

38. ウイルス感染における液性免疫記憶形成機序

黒崎 知博

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

Key words : influenza virus infection, IgG, long-lived plasma cell, memory B cell, germinal center (GC)

緒言

液性免疫記憶は、再度のウイルス感染防御に必須の役割を担っていることはよく知られており、これを支える細胞群として、常に抗体を産生し続ける長期プラズマ細胞と、抗体レセプターを細胞表面に有するメモリーB細胞と、2種類の細胞が存在する。長期プラズマ細胞の重要性はよく認識されてきていたが、「本当にメモリーB細胞は再感染防御に必要とされるのか」という設問は、依然として賛否両論存在するという現況である [1]。

我々は、インフルエンザ感染モデル系を用いて、メモリーB細胞は、2度目に変異インフルエンザウイルス感染する時に必須の役割を担っていることを明らかにした。更に、必須とされるメモリーB細胞の抗原特異性を明らかにし、一次感染時、どのような経路を辿って、このメモリーB細胞が形成されるかを明らかにした。

方法および結果

1. Pre-existing ではなく、変異インフルエンザ再感染により、あらたに産生される抗体 (Ab) の重要性検定

図1で示すようにインフルエンザ感染ではエンヴェロップ蛋白であるヘモグルチニン (HA) 抗原にたいする抗体が、生体防御に必須の役割を担っている。このHA蛋白の構造はhead, stem領域と2つの領域から構成されている。head領域は、ウイルスサイドで高頻度に変異が生じ、これが、インフルエンザウイルスに対するワクチン開発の大きな障害になっている。一方、ウイルスサイドの変異が生じにくい部位 (stem領域) が存在し、稀ではあるが、この領域に対するAbを有するヒトが存在することが報告されている。

まず、マウスにH1N1 narita型インフルエンザを感染させ、免疫記憶状態を誘導する。その後、同じ型のnarita型を再感染させた場合と、head領域に非常に変異のあるH1N1 PR8型インフルエンザ再感染させた場合、感染防御能力を体重減少で測定して、どのようなファクターが再感染からの生体防御に必須かを検定した。

Narita/naritaの場合、2度目のnarita株感染の直前に、最初にnarita株を感染させたマウスからの血清を移入しておけば、ナイーブマウスにnarita株を感染させても、十分に感染防御されることが判明した。ナイーブマウスにPR8株感染の場合は、この血清移入は全く無効であった。しかし、Narita/PR8の2度目のPR8再感染の初期に産生される血清を移入した場合、ナイーブマウスにPR8の感染させても十分防御されることが判明した (図2)。この結果は同じ株のウイルスの再感染にはpre-existingのAbで十分であるが、変異ウイルスの再感染には無効であること、更に、変異ウイルスからの再感染生体防御には、初期にde novoに産生されるAbが必須の役割になっていることを示している。

更に、narita/PR8の初期に産生されるAbのなかで、anti-stemプローブを用いて、anti-stem Abを枯渇させた場合、感染防御能は無効化した。このことより、narita/PR8の変異ウイルス再感染の場合、初期にde novoに産生されるanti-stem Abが重要であることを強く示している。

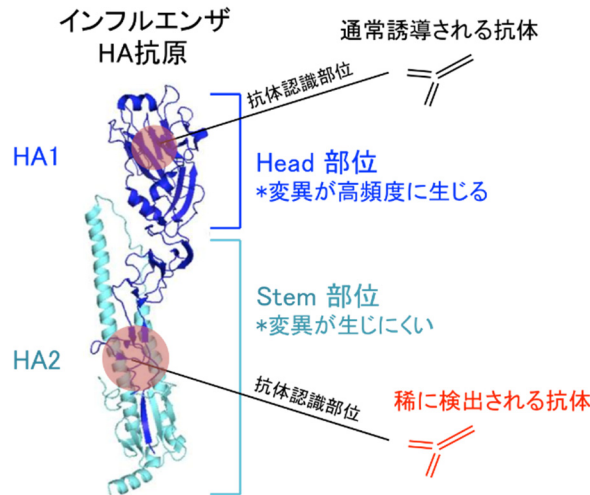


図1. インフルエンザ HA 抗原に対する抗体と作用点

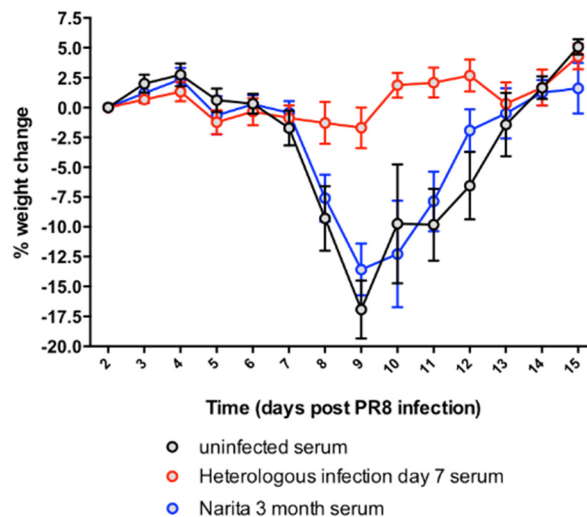


図2. メモリーB細胞由来の抗体の重要性

Narita 株感染3か月目(青)、Narita 株感染4か月後にPR8で再感染7日目(赤)、未感染(黒)のマウスから血清を回収した。ナイーブマウスにそれぞれの血清を移入し、PR8の感染を行った後、各マウスの感染後の体重変化を評価した。

2. Anti-stem メモリーB細胞の生成・活性化

それでは、narita/PR8後に *de novo* 産生される anti-stem Ab ほどの B細胞が活性化されてできるのか？ narita 株一次感染の時に産生された anti-stem メモリーB細胞か、anti-stem ナイーブ B細胞の可能性が考えられる。前者の場合、そのようなメモリーB細胞が一次感染中に実際作られて、PR8の再感染後、その細胞が活性化されている必要がある。実際 IgG タイプの anti-stem メモリーB細胞が少ないながら、narita 株の一次感染中に作られること、又、PR8再感染後に Edu を取り込んで活性化されていることを証明した(図3)。

更に一度 GC 経したメモリーB細胞を fate mapping できるマウスを用いて、narita 一次感染中に産生されたメモリーB細胞を tomato でラベルし、PR8再感染をさせ、anti-stem プラズマ細胞をみると、約75%の細胞がメモリーB細胞由来で tomato でラベルされていた。

これらの実験結果より、narita/PR8再感染後初期に産生される anti-stem Ab は多くは、anti-stem メモリーB細胞が活性化された結果生じたプラズマ細胞由来のものと結論した。

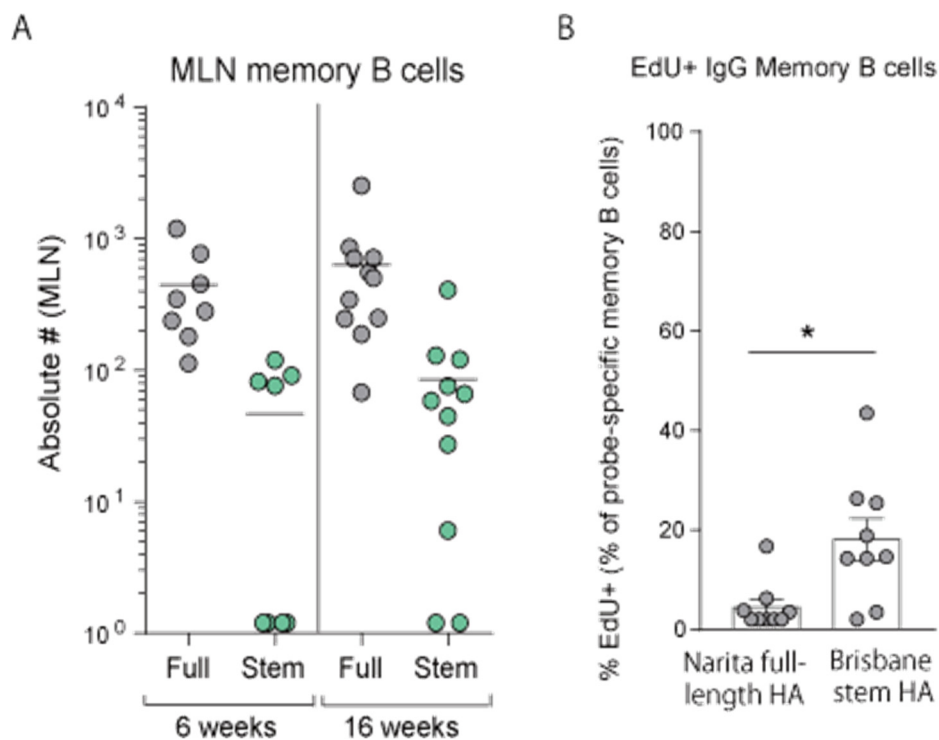


図3. 異なった領域に対するメモリーB細胞の産生

- (A) Narita 株感染マウスの感染6週目、16週目におけるHA特異的(灰)、HA-stem特異的(緑) IgGタイプメモリーB細胞数の測定を行った。
- (B) Narita株感染4か月後のマウスをPR8で再感染し、4日目後、EdU投与を1時間行い、活性化され(増殖し)ているメモリー細胞由来IgG陽性B細胞について評価した。

3. 再感染後、活性化されたプラズマ細胞の起源

このanti-stemメモリーB細胞の性質(特にAb)を調べるため、narita/PR8再感染後産生されたプラズマ細胞をシングルで単離して、培養し、そのAbのstemにたいする親和性、及び他のウイルス株(H5N1を用いた)のstem領域にたいする反応性を調べた。コントロールとして、ナイーブB細胞由来のプラズマ細胞も調べた。図4で示しているように、stem領域に対する親和性は約10倍、ナイーブB細胞に比して高くなっていた。又、他のインフルエンザ型H5N1にも反応するようなプラズマ細胞が約60%存在していた。

1、2の結果を踏まえ、総合的に考えると、narita/PR8の変異ウイルスの再感染の場合、非常に低いながら、一次感染中に産生されるstem領域に対するメモリーB細胞が存在し、活性化されることが、生体防御に必須であること。又、そのメモリーB細胞はGCを経て、その間に、stem領域に対する親和性が上昇するのみならず、広汎な型のインフルエンザH5N1にも反応できるように変異していることが判明した。

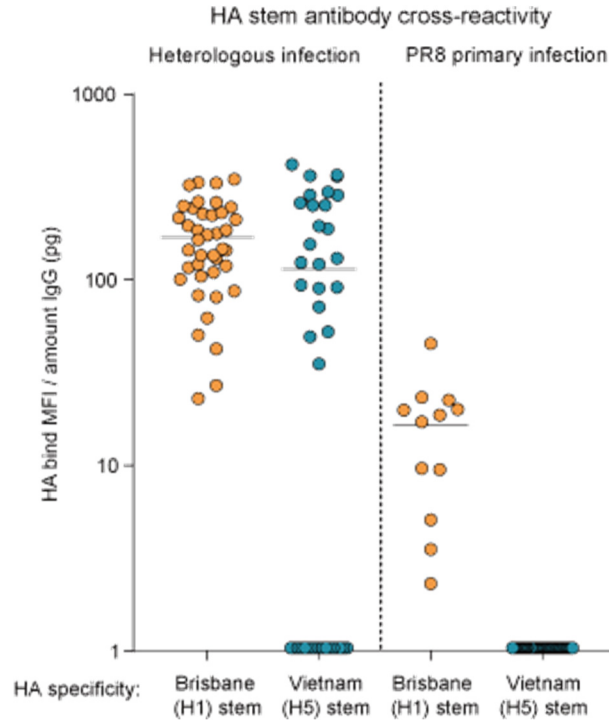


図 4. Stem 領域に対するメモリーB 細胞は一次感染中に成熟する

Narita株感染4か月後にPR8で再感染7日目のマウスから、感染後誘導されたプラズマ細胞をシングルで単離後、培養し、抗体を培養上清中に誘導した。その抗体のstemに対する親和性（橙）、及び他のウイルス株（H5N1を用いた）のstem領域にたいする親和性と反応性（青）を検討した。コントロールとして、ナイーブB細胞由来のプラズマ細胞も検討した。

考 察

我々は既に、GC由来のメモリーB細胞は、寧ろ広汎な親和性のものが選択され、それ故に、再度の変異ウイルス感染の時に、反応できるAbレパトアーを増やしているというモデルを提唱してきた [2, 3]。本研究では、そのモデルをインフルエンザウイルス感染を用いて直接的に証明するようデザインし、実際にマウスモデル系ではあるが、初めて、*in vivo*でメモリーB細胞の重要性を示すことができた。

更に、一次感染中に親和性が上昇することは、予測されていたが、*breath* (他の型のインフルエンザに対する反応性) も上昇しているのは、予想外であった。更にシングルセル解析を用いて、どのような変異が*breath*獲得するのに重要なのかを検索していく予定である。

又、我々の実験結果は、従来ヒトでは、プラズマ細胞のAbレパトアー解析を中心に行われてきたが、特に変異ウイルスに対する反応性の観点では、メモリーB細胞のレパトアー解析がより重要であることを強く示している。

共同研究者・謝辞

本研究は、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の新中須亮、Sarah Leach とともに行われた。これらの人々に感謝の意を表す。

文 献

- 1) Zinkernagel RM, Hengartner H. Protective 'immunity' by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'. *Immunol Rev.* 2006 Jun 13. 211:310-9. Review. PMID: 16824138 DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00402.x
- 2) 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. PMID: 27158841
- 3) Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T. Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol Rev.* 2018 May;283(1):138-149. doi: 10.1111/imr.12640. Review. PMID:29664566