

令和元年6月12日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15714

研究課題名(和文)形質細胞長寿命獲得機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the acquisition mechanism of a long life in plasma cells

研究代表者

伊藤 亜里 (Itoh-Nakadai, Ari)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：90749772

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)：免疫記憶の柱の一つである、抗体産生を長期に行う長期生存形質細胞を取り巻く環境については明らかになりつつあるが、それ自体の性質の変化は明らかではない。我々は、骨髄の形質細胞で脾臓に比べて発現が高い遺伝子として、亜鉛を結合するMT1とMT2を同定した。MT1、MT2高発現形質細胞の遺伝子発現を調べたところ、Flt1、Hmox1など、細胞のストレス低減に関連する遺伝子群と発現の相関が高かった。脾臓の形質細胞ではMT1とMT2の発現がIL-6刺激によって上昇した。これらの結果から、長寿命形質細胞は、骨髄環境内でIL-6などの生存刺激を受けてストレス耐性機能を獲得している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一度感染症にかかれば二度と同じ感染症に罹患することがない、「免疫記憶」の柱の一つは、骨髄に存在して長期生存し、抗体を産生し続ける形質細胞である。我々は、骨髄に存在する長期生存形質細胞と、脾臓に存在する短寿命形質細胞、一つ一つの遺伝子発現を比較し、その違いを抽出した。その結果、骨髄に存在する形質細胞は、脾臓に存在する形質細胞に比べて、抗体産生能や細胞のストレス低減に寄与する遺伝子群の発現が高いことがわかった。長寿命形質細胞の性質を知ることは、抗体関連疾患であるアレルギーや自己免疫疾患の治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Long-lived plasma cells (LLPCs) reside in bone marrow (BM) and provide long-term defense against infection. However, the mechanism of the longevity of LLPCs is not fully understood. To explore the difference between tissue specific plasma cells, we performed single cell RNA-sequencing (scRNA-Seq) analysis on plasma cells from bone marrow and spleen. In order to eliminate false positive results due to difference in isotypes, we separated cells into IgG and IgA in scRNA-seq analysis, and investigated their profiles of gene expression between bone marrow and spleen. We found that metabolism- and ribosomal RNA biogenesis-related genes were significantly enriched in bone marrow plasma cells compared to that of the spleen. We also observed that several metal binding factor genes had high expression in bone marrow plasma cells. These results suggest that the characteristic of plasma cells varies from tissue to tissue.

研究分野：免疫学

キーワード：獲得免疫 長期生存形質細胞 骨髄形質細胞 脾臓形質細胞 メタロチオネイン

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

1. 研究開始当初の背景

一度感染症にかかれば二度と同じ感染症に罹患することがない、いわゆる免疫の獲得という現象から、我々は、「免疫記憶」というシステムが存在すると理解することができる。免疫記憶の柱の一つは、骨髄に存在する長期生存形質細胞である。抗原刺激を受けたB細胞は、脾臓やリンパ節の胚中心で、抗体を産生する短寿命の形質細胞に分化する。その後、一部の細胞が体内を循環して骨髄に定着し、長期に維持されることが知られている。骨髄の形質細胞ニッチは、IL-6やAPRILなどの形質細胞生存因子を分泌する好酸球や樹状細胞、それらの細胞を保持するCXCL12産生ストローマ細胞など、様々な細胞から構成されていることが知られているが、形質細胞自体の性質の変化は明らかではない。そこで、本研究では、免疫記憶機構の理解のため、骨髄の長寿命形質細胞の維持機構を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、形質細胞の長寿命に重要な遺伝子を抽出するため、骨髄の長寿命形質細胞と脾臓の短寿命形質細胞の遺伝子発現解析を行うこととした。この解析をバルクの細胞で行った論文はあるが、形質細胞のアイソタイプは組織間で異なる可能性があり、アイソタイプの違いは遺伝子発現の違いにつながる可能性があることから、1細胞での遺伝子発現比較が重要であると考えられた。そこで、本研究では、骨髄に存在する長寿命の形質細胞と、脾臓に存在する短寿命の形質細胞の遺伝子発現の違いを Single cell RNA-seq (sc-RNA-seq によって) 解析した。それにより、抽出された機能や因子から長寿命に必要な機構を推測することを目的とした。

3. 研究の方法

骨髄及び脾臓の形質細胞の1細胞 RNA-Seq を CEL-Seq2 法によって行った。CEL-Seq2 法は、2016年に Hashimshony らによって開発された方法である。申請者は、国際共同研究加速基金(国際共同研究強化)の支援によって渡航先でアドバイスをを受け、帰国後東北大学で CEL-Seq2 法を立ち上げた。解析は主に R を使用して行った。IgA 陽性形質細胞の寿命測定は BrdU を飲水から投与する方法で行った。詳細は研究成果に記載する。

4. 研究成果

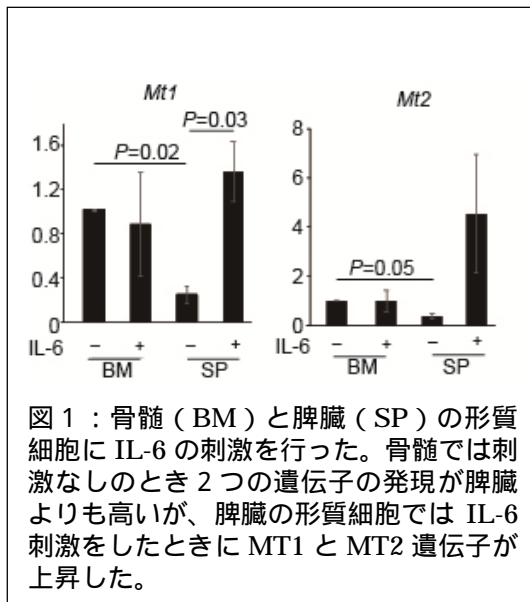
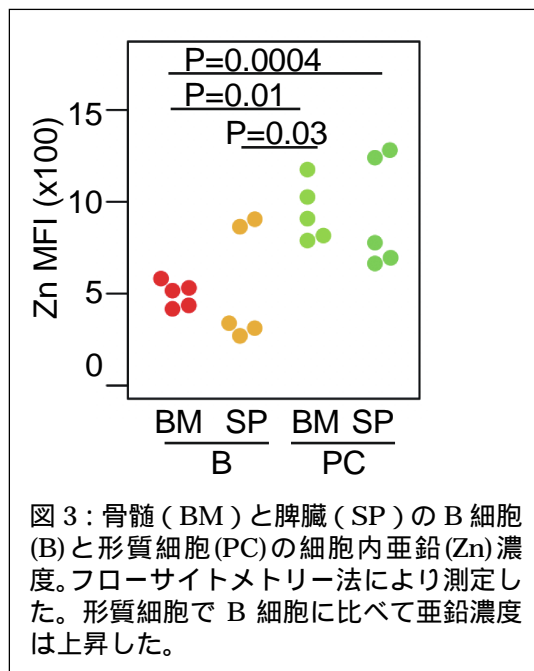
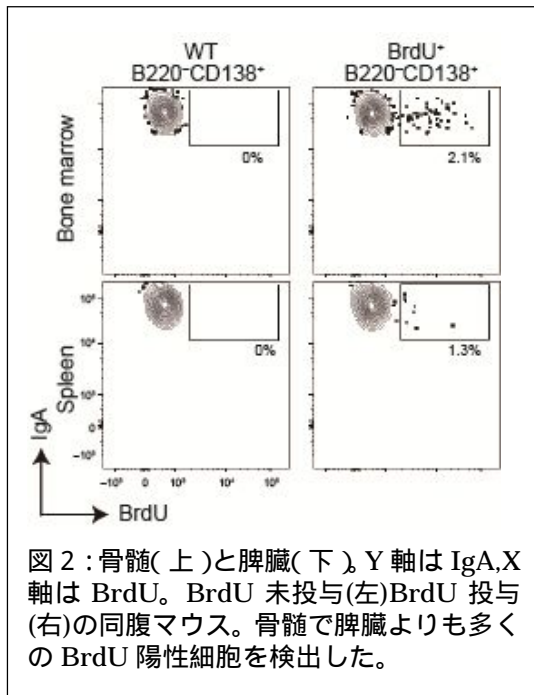


図1：骨髄 (BM) と脾臓 (SP) の形質細胞に IL-6 の刺激を行った。骨髄では刺激なしのとき 2 つの遺伝子の発現が脾臓よりも高いが、脾臓の形質細胞では IL-6 刺激をしたときに MT1 と MT2 遺伝子が上昇した。

国際共同研究加速基金(国際共同研究強化)の支援を受けて行った先行研究では、骨髄と脾臓の抗体のアイソタイプは大きく異なっており、脾臓では IgM 型の形質細胞が多く、骨髄ではクラススイッチした形質細胞が多かった。一方で、IgA 型の形質細胞は、骨髄にも脾臓にも半数の割合で存在した。この結果は、フローサイトメーターを用いた方法と Enzyme-linked immunosorbent spot formation (ELISpot)を用いた方法の両方で同様であった。

scRNA-Seq により、骨髄と脾臓の形質細胞の遺伝子発現の解析を行った。両方の組織で半数を占めていた IgA 型の形質細胞で遺伝子発現解析を行ったところ、亜鉛結合タンパク質である metallothionein (MT)1 と MT2 の遺伝子が骨髄で発現が高いことを見出した。この 2 つの遺伝子の骨髄での発現は、非常に相関が高く、MT1 と MT2 は同一の制御を受けているのではないかと考えられた。そこで、骨髄の形質細胞と脾臓の形質細胞を分取し、形質細胞の生存に重要な IL-6 で刺激を

おこなった。興味深いことに、脾臓の形質細胞では MT1 と MT2 の遺伝子発現が上昇したのに対し、骨髄の形質細胞では差が見られなかった。これは、骨髄の形質細胞では、すでに IL-6 などの刺激を受けて MT の発現が上昇していること、脾臓の形質細胞が骨髄に到達して、IL-6 の刺激を受ければ MT の発現が上昇することを示唆していた(図 1)。IgA は、腸や気道などの粘膜上皮で活躍する抗体である。したがって、骨髄に存在する IgA 陽性形質細胞が長寿命を獲得した細胞であるかどうか疑問があった。そこで、離乳したての仔マウスが餌を食べ始めることによって外界から異物が入り、多くの IgA 陽性形質細胞が作られることを期待して、離乳したての 3 週齢のマウスに 18 日に渡って BrdU を飲水にまぜ、経口により投与した。6 ヶ月後骨髄と脾臓に存在する BrdU 陽性 IgA 細胞を検出したところ、骨髄で 2.1%、脾臓で 1.3% の BrdU 陽性 IgA 陽性細胞が存在した(図 2)。



この結果から、骨髄に長期生存 IgA が存在することがわかった。MT1 と MT2 は、亜鉛を結合するタンパク質である。そこで、申請者は、骨髄と脾臓の形質細胞及び B 細胞で亜鉛濃度の変化の有無を調べた。その結果、骨髄と脾臓の形質細胞の間で亜鉛濃度の変化は見られなかったが、B 細胞から形質細胞に分化すると上昇することを見出した(図 3)。亜鉛は B 細胞で細胞死を防ぐ因子として重要であるとの報告があり、MT1 と MT2 は長期に細胞内に安定して亜鉛を維持する役割を担っているのではないかと推測される。さらに、骨髄の MT 高発現細胞群では、抗酸化ストレス効果のある HO-1、ER ストレスを低減する Herped1、鉄を貯蔵する Ferritin などの遺伝子発現が上昇していた。MT タンパク質も、亜鉛や銅、カドミウムと結合し、抗酸化作用をもつタンパク質である。したがって、形質細胞は、骨髄環境でストレス耐性型の遺伝子発現に変化し、長寿命を獲得している可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Miura, Y., Morooka, M., Sax, N., Roychoudhuri, R., Itoh-Nakadai, A., Brydun, A., Funayama, R., Nakayama, K., Satomi, S., Matsumoto, M., et al. (2018). Bach2 Promotes B Cell Receptor-Induced Proliferation of B Lymphocytes and Represses Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J Immunol* 200, 2882-2893. (査読あり)
- (2) Kayaba, A., Itoh-Nakadai, A., Niibe, K., Shiota, M., Funayama, R., Sugahara-Tobinai, A., Wong, Y.L., Inui, M., Nakayama, K., and Takai, T. (2018). Bone Marrow PDGFR+Sca-1+ Enriched Mesenchymal Stem Cells Support Survival of and Antibody Production by Plasma Cells in vitro through IL-6. *Int Immunol*. (査読あり)
- (3) Kato, H., Itoh-Nakadai, A., Matsumoto, M., Ishii, Y., Watanabe-Matsui, M., Ikeda, M., Ebina-Shibuya, R., Sato, Y., Kobayashi, M., Nishizawa, H., et al. (2018). Infection perturbs Bach2- and Bach1-dependent erythroid lineage 'choice' to cause anemia. *Nat Immunol* 19,

1059-1070. (査読あり)

- (4) Sato, Y., Katoh, Y., Matsumoto, M., Sato, M., Ebina, M., Itoh-Nakadai, A., Funayama, R., Nakayama, K., Unno, M., and Igarashi, K. (2017). Regulatory signatures of liver regeneration distilled by integrative analysis of mRNA, histone methylation, and proteomics. *J Biol Chem* 292, 8019-8037. (査読あり)
- (5) Sato, Y., Kato, H., Ebina-Shibuya, R., Itoh-Nakadai, A., Okuyama, R., and Igarashi, K. (2017). Bach2 Controls Homeostasis of Eosinophils by Restricting the Type-2 Helper Function of T Cells. *Tohoku J Exp Med* 241, 175-182. (査読あり)
- (6) Kobayashi, M., Kato, H., Hada, H., Itoh-Nakadai, A., Fujiwara, T., Muto, A., Inoguchi, Y., Ichiyanagi, K., Hojo, W., Tomosugi, N., et al. (2017). Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. *Haematologica* 102, 454-465. (査読あり)
- (7) Itoh-Nakadai, A., Matsumoto, M., Kato, H., Sasaki, J., Uehara, Y., Sato, Y., Ebina-Shibuya, R., Morooka, M., Funayama, R., Nakayama, K., et al. (2017). A Bach2-Cebp Gene Regulatory Network for the Commitment of Multipotent Hematopoietic Progenitors. *Cell Rep* 18, 2401-2414. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) Itoh-Nakadai A and Takai T, Secretary leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells,第 46 回日本免疫学会学術集会、仙台、2017 年 12 月 12 日-14 日
- (2) Itoh-Nakadai A, Kayaba A and Takai T, Secretary leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells, 5th Annual meeting of the international cytokine & interferon society, Kanazawa, Japan, Oct 29- Nov 2, 2017
- (3) 伊藤亜里、萱場敦子、高井俊行 長寿命形質細胞の免疫記憶維持の解明、第 3 回日本骨免疫学会、沖縄、2017 年 6 月 27 日—29 日
- (4) Itoh-Nakadai A and Takai T, Secretary leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells, Keystone symposia, Whistler, British Columbia, Canada, April 23-27, 2017
- (5) Itoh-Nakadai A and Takai T, Secretary leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells, The Inaugural Chiba University - UC San Diego Symposium on Mucosal Immunology, Allergy and Vaccines: Impact on Mucosal Diseases and Global Health, San Diego, CA, USA, Feb 21-22, 2017

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。