

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02749

研究課題名（和文）シングルセル解析による免疫記憶生成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism for immunological memory by single cell analysis

研究代表者

井上 毅（Inoue, Takeshi）

東京大学・新世代感染症センター・教授

研究者番号：80466838

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々はいくつかの研究で、胚中心に存在する記憶B前駆細胞を同定し、胚中心に留まる、あるいはプラズマ細胞に分化するB細胞集団と比較して、記憶B細胞に分化する細胞は表面B細胞受容体（BCR）の発現が高いことを見出していたが、その生理的意義は不明であった。本研究ではヘテロジニアスな胚中心B細胞集団のなかで、BCR発現の勾配を生み出している要因について探索した。我々が開発したシングルB細胞解析技術を用い、抗原親和性が同等で表面発現量の異なるBCRノックインB細胞を作成し、*in vivo*における分化を解析したところ、B細胞表面BCR発現量の差が記憶B細胞への分化効率に影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで明らかになっていない複雑な液性免疫記憶の成立のメカニズムの解明につながる基礎研究であり、将来的により効率的な新しいワクチン開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have previously identified memory B precursor cells in the germinal center (GC) and found that GC B cells expressing higher surface BCR favor memory B cell fate. To elucidate the physiological significance of BCR expression during memory B cell differentiation, we analyzed the factor for generating the difference in surface BCR expression in GC B cells. Using our single B cell analysis technology, we generated BCR knock-in B cells with similar affinity and different levels of surface BCR expression, and analyzed their *in vivo* differentiation upon immunization. Our results suggest that the difference in BCR surface expression can affect the efficiency of GC B cell differentiation into memory B cells.

研究分野：免疫学

キーワード：胚中心 免疫記憶 B細胞受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスや細菌といった病原体に対する感染防御免疫の中心の一つは、記憶 B 細胞が抗体産生細胞へ分化し、高親和性抗体を産生して病原体を無毒化することである。また、記憶 B 細胞の産生や抗体産生細胞への分化に異常が生じると、感染防御能の低下、アレルギーや自己免疫疾患を引き起こす。このような「免疫学的記憶」は獲得免疫系で最も特徴的な現象の一つであり、一度目の免疫反応で産生された記憶 B 細胞は、再感染時に迅速・頑強に反応できる。記憶 B 細胞は主に二次リンパ組織に形成される胚中心から産生されてくるが、胚中心における B 細胞の選択、分化メカニズムは複雑であり、完全に明らかになっていない。

我々はこれまでの研究で、胚中心に存在する記憶 B 前駆細胞を同定し、胚中心に留まる、あるいはプラズマ細胞に分化する B 細胞集団と比較して、記憶 B 細胞に分化する細胞は低代謝状態にあり、表面 B 細胞受容体 (BCR) の発現を上昇させてより多くの生存シグナルを獲得していることを見出した (Inoue et al., J Exp Med, 2021)。このうち、低代謝状態と記憶 B 細胞分化の関係については、これまでの我々の低親和性 B 細胞が記憶 B 細胞に分化しやすい、という研究結果と矛盾しない (Shinnakasu et al., Nat Immunol, 2016)。すなわち、低親和性 B 細胞は cognate な濾胞ヘルパー T 細胞との競合的相互作用の結果より少ない T 細胞ヘルプシグナルを受け取り、その下流に位置する mTORC1 活性が低くなると考えられるからである。一方、表面 BCR 発現の上昇については、これまで現象としての観察にとどまっており、その意義は不明である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ヘテロジニアスな胚中心 B 細胞集団のなかで、BCR 発現の勾配を生み出している要因は何か、そしてその生理意義について明らかにするべく研究を行った (図 1)。この課題は記憶 B 細胞産生機構の理解を深めるだけでなく、記憶 B 細胞の特性の一つである長寿命性 (と一般的に考えられている) の分子基盤を提供する重要な問いである。本研究では、胚中心 B 細胞をシングルセルレベルで解析し、これまでの研究で開発したシングル B 細胞レパトア解析、抗体クローニング技術を駆使し、CRISPR/Cas9 システムを用いた BCR ノックイン技術の開発による BCR 発現と記憶 B 細胞分化の因果関係の検証を目的とした研究を行った。

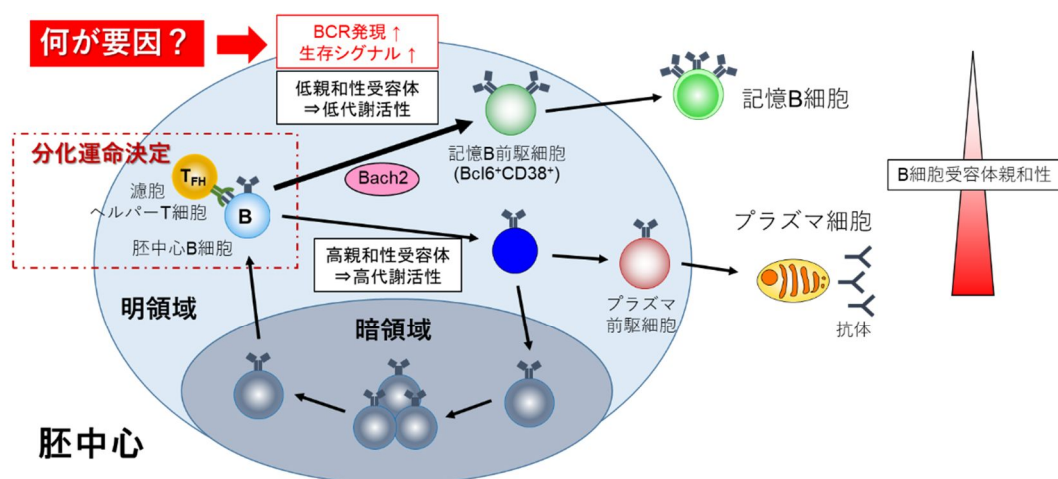


図1: 胚中心におけるB細胞分化メカニズム

B細胞は胚中心において記憶B細胞分化、プラズマ細胞分化、胚中心に留まり暗領域に移行、という分化運命決定がなされる。記憶B細胞分化には低代謝活性とBCRからの生存シグナルが重要な要因であることが分かった。しかしBCR発現上昇を誘導し、記憶B細胞分化運命を導くメカニズムは不明。

3. 研究の方法

(1) Bcl6 蛍光レポーターマウスを用いた NP ハプテン特異的胚中心 B 細胞と記憶 B 細胞のシングルセル解析

Bcl6 レポーターマウスに NP ハプテン-タンパク抗原で免疫し、10 日~2 週後の脾臓より分化選択中の胚中心 B 細胞と、記憶 B 前駆細胞集団をセルソーターで検出、シングルセル単離する。この際インデックスソーティングにより表面 BCR 発現量情報を取得しておく。単離したシングル B 細胞より RT-PCR により BCR 遺伝子を増幅、配列情報を取得する。同時に得られた BCR 遺伝子断片をクローニングしてリコンビナント抗体を作製し、抗原との親和性を BLI 法により生化学的に測定する。得られた情報から同等の親和性を持ち表面 BCR 発現量が異なる BCR 配列を選択する。

(2) CRISPR/Cas9 による効率的 BCR ノックイン技術の開発

マウス B 細胞の免疫グロブリン遺伝子座に CRISPR/Cas9 を用いて内在性の *Igh* 遺伝子を切断し、特定の BCR 配列をノックインする技術を開発する。

(3) BCR ノックイン B 細胞における表面 BCR 発現量の解析

(1)で取得、選択した BCR 配列を(2)の手法でマウス B 細胞にノックインする。ノックイン B 細胞の表面 BCR 発現量を解析し、細胞単離前の BCR 発現量を再現できるか検討する。

(4) BCR ノックイン B 細胞の in vivo 記憶 B 細胞分化解析

(3)で得られた BCR ノックイン B 細胞をマウス個体内に養子移入し、ハプテン-タンパク抗原で免疫することで、胚中心、記憶 B 細胞への分化を誘導する。これにより異なる BCR 配列を持つ B 細胞が胚中心での競合の末、表面 BCR 発現量の高い B 細胞がより効率よく記憶 B 細胞に分化するという仮説を検定する。

4. 研究成果

(1) 胚中心 B 細胞、記憶 B 細胞 BCR 由来モノクローナル抗体の解析

細胞表面 BCR (IgG1) の発現量情報を取得の上、NP ハプテン特異的シングル胚中心 B 細胞、記憶 B 細胞からそれぞれ 10 クローンずつのリコンビナント抗体をクローニングし、抗原との親和性を BLI 法により測定した。これにより親和性と細胞表面発現量を連結させた BCR 配列情報を取得することに成功した。

(2) CRISPR/Cas9 による効率的 BCR ノックイン技術の開発

先行論文 (Hartweiger et al., J Exp Med, 2019) による手法を改良し、in vitro で培養した primary マウス B 細胞に CRISPR/Cas9 を用いてより簡便、効率的に BCR をノックインする技術の開発に成功した (図 2) 。

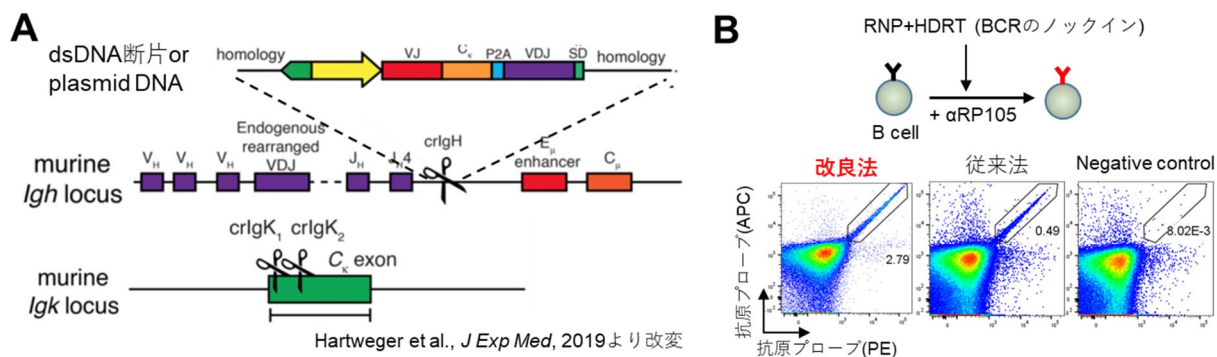


図 2: CRISPR/Cas9システムによるBCRノックイン技術の開発

(A) マウス免疫グロブリン遺伝子座のCRISPR/Cas9による切断、BCR遺伝子断片のノックインのデザイン。
 (B) 従来法を改良し、より簡便かつ効率的(4~6倍)にBCRをノックインできる手法を開発した。

(3) BCR ノックイン B 細胞における表面 BCR 発現量の解析

(1)で取得、選択した BCR 配列を(2)の手法でマウス B 細胞にノックインし、表面 BCR 発現量を解析したところ、細胞単離前の胚中心あるいは記憶 B 細胞として発現していた表面 BCR 量を反映していることが分かった。このことは少なくとも BCR レパトアの塩基配列そのものが表面 B 細胞の発現量を規定する主要な要因の一つであることを示唆している。

(4) BCR ノックイン B 細胞の in vivo 記憶 B 細胞分化解析

(3)で得られた BCR ノックイン B 細胞(同等の親和性を持つが、異なる表面 BCR 発現を示す B 細胞)を数ペア選択し、野生型マウス個体内に共養子移入し、ハプテン-タンパク抗原で免疫した。免疫 10 日後の in vivo における競合的な B 細胞の分化を解析したところ、B 細胞表面 BCR 発現量の差が記憶 B 細胞への分化効率に影響を与えることが分かり、本研究仮説を支持する結果が得られた。一方で、ノックイン B 細胞の in vivo での応答自体は非常に弱いものであり、本研究結果の解釈を確定するには実験系のさらなる改良、異なる抗原/BCR による再現性の確認が必要であると考えられる。

本研究はこれまで明らかになっていない複雑な液性免疫記憶の成立のメカニズムの解明につながる基礎研究であり、将来的により効率的な新しいワクチン開発に貢献する可能性がある。

<引用文献>

Inoue T, Shinnakasu R, Kawai C, Ise W, Kawakami E, Sax N, Oki T, Kitamura T, Yamashita K, Fukuyama H, Kurosaki T. Exit from germinal center to become quiescent memory B cells depends on metabolic reprogramming and provision of a survival signal. *J Exp Med*. 2021 Jan 4;218(1):e20200866. doi: 10.1084/jem.

Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, Takahashi Y, Fukuyama H, Okada T, Kurosaki T. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat Immunol*. 2016 Jul;17(7):861-9. doi: 10.1038/ni.3460.

Hartweger H, McGuire AT, Horning M, Taylor JJ, Dosenovic P, Yost D, Gazumyan A, Seaman MS, Stamatatos L, Jankovic M, Nussenzweig MC. HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. *J Exp Med*. 2019 Jun 3;216(6):1301-1310. doi: 10.1084/jem.20190287.

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 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Li Shasha, Bern Michael D, Miao Benpeng, Fan Changxu, Xing Xiaoyun, Inoue Takeshi, Piersma Sytse J, Wang Ting, Colonna Marco, Kurosaki Tomohiro, Yokoyama Wayne M	4. 巻 11
2. 論文標題 The transcription factor Bach2 negatively regulates murine natural killer cell maturation and function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e77294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.77294	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 Inoue T, Shinnakasu R, Kawai C, Yamamoto H, Sakakibara S, Ono C, Itoh Y, Terooatea T, Yamashita K, Okamoto T, Hashii N, Ishii-Watabe A, Butler NS, Matsuura Y, Matsumoto H, Otsuka S, Hiraoka K, Teshima T, Murakami M, Kurosaki T	4. 巻 220
2. 論文標題 Antibody feedback contributes to facilitating the development of Omicron-reactive memory B cells in SARS-CoV-2 mRNA vaccinees	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20221786
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20221786	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 Lee MSL, Inoue T, Ise W, Matsuo-Dapaah J, Wing JB, Temizoz B, Kobiyama K, Hayashi T, Patil A, Sakaguchi S, Simon AK, Bezbradica JS, Nagatoishi S, Tsumoto K, Inoue J, Akira S, Kurosaki T, Ishii KJ, Coban C	4. 巻 219
2. 論文標題 B cell-intrinsic TBK1 is essential for germinal center formation during infection and vaccination in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20211336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20211336	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 Inoue T, Shinnakasu R, Kurosaki T	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of High Quality Memory B Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 825813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.825813	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	4. 巻 35
2. 論文標題 Memory B cell differentiation from germinal centers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 565 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxad017	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, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Memory B cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Reviews Immunology	6. 最初と最後の頁 5 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41577-023-00897-3	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 Yada Yutaro, Matsumoto Masanori, Inoue Takeshi, Baba Akemi, Higuchi Ryota, Kawai Chie, Yanagisawa Masashi, Kitamura Daisuke, Ohga Shouichi, Kurosaki Tomohiro, Baba Yoshihiro	4. 巻 221
2. 論文標題 STIM-mediated calcium influx regulates maintenance and selection of germinal center B cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20222178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20222178	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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上 毅
2. 発表標題 Germinal center B cell selection and survival regulated by optimal BCR signaling
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 毅
2. 発表標題 COVID-19 mRNAワクチンでなぜオミクロン中和抗体が作られるのか
3. 学会等名 第2回日本医学会連合リトリート（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Inoue
2. 発表標題 Why can 3rd mRNA vaccination induce Omicron-neutralizing antibodies?
3. 学会等名 東京大学医科学研究所 学友会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023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