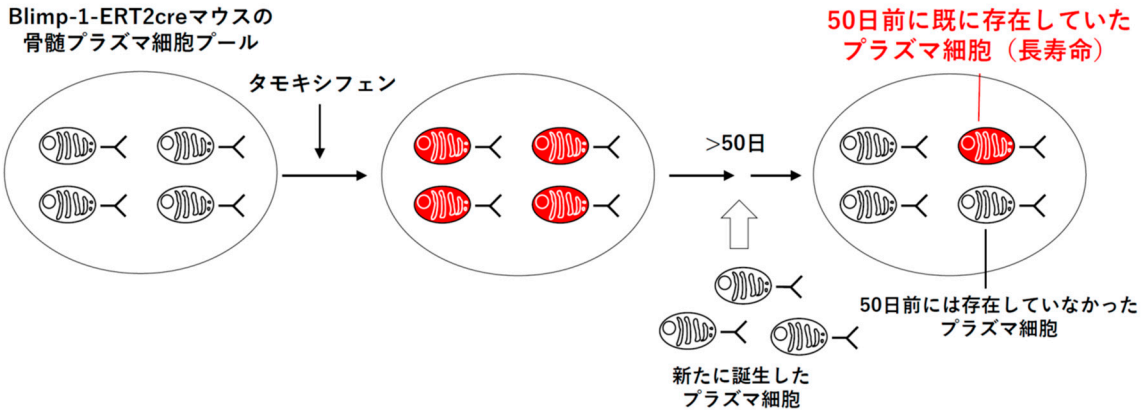
23　長寿命プラズマ細胞の分離と分子マーカーの同定	伊勢　渉

【目的】ウイルスや細菌の排除に必要不可欠な抗体分子は B 細胞から分化したプラズマ細胞によって産生される。抗体の半減期は数日から 20 日程度であるが、感染・ワクチン接種後に抗体産生応答は時に数十年に渡って持続する。これはプラズマ細胞の一部が骨髄で長期に渡って生存し続けるからだと考えられている。実際にヒトで 50 年前に感染したと考えられる麻疹に対する抗体を作り続けるプラズマ細胞の存在が報告されている。このような長寿命プラズマ細胞の特性を明らかにすることは、効率の良いワクチン開発のために非常に重要である。しかし、長寿命プラズマ細胞を識別可能な分子マーカーが存在しないために研究が進展していないのが現状である。そこで本研究では長寿命プラズマ細胞の同定・分離を可能とする新規実験系を開発し、長寿命プラズマ細胞の特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】プラズマ細胞特異的転写因子である *Blimp-1* 遺伝子座に *ERT2cre* をノックインした Blimp-1-ERT2cre マウスを作製し、これを Rosa-stop-tdTomato（Ai14）マウスと交配した（以下、Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスと呼ぶ）。このマウスにタモキシフェンを投与することで、マウス体内に存在する全てのプラズマ細胞を誘導性に赤色蛍光 tdTomato でラベルした。その後タモキシフェンの投与を中止し、経時的に骨髄に存在する tdTomato 陽性プラズマ細胞の細胞表面分子の発現パターンなどを解析した。また長期生存を果たしたプラズマ細胞を分離し、RNA シークエンス解析を行った。

【結果】タモキシフェンの投与を中止して 7 日目には骨髄内に tdTomato 陰性プラズマ細胞が観察されたことから、新たに産生されたプラズマ細胞の骨髄への流入が起きていることが示唆された。一方骨髄プラズマ細胞中の tdTomato 陽性細胞の割合は時間とともに減少し、56 日後には約 30%であった。56 日以降でその割合はほぼ一定であったことから、56 日後に存在する tdTomato 陽性細胞は長寿命プラズマ細胞であると考えられた。この長寿命プラズマ細胞はほぼ全てが $B220^{nega}MHC$ クラス II^{nega} であった。またタモキシフェン投与直後、28 日後、56 日後に生存している tdTomato 陽性プラズマ細胞を分離し、RNA シークエンス解析を行った。その結果、長寿命プラズマ細胞では増殖や細胞周期に関わる遺伝子群の発現が低下していることが判明した。

長寿プラズマ細胞の蛍光ラベル



23. 長寿命プラズマ細胞の分離と分子マーカーの同定

伊勢　渉

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：プラズマ細胞，生存，抗体

緒　言

ウイルスや細菌の排除に必要不可欠な抗体分子は B 細胞から分化したプラズマ細胞によって産生される。抗体の半減期は数日から 20 日程度であるが、感染やワクチン接種後に抗体産生が数十年に渡って検出されることがある。これはプラズマ細胞の大部分は数日で死滅するのに対し、一部のプラズマ細胞が骨髄などの niche で長期に渡って生存し続けるからだと考えられている［1，2］。実際、ヒトで 50 年前に感染したと考えられる麻疹に対する抗体を作り続けるプラズマ細胞の存在が報告されている［3］。このような長期生存型（長寿命）プラズマ細胞を誘導できるかどうかがワクチンの成否を握ると考えられるが、長寿命プラズマ細胞を識別可能な分子マーカーが存在しないために研究が進展していないのが現状である。本研究では、まずプラズマ細胞の生存を追跡することで長寿命プラズマ細胞を同定できる実験系を開発した。同定した長寿命プラズマ細胞の細胞表面分子発現を解析し、特徴的な細胞表面分子発現パターンを見出した。さらに RNA シークエンス解析を行い、長寿命プラズマ細胞では増殖や細胞周期に関わる遺伝子群の発現が低下していることを見出した。本研究で得られた成果は長寿命プラズマ細胞の特性を明らかにし、ワクチンの開発や改善に役立つことが期待される。

方法および結果

1.　プラズマ細胞の生存を追跡する新規実験系の開発

プラズマ細胞特異的転写因子 *Blimp-1* 遺伝子座に *ERT2cre* をノックインした Blimp-1-ERT2cre マウスを作製し、これを Rosa-stop-tdTomato（Ai14）マウスと交配した（以下、Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスと呼ぶ）。このマウスにタモキシフェンを 3 日間投与した。脾臓や骨髄のリンパ球の tdTomato 発現を解析したところ、ほぼ全てのプラズマ細胞（$CD138^{+}$）が tdTomato 陽性だったのに対し、他のリンパ球は tdTomato 陰性であった（図 1）。この結果は、この実験系を用いることでプラズマ細胞を誘導性に、かつ特異的に蛍光ラベルできることを示すものである。

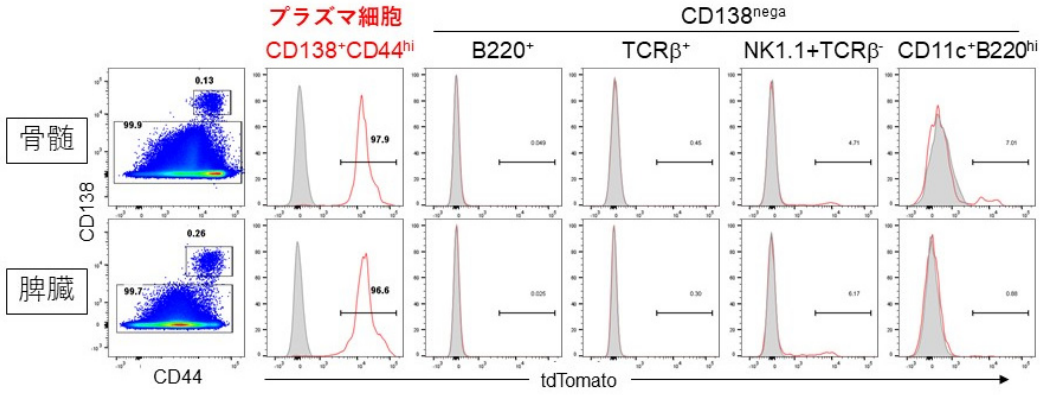


図 1. プラズマ細胞の誘導的蛍光ラベル

Bimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスに 3 日間タモキシフェンを投与した後、骨髄あるいは脾臓の $CD138^{+}$ $CD44^{hi}$ 細胞（プラズマ細胞）、$CD138^{nega}$ 細胞（非プラズマ細胞）の tdTomato 発現を解析した。

次にタモキシフェンの投与を中止し、蛍光ラベルされたプラズマ細胞の割合の変化を経時的に解析した。タモキシフェンの投与を中止して 7 日目には骨髄内に tdTomato 陰性プラズマ細胞が観察されはじめ、14 日目には tdTomato 陽性プラズマ細胞の割合は 50%にまで低下した（図 2A)。骨髄プラズマ細胞中の tdTomato 陽性細胞の割合は時間とともに減少し、56 日後には約 30%まで低下した（図 2B)。tdTomato 陽性細胞の割合はその後はほとんど変わらなかったことから、56 日以降に存在する tdTomato 陽性細胞は長寿命プラズマ細胞であると考えられた。

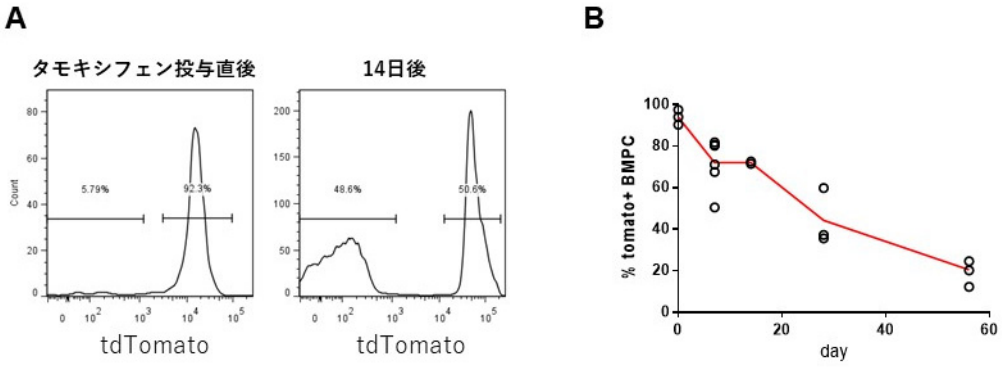


図 2. 骨髄プラズマ細胞の生存追跡

A) Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスにタモキシフェンを投与して直後と 14 日後の骨髄プラズマ細胞の tdTomato 発現。

B) Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスにタモキシフェンを投与して、7、14、28、56 日後の骨髄プラズマ細胞中の tdTomato 陽性細胞の割合。

2. 長寿命プラズマ細胞の細胞表面分子の解析

次に長寿命プラズマ細胞のマーカーを同定する目的で、骨髄プラズマ細胞を蛍光ラベルした後に細胞表面分子の発現パターンの変化を経時的に観察した。ここでは B220 と MHC クラスⅡ（MHC-Ⅱ）の発現を解析した。蛍光ラベル直後のプラズマ細胞は、$B220^{+}MHC\text{-}Ⅱ^{+}$、$B220^{-}MHC\text{-}Ⅱ^{+}$、および $B220^{-}MHC\text{-}Ⅱ^{-}$の 3 つのポピュレーションで構成されていたが、時間の経過とともに $B220^{+}MHC\text{-}Ⅱ^{+}$および $B220^{-}MHC\text{-}Ⅱ^{+}$が減少し、56 日後のプラズマ細胞のほとんどは $B220^{-}MHC\text{-}Ⅱ^{-}$であった（図 3)。以上の結果から、長寿命プラズマ細胞は $B220^{-}MHC\text{-}Ⅱ^{-}$というフェノタイプを示すことが判明した。

3. 長寿命プラズマ細胞の遺伝子発現解析

最後に長寿命プラズマ細胞の生存や機能を制御しているファクターを同定する目的で、タモキシフェン投与直後、28 日後、56 日後に生存している tdTomato 陽性骨髄プラズマ細胞を分離し、RNA シークエンス解析を行った（図 4)。得られた遺伝子発現データを基に gene set enrichment analysis を行ったところ、長寿命プラズマ細胞では増殖や細胞周期に関わる遺伝子群の発現が低下していることが判明し、quiescent な状態にあることが示唆された。また長寿命プラズマ細胞に高発現する多くの遺伝子を同定することができた。

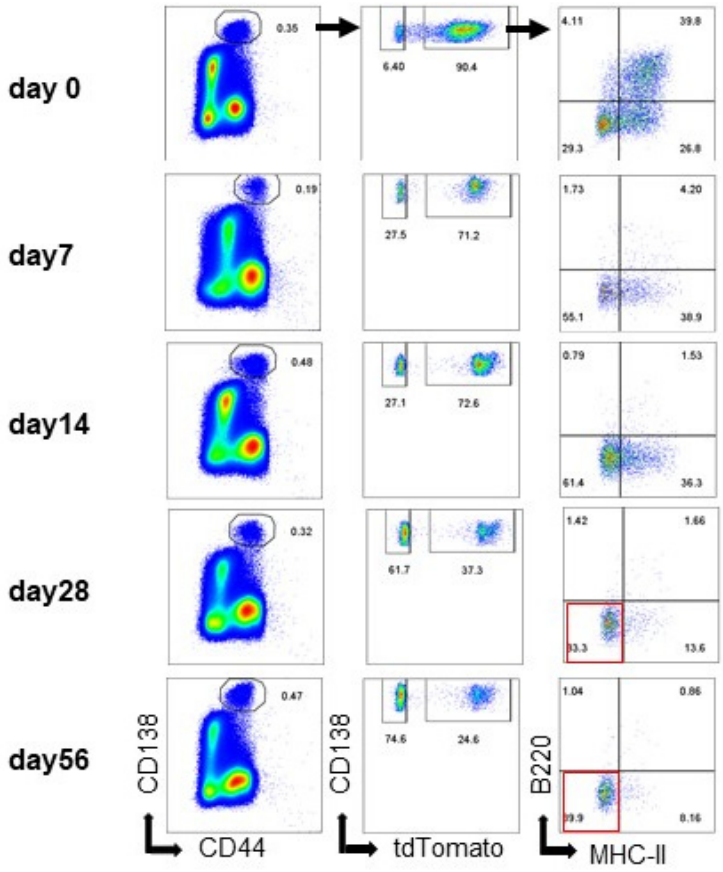


図 3. プラズマ細胞の B220 および MHC クラスⅡ発現

Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスにタモキシフェンを投与してから 7、14、28、56 日後に骨髄を採取。

骨髄プラズマ細胞（$CD138^{+}CD44^{hi}$）のうち tdTomato 陽性細胞の B220 および MHC クラスⅡ発現を解析した。

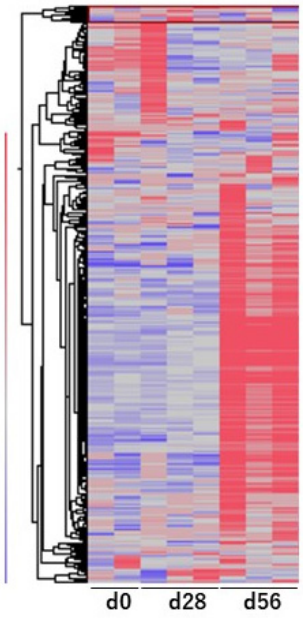


図 4. 長寿命プラズマ細胞の遺伝子発現解析

Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスにタモキシフェンを投与して直後、あるいは 28、56 日後に骨髄を採取。

骨髄プラズマ細胞（$CD138^{+}CD44^{hi}$）のうち tdTomato 陽性細胞をソーティングし、RNA シークエンス解析を行った。

考　察

本研究は、これまでその実態が不明であった長寿命プラズマ細胞の特性を明らかにすることを目的として遂行された。Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスを樹立することにより、プラズマ細胞の “fate-mapping”が可能となり、骨髄プラズマ細胞プールには常に新たなプラズマ細胞の流入があること、骨髄プラズマ細胞の全てが決して長寿命ではない、という従来の教科書的な知見とは異なる予想外の結果を得ることができた。また長期生存を果たしたプラズマ細胞を初めて同定・分離することに成功した。今後は長寿命プラズマ細胞に高発現する遺伝子の機能を解析していくことで、長寿命プラズマ細胞の生存・機能を支持する分子メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、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藤井健太郎氏、小池拓矢博士である。

文　献

1） Lightman SM, Utley A, Lee KP. Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. Front Immunol. 2019 May 3;10:965. doi:10.3389/fimmu.2019.00965. eCollection 2019. Review. PubMed PMID: 31130955; PubMed Central PMCID: PMC6510054.

2） Ise W, Kurosaki T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. Immunol Rev. 2019 Mar;288(1):64-74. doi: 10.1111/imr.12751. Review. PubMed PMID: 30874351.

3） Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, Rosenberg AF, Darce J, Gregoretti IV, Popova L, Kaminiski D, Fucile CF, Albizua I, Kyu S, Chiang KY, Bradley KT, Burack R, Slifka M, Hammarlund E, Wu H, Zhao L, Walsh EE, Falsey AR, Randall TD, Cheung WC, Sanz I, Lee FE. Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow. Immunity. 2015 Jul 21;43(1):132-45. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.016. Epub 2015 Jul 14. PubMed PMID: 26187412; PubMed Central PMCID: PMC4680845.