

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22538

研究課題名（和文）体細胞寿命および新旧細胞間相互作用の解析

研究課題名（英文）Whole-life tracing and cell-cell regulation in B cells

研究代表者

保田 朋波流（YASUDA, TOMOHARU）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：40334429

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：標識したEYFP発現B細胞が免疫系によって拒絶されることが懸念されたが、拒絶に必要なT細胞は活性化されず、標識から180日以上を経過しても標識B細胞が免疫系から拒絶されなかった。このことから分化したB細胞の標識および寿命の絶対計測が本システムにおいて可能であることが確認できた。標識したB細胞を1年に渡って追跡した結果、若齢の間は短期間でB細胞が入れ替わるものの個体の加齢が進むにつれて入れ替わりの速度が低下することがわかった。また抗原に未感作のB細胞がこれまでに考えられていたよりもはるかに長期に渡って未感作のまま生体内に残存することを初めて突き止めることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外来抗原に特異的な免疫記憶（抗体産生細胞、記憶B細胞、記憶T細胞から構成される）を形成する個々の細胞が維持される期間を明らかにすることは、免疫記憶の成り立ちを理解する根幹に関わりその重要性は明白である。記憶細胞の生存期間が定量化できるようになれば、生存期間ごとに細胞を解析できるようになるため特定細胞の長期生存を可能にする分子メカニズムに迫ることもできる。このような解析を進めていくことで免疫記憶の成り立ちや抗体選択のメカニズムのさらなる理解に貢献し、効果的なワクチン開発、アレルギーや自己免疫などの疾患治療に役立つことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Labeled EYFP-expressing B cells could be rejected by the immune system, however T cells were not activated and labeled B cells had not rejected by the immune system more than 180 days after labeling. Thus confirmed that the labeling of differentiated B cells and the absolute measurement of lifespan are possible using this system. As a result of tracking the labeled B cells for one year, we found that the B cells were replaced in a short period during young age, but the turnover decreased as aging. In addition, we succeeded to find that naive B cells that have not been activated by the antigen stay circulation in vivo for a much longer period of time than previously thought.

研究分野：免疫

キーワード：B細胞 免疫老化 免疫寿命 細胞老化 免疫応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫系は一度感作された抗原に対して長期に渡って記憶応答できるという特性から、抗原に特異的な細胞が長期間に渡って生存することが想定されてきた。確かに抗原特異的な記憶細胞や抗体産生細胞を長期に渡り検出することが可能であるが、一度体内に入った抗原を完全に除去することは不可能であり、それら細胞がいつの時点で反応して生まれたか特定することは難しい。BrdU などを用いて DNA 標識された細胞を追跡する方法もあるが細胞分裂に伴って標識が消失する上、細胞毒性もあり長期間に渡る追跡は不可能である。そこでこれらの問題点を克服し、様々な B 細胞を不可逆的に標識することで個体の生涯に渡って追跡できる実験系を構築したいとの考えに至った。

2. 研究の目的

本研究課題では機能分化した細胞を生体内において不可逆かつ選択的に標識することで生涯に渡って追跡する技術を開発し、それら特定の細胞種の前段階である幹細胞や前駆細胞を異なる時系列で区別して標識することで、新旧細胞間での寿命や分化への影響、古い細胞と新しい細胞の入れ替え速度、また細胞機能に影響する新旧細胞間の相互作用を解析することを目指す。

3. 研究の方法

生きた個体における B 細胞の選択的標識には遺伝子改変マウスを用いる。具体的には研究代表者が長年在籍した Klaus Rajewsky 研究室で開発された Cre-loxP マウス遺伝子組換え系を用い、分化した B 細胞特異的な CreER^{T2} 発現マウスと Cre 依存的蛍光タンパク質発現レポーターを組み合わせる事で任意の時期に成熟 B 細胞を蛍光タンパク質で不可逆標識する。CreER^{T2} は Cre 組み換え酵素と変異型エストロゲン受容体の融合タンパク質で、タモキシフェンをマウスに投与した時のみ Cre が細胞核に移行し loxP 配列に挟まれた転写翻訳停止配列を除去することで蛍光タンパク質を不可逆的に発現させることができる。実際にそのようなマウス (Mb1CreER^{T2}; R26EYFP^{f1STOP} マウス) を作成し、タモキシフェン投与後に分化 B 細胞の解析を行なった。その結果全身の様々な B 細胞が非常に効率よく EYFP タンパク質で標識され、未分化な B 細胞は一時的には標識されるものの短期間で分化するため結果的に分化後の B 細胞だけが標識できることが分かった。またこれら EYFP 発現 B 細胞が免疫系によって拒絶されることが懸念されたが、拒絶に重要な T 細胞は活性化されず、標識から 180 日以上を経過しても標識 B 細胞が免疫系から拒絶されなかった。このことから分化した B 細胞の標識および寿命の絶対計測が本システムにおいて可能であり、今後個体生涯を通じたフローサイトメトリー解析を行うことで、様々な機能分化した B 細胞サブタイプ (B1 細胞、濾胞 B 細胞、辺縁帯 B 細胞、胚中心 B 細胞、記憶 B 細胞、抗体産生細胞) それぞれの寿命を算出する。新たに産生される B 細胞の標識には Tet-On システムと Dre-rox 組み換え系を用いる。rtTA 遺伝子を B 細胞前駆細胞で発現する Flt3 遺伝子プロモーター下流に挿入したマウスと Rosa26 遺伝子座に Tet 誘導性の Dre 組み換え酵素と RFP レポーターをノックインしたマウスを作成し交配する。このマウスにドキシサイクリンを投与することで任意の時期に新しく産生された B 細胞のみ RFP で標識され、EYFP 標識系と組み合わせることで任意の 2 つの異なる時期に形成された B 細胞を同一個体内で解析することが可能になる。Dre-rox は Cre-loxP に類似の組み換えシステムでまだ広く用いられてないが、その特異性と組み換え効率に関して代表者等が既にマウスを作成し実用的である事を確認済みである。マウスにお

ける Tet システムは既に多くの研究室で実用化されている。異なる時期に形成された B 細胞の寿命や入れ替わりは経時的なフローサイトメトリー解析で定量化する。前後の時間軸で形成された細胞間の免疫機能への影響や競合は T 細胞依存性抗原である NP-CGG で免疫後、抗原特異的な胚中心 B 細胞、記憶 B 細胞、抗体産生細胞をフローサイトメトリー解析、組織切片イメージング解析、レパトア解析などで行う。細胞間相互作用や競合の解析はリンパ球移植や in vitro 培養系を用いて行う。

4 . 研究成果

同一個体の全く異なる二つの時期に独立して B 細胞を不可逆標識するために 2 種類の異なるマウスラインを新たに作成する予定であった。しかしながら、1 系統目のマウス (Mb1CreER^{T2};R26EYFP^{f1STOP} マウス) を作成し解析の途中で研究代表者が大学を移動することになり、また新型コロナウイルス感染拡大も重なり 2 系統目のマウス (Flt3-rtTA;R26TR-Dre-RFP^{f1STOP} マウス) の樹立が研究期間内に間に合わなかった。Mb1CreER^{T2};R26EYFP^{f1STOP} マウスを用いて B 細胞を Tamoxifen 投与により標識し、Cre-loxP 組換えで不可逆標識された B 細胞の挙動を追跡し、様々な B 細胞群ごとの細胞寿命を半減期を計測することで定量化することに成功した。標識した EYFP 発現 B 細胞が免疫系によって拒絶されることが懸念されたが、標識された B 細胞を拒絶するような T 細胞は活性化されず、標識から 180 日以上を経過しても標識 B 細胞を検出し続けることができた。標識した B 細胞を 1 年に渡って追跡した結果、若齢の間は短期間で B 細胞が入れ替わるものの個体の加齢が進むにつれて入れ替わりの速度が低下することがわかった。また抗原に未感作の B 細胞がこれまでに考えられていたよりもはるかに長期に渡って未感作のまま生体内に残存することを初めて突き止めることに成功した。

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 5件）

1. 著者名 Yasuda Tomoharu, Saito Yuichi, Ono Chisato, Kawata Kazuhiko, Baba Akemi, Baba Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation and characterization of CD19-iCre mice as a tool for efficient and specific conditional gene targeting in B cells	5. 発行年 2021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/s41598-021-84786-6	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 -
1. 著者名 Huang Shiyu, Yasuda Tomoharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Pathologically Relevant Mouse Models for Epstein-Barr Virus-Associated B Cell Lymphoma	5. 発行年 2021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.2021.639844	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 Sakurai Tetsuya, Kukimoto-Niino Mutsuko, Kunimura Kazufumi, Yamane Nana, Sakata Daiji, Aihara Ryosuke, Yasuda Tomoharu, Yokoyama Shigeyuki, Shirouzu Mikako, Fukui Yoshinori, Uruno Takehito	4. 巻 4
2. 論文標題 A conserved PI(4,5)P2-binding domain is critical for immune regulatory function of DOCK8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000873	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 Sommermann Thomas, Yasuda Tomoharu, Ronen Jonathan, Wirtz Tristan, Weber Timm, Sack Ulrike, Caesar Rebecca, Zhang Jingwei, Li Xun, Chu Van Trung, Jauch Anna, Unger Kristian, Hodson Daniel J., Akalin Altuna, Rajewsky Klaus	4. 巻 117
2. 論文標題 Functional interplay of Epstein-Barr virus oncoproteins in a mouse model of B cell lymphomagenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 14421 ~ 14432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1921139117	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 Imami K, Yasuda T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Measuring protein synthesis during cell cycle by Azidohomoalanine (AHA) labeling and flow cytometric analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio-Protocol	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) 10.21769/BioProtoc.3215	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 抗原受容体と免疫細胞の維持機構
3. 学会等名 第一三共 消化器疾患セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 抗原受容体と免疫寿命のコントロール
3. 学会等名 広島市医師会 第135回学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoharu Yasuda, Klaus Rajewsky
2. 発表標題 B cell division in the heterogeneous pre-tumor microenvironment is required for lymphoma development
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 EBウイルスとヒト免疫系の共生/共進化
3. 学会等名 中国四国ウイルス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 EBV-LMP1による宿主抗原性転換と細胞傷害性T細胞分化
3. 学会等名 第1回 感染に起因する腫瘍の共同研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 抗原受容体とB細胞寿命
3. 学会等名 第65回 広島大学第二外科同門研修会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 抗原受容体シグナルとB細胞寿命
3. 学会等名 第46回 広島大学健康長寿研究拠点HiHAセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田朋波流
2. 発表標題 EBウイルスとヒト免疫系の共生 / 共進化
3. 学会等名 広島免疫学リサーチセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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		
ドイツ	Max Delbruck Center	Max Planck Institute	