

黒崎 知博

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任教授

液性免疫制御による新しい治療法の開発

§ 1. 研究実施の概要

本 CREST プロジェクトは、メモリーB細胞の適切な活性化・生存維持が、外来性抗原に対する迅速免疫応答性、及び末梢免疫寛容成立に重要な役割を担っていることに着目し、その奥底に潜むメカニズム解明を目指した提案である。

メモリーB細胞の定義は、抗原プライミング(Ag-experienced)細胞であるが、モデル抗原を用いて、1)メモリーB細胞には少なくとも IgM⁺IgD⁺, IgM⁺IgD⁻, IgG1⁺の3種類に分類されるが、これら3つの亜集団は、その存在部位、生体内での寿命が異なっている、2) conventional なメモリーB細胞である IgG1⁺細胞は、ナイーブB細胞に比して、より迅速にプラズマ細胞へ分化する。3)その分化迅速性は転写因子 Pax5, Bach2 の発現抑制によることが示唆された。4) IgG1⁺メモリーB細胞の分化には、細胞内シグナル分子 Erk 活性化が要求される、ことを明らかにした。さらに、インフルエンザウイルス感染ならびにワクチン接種モデルを用いて、1) クラススイッチしたメモリーが肺の間質に存在する、2) Toll-like receptor シグナルが IgG1 メモリーB細胞の再活性化を制御する、ことを明らかにした。

§ 2. 研究実施体制

(1)「研究代表者(黒崎・高橋)」グループ

① 研究分担グループ長:黒崎 知博 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター、特任教授)
(研究代表者)

サブグループ長:高橋 宜聖(国立感染症研究所免疫療法室、室長)

② 研究項目

- 存在部位・活性化部位の同定
 - NPモデル抗原を用いて(黒崎サブグループ)
 - ウィルス抗原を用いて(高橋サブグループ)
- 他の細胞系列要求性の検定
 - メモリーB細胞活性化について(黒崎サブグループ)
 - プラズマ細胞の存在部位の同定(黒崎サブグループ)
- インフルエンザウイルスに対するメモリーB細胞応答の解析(高橋サブグループ)

- 末梢免疫寛容破綻メカニズム解明
 - 新規自己免疫モデルマウス樹立(黒崎サブグループ)

(2)「共同研究者(古川)」グループ

- ① 研究分担グループ長:古川 鋼一 (名古屋大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - IgGシアル酸モデルの検定
 - モデルマウスの樹立

§ 3. 研究実施内容

メモリーB細胞に亜集団が存在する。

抗原プライミングを起こしたB細胞を特異的にラベルする遺伝学的方法が開発されてきた(図1)。

AID は抗原刺激によって活性化されるが、AID locus に Cre を連結し、Rosa locus に RFP をノックインしたマウスと交配させることにより、一度 AID が on になると、恒常的に RFP が発現するマウスの作成が可能になる。

このマウスを用いて、同一抗原で、どのようなメモリー細胞亜集団が形成されるかを検討した。その結果 conventional メモリーB細胞である IgG1⁺タイプ以外に、IgM⁺IgD⁺, IgM⁺IgD⁻メモリーB細胞が形成される。これらメモリー亜集団の内、生体内の寿命は IgG1⁺, IgM⁺IgD⁺, IgM⁺IgD⁻の順番に長かった。この寿命差は、2010年に私たちが観察した、IgG1⁺メモリーB細胞は胚中心(GC)周囲にIgM⁺メモリーB細胞は濾胞(Follicular)に存在するという、存在様式の差を反映している可能性がある。

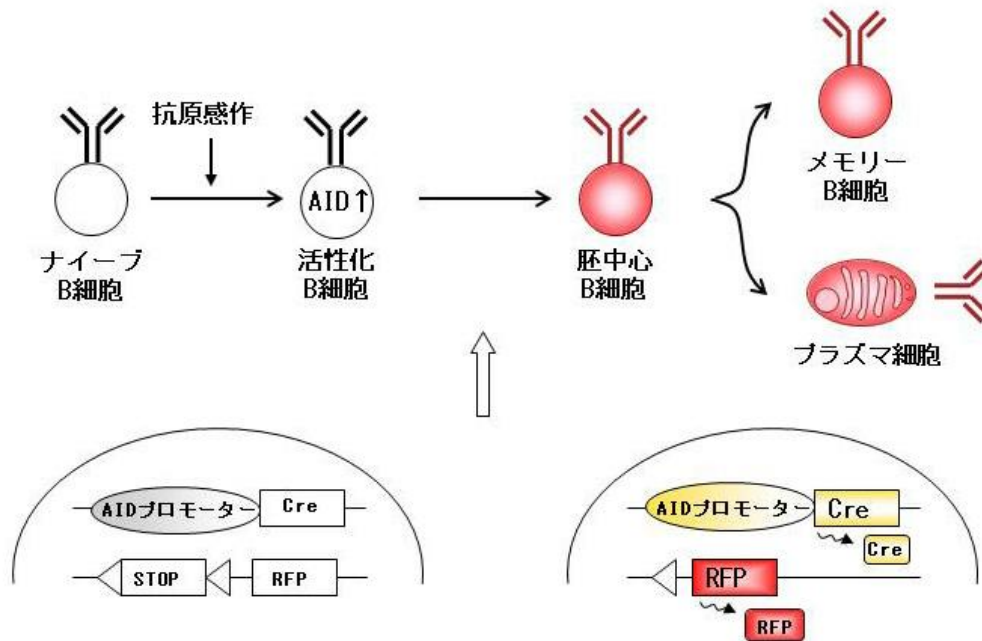


図1 抗原刺激を受けた細胞の遺伝学的ラベル法
AIDプロモーターの下流にCreを連結したマウスと、Rosa locusにRFPをノックインしたマウスとを交配する。抗原にプライムされたB細胞はAIDの活性化に伴いCre遺伝子を発現し、LoxPに挟まれたストップ配列が除去される。その後、胚中心B細胞、メモリーB細胞、クラススイッチしたプラズマ細胞は、Creの発現に関わらず恒常的にRFPを発現する。

Conventional メモリーB細胞 (IgG1+タイプ) は、ナイーブ B 細胞に比して、より迅速にプラズマ細胞へ分化する。

IgG1+メモリーB細胞は、再度の抗原侵入により、迅速に液性免疫を開始するための必須の細胞と考えられてきている。しかしながら、メモリーB細胞とナイーブ B 細胞の性質比較はいままで行われてこなかった。抗原特異性を固定したノックイン BCR を用いて、ナイーブ IgM+ B 細胞と conventional な IgG1+ メモリーB細胞を、Rag KO マウスに、活性化した T 細胞と一緒に導入し、抗原を加えるという *in vivo* 機能検定系を用いて調べた。その結果、メモリーIgG1+細胞は、ナイーブ細胞に比して、細胞増殖能が増加していることはなかった。しかしながら、非常に迅速にプラズマ細胞への分化を示した。このことは、IgG1+タイプのメモリーB細胞は *intrinsic* に、プラズマ細胞への分化能が亢進していることを示している。

IgG1+タイプメモリーB細胞は転写因子 Pax5, Bach2 の発現低下がある。

IgG1+タイプメモリーB細胞のプラズマ細胞への分化能の亢進の分子機序を検索するために、B細胞及びプラズマ細胞に必須の転写因子の発現を QT-PCR 法を用いて調べた。その結果、B細胞の identity を決定している Pax5, Bach2 の発現低下が認められた。さらに siRNA 法を用いて

ナイーブ B 細胞の Pax5, Bach2 の発現量を低下させることにより、ナイーブ B 細胞のプラズマ細胞への分化能亢進が認められた。これらのことは、IgG1+メモリーB細胞の分化能亢進は、Pax5, Bach2 の発現低下によって担われていることを強く示唆している。

IgG1+ メモリーB 細胞のプラズマ細胞への分化には、細胞内シグナル分子である Erk の活性化が要求される。

メモリーB 細胞の活性化・生存に必要な、細胞表面因子・シグナル因子を系統的に検索しており、今までに PLCγ2 が生存に必須であることを見いだしてきている。多くのレセプター群のシグナルに関与している Erk の機能を、IgG1Cre を用い IgG1 クラススイッチ後に欠損できるマウスを用いて検索した。このマウスでは、IgG1+メモリーB 細胞は生成されるにもかかわらず、抗原特異的プラズマ細胞は殆ど産生されてこなかった。このことは、メモリーB細胞の活性化に Erk が要求されていることを示している。さらに、分子機序を *in vitro* 機能検定系を用いて調べた結果 Erk の重要なターゲットの一つは転写因子 Blimp であることが判明した。転写因子 Blimp はプラズマ細胞の分化に必須の因子であり、Erk→Blimp1→プラズマ分化の経路が存在することを明らかにすることができた。

インフルエンザウイルス感染後の肺間質にクラススイッチしたメモリーB 細胞が局在するこれまでインフルエンザウイルス感染後の肺において、IgA や IgG にクラススイッチしたメモリーB 細胞が存在し、感染防御を担うことを明らかにした。肺の中でのメモリーB 細胞の存在部位を解析した結果、予想された気管関連リンパ組織とは異なり、主に間質に存在することが明らかとなった。

インフルエンザワクチンに対するメモリーB 細胞の再活性化には Toll-like receptor (TLR) シグナルが関与するインフルエンザワクチンを用い、Toll-like receptor によるメモリーB 細胞活性化の制御機構を解析した。その結果、TLR7 欠損マウスや MyD88 欠損マウスでは、T 細胞非依存的なメモリーB 細胞の再活性化がほぼ完全に消失することが判明した。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1 Aiba, Y., Kometani, K., Hamadate, M., Moriyama, S., Sakaue-Sawano, A., Tomura, M., Lucie, H., Fehling, H.J., Casella, R., Kanagawa, O., Miyawaki, A., and Kurosaki, T. Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.** 107:12192-12197, 2010. (DOI:

10.1073/pnas.1005443107)

2. Yasuda T., Kometani, K., Takahashi, N., Imai, Y., Aiba, Y., and Kurosaki, T. Erk kinases control plasma cell differentiation by regulating expression of Blimp-1. **Sci. Signal.** (in press)

3. Matsumoto, M., Fujii, Y., Baba, A., Hikida, M., Kurosaki, T. and Baba, Y. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through IL-10 production. **Immunity** (in press)