

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19461

研究課題名(和文)自己免疫病発症に関わるB細胞の脱寛容伝播のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanisms for de-tolerance spreading of B cells in autoimmune diseases

研究代表者

北村 大介(Kitamura, Daisuke)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：70204914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：自己寛容機構にも拘わらず、自己免疫疾患において自己反応性B細胞が抗体産生に至る理由は不明である。最近、自己反応性胚中心B細胞が他のB細胞の自己寛容を破る、脱寛容の伝播というべき現象が見出された。そのメカニズムを解明するべく、IgA腎症モデルであるgddYマウスを用いて研究した。このマウスは加齢とともに血中に腎糸球体タンパクに結合するIgA自己抗体が産生され、それが認識するタンパクの種類が次第に増加していくことを見出した。また、腎臓には体細胞超突然変異を有したIgA陽性形質芽細胞が蓄積し、これは抗生物質投与により消失した。常在細菌からの持続的刺激が脱寛容の伝播を引き起こす可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLE等の全身性自己免疫疾患では、血清自己抗体の種類が次第に拡大していく現象(epitope spreading)が知られている。これは、抗原の異なる自己反応性B細胞が次々に寛容を脱して活性化すると解釈され、上述の脱寛容伝播という現象はこれをうまく説明できる。この脱寛容伝播現象のメカニズムの解明は自己免疫という免疫学的の中心課題の進展に繋がり、また、自己免疫疾患の進展を抑える治療法の開発にも繋がると思われる。

研究成果の概要(英文)：The reason why autoreactive B cells are activated and produce autoantibodies in autoimmune diseases in spite of the self-tolerance principle is still unknown. Recently, a phenomenon so called de-tolerance spreading has been found, in which autoreactive germinal center B cells break tolerance of other autoreactive B cells. To understand its mechanism, we used gddY mice, a model of IgA nephropathy. We found that gddY mice produced IgA-type autoantibodies that bind to proteins of glomeruli the number of which increased with age. We also found that IgA+ plasmablasts with mutated Ig V genes accumulated in the kidneys of gddY mice with age, which was suppressed by continuous administration of antibiotics. These data suggest that continuous stimuli from commensal bacteria promote de-tolerance spreading and activation of pre-tolerized autoreactive memory B cells to produce autoantibodies.

研究分野：免疫学

キーワード：自己抗体 自己寛容 自己免疫疾患 IgA腎症

1. 研究開始当初の背景

自己抗体が主因である自己免疫疾患は多いが、本来自己寛容が成立している個体免疫系において、どうして自己反応性の B 細胞が活性化し抗体産生に至るのか、未だ解明されていない。従来、アネルギー状態にある自己反応性あるいは多反応性の B 細胞が感染等の非特異的刺激によって活性化されたと考えられてきたが、これでは短命の形質細胞が形成され、自己抗体産生は一過性となるはずである。自己免疫疾患における慢性的な自己抗体産生を説明するには、自己抗体を産生する長期生存形質細胞 (LLPC) や自己反応性の記憶 B 細胞の存在が必要となる。これら B 細胞記憶は、基本的には T 細胞依存性 (TD) 免疫応答における胚中心 (GC) 反応を経て形成される。自己免疫疾患では、自己反応性 B 細胞が寛容を脱して自己反応性 T 細胞と共に TD 免疫応答を起こしているのだろうか。

一方、SLE 等の全身性自己免疫疾患では、血清自己抗体の種類が次第に拡大していく現象 (epitope spreading) が知られている。この現象は、単一の自己反応性 B 細胞クローンの活性化だけでは説明できず、抗原の異なる自己反応性 B 細胞が次々に寛容を脱して活性化し自己抗体を産生したと考えざるを得ない。これについて近年これを支持する研究結果が報告された。核抗原特異的免疫グロブリン (Ig) ノックインマウスで自発的に形成された GC において、野生型 (非ノックイン) Ig 遺伝子を発現する B 細胞も増殖し、親和性成熟を経て様々な抗原に対する自己抗体を産生したというものである (Degen et al, *Cell* 170:913, 2017)。これは、活性化した自己反応性 GC-B 細胞クローンによって他の自己反応性 B 細胞の自己寛容が破られた、つまり脱寛容が伝播したと考えられる。また、こうして 2 次的に活性化した自己反応性 B 細胞は記憶を形成し、長期に自己抗体を産生すると考える必要がある。しかし、こうした「脱寛容伝播」のメカニズムは分かっていない。

2. 研究の目的

以上より私は、感染等で寛容を脱し活性化された自己反応性 GC-B 細胞から他の自己反応性 B 細胞に脱寛容が伝播し、それらが活性化し胚中心を経て B 細胞記憶を形成することが自己抗体主体の自己免疫疾患の病因ではないかと考えた。この仮説をマウスモデルで検証し、そのメカニズムを解明することを目的として本研究を計画した。

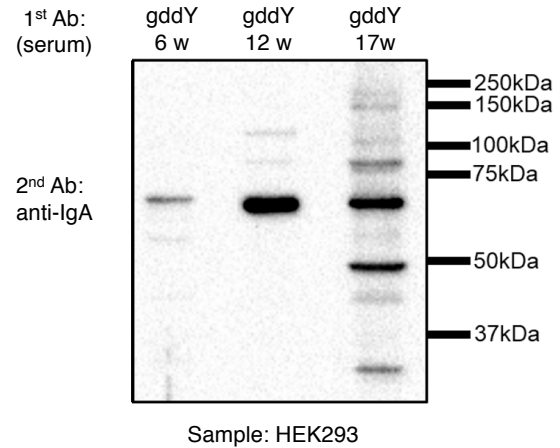
3. 研究の方法

脱寛容の伝播が自己免疫疾患の原因であるか検証するために、本研究では自己免疫疾患の 1 つ IgA 腎症のモデルである gddY マウスを用いた。このマウスは近交系マウス ddY から高頻度に発症する個体を選択的に継代することにより、ほぼ 100%の個体で発症する集団としたものである (順天堂大医、鈴木ら : *J Am Soc Nephrol* 23 : 1364, 2012)。ヒトの IgA 腎症では腎糸球体に IgA のほか IgG 抗体も沈着するが、IgA のヒンジ領域の異常な O 型糖鎖 (ガラクトース欠損糖鎖) が特徴であり、この糖鎖を認識する IgG 型自己抗体が見出されている。また、ヒト IgA 腎症は扁桃炎を伴うことが多く、扁桃摘出により寛解することが多い。以上より、扁桃の GC において抗異常糖鎖抗体を含む自己抗体が産生されているのではないかと、そして、そこには脱寛容の伝播が関与しているのではないかと考えた。gddY マウスはヒト IgA 腎症の特徴を多く備えており、また、T 細胞以外の脾臓細胞の移入によって正常マウスに IgA 腎症を再構成できる (鈴木ら : *Nephrol Dial Transplant* 28:320, 2013)。以上より、gddY マウスの自己反応性 B 細胞の中から何らかの刺激により自己寛容を脱して一過性に活性化するものが出現し、それによって他の自己反応性 B 細胞に脱寛容が伝播され、それらは活性化し自己抗体を長期に産生する B 細胞記憶を形成するという、自己免疫疾患発病のシナリオを想定した。gddY マウスを用いてこの脱寛容の伝播が自己免疫疾患発症に関わることを証明するとともに、そのメカニズムを解明することをめざした。

4. 研究成果

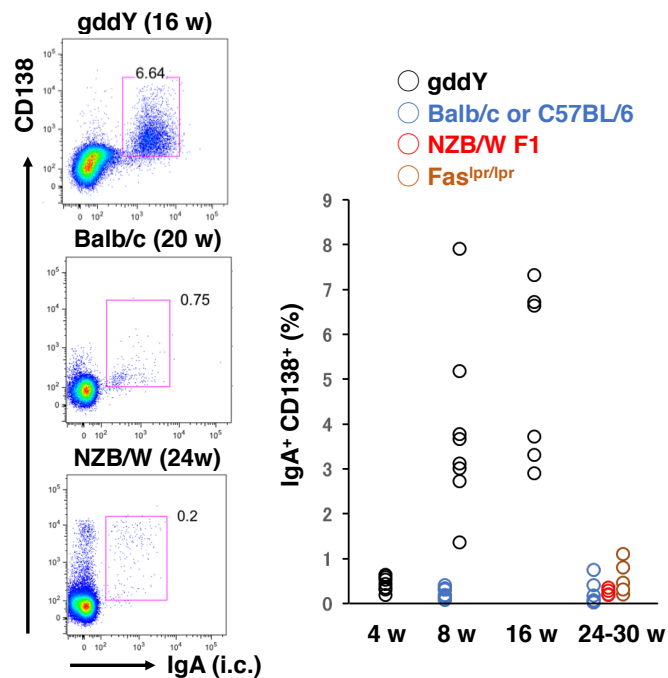
まず、gddY マウスの血清中に、腎糸球体に結合する IgA 抗体が加齢とともに増加することを見出した。クラススイッチした抗体を持たない AID 欠損マウスの腎切片をサンプルとして、gddY マウス血清を 1 次抗体、抗 IgA 抗体を 2 次抗体として蛍光免疫染色を行ったところ、糸球体が染色された。また、gddY マウス血清と抗 IgA 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、マウス腎、腎から単離された糸球体、培養メサンギウム細胞、ヒト胎児腎細胞株 (HEK293)、それぞれの抽出タンパクにバンドが検出され、

加齢とともに検出されるバンドの数が増大していった (右図)。興味深いことに、12 週齢以降には 2 本鎖 DNA に対する IgG 抗体も検出され、これも加齢とともに増加した。以上のデータから、gddY マウスでは IgA 抗体の epitope spreading が起こっている可能性があり、さらには、IgG 型の胚中心 B 細胞を基盤として脱寛容の伝播が起こっている可能性が示唆された。



また、gddY マウスの腎臓に IgA 陽性の形質芽細胞が浸潤し、その数は加齢とともに増加した (下図)。その形質芽細胞から *in vitro* で産生された抗体も何らかの糸球体タンパクに反応することを発見した。さらに、この形質芽細胞の各 1 細胞から単離した IgH 鎖 L 鎖の V 領域の塩基配列を解析したところ、ほとんどの V 領域に体細胞変異が見られ、一部にクローンの重複が見られた。よって、この形質芽細胞は胚中心で増殖しながら体細胞変異により多様化した後、形質芽細胞へと分化したものと考えられる。さらに、gddY マウスに若齢期からの抗生物質を投与することにより、形質芽細胞の蓄積が抑制された。このことから、この形質芽細胞は比較的短命であり、常在細菌からの何らかの刺激が、胚中心から分化した記憶 B 細胞からの形質細胞分化を持続的に誘導していることが示唆された。

以上より、gddY マウスは腎糸球体に対する IgA 型自己抗体を産生し、その抗体の特異性が時間とともに多様化していくこと、この多様化は恐らく胚中心で体細胞突然変異により誘導されることが分かった。また、多様化した後の記憶 B 細胞が常在細菌に刺激され、恐らくそれにより IgA へとクラススイッチしたのち形質芽細胞へと分化し、腎実質に蓄積すると考えられた。したがって、gddY マウスは、自然発症する自己免疫疾患モデルマウスの中で脱寛容伝播のメカニズムを研究する対象となり得る貴重なモデルであることが明らかになった。



以上より、gddY マウスは腎糸球体に対する IgA 型自己抗体を産生し、その抗体の特異性が時間とともに多様化していくこと、この多様化は恐らく胚中心で体細胞突然変異により誘導されることが分かった。また、多様化した後の記憶 B 細胞が常在細菌に刺激され、恐らくそれにより IgA へとクラススイッチしたのち形質芽細胞へと分化し、腎実質に蓄積すると考えられた。したがって、gddY マウスは、自然発症する自己免疫疾患モデルマウスの中で脱寛容伝播のメカニズムを研究する対象となり得る貴重なモデルであることが明らかになった。

以上より、gddY マウスは腎糸球体に対する IgA 型自己抗体を産生し、その抗体の特異性が時間とともに多様化していくこと、この多様化は恐らく胚中心で体細胞突然変異により誘導されることが分かった。また、多様化した後の記憶 B 細胞が常在細菌に刺激され、恐らくそれにより IgA へとクラススイッチしたのち形質芽細胞へと分化し、腎実質に蓄積すると考えられた。したがって、gddY マウスは、自然発症する自己免疫疾患モデルマウスの中で脱寛容伝播のメカニズムを研究する対象となり得る貴重なモデルであることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Litzler, L.C., Zahn, A., Meli, A.P., Hebert, S., Patenaude, A., Methot, S.P., Sprumont, A., Bois, T., Kitamura, D., Costantino, S., King, I.L., Kleinman, C.L., Richard, S., Di Noia, J.M.	4. 巻 10
2. 論文標題 PRMT5 is essential for B cell development and germinal center dynamics.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41467-018-07884-6	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 Dascani, P., Ding, C., Kong, K., Tieri, D., Hu, X., Zhang, H., Kitamura, D., Bolli, R., Rouchka, E.C., Yan, J.	4. 巻 2
2. 論文標題 Transcription Factor STAT3 Serves as a negative regulator controlling IgE class switching in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 349-362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800069	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 Takatsuka, S., Yamada, H., Haniuda, K., Saruwatari, H., Ichihashi, M., Renauld, J.-C. and Kitamura, D.	4. 巻 19
2. 論文標題 IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1025-1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-018-0177-0.	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 Le Gallou, S., Zhou, Z., Thai, L.H., Fritzen, R., de Los Aires, A.V., Megret, J., Yu, P., Kitamura, D., Bille, E., Tros, F., Nassif, X., Charbit, A., Weller, S., Weill, J.C. and Reynaud, C.A.	4. 巻 215
2. 論文標題 A splenic IgM memory subset with antibacterial specificities is sustained from persistent mucosal responses.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2035-2053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20180977	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 Kodama, T., Hasegawa, M., Sakamoto, Y., Haniuda, K., Kitamura, D.	4. 巻 32
2. 論文標題 Ubiquitination of IgG1 cytoplasmic tail modulates B-cell signaling and activation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 385-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa009	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 Finney, J., Yang, G., Kuraoka, M., Song, S., Nojima, T., Verkoczy, L., Kitamura, D., Haynes, B.F., Kelsoe, G.	4. 巻 203
2. 論文標題 Cross-reactivity to kynureninase tolerizes B cells that express the HIV-1 broadly neutralizing antibody 2F5.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3268-3281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900069	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 Koike, T., Harada, K., Horiuchi, S., Kitamura, D.	4. 巻 8
2. 論文標題 The quantity of CD40 signaling determines the differentiation of B cells into functionally distinct memory cell subsets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e44245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.44245	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 Haniuda, K., Kitamura, D.	4. 巻 9
2. 論文標題 Induced germinal center B cell culture system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e3163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3163	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10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Daisuke Kitamura
2. 発表標題 Regulatory Mechanisms for Memory B Cell Development and Function.
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA, B Cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kitamura
2. 発表標題 IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses.
3. 学会等名 2nd International Innovation Dialogue on Genome Engineering Animal Models and Biomedical Research Symposium. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北村大介
2. 発表標題 B細胞による獲得免疫応答とその制御メカニズム
3. 学会等名 第4回川島カンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihito Nihei, Kei Haniuda, Mizuki Higashiyama, Yusuke Suzuki and Daisuke Kitamura
2. 発表標題 Characteristics of naive B cells in murine IgA nephropathy.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kitamura
2. 発表標題 Mechanisms for Memory B-Cell Formation and Function: Possible Implications for Vaccination.
3. 学会等名 The 3rd Annual Chiba University-UCSD Symposium on Mucosal Immunology, Allergy and Vaccines. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村大介
2. 発表標題 Memory B cell generation and response.
3. 学会等名 The 30th Anniversary International Symposium of Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村大介
2. 発表標題 ベーシックシンポジウム2:B細胞
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shohei Asami, Yoshihito Nihei, Kei Haniuda, Mizuki Higashiyama, Yusuke Suzuki, Daisuke Kitamura
2. 発表標題 Commensal bacteria-dependent IgA+ Plasmablasts secrete autoantibodies against glomerular antigens in a mouse model for IgAN.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihito Nihei, Kei Haniuda, Hitoshi Suzuki, Toshiki Kano, Yusuke Fukao, Daisuke Kitamura, Yusuke Suzuki
2. 発表標題 Characteristics of B cells in IgA Nephropathy model mice.
3. 学会等名 Kidney week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihito Nihei, Kei Haniuda, Hitoshi Suzuki, Toshiki Kano, Yusuke Fukao, Daisuke Kitamura, Yusuke Suzuki
2. 発表標題 Characteristics of naive and germinal center B cells in murine IgA nephropathy.
3. 学会等名 International Society of Nephrology World Congress of Nephrology 2019 (国際学会)
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