

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860377

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染モデルにおける長期生存型抗体産生細胞の維持機構の解明

研究課題名(英文) Maintenance mechanisms of long-lived plasma cells in influenza infectious disease

## 研究代表者

小野寺 大志 (Onodera, Taishi)

国立感染症研究所・その他部局等・主任研究官

研究者番号：90513143

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)：インフルエンザ感染後において長期生存型抗体産生細胞は非常に長期に渡り高親和性の抗体を産生する。それらは限られた寿命( $t_{1/2} \sim 100$  days)にも関わらず数十年に渡り骨髄で一定数維持される。そこには長期生存型抗体産生細胞を供給するメカニズムが必須である。我々はこの長期生存型抗体産生細胞が感染の際に形成されるCD273陽性記憶B細胞によって再補充されることを明らかにした。更に、このCD273陽性記憶B細胞が持つユニークな特徴を解析した結果、CCR6等のケモカインレセプター、またZBTB20, ZBTB32, Snyd2等の転写因子を特異的に発現している事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：After influenza infection, LLPCs continuously produce virus-specific antibodies with higher affinity for long period of time. They have been maintained constant in their cell number for years in bone marrow (BM), regardless of their limited lifespan ( $t_{1/2} \sim 100$  days). We found that LLPCs in BM are replenished by adoptive transferred CD273+ but not CD273- memory B cells, both of which were generated by influenza infection. Moreover, flow cytometric and QPCR analysis demonstrated that the CD273+ memory B cells have the unique expression pattern of chemokine receptors including CCR6 and transcription factors; ZBTB20, ZBTB32, and Snyd2 which are known to be involved in differentiation and maintenance of LLPCs. Thus, these data suggest that the CD273+ memory B cells have the capability to replenish the LLPC pool, probably due to their unique chemotactic and transcriptional properties, and thereby stabilize the number of LLPCs in BM for long period of time.

研究分野：免疫学

キーワード：インフルエンザ感染 免疫記憶 長期生存型抗体産生細胞

### 1. 研究開始当初の背景

現在世界的に使用されている多くの感染症ワクチンは、B 細胞記憶を介した中和抗体産生により感染防御を行う。中でもインフルエンザウイルス感染症はその被害の甚大さから最も警戒を要する感染症であり、より有効なワクチン開発が望まれている。しかし、現在使用されているインフルエンザワクチン(HA ワクチン)は接種後の血中の抗体価の有効持続期間が3 ヶ月程度と非常に短く、終生免疫を得ることはできない。一方、実際の感染によって誘導された特異抗体は感染後、数十年という長期に渡り維持されていることが明らかとなっており、実際、それらが感染防御に非常に有効に働いていることが報告されている。しかし、このインフルエンザウイルス感染特異的に誘導される血中抗体価の長期的な維持機構の詳細はほとんど明らかになっていない。このメカニズムを解明することは、今後のワクチン戦略を考える上で非常に重要な課題である。

これまで様々な抗原を用いた解析により、長期的な血中抗体の維持には末梢リンパ組織や骨髄で維持されている長期生存型の抗体産生細胞が寄与していることが報告されている。この長期生存型抗体産生細胞は人工的なモデル抗原を用いた研究から記憶B細胞に関係なく初回免疫時に形成されるとの報告もあるが(Ahuja A, et al., 2008) 生体内における寿命や生存に必須な niche の限界から1個体あたり $10^6$  cells 程度しか維持できず、更に自然界では数限りない抗原に暴露され続けており、新たに形成された長期生存型抗体産生細胞が古い長期生存型抗体産生細胞と頻繁な入れ替わりをしていることが知られている(Radbruch A, et al., 2006)。これらの事から同じ抗原特異性を獲得した記憶B細胞からの長期生存型抗体産生細胞への継続的な供給が長期的な血中抗体の維持に重要な役割を果たしていることが強く推察される(DiLillo DJ, et al., 2008, Bernasconi NL, et al., 2002) (図1)。しかし、近年、記憶B細胞にはIgクラスや細胞表面マーカーの違いなどから、多くのサブセットが存在し、異なった機能的役割を担っていることが明らかとなっており(KA.Pape, et al., 2011, Dogan I et al., 2009, SM Anderson et al., 2007)。またインフルエンザ感染においては全く新たな記憶B細胞サブセットが形成されていること、また

それらが感染防御に重要な役割を果たしている事を我々には明らかとしてきた(Onodera T, et al., 2012)。しかし、インフルエンザウイルス感染後に長期的に維持される抗体産生細胞がどのような記憶B細胞サブセットから供給され、その長期生存型抗体産生細胞への分化にどのような因子が関与しているのかは未解明のままである。最近、我々はインフルエンザウイルス粒子によって形成された記憶B細胞が、HAワクチンによって形成された記憶B細胞とは抗体産生応答能の異なる細胞集団を形成していることを発見し、ケモカインレセプター等のいくつかの遺伝子発現が異なる事を明らかにした(未発表)。この申請者の発見は、インフルエンザウイルス感染者特異的に認められる長期的な血中抗体の供給メカニズムを明らかにする上で重要な知見を提供する可能性を秘めており、新たなワクチン戦略を構築する一助となることが期待される。

### 2. 研究の目的

インフルエンザウイルス感染者は数十年の長期に渡り血中抗体を維持するが、HAワクチンでは数か月しか血中抗体を維持できない。我々はインフルエンザウイルス粒子とHAワクチンに対して形成された、長期生存型抗体産生細胞の前駆体である記憶B細胞で、その応答性と発現する遺伝子群が異なる事を発見した。これらの知見をもとに、記憶B細胞の質の違いから長期生存型抗体産生細胞の供給メカニズムを明らかにし、新たなワクチン戦略を構築するための基盤的知識を提供する。

### 3. 研究の方法

これまで、インフルエンザウイルス特異的な記憶B細胞の検出ならびに純化技術が未整備であったため、感染モデルにおける記憶B細胞の動態の詳細に関して解析することは困難であった。我々はインフルエンザウイルスに特異的な記憶B細胞を純化・精製する技術を開発し、細胞移入実験系によってインフルエンザウイルス特異的B細胞の抗原応答性をin vivoで評価することに成功している。更に世界に先駆けて、大部分のB細胞がインフルエンザウイルス抗原に対して特異的な抗原受容体を発現する遺伝子組換えマウスを作出し、ウイルス特異的なB細胞の動態をin vivoで追跡するシステムを構築している。本研究では、これら実験システムの新規性を基盤とし、インフルエンザウイルス感染特異的に維持される長期的な血中抗体(長期生存

型抗体産生細胞)を供給している記憶B細胞の応答を細胞・分子レベルで詳細に解析する。

#### 4. 研究成果

不活化全粒子インフルエンザワクチンを接種後に形成されたインフルエンザウイルス特異的記憶B細胞のうちどのサブセットが長期抗体産生細胞の供給に参与しているのかを細胞移植実験により解析した結果、記憶B細胞サブセットの中でもCD273陽性記憶B細胞が供給源になっている事を明らかにした。更にその分子メカニズムを解明する一環としてこの記憶B細胞サブセットの遺伝子発現パターンを他の記憶B細胞と比較解析した結果、ZBTB20, ZBTB32, Smyd2等の長期生存型抗体産生細胞での発現上昇、またその分化に参与していると報告されている転写因子の発現が顕著に上昇している事を明らかにした。また、これらの記憶B細胞がCCR6等のケモカインレセプターを特異的に発現している事をフローサイトメトリーにより明らかにした。しかし、これらの転写因子群、ケモカインレセプターの記憶B細胞における発現が実際に長期生存型抗体産生細胞の供給に参与しているのかは不明であったため、レンチウイルスベクターによりこれらの候補遺伝子をマウスB細胞に導入しマウスに移植した後、ワクチン接種後に誘導的に発現させる、長期生存型抗体産生細胞に参与する遺伝子を釣りあげる、全く新たなin vivoスクリーニング方法を立ち上げた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through Toll-like receptor signaling. Taishi Onodera, Akira Hosono, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shuichi, Kaminogawa, Yoshinobu Okuno, Tomohiro Kurosaki, Manabu Ato, Kazuo Kobayashi, Yoshimasa Takahashi.

J Immunology 2016 May 15;196(10):4172-84 (2016)

Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape.

Adachi Y, Onodera T, Yamada Y, Daio R, Tsuiji M, Inoue T, Kobayashi K, Kurosaki T, Ato M, Takahashi Y.

J Exp Med. Sep 21;212(10):1709-23. (2015)

Epitope Mapping of the Hemagglutinin Molecule of A/(H1N1)pdm09 Virus by Using Monoclonal Antibody Escape Mutants. Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M,

Takahashi Y, Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumura T, Ato M, Kobayashi K, Shimotai Y, Mizuta K, Hongo S, Tashiro M, Nobusawa E.

J Virol. 2014 Nov;88(21):12364-73. (2014)

[学会発表](計9件)

Taishi Onodera, Yuichi Aiba, Tomohiro Kurosaki, Kazuo Kobayashi, Yoshimasa Takahashi. 2013 B-cell intrinsic Toll-like receptor signaling accelerates memory B cell response to booster influenza vaccination. Keystone symposia(B cell development and function)(Colorado, USA, 2013年)

Onodera Taishi, Adachi Takahiro, Tsubata Takeshi, Kurosaki Tomohiro, Adachi Yu, Ato Manabu, Takahashi Yoshimasa. 2013. Replenishment of Long-Lived Plasma Cells is constitutively restricted by CD4+T cells in their maintenance phase after influenza vaccination. 第42回日本免疫学会学術集会(幕張、2013年12月)。

Adachi Takahiro, Yoshikawa Souichiro, Karasuyama Hajime, Onodera Taishi. 2013. In vivo imaging of calcium signaling in B cells of mice expressing the genetically encoded YC3.60 calcium indicator. 第42回日本免疫学会学術集会(幕張、2013年12月)。

Onodera Taishi, Adachi Takahiro, Tsubata Takeshi, Kurosaki Tomohiro, Adachi Yu, Ato Manabu, Takahashi Yoshimasa. 2014. CD273+ memory B cells replenish bone marrow plasma cells in the steady state after influenza vaccination 第43回日本免疫学会学術集会(京都、2014年12月)。

Adachi Takahiro, Yoshikawa Souichiro, Onodera Taishi, Takahashi Yoshimasa, Karasuyama Hajime. 2014. In vivo imaging of calcium signaling in B cells of mice expressing the genetically encoded YC3.60 calcium indicator. 第43回日本免疫学会学術集会(京都、2014年12月)

小野寺大志、田代真人、黒崎知博、阿戸学、高橋宜聖. 2014. B細胞内因性TLRシグナルによるインフルエンザワクチンの奏功機序. 第7回次世代アジュバント研究会(独立行政法人医薬基盤研究所、大阪、1月)

Onodera Taishi, Adachi Takahiro, Tsubata Takeshi, Ato Manabu, Takahashi Yoshimasa. 2015. Visualization of anti-nuclear Ab producing B cells by

flow-cytometry in a SLE mouse model.第44回日本免疫学会学術集会(札幌、2015年11月)

Adachi Yu, Onodera Taishi, Ato Manabu, Takahashi Yoshimasa.2015. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. 第44回日本免疫学会学術集会(札幌、2015年11月)

Adachi Takahiro, Yoshikawa Soichiro, Karasuyama Hajime, Onodera Taishi, Takahashi Yoshimasa, Kikuta junichi, Ishii Masasu, Tedder F. Tomas. 2015. Intravital imaging of Ca<sup>2+</sup> signals in lymphocytes of the Ca<sup>2+</sup> biosensor YC3.60 transgenic mice. 第44回日本免疫学会学術集会(札幌、2015年11月)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
国立感染症研究所免疫部  
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野寺大志 (ONODERA, Taishi)  
国立感染症研究所・免疫部・主任研究官  
研究者番号： 90513143

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )