

記憶 B 細胞の分化メカニズムの解明

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター
分化制御研究室
井上 毅

<研究の背景・目的>

免疫記憶は獲得免疫系における最も特徴的な現象の一つであり、記憶 B 細胞の産生・分化メカニズムを解明することは、獲得免疫系による生体防御機構の理解、そして効果的なワクチン開発のために極めて重要である。胚中心 B 細胞から記憶 B 細胞への分化誘導機構を解析するために、我々は胚中心から生成してすぐの記憶 B 細胞を検出するレポーターマウスを開発した。このマウスとモデル抗原(NP ハプテン)による実験系を用い、B 細胞抗原受容体(BCR)の体細胞高頻度突然変異を解析することで、我々は、「記憶 B 細胞は、胚中心形成直後の、親和性成熟が十分に起こる前の胚中心 B 細胞から誘導されやすい」ことを明らかにした(1)。これは、「抗原への親和性成熟が進んだ胚中心 B 細胞が記憶 B 細胞に分化誘導される」とされていた従来の概念を覆すモデルであり、当該研究分野に大きなインパクトを与えた(2) (図 1)。次なる疑問として、「記憶 B 細胞が、親和性成熟が十分に起こる前の胚中心 B 細胞から誘導されやすいのはなぜか?」、言い換えると「胚中心において記憶 B 細胞分化への運命決定を司る細胞内因子は何か?」という課題が焦点となる。

GC B細胞から記憶B細胞、プラズマ細胞への分化

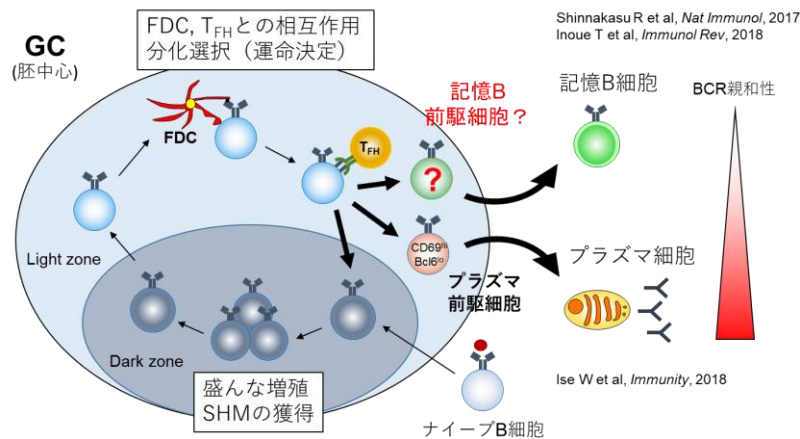


図 1 目的：記憶B前駆細胞を同定し、記憶B細胞分化のメカニズムを理解する

上記の BCR 親和性と胚中心 B 細胞分化傾向に相関があるということはすなわち、胚中心から記憶 B 細胞への分化は完全に stochastic な(胚中心から記憶 B 細胞がランダムに選ばれる)反応ではなく、何らかの instructive な誘導メカニズムが存在することを意味しており、このことは胚中心にはすでに記憶 B 細胞への分化運命が決定づけられた前駆細胞が存在する可能性を示唆している。そこで本研究では「胚中心における記憶 B 細胞前駆細胞の同定およびその機能解析」を行うことを目的とした。我々は胚中心 B 細胞を詳細に解析していく過程で、胚中心 B 細胞マーカーである Bcl6 陽性、且つ(マウス)記憶 B 細胞マーカーである CD38 陽性という両者の中間状態と思われる稀少細胞集団を発見することができた(図 2)。この細胞集団は胚中心形成後期には存在しなくなるため、胚中心形成初期に記憶 B 細胞が形成されるという我々の主張と合致する。本研究では、この Bcl6⁺CD38⁺細胞のトランスクリプトーム解析、および adoptive transfer 法による *in vivo* 機能解析を通じて記憶 B 細胞分化への運命決定を制御する分子メカニズムの解明を目指した。

記憶B前駆細胞の同定

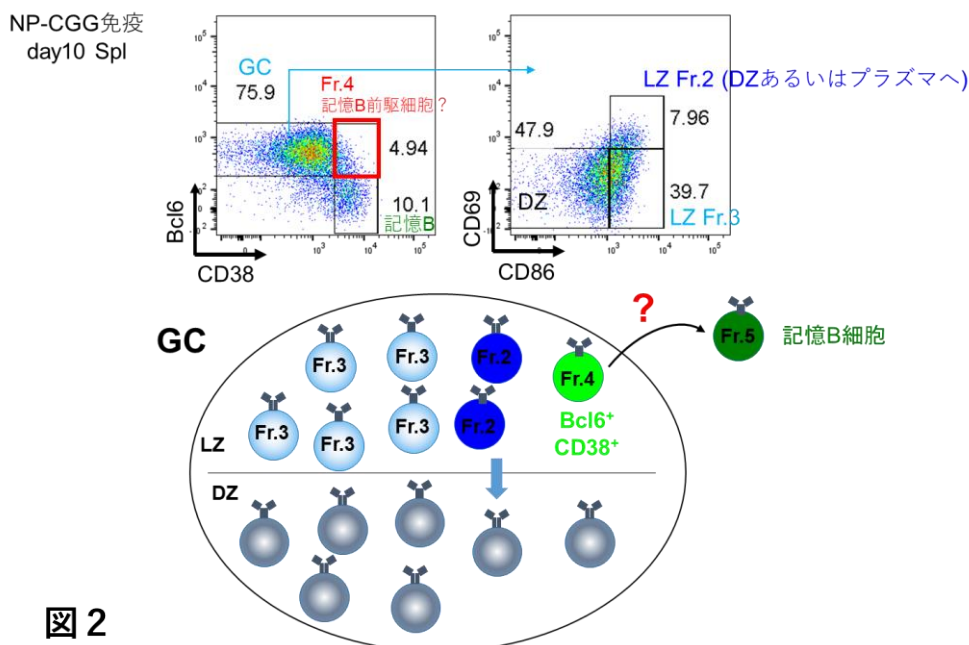


図2

<研究成果・今後の展望>

胚中心B細胞をCD38, Bcl6, CD86, CD69というマーカーを用いることでいくつかのサブポピュレーションに分画することができた。このうち、CD38⁻CD86^{hi}CD69^{hi}Bcl6^{hi}(Fr.2)はT細胞ヘルプを受けてlight zone (LZ)からdark zone (DZ)へと移行、あるいはプラズマ細胞に分化していく細胞であり、CD38⁻CD86^{hi}CD69^{lo}Bcl6^{hi}(Fr.3)は選択を受けているLZの大部分の細胞であるが、CD38⁺Bcl6⁺(Fr.4)という稀少細胞集団が記憶B前駆細胞ではないかとの仮説を検証するため、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析を行った。Principal component analysisの結果、仮説通りFr.3が分化の分岐点に位置しており、Fr.3からプラズマ細胞へと分化していくtrajectory pathと、Fr.3から記憶B細胞へと分化していくtrajectory pathが検出できた(図3)。重要なことに、Fr.4はFr.3から記憶B細胞への分化径路上の初期に位置しており、遺伝子発現状態としては確かに記憶B前駆細胞としての性質を持っていると解釈することができる。さらにこれらの各細胞集団を単離し、adoptive transfer実験を行って抗原刺激によるリコール反応を解析したところ、Fr.4は胚中心B細胞と記憶B細胞の中間程度の反応を示した。このことから、機能的にもFr.4を記憶B前駆細胞として定義することの妥当性が示された。

RNA-seq → Principal component analysis

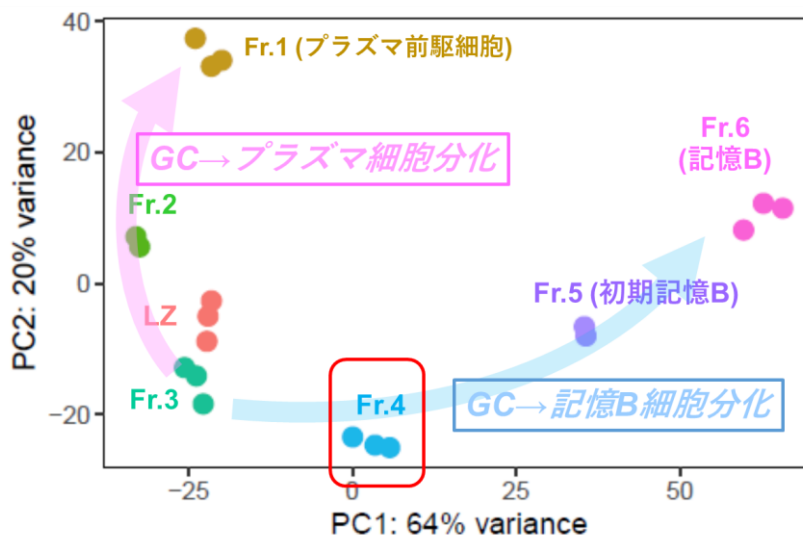


図3

次にこの Fr.4 記憶 B 前駆細胞と、DZ あるいはプラズマ細胞へ分化していく Fr.2 の性質の違いを明らかにするため、上述の RNA-seq データを用いた Gene set enrichment analysis を行った。その結果、Fr.2 は Fr.4 に比べて mTORC1 シグナリング、解糖系、酸化リン酸化といった gene set の enrich が認められ、記憶 B 前駆細胞はより代謝活性が低い状態にあることが示唆された。実際 phospho-S6 protein の発現量が Fr.2 で高く検出されたことから、記憶 B 前駆細胞は mTORC1 活性が低いことが確認された。

そこで次に、記憶 B 細胞産生における mTORC1 活性の役割を「B 細胞特異的に」評価することを目的として、図 4 に示すマウスモデルを用いた実験系を開発した。Mtor 遺伝子に点変異を持ち mTORC1 阻害剤であるラパマイシンに耐性となる変異マウス(3)を用いた B 細胞の移入実験を行い、免疫後にマウスにラパマイシンを投与することで、胚中心反応時に B 細胞特異的に mTORC1 活性を阻害することが可能となる。実験の結果、比較対象として共移入した Mtor 変異(ラパマイシン耐性)B 細胞と比較して野生型(ラパマイシン感受性)B 細胞からより効率的に記憶 B 細胞が産生されたことから、B 細胞特異的な mTORC1 活性低減により記憶 B 細胞分化が亢進することが明らかになった(図 4)。(4)

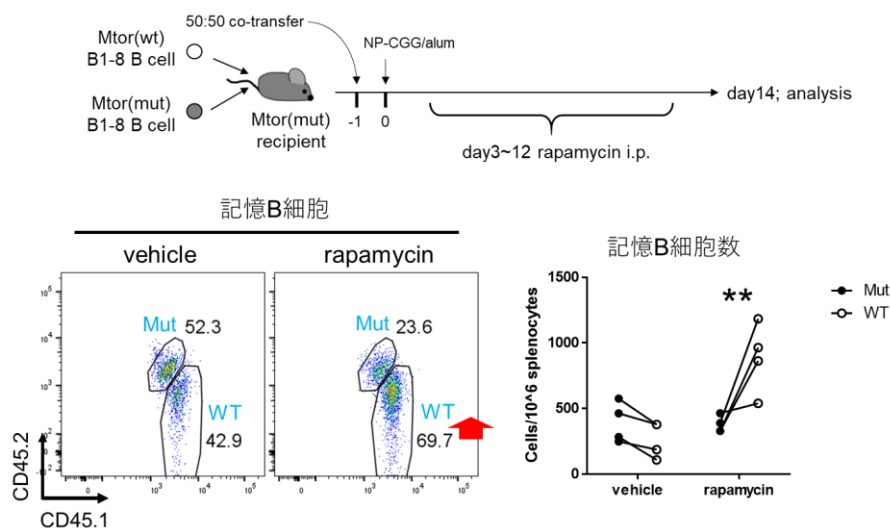


図 4 mTORC1活性低減により記憶B細胞分化が亢進する

他の免疫細胞、例えば T 細胞ではナイーブ T 細胞からエフェクター T 細胞、記憶 T 細胞へと分化する過程で、代謝的な休止状態から酸化リン酸化の亢進、そして解糖系の亢進とダイナミックに代謝状態が変化することが知られている。しかしこれまで B 細胞分化における代謝制御の役割は不明な点が多かったが、本研究により胚中心 B 細胞分化制御にメタボリズムの調節が重要な役割を果たしていることが明らかになった。BCR 親和性の高い B 細胞はより多くの抗原を T 細胞に提示することにより、より多くの T 細胞ヘルプ (CD40L, IL-21 等) を受け取ることから、そのシグナル下流で胚中心 B 細胞の mTORC1 活性が上昇するものと考えられる。このことは我々の先行研究における BCR 親和性の高い胚中心 B 細胞がプラズマ細胞に分化しやすいという主張と矛盾しない。

今後は、このようにメタボリズムの調節が記憶 B 細胞の「質」の変化に及ぼす影響を明らかにするため、単純なタンパク質抗原からインフルエンザウイルス等のより複雑な抗原による免疫系に切り替え、BCR レパトアの変化や感染防御機能への影響等を明らかにしていきたいと考えている。このような研究はインフルエンザウイルスの新たなワクチン開発戦略の基盤になると期待される。

1. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, et al. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat Immunol.*2016;17:861-869.
2. Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T. Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol Rev.*2018;283:138-149.
3. Ersching J, Efeyan A, Mesin L, et al. Germinal Center Selection and Affinity Maturation Require Dynamic Regulation of mTORC1 Kinase. *Immunity.*2017;46:1045-1058 e1046.
4. Inoue T, Shinnakasu R, Kawai C, et al. Exit from germinal center to become quiescent memory B cells depends on metabolic reprogramming and provision of a survival signal. *J Exp Med.*2021;218.