

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26221306

研究課題名(和文)メモリーB細胞の形成と維持を支える内的・外的メカニズム

研究課題名(英文) Intrinsic and extrinsic Mechanism underlying generation and maintenance of memory B cells

研究代表者

黒崎 知博 (Kurosaki, Tomohiro)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授(常勤)

研究者番号：50178125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 153,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫システムは、一度経験した病原体に対して長期記憶(メモリー)が成立し同じ病原体の再感染に対し迅速に対応できるようになっている。この「免疫記憶」機能を担うのは、メモリーB/T細胞であるが、本研究では、このメモリーB細胞の生成・長期生存メカニズムを探索した。病原体感染後B細胞は胚中心(GC)反応を経てIgMからIgGにクラススイッチし、高親和性IgG細胞を作っていくが、メモリーB細胞はGC反応中、IgGタイプで中親和性かつ広汎な親和性を有する細胞が選択されていた。又、産生されたメモリーB細胞は長期生存するためにBAFFレセプターとIgGレセプターによる生存シグナルが必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスに対する致死率は依然として高いままであり効果的な新規ワクチンの開発が待望されている。メモリーB/T細胞はワクチンの効果発現のための必須細胞であるにもかかわらず生体内で少数しか存在しない等の実験的困難さがあり研究の進展が非常に阻まれていた領域である。本研究はその困難な点を克服するために新規研究手法を樹立し、機能的メモリーB細胞の生成・長期生存メカニズムに関して大きな一歩を記したものでその重要性は国際免疫学会、Keystoneシンポジウムで成果発表を要請されたことよりも明らかである。又、インフルエンザ等致死率の高い感染症に対する新規ワクチン開発への大きな貢献をするものである。

研究成果の概要(英文)：Once the pathogen invades into our body, the immune system operates and remembers this pathogen for long time. Then, when the same pathogen is invaded again, our immune system is able to respond to it quickly, thereby eliminating the pathogen very efficiently. Here, we have been addressing the mechanism how memory B cells are generated and long-lived. Upon infection, B cells undergo GC reactions, whereby IgM to IgG class-switching and generation of high-affinity IgG GC B cells take place. During GC reactions, GC B cells take fate decisions; differentiation to plasma cells or to memory B cells. We found that among GC B cells, IgG B cells harboring intermediate and broad affinities are selected into the memory B cell pool. In addition, generated IgG memory B cells require BAFF receptor and IgG receptor for their long-lasting survival.

研究分野：免疫学

キーワード：メモリーB細胞 胚中心B細胞 インフルエンザ感染 変異ウイルス エピトープ認識

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「免疫記憶」、この迅速な反応を用いた予防・治療法は、ワクチン療法である、は免疫学において解明されるべき最も重要なものの一つである。しかしながら、「液性免疫記憶」の場合、メモリーB細胞の特徴的性質(迅速反応性・高親和性 IgG 抗体誘導性・長期生存性)を支えるメカニズム研究は、非常に難しい課題と考えられ、これまで殆ど進展してこなかった。従って、「液性免疫記憶」に関して基盤的知見の集積が殆どなされておらず、新規ワクチン開発に関して、依然として、経験則に頼っているのが現状である。この研究進展を阻んでいる大きな理由は、2つ考えられる。一つは、生体内で作られるメモリーB細胞の数が極めて少なく、その単離・機能解析が困難を極めること。二つめは、液性免疫記憶が、多種の免疫細胞群(例えばT細胞・濾胞樹状細胞(FDC))との *in vivo* 相互作用ではじめて、形成・活性化されるため、*in vivo* の多種の細胞の相互作用をトレース・コントロールする研究手法(例えば、*in vivo* fate mapping など)なしには、この研究遂行が困難であることが挙げられる。

既に、申請者らは、メモリーB細胞の単離法・機能検定系の開発を行い、更に、確立した実験系を駆使して、抗原再刺激により、なぜ迅速に IgG1 抗体産生が生じるのかという課題にアプローチしてきた。IgG1 メモリーB細胞では、転写因子 Bach2 の発現低下が生じており、このため、抗原再刺激により、迅速に IgG1 抗体産生細胞へ分化していく、ことを明らかにした (Kometani et al; *Immunity*, 2013)。

次に解決しなければいけない課題は、機能的に重要な IgG メモリーB細胞の生成メカニズム、長期生存性獲得メカニズムの探索である。

2. 研究の目的

本研究では、液性免疫記憶に関して、病原体再感染からの生体防御に必須なメモリーB細胞サブセットの同定、更に、そのメモリーB細胞の生成・長期生存性獲得メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

外来性抗原モデルとして、メモリーB細胞のトレースが最も確立している NP を用いたハプテン抗原系、及び、感染モデルとしてインフルエンザウイルスを用いる。

メモリーB細胞の生成メカニズムの検索に関しては、GC B細胞特異的プロモーターを用いて、このプロモーターが発現した後の細胞系列では蛍光タンパクが不可逆的に発現する Fate-mapping マウスを用いる。又メモリーB細胞前駆細胞の単離には Bcl6-GFP fusion タンパク質が Bcl6 遺伝子座位にノックインされたマウスを用いて行う。

メモリーB細胞の長期生存に重要なファクターの同定には、BAFF-R の flox マウス及び BCR H chain の flox マウスを用いて行う。

4. 研究成果

1) インフルエンザ再感染モデルにおける IgG メモリーB細胞の機能的重要性の証明。

IgM, IgG メモリーB細胞の機能的重要性に関して、再度の変異インフルエンザウイルス感染モデルを用いて検討した。その目的で、GC B細胞を経て産生されるメモリーB細胞を特異的にラベルできる S1PR2ERT2Cre 発現 B細胞を用いた。

一度インフルエンザウイルスに感染させたマウスを3か月後、今度は変異インフルエンザウイルスで感染させると、メモリーB細胞由来の抗体が、感染防御に必須であること、又、そのメモリーB細胞は殆ど S1PR2ERT2Cre でラベルされた細胞、すなわち GC 由来の IgG タイプメモリーB細胞であることが判明した(図1)。

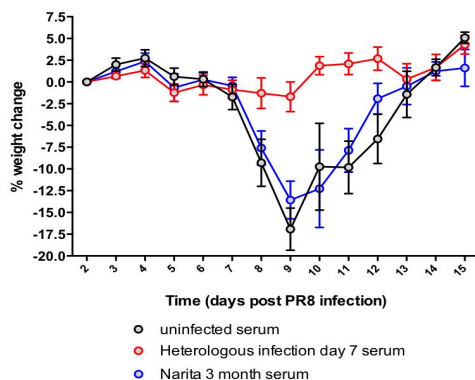


図1. インフルエンザウイルス感染モデルにおけるメモリーB細胞の機能的重要性
インフルエンザ株で感染後に変異ウイルスで再感染させたマウス血清(赤)をナイーブマウスに移入し、変異ウイルスによる感染実験を行った。その結果、感染による体重減少が抑制され、感染に耐性を示したことから、メモリーB細胞由来の抗体が感染防御に重要であることが示唆された。

2) IgG メモリーB 細胞は GC 反応中早期に、中親和性かつ広汎な親和性を有する GC B 細胞が選択されていた。S1PR2ERT2Cre B 細胞は、免疫刺激後特定の時間に GC B 細胞をラベルできるので、何時、GC B 細胞からメモリーB 細胞への分化が効率的に起こるかを測定することができる。予測に反して早期(免疫後12日)に、メモリーB 細胞への分化がピークに達し、その後急速に減弱することが判明した。又、ある時期に産生されたメモリーB 細胞と、GC B 細胞の親和性を比較してみると、寧ろメモリーB 細胞の方が親和性はより低かった。このことは、メモリーB 細胞はT 細胞からのヘルプが弱いことを示しており、事実 RNAseq で解析してみると、その予測が正しいことが判明した(図2)。これらの実験結果、及びインフルエンザウイルス感染モデルを用いた結果より、「GC は、本来高親和性 B 細胞を産生するためのマシンであるが、メモリーB 細胞は、寧ろ中親和性で広汎な親和性を有する細胞が選択されてくる」又、それ故「GC から産生されるメモリーB 細胞は2 度目の変異ウイルス感染からにも反応でき、生体防御に必須の役割をする」というモデル提出につながった。

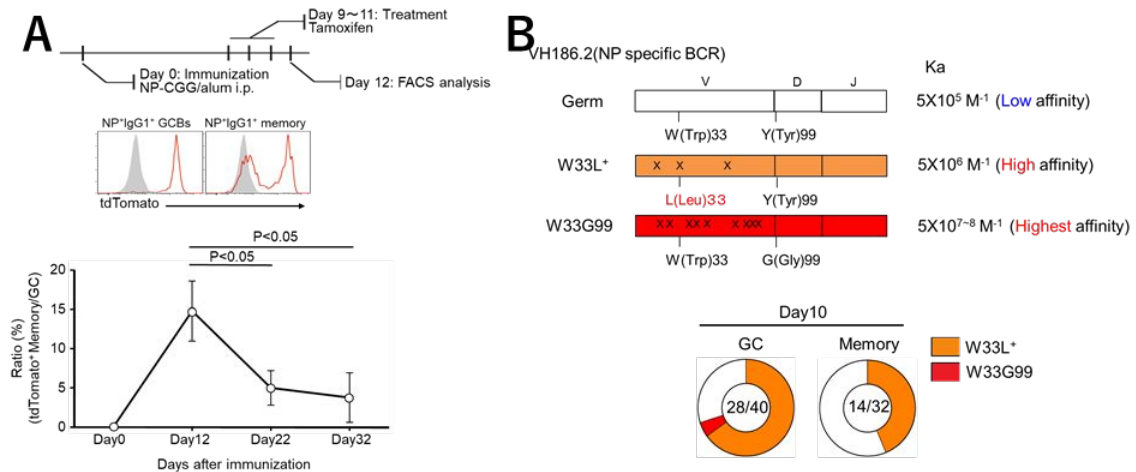


図2. S1pr2-ERT2creマウスを用いたメモリーB細胞の標識実験

- (A) S1pr2-ERT2creマウスのGC B細胞を免疫後特定の時期に蛍光ラベルしたところ、免疫12日後にメモリーB細胞への分化がピークに達することが分かった。
 (B) VH186.2遺伝子の変異解析により、GC B細胞と比較してメモリーB細胞のほうがNP抗原への親和性が低いことが分かった。

3) IgG メモリーB 細胞の長期生存にT 細胞は要求されない。

通常の感染では、メモリーB 細胞が産生されると同時に、そのメモリーB 細胞を活性化するメモリーT 細胞も産生されてくるわけであるが、この、メモリーT 細胞がメモリーB 細胞の長期生存性に必須かどうかを、anti-CD4 枯渇抗体を用いて検討した。この結果、メモリーT 細胞はメモリーB 細胞の長期生存性には必須ではないことが判明した。

4) IgG メモリーB 細胞長期生存の B 細胞内因的ファクターとしては、BAFF-R と BCR が要求される。メモリーB 細胞の長期生存に必要な内在性ファクターとして、BAFF-R および BCR の要求性を、BAFF-R flox, BCR flox マウスを用いて、これら2つのレセプターをメモリーB 細胞樹立後に欠損させることにより検討した。この2つのレセプターともに必須であることが、判明した(図3)。この2つのレセプターはナイーブB 細胞、アナジーB 細胞でも、それらの生存に必須であることが知られており、「これらレセプターシグナルを介して、メモリーB 細胞・ナイーブB 細胞・アナジーB 細胞の間で、どのような競合が生じるか」は、次なる重要な課題であることが示された。

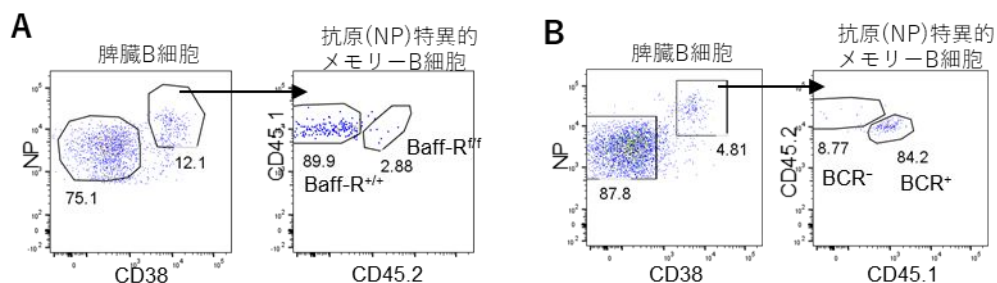


図3. メモリーB細胞の生存に必要な内在性ファクターの同定

Baff-R(A)あるいはBCR(B)をメモリーB細胞樹立後に誘導的に欠損させたところ、いずれも抗原特異的メモリーB細胞が顕著に減少したことから、この2つのレセプターはメモリーB細胞の生存に必須であることが分かった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 56件)

1. Ise W, Kurosaki T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunol. Rev.* (2019) 288(1):64-74. doi: 10.1111/imr.12751. Review 査読無
2. Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T. Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol. Rev.* (2018) 283(1):138-149. doi: 10.1111/imr.12640 Review 査読無
3. Ise W, Fujii K, Shiroguchi K, Ito A, Kometani K, Takeda K, Kawakami E, Yamashita K, Suzuki K, Okada T, Kurosaki T. T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate. *Immunity.* (2018) 48(4):702-715.e4. doi: 10.1016/j.immuni. 査読有
4. Herndler-Brandstetter D, Ishigame H, Shinnakasu R, Plajer V, Stecher C, Zhao J, Lietzenmayer M, Kroehling L, Takumi A, Kometani K, Inoue T, Kluger Y, Kaech SM, Kurosaki T, Okada T, Flavell RA. KLRG1⁺ Effector CD8⁺ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. *Immunity.* (2018) 48(4):716-729.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.015. 査読有
5. Wing JB, Kitagawa Y, Locci M, Hume H, Tay C, Morita T, Kidani Y, Matsuda K, Inoue T, Kurosaki T, Crotty S, Coban C, Ohkura N, Sakaguchi S. A distinct subpopulation of CD25⁻ T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017)114(31) E6400-E6409. doi: 10.1073/pnas.1705551114. 査読有
6. Shinnakasu R, Kurosaki T. Regulation of memory B and plasma cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* (2017) 45:126-131. doi: 10.1016/j.coi.2017.03.003. 査読無
7. Igarashi K, Kurosaki T, Roychoudhuri R. BACH transcription factors in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* (2017) 17(7):437-450. doi: 10.1038/nri.2017.26. 査読有
8. Inoue T, Shinnakasu R, Ise W, Kawai C, Egawa T, Kurosaki T. The transcription factor Foxo1 controls germinal center B cell proliferation in response to T cell help. *J. Exp. Med.* (2017) 214(4):1181-1198. doi: 10.1084/jem.20161263. 査読有
9. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, Takahashi, Y, Fukuyama H, Okada T, Kurosaki T. Regulated selection of germinal center cells into the memory B cell compartment. *Nat. Immunol.* (2016) 17(7):861-9. doi: 10.1038/ni.3460. 査読有
10. Adachi Y, Onodera T, Yamada Y, Daio R, Tsuiji M, Inoue T, Kobayashi K, Kurosaki T, Ato M, Takahashi Y. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J. Exp. Med.* (2015)212(10):1709-23. doi: 10.1084/jem.20142284. 査読有
11. Uebelhart R, Hug E, Bach MP, Wossning T, Duhren-von Minden M, Horn AHC, Kometani K, Kurosaki T, Sticht H, Reth M, Jumaa H. Responsiveness of B cells is regulated by the hinge region of IgD. *Nat. Immunol.* (2015)16:534-43. doi: 10.1038/ni.3141. 査読有
12. Kometani K, Kurosaki T. Differentiation and maintenance of long-lived plasma cells. *Curr. Opin. Immunol.* (2015) 33:64-9. doi: 10.1016/j.coi.2015.01.017. 査読無
13. Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T Cells Control Antigen-Specific Expansion of Tfh Cell Number and Humoral Immune Responses via the Coreceptor CTLA-4. *Immunity* (2014) 41(6):1013-25. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.006. 査読有

14. Ise W, Inoue T, McLachlan JB, Kometani K, Kubo M, Okada T, Kurosaki T. Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory T_H cells. Proc. Natl. Acad. U.S.A. (2014) 111:11792-7. doi: 10.1073/pnas.1404671111. 査読有

〔学会発表〕(計 56 件)

1. Kurosaki T. (招待講演) “ Selection Mechanisms of Germinal Center Cells into the Memory B Cell Compartment ” B Cell-T Cell Interactions, Keystone Symposia Conference, Feb 10-14(Feb12),2019, Keystone Resort, Colorado, USA
2. Kurosaki T. (招待講演) ” Fate decision of germinal center B cells ” International Symposium on B cells, Dec 7,2018, Shanghai, China
3. Kurosaki T. (招待講演) “ Fate decision of germinal center B cells ” Japanese-German Immunology Workshop, Sep 6 9(Sep 7),2018, Ettal, Germany
4. Kurosaki T. (招待講演) “ Fate decision of germinal center B cells ” B Cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity Keystone Symposia Conference, Jun 17 21(Jun 19), 2018, Dresden, Germany
5. Kurosaki T. (招待講演) ” Selection of Germinal Center B Cells into the Memory B Cell or Plasma Cell Compartment ”, KAI International Meeting 2017, Nov 8-10(Nov 10), 2017, Seoul, South Korea
6. Kurosaki T. (研究発表) “ Selection mechanism of germinal center cells into plasma fate ” The 19th Germinal Centre Conference, Sep 14-17(Sep 16), 2017, San Servolo, Venice, Italy
7. Kurosaki T. (招待講演) “ Transcriptional regulation in memory B cell development ” EMBO conference “ Lymphocyte Antigen Receptor Signaling ” Sep 3-7(Sep 6), 2016, Siena, Italy
8. Kurosaki T. (招待講演) ” Instructive selection of germinal center B cells into the memory compartment ” International congress of Immunology 2016, August 21-26 (Aug 26), 2016, Melbourne Australia
9. Kurosaki T. (招待講演) “ Instructive selection of germinal center B cells into the memory compartment ” Antibody and Fc Receptor Biology: Bench to Bedside a Special Symposium to Honor Jeffrey V. Ravetch on his 65th Birthday, May 9, 2016, The Rockefeller university, New York, USA
10. Kurosaki T. (招待講演) “ Selection of germinal centre B cells into memory compartment. ” 1st International Symposium on B cells: Immunity and Autoimmunity October 1-3(Oct 2), 2015, Erlangen, Germany,

〔図書〕(計 2 件)

1. Reth M Nitschke L, Hikida M, Kurosaki T. Structure and Signaling Function of the B-Cell Antigen Receptor and Its Coreceptors. In Molecular Biology of B Cells, Second Edition, Alt FW, Honjo T, Radbruch A and Reth M.(eds.), Academic Press, London, UK, 151-70 (2014): release date, Dec. 22, 2014
2. 審良静男、黒崎知博。「新しい免疫入門 自然免疫から自然炎症まで」 講談社ブルーバックス。3-214 2014年12月19日

〔その他〕

〔新聞掲載〕

1. 化学工業日報「B細胞の分化機序解明」2018年4月25日
2. 薬事日報「ウイルス感染症防御の必須抗体産生経路を発見」2018年4月25日
3. 日経産業新聞「感染症抗体作る「プラズマ細胞」生成 複数たんぱく質が関与 理研や阪

大 効き目向上に期待」2018年4月18日

4. 日刊工業新聞「抗体作る仕組み解明 病原体感染防御 ワクチン開発に道 理研と阪大」
2018年4月18日
5. 化学工業日報「メモリーB細胞 分化に柔軟性 類似抗原も認識、ワクチン開発に期待」
2016年5月16日
6. 日刊工業新聞
「阪大、多発性硬化症抑える免疫細胞を確認-たんぱく質IL-10がB細胞集団から分泌」
2014年12月5日
7. 読売新聞夕刊「多発性硬化症悪化抑制 阪大チーム 血中たんぱく質に効果」
2014年12月5日
8. 科学新聞「細胞のアナログ情報をデジタル変換 理研などの研究グループ解明」
2014年6月13日

ホームページ等 <http://lymph.ifrec.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター

(1)研究分担者

研究分担者氏名：福山 英啓

ローマ字氏名： FUKUYAMA, Hidehiro

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：統合生命医科学研究センター

職名：上級研究員

研究者番号(8桁)：70303956

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。