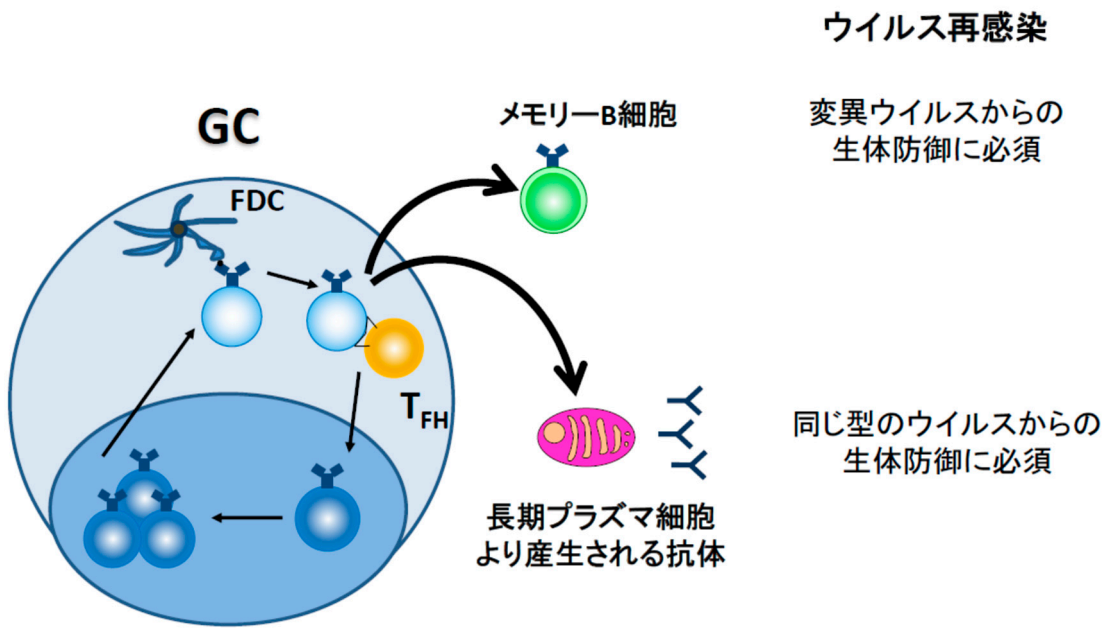
38　ウイルス感染における液性免疫記憶形成機序	黒崎　知博

【目的】インフルエンザ感染に対する液性免疫記憶を支える細胞として、常に抗体を産生し続ける長期プラズマ細胞と、ウイルス刺激により活性化されるメモリーB 細胞と 2 種類の細胞集団が存在する。しかしながら、インフルエンザ再感染時、この 2 種類の細胞群のユニークな機能、及び生成機序は明らかにされてきていなかった。従って、本研究では、この課題にチャレンジした。

【方法】H1N1 型のインフルエンザ株（Narita 株）を先ず、マウスに一次感染し、免疫記憶を形成さす。その後、同じ株である Narita 株を感染さす系と、H1N1 型ではあるが変異株である PR8 株を感染さす系を用いて、2 種類の細胞群のインフルエンザウイルス再感染時における機能検定をおこなった。

【結果】長期プラズマ細胞により産生される抗体（Antibody：Ab）は、同じ株のインフルエンザ感染に必須の役割をしていた。一方、この抗体は、変異インフルエンザ PR8 感染には、全く効果がなく、一次感染時に形成されたメモリーB 細胞が必須であった。この機能的メモリーB 細胞の抗体は、胚中心（GC）を経て変異を受け、親和性が高くなると同時に、他の型のインフルエンザウイルス（例えば、鳥インフルエンザウイルスである H5N1 型）に対しての反応性も獲得していた。

メモリーB 細胞と長期プラズマ細胞の機能相違



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ープ蛋白であるヘモアグルチニン（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。

先ず、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、ナイーヴマウスに 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、感染防御能は無力化した。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。

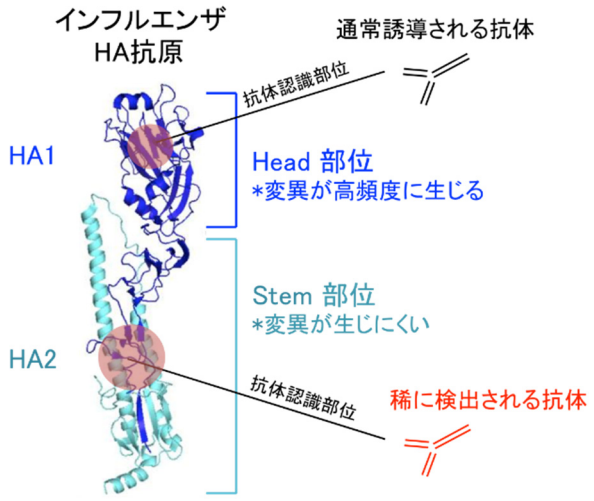


図 1. インフルエンザ HA 抗原に対する抗体と作用点

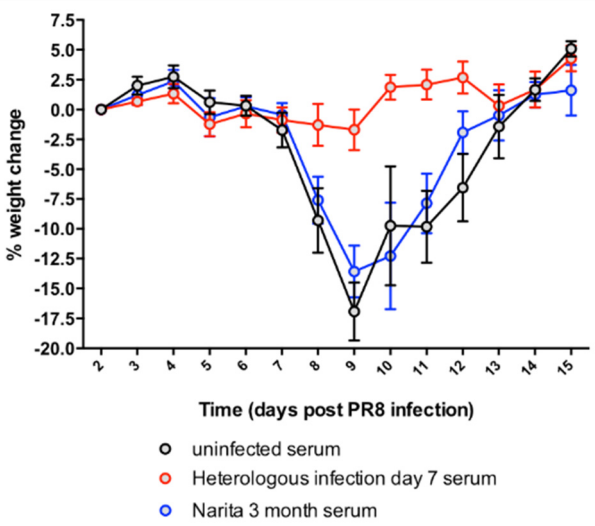


図 2. メモリーB 細胞由来の抗体の重要性

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 はどの 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 プラズマ細胞をみてみると、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。

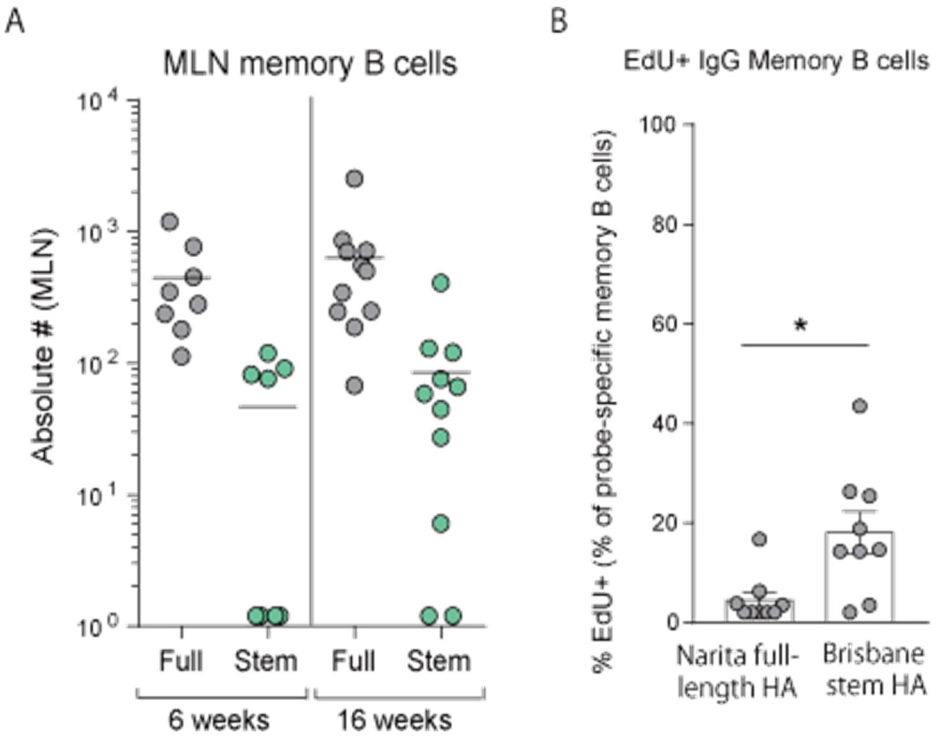


図 3. 異なった領域に対するメモリーB 細胞の産生

(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。

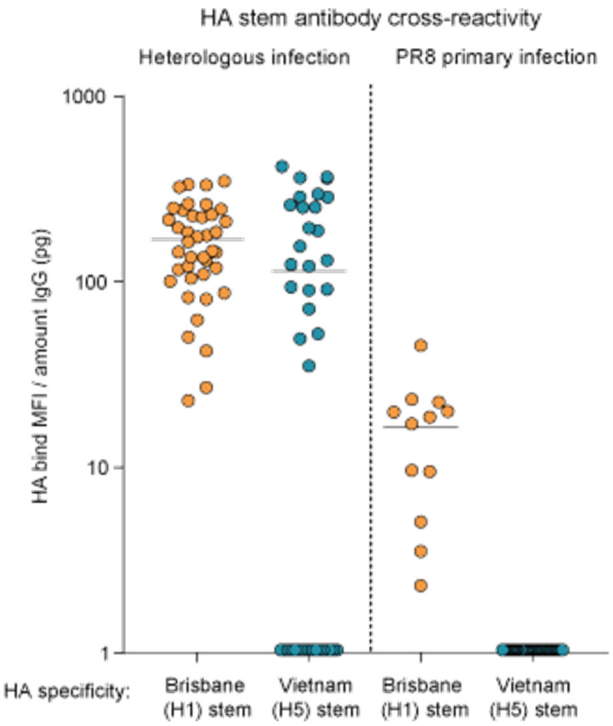


図 4. Stem 領域に対するメモリーB 細胞は一次感染中に成熟する

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る。

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