

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659222

研究課題名(和文) 記憶B細胞の可視化による記憶免疫応答ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analysis of Immune Memory Dynamics by visualizing memory B cell subsets

研究代表者

伊勢 渉 (Ise, Wataru)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・准教授

研究者番号：70323483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：活性化されたIgM陽性B細胞を特異的にラベルでき、かつ誘導性に除去できる新たなマウスの樹立に成功した。このM-SDVマウスはCmu遺伝子の下流にloxP配列で挟まれたSTOPカセット、続いてDTR-Venus発現カセットが挿入されており、creリコンビナーゼが働くとIgM陽性細胞がDTR-Venusを発現する。我々はこのマウスをAID-creマウスと交配させた。抗原で免疫すると、特異的IgM陽性細胞の一部がDTR-Venusを発現するのに対し、IgM陰性細胞ではDTR-Venusの発現が認められなかった。またDTを投与するとDTR-Venus陽性細胞がきれいに除去された。

研究成果の概要(英文)：We have established a new mouse line in which activated IgM+ B cells are specifically labeled and can be inducibly depleted. The M-SDV mice have loxP-flanked STOP cassette followed by DTR-Venus expression construct in Ig heavy chain Cmu locus. If Cre-mediated recombination occurs, IgM+ B cells should express DTR-Venus fusion protein. We crossed M-SDV line with AID-cre. After immunization, a fraction of IgM+ B cells became DTR-Venus positive, while IgM- B cells remained DTR-Venus negative. Further, when the mice were administered with DT, the DTR-Venus positive cells were completely deleted. These results suggest that M-SDV mouse model is an excellent system to detect or deplete IgM memory B cells whose function is largely unknown.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：B細胞 免疫記憶 抗体産生応答

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

記憶免疫は再感染からの生体防御に重要な機能を持つ。ワクチン接種による感染予防はまさに免疫記憶の機構を利用したものである。抗体が介在する液性免疫記憶において中心的な役割を担っているのは記憶 B 細胞であり、ワクチン接種により質の良い記憶 B 細胞を効率よく誘導することが重要である。しかしながら記憶 B 細胞の細胞生物学的実態は不明な点が多い、その理由として生体内の記憶 B 細胞の数は非常に少なく、これまで生体内で記憶 B 細胞を可視化したり、特異的に除去する方法がなかったこと、その機能を評価する適切な実験系が構築されてこなかったことが挙げられる。従来記憶 B 細胞の研究はクラススイッチした IgG 型記憶 B 細胞に焦点があてられてきた。しかし近年 IgM 型記憶 B 細胞の存在が明らかにされてきた。しかし再感染に対し、これらの記憶 B 細胞サブセットが異なる機能を発揮するのは明らかになっていない。

2. 研究の目的

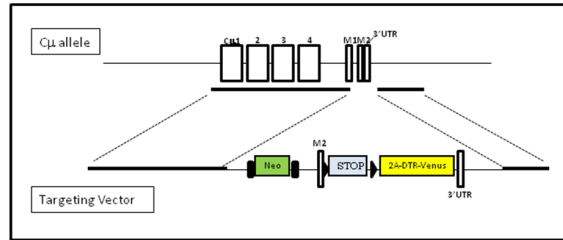
本課題では新規に遺伝子改変モデルマウスを樹立し、記憶 B 細胞の誕生、維持のダイナミズムとその機能を明らかにする。特にその機能が不明である IgM 陽性記憶 B 細胞に焦点をしばり、IgM 陽性記憶 B 細胞を特異的にラベルすること、また誘導性に除去することを可能にするマウスモデル系を構築することで、IgM 陽性記憶 B 細胞の機能を明確にすることを目的とする。本研究により記憶 B 細胞の機能的な重要性を明らかにし、どのようなタイプの記憶 B 細胞が再感染に対する防御に必要とされるのかを示す。

3. 研究の方法

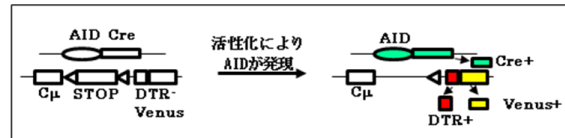
本研究では上で述べたように、記憶 B 細胞サブセットの解析、特に記憶 IgM B 細胞の機能を明らかにする目的で、まず新たな遺伝子改変動物モデルの作製を行った(研究成果の欄参照)。そして新たに作製したモデルマウスが研究目的を達するのに十分であるかを検証した。次に実際にマウスに抗原で免疫を行い、誘導される記憶 B 細胞サブセットが予想通り特異的にラベルされるのか、あるいは誘導性に除去することが可能であるのかどうかを順次検討した。

4. 研究成果

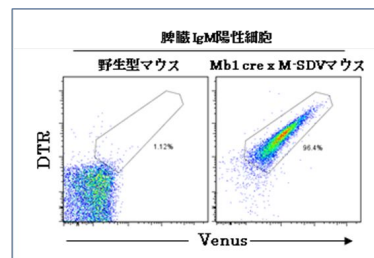
本課題では活性化された IgM 陽性細胞を特異的にラベルでき、かつ誘導性に除去できるマウスの樹立に成功した。このマウス(以下、M-SDV マウス)は抗体重鎖定常領域の Cmu 遺伝子の下流に loxp 配列で挟まれた STOP カセット、続いて 2A ペプチド - DTR (ジフテリア毒素レセプター) - Venus (蛍光色素) 融合タンパク質発現カセットが挿入されている(右上図)。



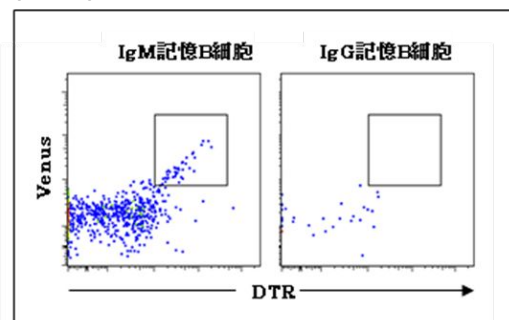
Cre リコンビナーゼによる組換えが起きると IgM 陽性細胞が DTR-Venus 融合タンパク質を発現する(下図)。



本課題ではまずこの実験系が正しく作動するかどうかを確認するために、M-SDV マウスを mb1-cre マウス(B細胞でのみ cre が働くマウス)と交配させ、B細胞上の DTR-Venus 発現を検討した。非免疫の状態では末梢(ここでは脾臓を解析した)の B細胞のほとんどが IgM を発現するが、予想通り、mb1-cre x M-SDV マウスの脾臓 B細胞の大部分が Venus-DTR 陽性であった(下図)。

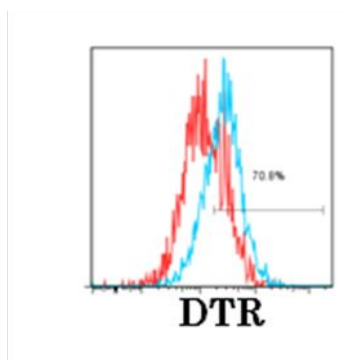


そこで次にこの M-SDV マウスを AID-cre マウスと交配させ(AID-Cre x M-SDV マウス)、抗原の免疫によって誘導される DTR-Venus 発現を解析した。その結果、抗原特異的 IgM 陽性細胞の一部が DTR - Venus を発現するのに対し、IgM 陰性細胞、特に IgM 陰性記憶 B細胞では DTR-Venus の発現が認められなかった(下図)。

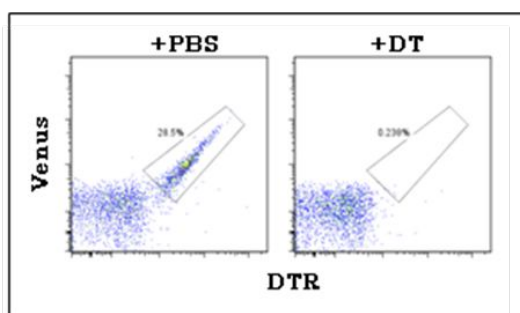


DTR-Venus 発現が IgM 陽性細胞に局限されることをさらに直接的に検討するために、

DTR-Venus 陽性細胞をセルソーターで分離し、in vitro で IgG1 細胞へのクラススイッチを誘導すると DTR-Venus 発が低下した（下図、青線：IgM 陽性細胞、赤線：IgG1 陽性細胞）。このことから DTR-Venus 発現は IgM 陽性細胞に限局されることが確認できた。



次にジフテリア毒素をマウスに投与することで DTR-Venus 陽性細胞をきれいに除去できるかどうかを確認した。抗原を免疫した後一部の IgM 細胞に DTR-Venus 発現を誘導した。その後ジフテリア毒素 (DT) を投与 (250 ng/匹、2 日間投与) し、脾臓 B 細胞の DTR-Venus 発現を調べた。その結果、DT の投与により DTR-Venus 陽性細胞が完全に除去された（下図）。



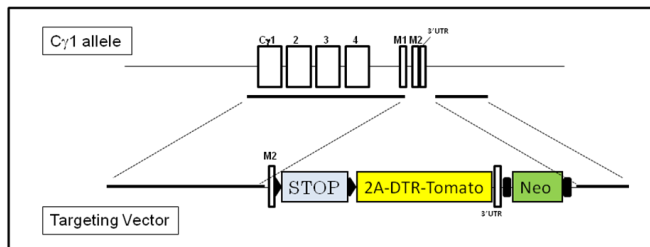
以上の結果から、この実験系は記憶 IgM 陽性細胞を特異的にラベルでき、かつ誘導的に除去できる優れたモデルであることが示された。

この M-SDV マウスモデルを用いることにより以下のことを明らかにすることが可能になると思われる

- 1) 記憶 IgM 陽性細胞の誕生の場、局在、寿命の解明：他の記憶 B 細胞サブセットとの比較解析
- 2) 記憶 IgM 陽性細胞の除去による機能解析：記憶 IgM 陽性細胞を除去した後に、抗原を再投与したりウイルス等を再感染させた時の免疫応答解析

現在この M-SDV マウスに加え、IgG1 陽性 B 細胞を特異的にラベル・除去できる

G1-SDtomato マウスも樹立中である（下図）。これらのマウスを駆逐することで、記憶 B 細胞サブセットの機能を明らかにできることが期待される。



5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊勢 渉 (Ise, Wataru)

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：70323483

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：