

## 液性免疫記憶の生成・維持・活性化機序

### Mechanisms of Generation, Maintenance, and Activation of Humoral Memory

黒崎 知博 (KUROSAKI TOMOHIRO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授



#### 研究の概要

「液性免疫記憶」の中心的機能を担っているメモリーB細胞のユニークな機能（迅速反応性・長期寿命）を明らかにすると同時に、その機能を支えている分子機序を解明する。

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：免疫記憶

#### 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは、まずウイルスをはじめとする侵入異物を局所で感知し、一時防御機構を発動し、続いて全身に配置されたリンパ組織における効率的な防御反応を開始・継続しながら、タイムリーな終焉を迎える。さらには、「免疫記憶」により、予想される外来異物の再侵入への準備を可能にするとともに、再侵入に対して迅速に対応できるようになっている。

この「免疫記憶」機能を担うメモリーB・T細胞は一次免疫反応中に生成されるわけであるが、ナイーブ細胞とは異なり、長期の寿命を有し維持され、異物の再侵入（二次免疫）により迅速・効率的に、メモリーB細胞の場合、長期抗体産生細胞へと分化し、再侵入異物を速やかに排除する。このような機能的な重要性にもかかわらず、メモリーB細胞のユニークな機能（迅速反応性・長期寿命）を支える分子機序に関する研究はほとんど進展してこなかった。この点を明らかにするためには、先ず、生体内でメモリーB細胞がどのような分化経路により生成されるのか、又、生成されたメモリーB細胞は生体内の何処に存在するのかが、明らかにされなければならない根源的課題である。

#### 2. 研究の目的

本研究では、従来の研究手法に加えて、メモリーB細胞の動態を *in vivo* で追跡する実験系またメモリーB細胞の *in vivo* 機能アッ

セイ系のの開発、を行い、これら実験手法を駆使して、この根源的課題を解決することを目的とする。

#### 3. 研究の方法

外来性抗原モデルとして、メモリーB細胞のトレースが最も確立しているNPを用いたハプテン抗原系を用いる。又、感染モデルとしてはインフルエンザウイルスを用いる。

メモリーB細胞の分化経路の検索に関しては、以下の実験手法を用いてアプローチする。メモリーB細胞は、従来、胚中心(Germinal Center; GC)B細胞から分化してくると考えられていたが、GC形成のないマウスでもメモリーB細胞が発生することより、この考えは再検討を要する重要な課題と考えられる。この課題解決には、GC-B細胞特異的プロモーターを用いて、このプロモーターが発現した後の細胞系列では蛍光蛋白が不可逆的に発現する Fate-mapping マウスを作成し、このマウスを用いて検定する。

メモリーB細胞の存在部位の同定に関しては以下の方法を用いる。メモリーB細胞を新規 fate-mapping 法を用いて蛍光ラベルする。この蛍光を発している細胞がリンパ節のどの部位に存在するかを蛍光顕微鏡を用いて詳細に観察していく。

#### 4. これまでの成果

1) IgM メモリーB細胞は胚中心(GC)過程を通過するものと、通過せずに生じるものが存

在する。

*in vivo* で一次抗原に感作されたかどうかを検定できる AID-fate mapping マウスを用いて、古典的なクラススイッチしたメモリーB細胞(例えばIgG1メモリーB細胞)だけではなく、IgMタイプのメモリーB細胞が存在することを明らかにした。このIgMメモリーB細胞は、GCを経ずに体細胞突然変異が生じないものと、GCを経て、生じているものの2つの亜集団が存在することが明らかになった。

2) クラススイッチしたメモリーB細胞は、生体内のどこで感染が生じたかの位置情報をも獲得し記憶している。

IgG1メモリーB細胞は脾臓に生じたGCの近傍に存在することを、組織染色、AID-Creを用いた fate-mapping マウスを併用して明らかにした。又、1次免疫と同様の部位で2次免疫を行なうと、迅速にGC近傍のIgG1メモリーB細胞が反応した。更に、局所への抗原投与ではdrainingリンパ節に生じたGCの近傍に存在することが明らかになった。このことは、メモリーB細胞は感染の近位のリンパ節に dominant に存在して、どこで感染が生じたかの位置情報を獲得していることを意味する。このことを、更に検討するために、インフルエンザ感染システムを用いて検討した。IgAメモリーB細胞、IgGメモリーB細胞はインフルエンザ感染した肺、及び最も近位のリンパ節に存在して、2次感染に即答することを明らかにした。

3) IgG1メモリーB細胞の2次応答迅速反応性を支える、外的・内的メカニズムの提唱。

IgG1メモリーB細胞が迅速に2次免疫に応答するのは、IgG1メモリーB細胞は抗原にアクセスしやすい部位に存在している(メカニズム1)。生体内で、メモリーT/B細胞が空間的近傍に存在しており、2次抗原侵入時に迅速に互いの細胞が相互作用し、迅速反応性に寄与している(メカニズム2)。更にIgMタイプB細胞とIgG1メモリーB細胞の*in vivo* 機能検定をおこなうと、IgG1メモリーB細胞は迅速にプラズマ細胞へ分化する(メカニズム3)。

少なくとも、この3つのメカニズムが協調的に働いて、IgG1メモリーB細胞の迅速反応性が生じているとモデル提唱に至った。

4) IgG1メモリーB細胞の長期寿命に必須の分子の同定。

IgG1メモリーB細胞の長期寿命のメカニズム探索の第一歩として、シグナル分子PLC $\gamma$ -2をメモリーB細胞を樹立した後、誘導的に欠損させた。コントロール細胞に比べて、IgG1メモリーB細胞の数が激減した。PLC $\gamma$ -2はBCRを介するシグナル伝達に必須

の分子であることを考えると、BCRを介するシグナルがIgG1メモリーB細胞の生存に必須であることを強く示唆している。

## 5. 今後の計画

単純な Fate-mapping 法では限界があるため、ダブル制御のかかる Fate-mapping 法を開発中である。この方法をいち早く確立して、今後2年で、メモリーB細胞の分化経路のより詳細な解析を行なう。

メモリーB細胞のユニークな機能を支える分子に関して、転写因子 Bach2 を含め、既に、有望な candidate の単離に成功している。今後2年で、この candidate の検証と、その機能発現機序の解明を行なう。

## 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Onodera, T., Takahashi, Y., Yokoi, Y., Ato, M., Kodama, Y., Hachimura, S., Kurosaki, T., and Kobayashi, K. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109,2485-90, 2012

2. Kometani, K., Yamada, T., Sasaki, Y., Yokosuka, T., Saito, T., Rajewsky, K., Ishiai, M., Hikida, M. and Kurosaki, T. CIN85 drives B cell responses by linking BCR signals to the canonical NF- $\kappa$ B pathway. J. Exp. Med. 208(7), 1447-1457, 2011

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 34, 703-714, 2011

4. 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. 4, (169) ra25, 2011

5. Kurosaki, T., Aiba, Y., Kometani, K., Moriyama, S., and Takahashi, Y. Unique properties of memory B cells of different isotypes. Immunol. Rev. 237(1);104-16, 2010

6. Aiba, Y., Kometani, K., Hamadate, M., Moriyama, S., Sakaue-Sawano, A., Tomura, M., Luche, 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. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107(27):12192-7, 2010

ホームページ等

[http://lymph.ifrec.osaka-u.ac.jp/research\\_j.html](http://lymph.ifrec.osaka-u.ac.jp/research_j.html)