

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21533

研究課題名（和文）異なるリコール応答を担う記憶B細胞サブセットの誘導メカニズムとその制御法の解明

研究課題名（英文）Mechanisms for induction and regulation of memory B cell subsets exhibiting distinct recall responses

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：免疫応答においてB細胞は記憶B（Bmem）細胞となり、再侵入した抗原に反応して形質細胞となり抗体を産生するが、一部は胚中心を形成しBmem細胞を再生する。この2種類のリコール応答は、それぞれ主にCD80-highおよびCD80-lowという2種類のBmemサブセットが起こす。私たちはこれらサブセットへの分化方向が一次免疫応答におけるB細胞へのCD40シグナルの強度により決まることを見出した。本研究では、これらのBmemサブセットの誘導・維持、リコール応答機構の解明を目指した。また、自己免疫疾患において、自己抗体の産生源となるBmem細胞の誘導機構、リコール応答機構についても研究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、初回接種時に2つのBmem細胞サブセットの産生を調節することで、二次免疫あるいは感染時に抗体産生とBmem細胞再産生のバランスが予測できる新たなワクチンの開発が可能となる。また、自己免疫疾患において、自己反応性Bmem細胞の形質細胞への分化あるいはBmem細胞維持を阻害する治療に応用が可能となる。具体的には、自己免疫モデルマウスにおいて、自己反応性Bmem細胞が交差反応性の口腔内共生細菌に反応して形質細胞へ分化することが明らかになった。自己抗体が交差反応するこの細菌と自己抗原との共通エピトープを同定すれば、自己反応性Bmem細胞の選択的制御が可能となる。

研究成果の概要（英文）：In the immune response to external antigens, responding B cells differentiate into memory B (Bmem) cells, mostly through germinal centers (GCs), and are maintained in the body for a long period. Upon reencounter with the same antigens, Bmem cells mostly differentiate to plasma cells and produce antibodies, while some Bmem cells differentiate to GC B cells and regenerate Bmem cells, as shown in mice. The two ways of the 'recall' responses are mainly caused by CD80-high and CD80-low Bmem cell subsets, respectively. We recently found that differentiation toward these two subsets is determined by the strength of CD40 signaling in B cells during the primary immune response. In this study, we sought to elucidate the mechanisms for the induction, maintenance, and recall-response regulation of these Bmem cell subsets as well as of Bmem cells that generate plasma cells to produce autoantibodies in autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：記憶B細胞 免疫応答 リコール応答 形質細胞 自己免疫疾患

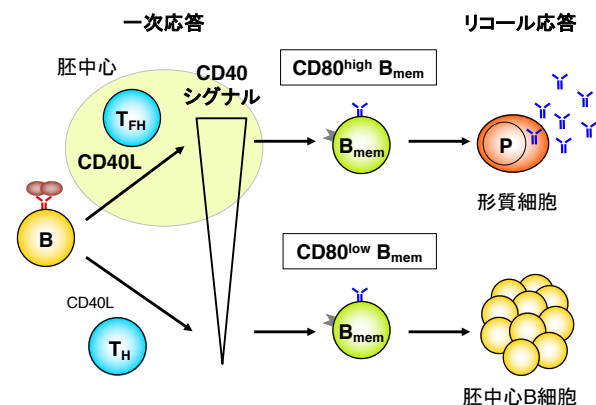
## 1. 研究開始当初の背景

天然痘ワクチンの発見以来、免疫記憶は免疫学の中心命題であったが、記憶 B 細胞には今なお謎が多い。抗原を認識したナイーブ (IgM<sup>+</sup>) B 細胞は、ヘルパー T (Th) 細胞から CD40-ligand (CD40L) や IL-4 等の刺激を受けて活性化・増殖すると同時に、一部はクラススイッチを起こして IgG や IgA を発現する。その後、短命の形質細胞となり抗体を産生するが、一部の B 細胞は濾胞 Th (Tfh) 細胞から CD40L や IL-21 等の刺激を受けて増殖し胚中心 (GC) を形成する。GCB 細胞では抗原受容体 V 領域に変異が起こり、その結果抗原親和性が向上した B 細胞が選択され記憶 B (B<sub>mem</sub>) 細胞あるいは長期生存形質細胞 (LLPC) へと分化する。B<sub>mem</sub> 細胞はヒトでは数十年間も生存し、全身のリンパ組織を巡回する。再侵入した抗原を認識した B<sub>mem</sub> 細胞は記憶 Th 細胞からの刺激を受けて増殖し、多くは形質細胞に分化して大量の高親和性抗体を産生するが、一部は GCB 細胞となり、親和性成熟を経て再び B<sub>mem</sub> 細胞に分化する (リコール応答)。このリコール応答の制御機構については、B<sub>mem</sub> 細胞自身が産生する IL-9 が B<sub>mem</sub> 細胞の増殖と形質細胞への分化を促進する一方、GCB 細胞への分化を抑制することを私たちが発見した (Takatsuka et al. *Nat. Immunol.* 19:1025, 2018)。また、B<sub>mem</sub> 細胞上に発現する gp49B (Lilrb4) のシグナルが B<sub>mem</sub> 細胞の増殖、形質細胞分化を抑制すること (Fukao et al. *J. Immunol.* 2014)、さらに、B<sub>mem</sub> 細胞は同じエピトープを有する 2 型 T 細胞非依存的抗原に結合するとアポトーシスにより排除されることを見出した (Haniuda et al. *J. Immunol.* 2011)。

一方、B<sub>mem</sub> 細胞の形成機構はほとんど分かっていない。B 細胞を刺激する細胞外シグナルでは CD40L が B<sub>mem</sub> 細胞形成に必要であるが、IL-21 や IL-4 は必須ではないことが報告されている。Hai Qi らは、一次応答の際に Tfh 細胞から産生される IL-9 が GCB 細胞から B<sub>mem</sub> 細胞への分化を誘導すると報告した (Wang et al. *Nat. Immunol.* 18:921, 2017)。しかし、私たちの解析では、IL-9 を発現する Tfh 細胞はほとんど無く、また、IL-9R 欠損マウスでは正常数の B<sub>mem</sub> 細胞が産生された (Takatsuka et al. *Nat. Immunol.* 2018)。よって、B<sub>mem</sub> 細胞形成を誘導する可溶性因子は未だに分かっていない。

近年、B<sub>mem</sub> 細胞には、リコール応答の際に形質細胞あるいは GCB 細胞に分化しやすいという異なるサブセットが見出され、それらはそれぞれ CD80<sup>high</sup> と CD80<sup>low</sup> という表現型で見分けられる。私たちは、この 2 つのサブセットへの運命決定が、一次応答において B 細胞が受ける CD40 シグナルの量に強く影響されることを見出した。すなわち、CD40L を強く発現する Tfh 細胞から受ける CD40 刺激の量が多い場合、CD80<sup>high</sup> B<sub>mem</sub> 細胞への分化が促進され、Tfh 細胞からの刺激が少ない場合には CD80<sup>low</sup> B<sub>mem</sub> 細胞への分化が促進される (右図)。また、比較的親和性の高い B 細胞が、恐らく競合的な抗原提示を介して、*in vivo* で CD80<sup>high</sup> B<sub>mem</sub> 細胞となりやすいことも見出した (Koike et al. *eLife* 8:e44245, 2019)。この結果から、2 つの B<sub>mem</sub> 細胞サブセットの産生機構は異なると考えられ、それぞれ分けて考える必要があると思われた。

また近年、自己抗体が主な病因である自己免疫疾患において、B 細胞マーカーの 1 つである CD20 に特異的な抗体医薬が奏効することが注目されている。CD20 は形質細胞には発現せず、未感作 B 細胞および B<sub>mem</sub> 細胞に発現する。同一の自己抗体を産生する形質細胞が常に未感作 B 細胞から新しく産生されるとは考えづらいので、増大したクローンとして維持されている自己反応性 B<sub>mem</sub> 細胞から継続的に産生されると考えるのが妥当である。このような B<sub>mem</sub> 細胞を標的とする治療法を開発するためにも、2 つの B<sub>mem</sub> 細胞サブセットの維持・制御機構を明らかにする必要がある。



CD40シグナルの量が異なる記憶B細胞への分化を決定する

## 2. 研究の目的

以上の結果をもとに、この 2 つの B<sub>mem</sub> 細胞サブセットへの分化誘導に関わる細胞内機構を解明し、それを制御する新たな免疫方法を見出すことを目的として研究を開始した。この研究の成果は、例えばワクチンを複数回接種する場合に、一次免疫で形成された B<sub>mem</sub> 細胞から二次免疫後に迅速な抗体産生か、あるいは、GC を経た高親和性の B<sub>mem</sub> 細胞の再産生かを選択的に調整することが可能な新たなワクチン戦略の基盤となりうる。また、自己免疫疾患において自己抗体を産生する形質細胞を供給する一方で、高親和性 B<sub>mem</sub> 細胞を再産生する B<sub>mem</sub> 細胞のサブセットを解析し、それらの役割、産生・維持機構、リコール応答制御機構を明らかにすることも研究目的とした。その結果により、自己抗原特異的な B<sub>mem</sub> 細胞を標的とする新たな治療戦略の創生を期待した。

### 3. 研究の方法

(1) これまでに、CD40L と BAFF を発現させたフィーダー細胞 (40LB) 上で培養した B 細胞 (iGB 細胞) をマウスに移入すると *in vivo* で B<sub>mem</sub> 細胞に分化するという私たちが確立した方法を応用し、CD40L の発現量の異なるフィーダー細胞 (40LB-hi, 40LB-lo) の上で培養して得た iGB 細胞が、マウス個体内でそれぞれ上述の CD80<sup>high</sup> あるいは CD80<sup>low</sup> である B<sub>mem</sub> 細胞サブセットに主に分化することを報告している (Koike et al. *eLife*, 2019)。この結果より、量的に異なる CD40L 刺激を行なった時点で iGB 細胞の *in vivo* 移入後の分化方向が決定されると考えられる。したがって、40LB-hi あるいは 40LB-lo 上で培養した B 細胞の ATAC-seq を行い、分化後の CD80<sup>high</sup> あるいは CD80<sup>low</sup> それぞれの B<sub>mem</sub> 細胞の表現型、機能に関する遺伝子の転写制御領域を同定し、それらを制御する転写因子の探索の基礎データとする。

(2) 私たちは、IgA 腎症モデルである gddY マウスを用いて、腎糸球体メサンギウム細胞表面の自己タンパクに対する IgA 自己抗体が主な病因であることを見出した。このマウスの腎臓には、加齢とともに IgA 自己抗体を産生する形質芽細胞が蓄積した。この形質芽細胞を生み出す記憶 B 細胞を、同定した自己抗原タンパクのテトラマーを用いて同定し、そのサブセットおよび特徴を調べる。また、近年の報告 (*Nature*574:122, 2019; 他) を参考に、自己反応性 B<sub>mem</sub> 細胞の産生およびリコール応答における共生細菌の関与について調べる。

### 4. 研究成果

(1) 上記の方法で培養して得た iGB 細胞が、*in vivo* で CD80<sup>high</sup> あるいは CD80<sup>low</sup> B<sub>mem</sub> 細胞サブセットに分化することは、フィーダー上の培養時間が、iGB 細胞の増殖や CD80 発現に差が生じる以前の 24 時間であっても再現された。これを元に、40LB-hi, 40LB-lo 上でそれぞれ 24 時間培養した B 細胞について、ATAC-seq を行い、オープンクロマチン領域を同定しようとした。しかし、両者間で再現性のある有意な差は見出されなかった。この原因としては、CD80<sup>high</sup> あるいは CD80<sup>low</sup> 上で培養した B 細胞集団の不均質性が大きく、後に B<sub>mem</sub> 細胞に分化する細胞はその中のごく一部であり、CD40 刺激による活性化・増殖に関わる大きな遺伝子変化の中で 2 つの条件間での差が埋もれてしまった可能性が考えられる。

(2) 上記のように自己免疫疾患であることを見出された IgA 腎症のモデルマウス (gddY) の腎臓に蓄積する IgA 型形質芽細胞の個々の細胞から単離した IgA 遺伝子 H/L 鎖の V 領域の塩基配列を調べたところ、多数の体細胞超変異が入っており、一部は同一の VDJ 配列を使用していた。このことから、この抗体を産生する形質芽細胞はクローン増殖と親和性選択を経て形成された記憶 B 細胞から分化したものと考えられた。また、テトラマー化した自己抗原に結合する IgA<sup>+</sup> 記憶 B 細胞が gddY マウスの腎所属リンパ節に存在することを見出した。以上より、gddY マウスでは胚中心反応を繰り返した、おそらく CD80<sup>low</sup> 型を主とした自己反応性記憶 B 細胞が長期にわたる IgA 自己抗体産生の元となっていると思われる。さらに、抗生剤投与の実験から、腎臓での形質芽細胞の蓄積と IgA 自己抗体の産生が共生細菌に依存していること、また、血清および腎形質芽細胞由来の IgA が gddY マウスの特定の口腔内細菌に結合し、自己抗原との交差反応を示すことを見出した。以上より、IgA 型自己反応性記憶 B 細胞の産生とリコール応答は特定の細菌によって惹起されていることが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Nihei Y, Higashiyama M, Miyauchi K, Haniuda K, Suzuki Y, Kubo M, Kitamura D.	4. 巻 -
2. 論文標題 Subcutaneous immunization with zymosan generates mucosal IgA-eliciting memory and protects mice from heterologous influenza virus infection.	5. 発行年 2023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/dxad013	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 Kato K., Haniuda, K., Fukao, S., Kitamura, D.	4. 巻 35
2. 論文標題 B-cell-intrinsic DNase1L3 is essential for T-cell-independent type-II response in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 275-286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxad001	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 Nihei, Y., Haniuda, K., Higashiyama, M., Asami, S., Iwasaki, H., Fukao, Y., Nakayama, M., Suzuki, H., Kikkawa, M., Kazuno, S., Miura, Y., Suzuki, Y., Kitamura, D.	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of IgA autoantibodies targeting mesangial cells redefines the pathogenesis of IgA nephropathy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadd6734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.add6734	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 Amano, S., Haniuda, K., Fukao, S., Aoki, H., Ueha, S., Kitamura, D.	4. 巻 210
2. 論文標題 Commensal bacteria and the lung environment are responsible for Th2-mediated memory yielding natural IgE in MyD88-deficient mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 959-972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2200888	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 Fukao, S., Haniuda, K., Tamaki, H. and Kitamura, D.	4. 巻 10
2. 論文標題 Protein kinase C is essential for the IgG response against T-cell-independent type 2 antigens and commensal bacteria.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e72116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.72116	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 Kitamura, D.	4. 巻 33
2. 論文標題 Mechanisms for the regulation of memory B-cell recall responses in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 791-796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab042	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. and Kitamura, D.	4. 巻 70
2. 論文標題 Multi-faceted regulation of IgE production and humoral memory formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 163-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.11.002	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., Fukao, S. and Kitamura, D.	4. 巻 33
2. 論文標題 Metabolic reprogramming induces germinal center B cell differentiation through Bcl6 locus remodeling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108333	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 Nojima, T., Reynolds, A.E., Kitamura, D., Kelsoe, G. and Kuraoka, M.	4. 巻 205
2. 論文標題 Tracing self-reactive B cells in normal mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 90-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1901015	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. and 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 北村大介
2. 発表標題 Pathogenic antibody production by microbiota in an IgA nephropathy mouse model.
3. 学会等名 5th Symposium of the International Immunological Memory and Vaccine Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村大介、二瓶義人、東山瑞希、岩崎裕幸、久斗陸、羽生田圭、鈴木祐介
2. 発表標題 IgA腎症におけるIgA自己抗体産生
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村大介
2. 発表標題 B細胞におけるIgE産生制御
3. 学会等名 第7回総合アレルギー講習会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 IgA腎症に関連する自己抗体	発明者 北村大介, 鈴木祐介, 二瓶義人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/044409	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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