての評価

本項目では定量的な評価を行うため、Stem 特異的 BCR を発現する C179 BCR KI マウスを用いて行った。インフルエンザ感染により誘導した C179 由来 1 次メモリーB細胞を用意し

回収後、感染履歴のあるレシピエントマウスに数をふって移入後、ワクチン接種の形で行った。評価は GC B 細胞、プラズマ細胞の誘導能および 2 次メモリーコンパートメント形成能について評価を行った。

2 次感染時に誘導された抗体によるウイルス抗原マスキング効果による影響についての評価
誘導型プラズマ細胞除去システムを用いて、1 次感染時の既存抗体や 2 次ワクチンにより誘導される抗体を欠損させた際の 2 次 GC B 細胞誘導やプラズマ細胞分化への影響について検証した。方法は免疫誘導初期およびブースト直前にプラズマ細胞の除去を行いブースト後の 2 次プラズマ細胞および 2 次 GC への誘導効率および 2 次メモリーコンパートメント形成能の評価により行った。

4. 研究成果

(1)「メモリーB 細胞を中心とした Stem 特異的 B 細胞が変異ウイルス抗原により活性化される際の生体内での動態やメモリーコンパートメント形成に関わる細胞群の特徴評価」

本項目ではまず始めに、メモリーB 細胞を中心とした Stem 特異的 B 細胞が変異ウイルス抗原により活性化される際の生体内での動態に関してフローサイトメトリーとシングルセルレパトア解析による評価を行った。1 次インフルエンザ感染で誘導された Stem 特異的メモリーB 細胞とその後、変異ウイルス株によるワクチン接種時にナイーブやメモリーB 細胞から誘導される Stem 特異的 GC B 細胞ならびに、プラズマ細胞について、1 次メモリー細胞を特異的に標識できるマウスモデルを用いて評価したところ、主に活性化している細胞はメモリー由来の細胞であることが確認された。また、その際のレパトアを評価したところ、プラズマ細胞への分化は全ての 1 次メモリー細胞からまんべんなく誘導されていたのに対し、2 次 GC B 細胞は一部の 1 次メモリー細胞からのみ誘導されていた。

次に、B 細胞抗原受容体(BCR)レパトアについて、その特徴を特に BCR への変異導入数を基に評価したところ、プラズマ細胞への分化は比較的変異数の多い 1 次メモリーB 細胞から分化する傾向であり、逆に 2 次 GC B 細胞には比較的変異数の少ない細胞から分化している傾向がみられた。また、2 次 GC B 細胞の変異数の経時的な変異を追ったところ、時間が経つにつれ変異数が増えていく傾向にあった。以上の結果より、2 次 GC B 細胞へはナイーブ細胞ではなく、比較的亲和性の低い 1 次メモリーB 細胞から中心的に誘導され、1 次抗原とは異なる新たな抗原(2 次抗原)に対しても新たに親和性成熟を起し、1 次抗原のみならず 2 次抗原に対してもよりフィットした広域交差反応性 B 細胞が誘導されることが示唆された。

また、上記で得られた細胞レベル、レパトアレベルの結果について、より正確な解釈を行う目的で、レパトア解析により得られた単細胞クローンを用いての詳細な評価を行った。結果、特に感染により誘導された 1 次メモリーB 細胞から変異株ベースワクチンにより誘導された 2 次 GC B 細胞は、元々 1 次感染に利用された株への親和性が低く、ワクチン接種に利用された変異株に対しより親和性が高い傾向のある細胞が割合として多いことが確認された。また、GC に誘導された細胞は GC 内で親和性向上がみとめられている傾向がみとめられたが、結論を出すため評価継続中である。なお、1 次メモリーB 細胞由来プラズマ細胞およびメモリーB 細胞についても現在評価継続中である。

(2)「変異抗原によるワクチン接種後の免疫応答に影響を与えるうる要素の評価ならびにメカニズム解明」

存在する 1 次メモリーB 細胞の量による影響についての評価

1 次メモリーB 細胞の量による影響に関しては、誘導した Stem 特異的 BCR ノックイン 1 次メモリーB 細胞について数をふった細胞数をレシピエントマウスに移入することで評価を行った。ブースト後の移入細胞の挙動を評価したところ、プラズマ細胞の誘導に関しては数による影響は大きくなかったのに対し、2 次 GC B 細胞の誘導には数が大きく影響することが明らかとなった。現在は引き続き、2 次メモリーコンパートメント形成についての評価を実施中である。

2 次感染時に誘導された抗体によるウイルス抗原マスキング効果による影響についての評価

2 次抗原感作時に新規にナイーブ B 細胞やメモリーB 細胞から誘導される抗体を人為的に誘導できないよう細工をしたマウスを用い、細工なしのマウスと比較により評価を行った。その結果、抗体を人為的に誘導できないよう細工をしたマウスでは 2 次 GC 細胞誘導の増加が認められた。しかしながら細工なしマウスとの差や実際のナイーブ/メモリーB 細胞からの GC 誘導効率は、期待した程大きくなかったことから、抗体価としては低い、2 次免疫応答前に既に既に誘導されていた抗体もまた、2 次 GC 細胞誘導に大きな影響を与えている可能性が示唆された。そこで、2

次免疫応答前に存在する抗体 1 次抗体も含めた全抗体による影響を評価する目的で、存在する全ての抗体からの影響が全く及ばない環境下での 2 次 GC B 細胞誘導効率についての評価を行った。その結果、ウイルス抗原特異的メモリーB 細胞およびナイーブ B 細胞の 2 次免疫応答時の GC B 細胞への分化は抗体によるマスキング効果により著しく抑制されていることが明らかとなった。現在は、2 次メモリーコンパートメントへの影響についても評価継続中である。

なお、(2)の項目においては、「メモリー濾胞ヘルパーT 細胞(Tfh)の存在による影響」も可能性として存在する。現在、評価実験を実施中である。

本課題では、インフルエンザウイルスへの感染防御に対し広域反応性をしめず難誘導性の稀少性抗体の免疫応答時の細胞/抗体挙動および免疫応答に影響を与える要因に着目し研究を実施したが、特に免疫記憶 B 細胞の挙動に関してはこれまでに誰も報告していない特徴を新たに発見することができた。また、免疫応答に影響を与える要因についてはウイルス抗原マスキングによる抗体フィードバック機構が予想以上に重要である知見が得られたことは本課題での大きな収穫であった。しかしながら研究実施の難易度から本課題期間中に計画した全て事項について評価が完了しておらず引き続き研究結果の論文化を目指し研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue T, Shinnakasu R, Kawai C, Yamamoto H, Sakakibara S, Ono C, Itoh Y, Terooatea T, Yamashita K, Okamoto T, Hashii N, Ishii-Watabe A, Butler N S., Matsuura Y, Matsumoto H, Otsuka S, Hiraoka K, Teshima T, Murakami M, Kurosaki T	4. 巻 220
2. 論文標題 Antibody feedback contributes to facilitating the development of Omicron-reactive memory B cells in SARS-CoV-2 mRNA vaccinees	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.20221786	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 該当する
1. 著者名 Inoue Takeshi, Shinnakasu Ryo, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of High Quality Memory B Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in 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) 10.3389/fimmu.2021.825813	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 Lu X, Hosono Y, Nagae M, Ishizuka S, Ishikawa E, Motooka D, Ozaki Y, Sax N, Maeda Y, Kato Y, Morita T, Shinnakasu R, Inoue T, Onodera T, Matsumura T, Shinkai M, Sato T, Nakamura S, Mori S, Kanda T, Nakayama E., Shioda T, Kurosaki T, Takeda K, Kumanogoh A, Arase H, Nakagami H, Yamashita K, Takahashi Y, Yamasaki S	4. 巻 218
2. 論文標題 Identification of conserved SARS-CoV-2 spike epitopes that expand cTfh clonotypes in mild COVID-19 patients public	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.20211327	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 -
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 -

1. 著者名 Onodera T, Sax N, Sato T, Adachi Y, Kotaki R, Inoue T, Shinnakasu R, Nakagawa T, Fukushi S, Terooatea T, Yoshikawa M, Tonouchi Ke, Nagakura T, Moriyama S, Matsumura T, Isogawa M, Terahara K, Takano T, Sun L, Nishiyama A, Omoto S, Shinkai M, Kurosaki T, Yamashita K, Takahashi Y	4. 巻 9
2. 論文標題 CD62L expression marks SARS-CoV-2 memory B cell subset with preference for neutralizing epitopes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	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/sciadv.adf0661	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 Ryo Shinnakasu, Shuhei Sakakibara, Tomohiro Kurosaki
2. 発表標題 Glycan engineering of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicits cross-neutralizing antibodies for SARS-related viruses
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〕

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
研究分担者	井上 毅 (Inoue Takeshi) (80466838)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (14401)	

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