

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05555・20K20465

研究課題名（和文）体内を循環する自己抗原を運ぶ微粒子と自己寛容

研究課題名（英文）Extracellular vesicles carrying self antigen impact on B cell tolerance

研究代表者

福山 英啓（FUKUYAMA, Hidehiro）

関西医科大学・附属免疫医学研究所・教授

研究者番号：70303956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：自己反応性B細胞は、骨髄において、抗体再編成、細胞の除去など、自己寛容のメカニズムを使って抑制されている。

自己寛容は、自己抗原とB細胞上のB細胞受容体が結合して初めて起こる。では、自己反応性B細胞が認識するこの自己抗原は、いったいどこからくるのか？ 私たちは、別の目的で、ある自己反応性抗体が認識する抗原のプロテオミクス解析を行った。偶然、この抗体は多くの細胞外微粒子関連タンパクと結合することがわかった。私たちは自己抗原が細胞外微粒子によって運ばれているのではないかと仮説を立てた。本研究では、自己抗原を微粒子上に持つ細胞外微粒子がB細胞の自己寛容に関わっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでB細胞の内在的な要因、すなわちB細胞の細胞死や活性化に関わるシグナル伝達の機能不全が自己寛容の破綻に大きく関わっていると考えられていたが、本研究結果により、細胞外微粒子のデリバリーという外来性の要因が、自己免疫疾患などの発症に関わっている可能性を示し、新たな視点を提供した。今後、細胞外微粒子という新たな軸で、ヒト自己免疫疾患を見直す必要がある。今後、ヒトサンプルを用いて、本研究で確立した手法にて細胞外微粒子がヒト自己免疫疾患に影響を及ぼしているのかを検討する。将来、膠原病やリュウマチなどの治療薬開発に新たなコンセプトを提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Self-reactive B cells are negatively regulated by several mechanisms, including receptor editing, cell death, and anergy, to maintain central tolerance. Engagement of an antigen and B cell receptor initiates these regulatory mechanisms. However, how can these self-antigens be delivered to the bone marrow?

Based on our study of a self-reactive antibody, BCR-expressing B cells, which are destined to be receptor-edited in vivo, bind largely to proteins related to extracellular vesicles (EVs), as shown by proteomics analysis. Administration of isolated EVs decreased the number of newly born self-reactive B cells. In contrast, administration of an EV biosynthesis inhibitor increased the number of self-reactive B cells.

Our research revealed that self-antigen-carrying extracellular vesicles in blood inhibit the emergence of self-reactive B cells. This finding provides new insight into how autoimmunity emerges and how we can prevent autoimmune diseases such as lupus.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞外微粒子 自己寛容 B細胞

1. 研究開始当初の背景

本研究に至った経緯は、私たちが樹立した遺伝子改変マウスの詳細な解析から得られたユニークな現象の発見が起点となる。私たちは、インフルエンザウイルスに対する広域中和抗体(C179)の抗体産生機序の解明を目指し、この広域中和抗体遺伝子のB細胞受容体(BCR)のノックインマウスを樹立、インフルエンザウイルス広域中和抗体B細胞の発生、維持を追跡していた(投稿準備中)。このマウスのB細胞は、発生の段階で、人ではメジャーな自己寛容メカニズムの一つである抗体再編成を起こす(Science 2003 Sep 5;301(5638):1374-7)。すなわち、導入した抗体軽鎖遺伝子ではない、他の抗体軽鎖遺伝子を代替えとして発現し、本来の抗原であるインフルエンザウイルスHA抗原にはわずかにしか反応しなくなっている。このことは、C179抗体は、インフルエンザウイルスのHA抗原に結合するが、同時に、何らかの自己抗原も認識している可能性があることを示唆する。

自己反応性B細胞は、骨髄において、抗体再編成、細胞の除去、不応答など、自己寛容のメカニズムを使って抑制されることが知られている。自己寛容は、自己抗原とB細胞上のB細胞受容体が結合して初めて起こる。では、自己反応性B細胞が認識するこの自己抗原は、いったいどこからくるのだろうか？ B細胞を教育する際の教科書的な全ての組織由来の自己抗原カタログはどのように提供されるのかは、これまで謎のままである。

広域中和抗体 C179 が認識する自己抗原を同定する目的で、新生児マウス個体の溶解液を用いて、C179 抗体による免疫沈降産物のプロテオミクス解析を行った。同定された 761 個のタンパクの Gene ontology 解析の結果、エキソソームなどの細胞外微粒子(EV)に関連するタンパクが特に多いことがわかった(表1)。

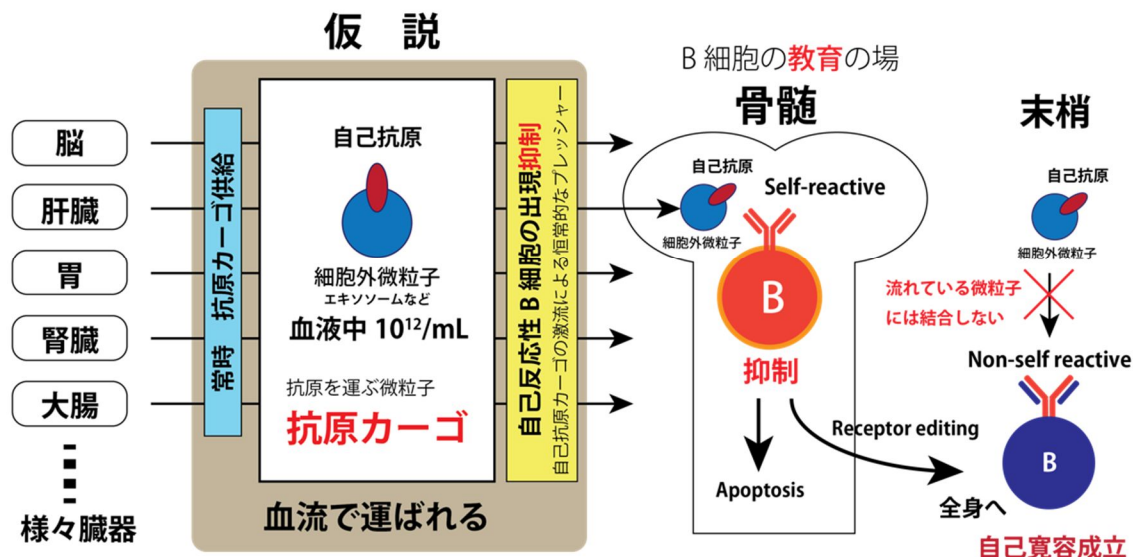
表1 プロテオミクス解析からC179に結合するエクソソーム関連タンパク質

	Mus musculus DB	C179 mAb pulled-down
total # proteins	22262	761
extracellular exosome #proteins	72	15
Ratio	0.3%	2.0%
Enrichment	1	6.1

2. 研究の目的

私たちは、『生体内を流れる細胞外微粒子(EV)が、自己抗原のカーゴとして、骨髄に運ばれ、自己反応性B細胞の抑制に寄与するのではないか』という仮説を立てた(下図)。本研究では、この仮説を立証することを目指す。

質問：様々な組織特有の自己抗原が、骨髄にどうやって運ばれるのか？



3. 研究の方法

細胞外微粒子の精製

マウス血漿からゲル濾過により分画に分け、その後の実験に使用した。

細胞外微粒子の特性解析

ナノ粒子追跡システム NanoSight LM10 を用いて、粒子濃度、サイズについて測定を行った。

抗体と細胞外微粒子との結合

Biacore3000(GE Healthcare)を用いた表面プラズモン共鳴分析法により解析を行なった。センサーチップ上にさまざまな抗体を固相化し、細胞外微粒子の粗精製分画を流し、抗体と細胞外微粒子の結合を計測した。

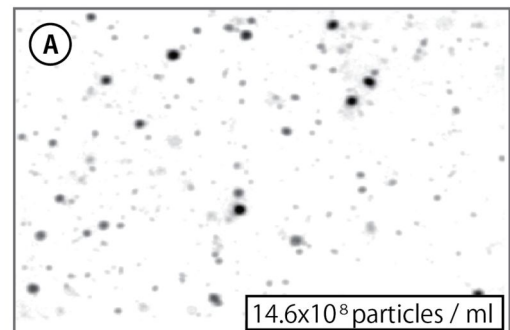
B 細胞解析

Flow cytometry 法により、B 細胞の動態の解析をおこなった。新生 B 細胞については EdU にてラベル、および CD93 陽性細胞画分を用いて実験を行なった。

4. 研究成果

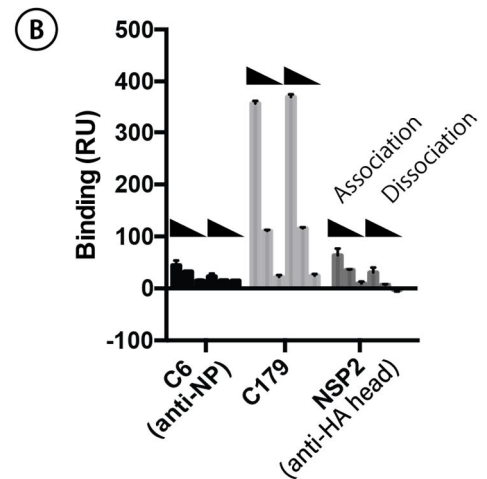
(1) EVは実際に自己反応性の抗体C179に結合するのか？

マウス血漿より EV を精製し、微粒子のサイズ、数を定量化することができる NanoSight を用いて精製 EV の性状を解析し、この精製 EV を用いて、表面プラズモン共鳴法にて、C179 抗体との結合について調べた。EV がインフルエンザウイルス広域中和抗体 C179 抗体と結合するが、他の 2 種類の抗体 (抗(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP)抗体 clone C6 と抗インフルエンザウイルス HA head 抗体 clone NSP2) には強い結合を示さなかった。(図 1)。このことから、プロテオミクス解析で予想した C179 が EV に特異的に結合することがわかった。



(2) EV 過剰投与による自己反応性 B 細胞への影響について

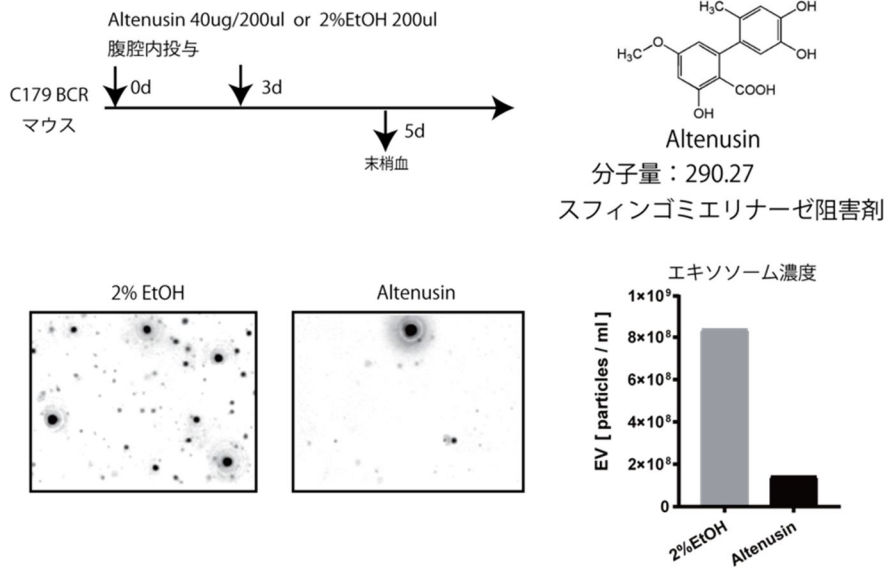
インフルエンザウイルス抗原ではない、モデル抗原を発現するマウス末梢血から精製した EV をこのモデル抗原を認識する抗体を発現する BCR マウスに投与した。結果、EV を投与することで、新生 B 細胞が減少した。EV の獲得免疫への関与は、1996 年、Raposo らによって B 細胞から pMHC(peptide-MHC) 複合体を表面にだす EV が産出される、という最初の報告がある(J. Exp. Med. 183, 1161-1172(1996))。その後、EV は抗原提示細胞の T 細胞への Cross-presentation の一つの機構として提唱されている(Nat. Rev. Immunol. 23, 236-250 (2023))。自己寛容という点では、胸腺での胸腺上皮細胞が放出する EV が自己抗原を提示し、負の選択において働いているという報告もある(Immunol. Cell Biol. 93, 727-734 (2015))。ただ、現時点で、自己反応性の B 細胞の抑制に EV が関わっているという報告はない。



(図 1)粗精製細胞外微粒子分画の形態と抗体への結合 (A)Nanosight画像 (B)抗体との結合 (BIACORE)

(3) 血中 EV の量を減らしたことによる自己反応性 B 細胞への影響について

EV 放出を阻害することで知られる Alutenusin(Sci Signal 2017, 10(473))を投与することにより、血漿中の EV の粒子数は減少した(図 2)。



(図2) Alternusinの投与により血中エキソソームは減少する

自己反応性抗体の C179 BCR マウスに Alternusin を投与したところ、自己反応性 B 細胞の数が末梢血で増加した。このことが、エクソソームなどの細胞外微粒子による自己反応性 B 細胞の制御が行われている可能性が示唆された。

(1)-(3)を含む本研究の結果から、細胞外微粒子が自己反応性 B 細胞の発生に寄与していることを示した。細胞外微粒子には全ての組織由来のさまざまなタンパク分子が発現していると考えられる。自己免疫疾患患者では、自己抗原の発現制御のみではなく、細胞外微粒子の生成過程、および量の制御にも問題がある可能性がある。

現在、時空間的に細胞外微粒子上にモデルタンパク抗原の発現をコントロールできる、またこのモデル抗原に対する抗体の BCR を持つマウスの作成した。できるだけ生理的条件下で、細胞外微粒子の自己反応性 B 細胞の発生への影響を調べる。

また、今後、本研究で構築した解析技術を用いて、ヒトにおける細胞外微粒子の自己抗原の定量化も進めていく予定である。

(特許の出願の可能性があるので、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある。本研究成果報告書は掲載可能な一部のみ)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Funari Riccardo, Fukuyama Hidehiro, Shen Amy Q.	4. 巻 208
2. 論文標題 Nanoplasmonic multiplex biosensing for COVID-19 vaccines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 114193 ~ 114193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2022.114193	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 Takeshita Masaru, Fukuyama Hidehiro, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies with therapeutic effects in two animal models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105596 ~ 105596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105596	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 Miyachi Kosuke, Adachi Yu, Tonouchi Keisuke, Yajima Taiki, Harada Yasuyo, Fukuyama Hidehiro, Deno Senka, Iwakura Yoichiro, Yoshimura Akihiko, Hasegawa Hideki, Yugi Katsuyuki, Fujii Shin-ichiro, Ohara Osamu, Takahashi Yoshimasa, Kubo Masato	4. 巻 12
2. 論文標題 Influenza virus infection expands the breadth of antibody responses through IL-4 signalling in B cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24090-z	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 Ishihara Sayaka, Sato Tsuyoshi, Sugioka Risa, Miwa Ryota, Saito Haruka, Sato Ryota, Fukuyama Hidehiro, Nakajima Akihiko, Sawai Satoshi, Kotani Ai, Katagiri Koko	4. 巻 12
2. 論文標題 Rap1 Is Essential for B-Cell Locomotion, Germinal Center Formation and Normal B-1a Cell Population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 624419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.624419	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 Inoue Takeshi, Shinnakasu Ryo, Kawai Chie, Ise Wataru, Kawakami Eiryō, Sax Nicolas, Oki Toshihiko, Kitamura Toshio, Yamashita Kazuo, Fukuyama Hidehiro, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 218
2. 論文標題 Exit from germinal center to become quiescent memory B cells depends on metabolic reprogramming and provision of a survival signal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20200866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20200866	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 Bartsch Yannic C. et al.	4. 巻 146
2. 論文標題 IgG Fc sialylation is regulated during the germinal center reaction following immunization with different adjuvants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 652 ~ 666.e11
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 Ogawa Kei, Asano Kenichi, Yotsumoto Satoshi, Yamane Tsuyoshi, Arita Makoto, Hayashi Yoshihiro, Harada Hironori, Makino Okamura Chieko, Fukuyama Hidehiro, Kondo Kenji, Yamasoba Tatsuya, Tanaka Masato	4. 巻 109
2. 論文標題 Frontline Science: Conversion of neutrophils into atypical Ly6G + SiglecF + immune cells with neurosupportive potential in olfactory neuroepithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 481 ~ 496
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 Shime Hiroaki, Odanaka Mizuyu, Tsuji Makoto, Matoba Takuma, Imai Masaki, Yasumizu Yoshiaki, Uraki Ryuta, Minohara Kiyoshi, Watanabe Maiko, Bonito Anthony John, Fukuyama Hidehiro, Ohkura Naganari, Sakaguchi Shimon, Morita Akimichi, Yamazaki Sayuri	4. 巻 117
2. 論文標題 Proenkephalin+regulatory T cells expanded by ultraviolet B exposure maintain skin homeostasis with a healing function	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 20696 ~ 20705
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 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) 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 -

1. 著者名 Sato Ryota, Makino-Okamura Chieko, Lin Quingshun, Wang Muying, Shoemaker Jason E, Kurosaki Tomohiro, Fukuyama Hidehiro	4. 巻 32
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 499 ~ 507
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 Zhao Tianchen, Tani Yuta, Makino-Okamura Chieko, Takita Morihito, Yamamoto Chika, Kawahara Eiki, Abe Toshiki, Sugiura Sota, Yoshimura Hiroki, Uchiyama Taiga, Yamazaki Isato, Ishigame Harumichi, Ueno Takaharu, Okuma Kazu, Wakui Masatoshi, Fukuyama Hidehiro, Tsubokura Masaharu	4. 巻 15
2. 論文標題 Diminished neutralizing activity against the XBB1.5 strain in 55.9% of individuals post 6 months COVID-19 mRNA booster vaccination: insights from a pseudovirus assay on 1,353 participants in the Fukushima vaccination community survey, Japan	5. 発行年 2024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.2024.1337520	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 Takeshita Masaru, Fukuyama Hidehiro, Kamada Katsuhiko, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Potent neutralizing broad-spectrum antibody against SARS-CoV-2 generated from dual-antigen-specific B cells from convalescents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106955 ~ 106955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106955	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 Takeshita Masaru, Fukuyama Hidehiro, Kamada Katsuhiko, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies with therapeutic effects in two animal models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105596 ~ 105596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105596	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福山英啓
2. 発表標題 Receptor editing gatekeeps emergence of InInfluenza broadly neutralizing antibodies
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤亮太
2. 発表標題 A transdermal adjuvanted vaccination shows protection from influenza virus infection
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 S A R S - C o V - 2 中和抗体又はその断片	発明者 福山英啓、岡村千絵 子 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/ 35159	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 アジュバント組成物	発明者 福山 英啓、佐藤 亮太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/044027	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 抗体において自己抗原に対する反応性を低減する方法、および低減された自 己抗原に対する反応性を有する抗体	発明者 福山英啓、岡村千絵 子、畑ひかる	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-221173	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アジュバント組成物	発明者 福山英啓、佐藤亮太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-216835	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------