

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19447

研究課題名(和文)免疫記憶の新規研究法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel method to study immune memory

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の活性を、「ある時空間のみ変異させ」、将来どのような効果をもたらすかの検定の重要性は言うまでもない。本研究では、細胞機能に重要な遺伝子、mTORC1を「特定の細胞のみ」、「特定の時間」阻害する方法の樹立を目指した。mTORC1分子はrapamycinで可逆的阻害がかかるが、rapamycin抵抗性mTORC1を見つけ、抵抗性mTORC1発現細胞では、rapamycinによる阻害が全くみられないことを確認した。すなわち、B細胞以外すべてこの「抵抗性mTORC1」を発現させ、野生型mTORC1を発現しているB細胞のみ、ある特定の時間rapamycinで阻害をかける方法の樹立が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは、多くの薬剤を用いて疾病の予防・治療を行っているわけであるが、実際、その薬剤は、「どの細胞のいつの時期」効いて、薬効を発現しているのかは明白にされていない。この研究で樹立された、特定の細胞のみで薬効が働く、方法は、この疑問解決に大変重要なツールを与えることになる。又、本研究からの重要な進展は、薬剤ターゲットを変異して、この変異ターゲットのみに働く薬剤の開発を同時に行うことにより、ある特定の細胞(例えば癌細胞)のみに働く薬剤を生体に投与し、正常細胞への影響を殆どなくすることも可能になる。

研究成果の概要(英文)：Development of a new method to reversibly inactivate specific genes in a tempo-spatial way is very important for biological research. Here, we have tried to develop an experimental system to reversibly inactivate the mTORC1 molecule in the B cell specific manner during a certain time window. To do this, we found that cells expressing the mutant mTORC1, being resistant to rapamycin, indeed behaved independently of rapamycin treatment. Then, we will intend to establish the transgenic mice expressing the resistant mTORC1 except B lineage cells, which allow us to inhibit mTORC1 in a B cell specific manner by rapamycin.

研究分野：免疫学

キーワード：ケミカルジェネティクス 時空間的制御 PI3キナーゼ mTORC1 rapamycin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物研究において、どの「時期」での、どの「細胞」の、どのような「イベント」が、時間を経た将来の運命決定に必須なのかを明らかにすることは、非常に重要な課題である。しかしながら、現在ルーチンに用いられている遺伝子ターゲティング法では、遺伝子欠損を不可逆的・永続的にさすという内在的欠陥を有している。従って、B細胞の場合胚中心(GC)反応を経て、メモリー細胞が形成されるわけであるが、GCの過程で生じる変化が、メモリー細胞機能にどのような影響を与えるかは非常に重要な命題にもかかわらず、この命題へのアプローチが困難を極めている(図1)。

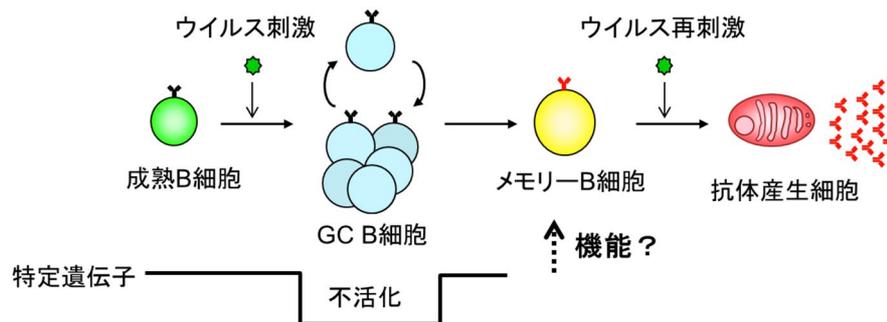


図1: 時空間特異的遺伝子不活化マウスの作製

特定の遺伝子をGC B細胞特異的に変異させ、メモリーB細胞機能に与える影響を検定する。

2. 研究の目的

本研究は阻害剤及び遺伝学的手法を用いた研究の長所・短所が、互いに相補的であることに着目し、例えば、阻害剤の場合、可逆的阻害を行えること、遺伝学的手法の場合、特定の細胞・時期のみでの発現を行えること、この2つの方法を combine し、現行の研究手法では不可能な、あらたな in vivo 研究手法を生み出そうとするものである。具体的ターゲット分子として、申請時はPI3キナーゼを用いる予定であったが、この目的にかなった阻害剤を単離することができず、途中で strategy の変更を行った。即ち、PI3キナーゼの重要なエフェクター分子である mTORC1 分子に的を絞る(図2) 既にこの分子には特異的、かつ可逆的阻害剤として rapamycin が存在していることに注目し、本研究では以下の3点を検証した。

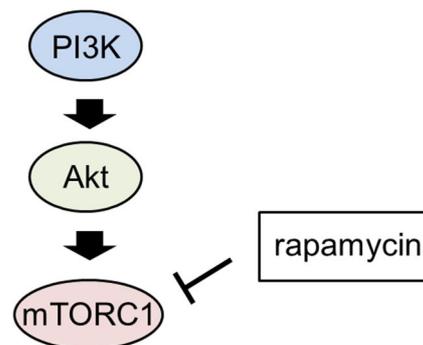


図2: PI3K/mTORC1シグナル経路

- (1) mTORC1分子に遺伝子改変できるような、アミノ酸変異を加えて、rapamycin感受性をもたないようなmTORC1を作成することができるのか。
- (2) このような変異mTORC1は、rapamycinで阻害を受けないということ以外、殆ど野生型mTORC1の活性をもっているのかどうか。
- (3) 野生型mTORC1発現細胞と変異型mTORC1発現細胞が共存したときに、確かに野生型のみmTORC1阻害がかかるのかどうか。

3. 研究の方法

(1) 先ず可能性のある変異 mTORC1 を 293T 細胞に共発現させ、確かにその変異が rapamycin 抵抗性になっているかどうか、それ以外は野生型 mTORC1 と同様の活性をもっているかどうか確認する。

(2) B 細胞に変異 mTORC1 をノックインし、変異 mTORC1 発現 B 細胞の細胞活性を、rapamycin 存在・非存在下で検定する。

4. 研究成果

(1) 変異 mTORC1 の作成

既に、甲状腺がんで rapamycin analogue に抵抗性を有する mTORC1 変異(F2108L)が (Wagle 2014) 報告されている。この変異 mTORC1 を作成し、293 T 細胞に強制発現して、S6 キナーゼの活性は、野生型 mTORC1 と同様であることを確認した。更に、この変異 mTORC1 が rapamycin 投与で、阻害を受けないこと、野生型 mTORC1 の場合、既に報告にあるとおり、阻害剤を washout したら、この阻害が速やかに回復することを確認した。

(2) mTORC1(F2108L)のノックイン B 細胞の検定

次に、変異 mTORC1 ノックイン B 細胞を用いて、この細胞が rapamycin 非存在下では、B 細胞の活性化が、野生型 B 細胞と同様であることを確認した。

(3) 野生型 B 細胞、変異 mTORC1 B 細胞の共存下における rapamycin による阻害

野生型 B 細胞、変異 B 細胞を 50%ずつ in vitro で共存させ、rapamycin 投与により、野生型 B 細胞のみ mTORC1 の阻害が生じることを S6 キナーゼ活性化等で確認した。

引用文献

Wagle N et al (2014) N. Engl. J. Med. 371, 1426-1433

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 18件／うち国際共著 15件／うちオープンアクセス 17件）

1. 著者名 Herndler-Brandstetter Dietmar, Ishigame Harumichi, Shinnakasu Ryo, Plajer Valerie, Stecher Carmen, Zhao Jun, Lietzenmayer Melanie, Kroehling Lina, Takumi Akiko, Kometani Kohei, Inoue Takeshi, Kluger Yuval, Kaech Susan M., Kurosaki Tomohiro, Okada Takaharu, Flavell Richard A.	4. 巻 48
2. 論文標題 KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 716 ~ 729.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2018.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Inoue Takeshi, Moran Imogen, Shinnakasu Ryo, Phan Tri Giang, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 283
2. 論文標題 Generation of memory B cells and their reactivation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 138 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.12640	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ise Wataru, Fujii Kentaro, Shiroguchi Katsuyuki, Ito Ayako, Kometani Kohei, Takeda Kiyoshi, Kawakami Eiryu, Yamashita Kazuo, Suzuki Kazuhiro, Okada Takaharu, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 48
2. 論文標題 T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 702 ~ 715.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2018.03.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Raju Saravanan, Kometani Kohei, Kurosaki Tomohiro, Shaw Andrey S., Egawa Takeshi	4. 巻 14
2. 論文標題 The adaptor molecule CD2AP in CD4 T cells modulates differentiation of follicular helper T cells during chronic LCMV infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mendoza Pilar, Martinez-Martin Nuria, Bovolenta Elena R., Reyes-Garau Diana, Hernansanz-Agustin Pablo, Delgado Pilar, Diaz-Munoz Manuel D., Oeste Clara L., Fernandez-Pisonero Isabel, Castellano Ester, Martinez-Ruiz Antonio, Alonso-Lopez Diego, Santos Eugenio, Bustelo Xose R., Kurosaki Tomohiro, Alarcon Balbino	4. 巻 11
2. 論文標題 R-Ras2 is required for germinal center formation to aid B cells during energetically demanding processes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaal1506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aal1506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kayama Hisako, Kohyama Masako, Okuzaki Daisuke, Motooka Daisuke, Barman Soumik, Okumura Ryu, Muneta Masato, Hoshino Katsuaki, Sasaki Izumi, Ise Wataru, Matsuno Hiroshi, Nishimura Junichi, Kurosaki Tomohiro, Nakamura Shota, Arase Hisashi, Kaisho Tsuneyasu, Takeda Kiyoshi	4. 巻 115
2. 論文標題 Heme ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis through providing intestinal macrophages with noninflammatory profiles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 8418 ~ 8423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1808426115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Shinya, Jiang Yu, Martinez Gustavo J., Tanaka Kentaro, Yan Xiaowei, Kurosaki Tomohiro, Kaartinen Vesa, Feng Xin-Hua, Tian Qiang, Wang Xiaohu, Dong Chen	4. 巻 215
2. 論文標題 Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1853 ~ 1868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20170779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Edwards Chelsea L., de Oca Marcela Montes, de Labastida Rivera Fabian, Kumar Rajiv, Ng Susanna S., Wang Yulin, Amante Fiona H., Kometani Kohei, Kurosaki Tomohiro, Sidwell Tom, Kallies Axel, Engwerda Christian R.	4. 巻 9
2. 論文標題 The Role of BACH2 in T Cells in Experimental Malaria Caused by Plasmodium chabaudi chabaudi AS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 2578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.02578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kong Mei Suen, Hashimoto-Tane Akiko, Kawashima Yusuke, Sakuma Machie, Yokosuka Tadashi, Kometani Kohei, Onishi Reiko, Carpino Nick, Ohara Osamu, Kurosaki Tomohiro, Phua Kia Kien, Saito Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of T cell activation and function by the adaptor protein CIN85	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaav4373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aav4373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Lee Michelle Sue Jann, Natsume Kitatani Yayoi, Temizoz Burcu, Fujita Yukiko, Konishi Aki, Matsuda Kyoko, Igari Yoshikatsu, Tsukui Toshihiro, Kobiyama Kouji, Kuroda Etsushi, Onishi Motoyasu, Marichal Thomas, Ise Wataru, Inoue Takeshi, Kurosaki Tomohiro, Mizuguchi Kenji, Akira Shizuo, Ishii Ken J, Coban Cevayir	4. 巻 49
2. 論文標題 B cell intrinsic MyD88 signaling controls IFN mediated early IgG2c class switching in mice in response to a particulate adjuvant	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1433-1440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201848084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Leach Sarah, Shinnakasu Ryo, Adachi Yu, Momota Masatoshi, Makino-Okamura Chieko, Yamamoto Takuya, Ishii Ken J, Fukuyama Hidehiro, Takahashi Yoshimasa, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Requirement for memory B-cell activation in protection from heterologous influenza virus reinfection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 771-779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz049	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 Adachi Yu, Tonouchi Keisuke, Nithichanon Arnone, Kuraoka Masayuki, Watanabe Akiko, Shinnakasu Ryo, Asanuma Hideki, Aina Akira, Ohmi Yusuke, Yamamoto Takuya, Ishii Ken J., Hasegawa Hideki, Takeyama Haruko, Lertmemongkolchai Ganjana, Kurosaki Tomohiro, Ato Manabu, Kelsie Garnett, Takahashi Yoshimasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-019-11821-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Usui Ryota, Yabe Daisuke, Fauzi Muhammad, Goto Hisanori, Botagarova Ainur, Tokumoto Shinsuke, Tatsuoka Hisato, Tahara Yumiko, Kobayashi Shizuka, Manabe Toshiya, Baba Yoshihiro, Kurosaki Tomohiro, Herrera Pedro Luis, Ogura Masahito, Nagashima Kazuaki, Inagaki Nobuya	4. 巻 9
2. 論文標題 GPR40 activation initiates store-operated Ca ²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic β -cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-019-52048-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Cossarizza Andrea et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1457-1973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201970107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Ryota, Makino-Okamura Chieko, Lin Quingshun, Wang Muying, Shoemaker Jason E, Kurosaki Tomohiro, Fukuyama Hidehiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Repurposing the psoriasis drug Oxarol to an ointment adjuvant for the influenza vaccine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International 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) 10.1093/intimm/dxaa012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sidwell Tom, Liao Yang, Garnham Alexandra L., Vasanthakumar Ajithkumar, Gloury Renee, Blume Jonas, Teh Peggy P., Chisanga David, Thelemann Christoph, de Labastida Rivera Fabian, Engwerda Christian R., Corcoran Lynn, Kometani Kohei, Kurosaki Tomohiro, Smyth Gordon K., Shi Wei, Kallies Axel	4. 巻 11
2. 論文標題 Attenuation of TCR-induced transcription by Bach2 controls regulatory T cell differentiation and homeostasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-019-14112-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mesin Luka, Schiepers Arien, Ersching Jonatan, Barbulescu Alexandru, Cavazzoni Cecilia B., Angelini Alessandro, Okada Takaharu, Kurosaki Tomohiro, Victora Gabriel D.	4. 巻 180
2. 論文標題 Restricted Clonality and Limited Germinal Center Reentry Characterize Memory B Cell Reactivation by Boosting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 92~106.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.11.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka S, Ise W, Inoue T, Ito A, Ono C, Shima Y, Sakakibara S, Nakayama M, Fujii K, Miura I, Sharif J, Koseki H, Pandelakis K, Raman I, Li Q, Kubo M, Fujiki K, Nakato R, Shirahige K, Araki H, Miura F, Ito T, Kawakami E, Baba Y, and Kurosaki T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Tet2 and Tet3 in B cells are required to repress CD86 and prevent autoimmunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature 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) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ise Wataru, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 288
2. 論文標題 Plasma cell differentiation during the germinal center reaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 64-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.12751	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11件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Fate decision of germinal center B cells
3. 学会等名 B Cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity Keystone Symposia Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Fate decision of germinal center B cells
3. 学会等名 Japanese-German Immunology Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Regulation of B cell tolerance by epigenetic factors
3. 学会等名 Cluster Science Days 2018 and the 10th international symposium of IFRcC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Fate decision of germinal center B cells
3. 学会等名 International Symposium on B cells (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Selection Mechanisms of Germinal Center Cells into the Memory B Cell Compartment
3. 学会等名 B Cell-T Cell Interactions, Keystone Symposia Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Generation of humoral memory compartments
3. 学会等名 The 10th JSH INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2019 in Ise-Shima (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Roles of epigenetic modification in B cell tolerance
3. 学会等名 2nd International Symposium on "B cell responses in immunity and autoimmunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒崎 知博
2. 発表標題 「B細胞・抗体を介する免疫制御」
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Function of Tet proteins in B cell tolerance
3. 学会等名 The International Symposium of Korean Autoimmunity-Synovitis Study Group (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Function of humoral memory compartments and their generation mechanism
3. 学会等名 New Horizons in B Cell Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kurosaki, T
2. 発表標題 Two functional humoral memory compartments and their generation mechanism
3. 学会等名 B Cell Renaissance: Epigenetics, Regulation and Immunotherapy, Keystone Symposia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://lymph.ifrec.osaka-u.ac.jp/

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