

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08856

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスに対する万能抗体誘導B細胞の誘導・維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of induction and maintenance mechanism of universal cross reactive B cells against influenza virus

研究代表者

新中須 亮 (Shinnakasu, Ryo)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：00451758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、「生体ではなぜ稀にしかStem特異的(万能抗体誘導)メモリーB細胞が検出できないのか」という疑問についてアドレスし以下のことが明らかとなった。stem特異的メモリーB細胞は生体内での維持能力が低い。Treg細胞を欠失した環境ではstem特異的B細胞が活性化しやすい。内因性T-betはstem特異的メモリーB細胞影響しない。以上の結果からstem特異的メモリーB細胞の前駆細胞が自己抗原反応性によるアナジー状態のため数が少ないことが推測された。現在は引き続き、クローニングしたstem特異的BCRの自己抗原への反応性について詳しく分析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでインフルエンザHA Stem部位に対する万能抗体誘導能を保持するメモリーB細胞を持っているヒトが稀に存在し、パンデミックな感染に於いても抵抗性を示すことが示されてきた。ただ、ヒト材料を用いた研究ではこの細胞の誘導機序など根源的課題へのアプローチには限界があった。本研究課題で得られる結果は、これまで誰も解明できていない Stem部位特異的メモリー細胞誘導・維持機構を細胞レベル・分子レベルで明らかにするという基礎的理解として非常に価値の高いものであり、さらに、本研究により得られた知見は、今後効果的な抗インフルエンザ万能ワクチンが開発されていく上で世の中に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, I addressed the question "why Stem-specific (universal cross reactive) memory B cells can be rarely detected in the body. For this question I clarified three things as below. (1) Stem-specific memory B cells have low in-vivo maintenance ability. (2) Stem-specific B cells are easily activated in an environment lacking Treg cells. (3) Endogenous T-bet does not affect induction of stem-specific memory B cells. From the above results, it was speculated that the number of stem-specific memory B cell progenitor cells was small due to the energy state by autoantigen reactivity. Currently, detailed analysis of reactivity of cloned stem-specific BCR to self-antigen is underway.

研究分野：感染症・免疫

キーワード：感染防御・制御 免疫 メモリーB細胞 抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ワクチン療法を使っただけの予防対策が活発に行なわれている代表的なものとしてインフルエンザワクチンが挙げられる。このワクチンの予防効果は、ウイルス表面に存在する Hemagglutinin(HA)を標的とする抗体が主要な役割を担っているが、通常の季節性インフルエンザ感染や現在一般的に使われている三価ワクチンでは、ドリフト・シフトにより高頻度に変異が生じやすい部位(HA Head 部位)に対する抗体を産生するメモリーB細胞のみが長期間生き残ることがこれまでの研究から明らかになっている。そのため、同じ型のインフルエンザであっても種が異なると、我々の体が予め用意していたメモリー細胞では、その感染を防ぐことはできない。しかしながら、稀に、変異が生じにくい部分(Stem 部位)に対する抗体、「万能抗体」を有するメモリーB細胞を保持するヒトが存在し、この万能抗体がパンデミック感染の時に非常に重要であることが証明されてきていた(図1)。

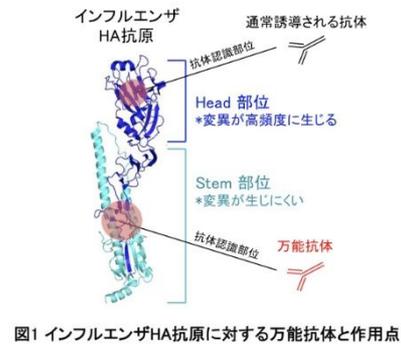


図1 インフルエンザHA抗原に対する万能抗体と作用点

従って、「Stem 特異的(万能抗体誘導)メモリーB細胞が稀にしか検出できないのはなぜか」という課題解明は、効果的な万能ワクチンを開発する上で必須であった。しかしながら、このメモリーB細胞は生体内で希少なため単離・機能解析が困難を極めていることやこれまでの解析法の限界が主因になり、今まで殆ど研究が進展してこなかった。

また、その当時、申請者はこのような希少細胞の機能解析を可能とする新規 fate-mapping マウスを樹立し、先ず、迅速メモリーB細胞を単離する方法を確立しており、又、モデル抗原に対する BCR レパトアを解析し、「メモリー細胞は GC 細胞のうち高親和性細胞が選択される」という予想に反して、寧ろ低親和性 B 細胞がメモリープールへと選択されることを明らかにしていた (Shinnakasu et. al; Nat. Immunol.; 2016)。この研究成果は、ウイルス感染時のメモリーB細胞選択に重要な示唆を与えると同時に、人為的メモリーB細胞選択法の可能性を示す初めての研究成果であった。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らがこれまでに確立した新たな実験系を用いて、Stem 特異的(万能抗体誘導)メモリーB細胞の分化誘導・維持機構を細胞レベル・分子レベルで明らかにすることで、「生体ではなぜ稀にしか Stem 特異的(万能抗体誘導)メモリーB細胞が検出できないのか」という疑問に答えることを目的としている。

3. 研究の方法

2.の目的を達成するために以下の3項目について解析を行った。

A.本研究で使用するプローブについてエピトープ同定を行い、プローブ分離の妥当性を検定する。その後、Head 部位、Stem 部位特異的メモリー細胞群についてレパトア特徴解析を行う。

B.Stem 特異的メモリーB細胞の特徴解析を目的として Head 特異的、Stem 特異的メモリーB細胞の生成・生存能力検定を行う。

C.「万能抗体の希少性」に対する、有力な仮説であるアナジー細胞モデルの実験的検定を中心に Stem 特異的メモリーB細胞誘導・維持機構について細胞レベル・分子レベルで解明する。

4. 研究成果

2017 年度に系の立ち上げを完成を完成させ、2018-2019 年度にかけて「生体ではなぜ稀にしか Stem 特異的(万能抗体誘導)メモリーB細胞が検出できないのか」について評価実験を行った。

2018 年度は、Stem 特異的メモリーB細胞が稀にしか検出できない理由として誘導能、生存能どちらの過程で障害をうけているかの検定を行った。ここでは、Head 特異的メモリーB細胞、Stem 特異的メモリーB細胞の誘導過程、生存過程の継時的変化をトレースし、どの過程が Head 特異的メモリー、Stem 特異的メモリーで決定的に異なるか2つの検証を行った。

メモリー細胞産生能の評価；まず始めに野生型 C57BL/6 マウスを Narita 株で感染させ、その後、GC 初期、後期のタイミングで誘導されるメモリー細胞について GCB 細胞でのメモリー前駆

細胞を検出する方法を用いてフローサイトメトリーにより評価を行った。その際、評価は Head 特異的 GCB 細胞と比較しながら行ったが、初期、後期でメモリー前駆細胞の誘導能の経時的な違いは見られなかった。

メモリー細胞生存能の評価；ここではまずシンプルに野生型マウスを Narita 株で感染し、メモリー細胞の数の変化をトレースした。その結果を Head 特異的メモリー細胞と比較検討したところ、明らかに初期のメモリー細胞での Head 特異的メモリー細胞と stem 特異的メモリーの比率に比べ、後期では、stem 特異的メモリー細胞の Head に対するメモリー細胞の比率が下がっていることが明らかになった。

2019 年度はインフルエンザ感染による Stem 特異的メモリーB 細胞が稀にしか検出できない理由として申請者が立てた 3 つの仮説について以下の 3 項目について検証を行った。

「Stem 特異的メモリーB 細胞の前駆細胞は本来自己反応性細胞であり、通常はアナジー状態にあるため免疫誘導能力が低く、そのために Stem 特異的メモリーB 細胞は稀にしか検出できない」という仮説の検証については、現在のところ、インフルエンザ感染により、誘導された Stem 特異的メモリーB 細胞をシングルセルで回収し、それぞれの BCR レパトア解析ならびに抗体の形でのクローニングを行った。その結果、C57BL/6 マウスには大体 15 前後の stem 特異的 BCR レパトアが存在することが明らかとなった。現在は、得られた stem 特異的抗体(BCR)を germ 型に戻してアナジーになる原因である自己抗原への反応性(ポリリアクティビティ)があるか評価中である。

「GC での濾胞制御性 T 細胞(Tfr)の働きにより、Stem 特異的 GC B 細胞誘導が抑制され、Stem 特異的メモリーB 細胞が誘導されにくい」という仮説の検証についていくつか解析を行った。実験は、まず Foxp3-DTR マウスとジフテリアトキシンを用いて全身から制御性 T 細胞(Treg)を欠損させたマウスについてインフルエンザ感染させた時の stem 特異的 B 細胞への影響について評価を行った。その結果、Treg を欠失したマウスでは stem 特異的な B 細胞による抗体価の有意な上昇が認められた。しかしながら、この時の stem 特異的メモリーB 細胞誘導については、個体によっては Treg 欠失マウスで細胞数の上昇がみられたものの差が大きくなかったため、数を増やして再度検証する必要があると結論付けた。この時の Head 特異的 B 細胞については面白いことに抗体価、メモリー細胞数ともに stem 特異的細胞と反比例している傾向にあった。Tfr 特異的な欠失マウスについては S1pr2-ERT2cre マウスがこの実験系では上手く使えてないことが明らかになったため、現在はその代わりに CXCR5-ERT2cre を用いた系を準備中である。

「IFN γ の下流にある転写因子 T-bet が Stem 特異的 GC B 細胞の誘導を正に制御するか」について検証を行った。実験は T-bet flox-CD19cre マウスを作製し、Stem 特異的メモリーB 細胞の誘導にどのような影響を与えるかで評価をおこなった。その結果、Control 群に比べて KO 群で特に stem 特異的細胞に影響を与えている結果は得られなかった。また、T-bet reporter を用いた T-bet 陽性メモリーB 細胞と陰性メモリーB 細胞の RNA-seq 解析も行ったが、その 2 つの細胞群で大きな違いはみとめられなかった。これらの結果より、T-bet の stem メモリーB 細胞分化への影響は強くないと結論づけた。もとの予定では GC 特異的に T-bet ノックアウトする予定であったが、今回の実験から結論が得られたため実施は見送った。

以上の結果から stem 特異的メモリーB 細胞の前駆細胞が自己抗原反応性によるアナジー状態のため数が少ないことが推測された。しかしながら、結論を導き出すまでの解析を終えることができなかったため、現在も引き続き、クローニングした stem 特異的 BCR の自己抗原への反応性等について詳しく分析中である。これらの結果も合わせて今後最終的な結論を導き出す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

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) doi: 10.1093/intimm/dxz049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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, Kelsoe 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 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 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 Xu Zichang, Li Songling, Rozewicki John, Yamashita Kazuo, Teraguchi Shunsuke, Inoue Takeshi, Shinnakasu Ryo, Leach Sarah, Kurosaki Tomohiro, Standley Daron M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Functional clustering of B cell receptors using sequence and structural features	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Systems Design & Engineering	6. 最初と最後の頁 769 ~ 778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9me00021f	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 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.	4. 巻 48(4)
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
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T.	4. 巻 283(1)
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) doi: 10.1111/imr.12640.	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 該当する

1. 著者名 Inoue Takeshi, Shinnakasu Ryo, Ise Wataru, Kawai Chie, Egawa Takeshi, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 214
2. 論文標題 The transcription factor Foxo1 controls germinal center B cell proliferation in response to T cell help	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1181 ~ 1198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20161263	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 該当する

1. 著者名 Shinnakasu Ryo, Kurosaki Tomohiro.	4. 巻 45
2. 論文標題 Regulation of memory B and plasma cell differentiation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Opinion in Immunology	6. 最初と最後の頁 126 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coi.2017.03.003.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----