

学位申請論文

CD40 刺激の強度が機能的に異なる
記憶 B 細胞への分化を決定する

2019 年 9 月

小池 拓矢

目次

目次.....	1
要旨.....	2
略語.....	3
研究背景.....	5
結果.....	9
考察.....	15
実験方法.....	18
謝辞.....	22
参考文献.....	23
図表.....	30

要旨

記憶 B (B_{mem})細胞は病原体の再感染に対して生体を防御する上で極めて重要である。近年、 B_{mem} 細胞には $CD80^+$ (effector memory B: B_{EM})の集団と $CD80^-$ (central memory B: B_{CM})の集団が存在し、二次応答の際に B_{EM} 細胞は主に形質細胞へと分化して高親和性抗体産生に寄与し、 B_{CM} 細胞は主に胚中心 (GC)を形成して B_{mem} 細胞の再供給を担うという仮説が提唱された。本研究はこれらの異なる応答が細胞内在的かつ B 細胞受容体 (BCR)のアイソタイプに非依存的事であることを示した。さらに、本研究は一次応答時の B_{EM} 細胞の形成には濾胞ヘルパーT細胞、相対的に強い $CD40$ 刺激、並びに高親和性 BCR が要求されるが、一方で B_{CM} 細胞はこれらには非依存的事であることを明らかにした。また、これらの異なる B_{mem} 細胞への運命決定が $CD40$ 刺激の量的な違いによって *in vitro* 培養系で再現できることを見出した。最後に、この $CD40$ 刺激は $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性化の違いに変換され、これに伴う BATF 及び IRF4 の発現上昇が GC B 細胞の B_{mem} 細胞への分化を誘導する可能性が示唆された。

略語

略語	詳細
Bach2	BTB and CNC homology, basic leucine zipper transcription factor 2
BAFF	B cell-activation factor
BATF	Basic leucine zipper ATF-like transcription factor
BCL6	B cell leukemia/lymphoma 6
B _{CM}	central memory B
BCR	B cell receptor
B _{EM}	effector memory B
B _{mem}	memory B
CA	Constitutively active
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40 ligand
CGG	chicken gamma globulin
EBI2	Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2
FCM	flow cytometry
FDC	follicular dendritic cell
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
Ig	immunoglobulin
iGB	<i>in-vitro</i> -induced germinal center B
IL	interleukin
iMB	induced memory B
IRF4	interferon regulatory factor 4
LPS	lipopolysaccharide
MHC	major histocompatibility complex
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NP	4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl
PCR	polymerase chain reaction
PD-L2	programmed death 1 ligand 2
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
SAP97	synapse-associated protein 97
T _{CM}	central memory T

TCR	T cell receptor
T _{EM}	effector memory T
T _{FH}	T follicular helper

研究背景

記憶 B 細胞の重要性

一度感染症に罹患し回復すると、その疫から免れることは古来より知られていた。この知見に基づき、Edward Jenner は牛痘を接種することで致死性の天然痘が予防可能なことを発見し、この手法をワクチン接種と命名した。以後様々な感染症が弱毒化または無毒化した病原菌を健常人に接種することで予防出来ることが明らかにされてきた。また、ワクチン接種により天然痘を撲滅したことは医学史における最も大きな功績の一つであろう。このワクチン接種は初回感染 (一次応答)により免疫記憶が形成され、再感染時に初回感染時と比較して、迅速でより強い免疫反応 (二次応答)を起こすという機構を利用している。二次応答時の感染防御の主体は一次応答によって形成された記憶 B 細胞 (B_{mem} 細胞)による迅速な中和抗体の産生である。二次応答時に産生される抗体はクラススイッチし、より親和性の高いものであり、これは B 細胞受容体 (BCR)の親和性成熟の場である胚中心を経由して発生した B_{mem} 細胞が再感染時に抗体産生細胞である形質細胞に迅速に分化するからであると考えられている。一方で、 B_{mem} 細胞は二次応答時に再び胚中心を形成し、更に親和性成熟を経て B_{mem} 細胞を再供給することも示されてきた。このように B_{mem} 細胞は再感染時の迅速な病原菌の排除及び感染する度により質の高い免疫記憶を形成していくという点で生体防御において極めて重要である。

T 細胞依存性免疫応答における記憶 B 細胞の形成

二次リンパ組織において抗原未感作の状態では B 細胞と T 細胞はそれぞれ B 細胞領域 (B 細胞濾胞)及び T 細胞領域に局在している。しかし、抗原により活性化された B 細胞及び T 細胞は B 細胞濾胞と T 細胞領域の境界に遊走し、B 細胞は取り込んだ抗原を主要組織適合抗原複合体 (MHC)を介して T 細胞に提示し、T 細胞と長期に続く相互作用を形成する (Okada et al., 2005)。このとき、MHC-抗原ペプチド複合体と T 細胞受容体 (TCR)との反応と共に、CD40 と CD40L などの補助シグナルが相互の活性化と成熟を促す。この段階の B 細胞は CD38 と GL7 を発現する活性化前駆細胞と呼ばれるものであるが、その後、CD38 の発現を失った胚中心 B 細胞へと分化して増殖し、B 細胞濾胞内に胚中心を形成する (Taylor et al., 2012)。胚中心では抗原受容体のクラススイッチと体細胞超突然変異が起こり、その結果、多様化した B 細胞の中から抗原に高い親和性をもつ B

細胞が選択され、その一部が B_{mem} 細胞へと分化する。しかし、胚中心 B 細胞から B_{mem} 細胞への分化を誘導・制御する機構はほとんど分かっていない。

古典的な B_{mem} はこのような胚中心 B 細胞に由来する B_{mem} 細胞であるが、近年、胚中心を介さないで形成される B_{mem} の存在が示されている (Kaji et al., 2012; Taylor et al., 2012)。この B_{mem} は古典的な B_{mem} と異なり、ほとんどが IgM 型であり、体細胞超突然変異もほとんど起こっていない。それゆえ、胚中心非依存性 B_{mem} 細胞は上述の T-B 境界の活性化前駆細胞から直接分化した B_{mem} であると考えられている。

近年、胚中心 B 細胞と B_{mem} 細胞の中間の性質を持つ GC 由来記憶 B 前駆細胞 (pre- B_{mem} 細胞) の存在が報告されている (Laidlaw et al., 2017; Wang et al., 2017)。pre- B_{mem} 細胞は胚中心マーカーである GL7、FAS、及び Ephrin-B1 を発現する一方で、GC のマスター転写因子である BCL6 の発現が GC B 細胞と比較して低く、記憶 B 細胞の表面マーカーである CD38 の発現が高い。加えて、 B_{mem} 細胞と同様に細胞周期が停止していることも報告されている。さらに、胚中心の中でも濾胞性ヘルパー T 細胞 (T_{FH} 細胞) や濾胞樹状細胞 (FDC) が存在する明領域に局在する細胞の表現型 (CXCR4^{lo} CD86^{hi}) を pre- B_{mem} 細胞が示すことから、抗原や T 細胞ヘルプによる選択を受けた後に pre- B_{mem} 細胞へと分化している可能性が存在する。また、pre- B_{mem} 細胞は特徴的なケモカイン受容体の発現を示すことが報告されている。pre- B_{mem} 細胞では GC 内の局在に必要な S1PR2 (Green et al., 2011) の発現が減少する一方で、血中への移行に重要な S1PR1、濾胞辺縁部にリガンドが存在する EBI2 (Pereira et al., 2009)、及び濾胞間領域にリガンドを発現するストローマが存在する CCR6 (Rodda et al., 2018) の発現が亢進する。加えて、pre- B_{mem} 細胞が GC の辺縁部に局在することから、これらのケモカイン受容体の発現により GC 外への移行が誘導されていることが示唆される。しかし、GC B 細胞から pre- B_{mem} 細胞への移行に重要な因子は現在明らかになっていない。

記憶 B 細胞の応答

B_{mem} 細胞は二次応答の際に大量の高親和性抗体を迅速に供給する一方で、胚中心 (GC) を介して抗原への親和性が改良された B_{mem} 細胞を感染のたびに供給することも知られている。 B_{mem} 細胞の迅速な応答はそれらが発現する B 細胞受容体 (BCR) のアイソタイプ、すなわち膜型 IgG (mIgG) によるものであるとされてきた。膜型 IgM (mIgM) の細胞質ドメインが 3 アミノ酸残基のみであるのと比較

して、mIgG の相対的に長い細胞質ドメインは BCR 架橋後に Grb2 や SAP97 などのシグナル分子をリクルートする特異的なモチーフを含み、これが BCR シグナルを増強し、形質細胞分化を促進することが報告されている (Engels et al., 2009; Kaisho et al., 1997; Liu et al., 2012; Lutz et al., 2015)。しかし、ハプテン NP 特異的 mIgG1 BCR を発現するナイーブ B 細胞 (単一の IgG1⁺ 記憶 B 細胞の核から作製されたクローンマウス由来)は NP 特異的 (IgH ノックインマウス由来) IgM⁺ ナイーブ B 細胞と同程度に増殖し、どちらの B 細胞も形質細胞というよりもむしろ優先的に GC B 細胞へと分化することが報告されている (Kometani et al., 2013)。これらの観察から、B_{mem} 細胞の形質細胞分化へのバイアスは単に mIgG が決定するものではなく、例えば形質細胞抑制因子である Bach2 の低発現のような細胞内在的な状態に起因することが示唆される (He et al., 2017a; Kometani et al., 2013)。この仮説を支持するように、ヒト B_{mem} 細胞は抗原非存在下の培養でも、ナイーブ B 細胞と比較して、より形質細胞へと分化しやすいとされている (Arpin et al., 1997)。

機能的に異なる記憶 B 細胞亜集団

近年、B_{mem} 細胞の機能的特性の理解が進むにつれて、B_{mem} 細胞集団は二次応答における分化方向の違い (形質細胞または胚中心) によって異なる亜集団に分類されることが提唱されてきた。初期の報告では、B_{mem} 細胞は mIgG⁺ 及び mIgM⁺ から構成され、前者はより形質細胞に、後者は GC に分化しやすい傾向にあることが示唆された (Dogan et al., 2009; Pape et al., 2011)。しかし、近年、これに相反する論文も報告されている (McHeyzer-Williams et al., 2015)。さらなる報告において、CD80 及び PD-L2 の発現によって機能的に異なる B_{mem} 細胞亜集団に分類可能であることが提唱された。すなわち、二次応答の際に、CD80⁺ PD-L2⁺ B_{mem} 細胞は形質細胞へと分化しやすく、CD80⁻ PD-L2⁻ B_{mem} 細胞はより GC を形成するという (Zuccarino-Catania et al., 2014)。BCR アイソタイプに基づいた分類と一致して、大多数の IgG⁺ B_{mem} 細胞は CD80⁺ PD-L2⁺ の表現型を示し、IgM⁺ B_{mem} 細胞の多くが CD80⁻ PD-L2⁻ 細胞である。さらに CD73 を加えて、CD80⁺ PD-L2⁺ CD73⁺ という、形質細胞に分化しやすい B_{mem} 細胞亜集団が定義された (He et al., 2017a)。

末梢を循環する記憶 T 細胞はエフェクター記憶 T (T_{EM}) 細胞とセントラル記憶 T (T_{CM}) 細胞と命名された機能的に異なる 2 つの亜集団に分類されてきた。リン

パ節帰巢に重要な CD62L 及び CCR7 を欠失する T_{EM} 細胞は大量のエフェクター サイトカインと細胞傷害性顆粒を供給する。一方で、CD62L 及び CCR7 が発現 する T_{CM} 細胞は増殖能及び自己再生能が高い (Mueller et al., 2013)。記憶 T 細胞 のように、形質細胞へと分化しやすい B_{mem} 細胞は B_{EM} 細胞、GC を形成しやす い B_{mem} 細胞は B_{CM} 細胞と分類することができるかもしれない。

現在、2 つの B_{mem} 細胞亜集団がいかにして形成されるかは明らかになってい ない。CD80⁺ PD-L2⁺ B_{mem} 細胞は抗原へ最も高い親和性を持つ B_{mem} 集団であり、 一方で CD80⁻ PD-L2⁻ B_{mem} 細胞は最も低い集団であることが報告されている (Tomayko et al., 2010; Zuccarino-Catania et al., 2014)。また、一般的に、高い親和性 の BCR を持つ B 細胞はより形質細胞へと分化しやすく、低い親和性の B 細胞は GC を形成しやすい (Ochiai et al., 2013; Paus et al., 2006; Sciammas et al., 2011)。 BCR への突然変異の頻度及び B_{mem} 細胞の発生時期の解析を踏まえると、IgG⁺ B_{mem} 細胞や CD80⁺ PD-L2⁺ B_{mem} 細胞のような形質細胞に分化しやすい B_{mem} 細胞 の多くは GC から発生し、一方で、IgM⁺ B_{mem} 細胞や CD80⁻ PD-L2⁻ B_{mem} 細胞の ような二次応答時に GC を形成しやすい B_{mem} 細胞は大多数が GC 形成前に生じ ることが示唆される (Weisel et al., 2016)。しかし、どのようなシグナルが、異な る B_{mem} 細胞亜集団への分化方向を決定しているのかは以前不明のままである。 それゆえ、本研究はこのシグナルメカニズムの解明を試みた。

結果

CD80⁺ 及び CD80⁻ 記憶 B 細胞の特徴

過去の報告に基づいて (He et al., 2017b; Zuccarino-Catania et al., 2014)、私は IgG1⁺ B_{mem} 細胞は基本的には CD80⁺ 及び CD80⁻ の亜集団に分類できると考えた。過去の報告と一致して、ほぼ全ての CD80⁺ B_{mem} 細胞は PD-L2 と CD73 を発現しており、それゆえ、親和性成熟した集団からなると思われた (He et al., 2017b; Tomayko et al., 2010; Zuccarino-Catania et al., 2014)。一方で、CD80⁻ B_{mem} 細胞には PD-L2⁺ と PD-L2⁻、CD73⁺ と CD73⁻ が混在していた (Fig. 1a)。CD62L は B_{mem} 細胞で発現しているとされているが (Anderson et al., 2007)、CD80⁺ B_{mem} 細胞は CD62L^{low} であり CD80⁻ B_{mem} 細胞は CD62L^{high} であって、これはそれぞれ T_{EM} 及び T_{CM} 細胞と類似していた。また、いずれの B_{mem} 細胞も報告通りにナイーブ B 細胞より FAS を高く発現していたが (Anderson et al., 2007)、GC B 細胞よりは発現が低かった。さらにどちらも GC マーカーである GL7 は発現していなかった。CD80⁺ と CD80⁻ B_{mem} 細胞はそれぞれ形質細胞及び GC B 細胞へと分化運命が決定しているかを調べるために、CD80 と IgG1 の発現によって分類される 4 つの B_{mem} 細胞亜集団を免疫したマウスから単離し、IL-21 と共に CD40L 及び BAFF を発現するフィーダー細胞 (40LB) 上で培養した (Nojima et al., 2011; Takatsuka et al., 2018) (Fig. 1b)。BCR のアイソタイプにかかわらず、CD80⁺ B_{mem} 細胞は、CD80⁻ B_{mem} 細胞と比較して、より形質細胞へと分化しやすく、GC B 細胞へと分化しにくい傾向にあった。この *in vitro* の結果は以前の *in vivo* のデータと一致し (Zuccarino-Catania et al., 2014)、さらに、CD80⁺ B_{mem} 細胞と CD80⁻ B_{mem} 細胞の分化運命決定機構は細胞内在的であり、基本的には BCR のアイソタイプや抗原親和性に非依存であることを明らかにした。以上の所見に基づき、記憶 T 細胞の分類に従って (Lanzavecchia and Sallusto, 2000)、CD80⁺ B_{mem} 細胞をエフェクター記憶 B (B_{EM}) 細胞、CD80⁻ B_{mem} 細胞をセントラル記憶 B (B_{CM}) 細胞と呼ぶことにする。

T_{FH} 細胞により誘導される強い CD40 シグナルが B_{EM} 細胞の形成に必要である

次に、B_{EM} 及び B_{CM} 細胞の形成における GC の要求性を明らかにすることを試みた。過去の報告において、GC を消失する B 細胞特異的 BCL6 欠損マウスで形成された記憶 B 細胞では CD80 及び PD-L2 の発現は正常であった (Kaji et al., 2012)。

B 細胞が正常である環境下での B_{mem} 細胞形成における GC の役割を調べるために、私は T_{FH} 細胞と GC を欠失する $CD4^+$ T 細胞特異的 BCL6 欠損マウスを用いた (Kaji et al., 2012)。免疫後 6 週において、 B_{EM} 細胞の数は、 $Cd4\text{-Cre } Bcl6^{+/+}$ マウスと比較して、 $Cd4\text{-Cre } Bcl6^{ff}$ マウスでは約 10 分の 1 に減少していたが、一方で B_{CM} 細胞の数に有意な差は見られなかった。このデータから GC 環境、特に T_{FH} 細胞が、 B_{EM} 細胞の形成に特異的に重要であることが示唆された。

T_{FH} 細胞は、ナイーブ及びエフェクター T 細胞と比較して、CD40L を高く発現していることが知られている (Breitfeld et al., 2000) (Fig. 2a)。さらに、CD40 刺激は CD80 の発現を誘導するが BCR 刺激は誘導しないという知見から (Lenschow et al., 1994; Ranheim and Kipps, 1993)、CD40 を介した T_{FH} 細胞からの刺激が B_{EM} 細胞の形成を促進するのではないかと考えた。この可能性を検証するために、初めに CD40L 欠損マウスをレシピエントとして抗原特異的 (BCR-knock-in マウス由来) ナイーブ B 細胞を移入し、免疫したが、ドナー B 細胞からの B_{mem} 細胞はほとんど形成されなかった。この結果は CD40 刺激が B_{mem} 細胞の発生には不可欠であることを示した (Fig. 2b)。

次に、B 細胞の活性化を部分的に阻害する量の抗 CD40L 阻害抗体を免疫したマウスに投与した (Xie et al., 2014)。抗 CD40L 抗体投与は選択的に B_{EM} 細胞の形成に影響を与えた。クラススイッチした B_{mem} 細胞における B_{EM} 細胞の割合は免疫後 10 日と 6 週において抗体投与群で有意に減少し、実数も顕著に減少したが、6 週においてその影響はいくらか回復した (Fig. 2c, d)。対照的に、免疫したマウスへの刺激的抗 CD40 抗体の投与は選択的に B_{EM} 細胞の数を増加させた (Fig. 2 e, f)。

最後に、NP 抗原特異的 B 細胞と CD40L をノックダウンさせた (あるいは対照の) キャリアタンパク質 (OVA) 特異的 (OT-II) $CD4^+$ T 細胞とを野生型マウスに共移入し、これを NP-OVA で免疫した。クラススイッチした B_{mem} 細胞における B_{EM} 細胞の割合は CD40L をノックダウンさせた T 細胞を移入したマウスで有意に減少した (Fig. 2g, h)。これらの結果をまとめると、CD40L による刺激は B_{mem} 細胞の形成には必須であるが、 T_{FH} 細胞による高レベルの CD40 刺激が選択的に B_{EM} 細胞の形成を促進することが明らかになった。

***In vitro* における CD40 刺激の強さが *in vivo* における B_{EM} または B_{CM} 表現型細胞への分化に影響を与える**

B 細胞内在的な CD40 刺激の量が B_{EM} または B_{CM} の形成に重要であるか明らかにするために、*in vitro* 誘導性 GC B(iGB) 細胞培養を応用した(Fig. 3c) (Nojima et al., 2011)。この培養系では、外来性の CD40L と BAFF を発現させた 40LB 細胞をフィーダーとして IL-4 存在下で培養することで、ナイーブ B 細胞の著しい増殖、効率よい IgG1 へのクラススイッチ、及び GC 様 B 細胞へと分化を誘導することが可能である。加えて、これらの iGB 細胞を放射線照射したマウスに移入すると *in vivo* において B_{mem} 様細胞 [induced memory B (iMB)細胞]へと分化する。iGB 培養系で異なるレベルの CD40 刺激を与えるために、私は CD40L の発現量の異なる 40LB 亜株を樹立し、CD40L の発現量の低い方から順に 40LB-lo, 40LB-mid, 40LB-hi と名付けた (Fig. 3a)。予想通りに、40LB-hi 上で培養した B 細胞 (iGB-hi 細胞)は最も高く CD80 を発現し、一方で、40LB-mid または 40LB-lo 上で培養した iGB-mid または iGB-lo 細胞はそれぞれ中間または低いレベルの CD80 の発現を示した (Fig. 3b)。

これらの iGB 細胞を放射線照射したマウスに移入し、2週間後脾臓細胞を FCM で解析すると、それぞれの iGB 細胞はほとんどが CD38⁺ (iMB)細胞へと分化し、そのうち IgG1⁺細胞の割合は同程度であった。しかし、BCR のアイソタイプに関わらず iGB-hi 細胞由来の iMB (iMB-hi)細胞のほとんどすべてが B_{EM} 様の CD80⁺ 細胞であるのに対して、iGB-lo 細胞由来の iMB (iMB-lo)細胞の多くが B_{CM} 様の CD80⁻ 細胞であった。iGB-mid 細胞由来の iMB (iMB-mid)細胞は中間の表現型を示した (Fig. 3d, e)。加えて、iMB-hi 細胞は iMB-lo 細胞と比較して PD-L2, CD73, 及び FAS を高発現し、一方で GL7 の発現は両者で同様に低かった (Fig. 3f)。以上の結果から、iMB-hi と iMB-lo 細胞は生体内の免疫応答で形成される B_{EM} 及び B_{CM} 細胞と表現型的に酷似していた。

これらの iMB 細胞が機能的にもそれぞれの B_{mem} 亜集団に似ているかを調べるために、私は 40LB 上で IL-21 を加えてそれらを培養し、それらの分化を FCM にて解析した。その結果、BCR のアイソタイプにかかわらず、iMB-lo 細胞はより GC B 細胞へと分化し、これは培養 2 日目でより明白に観察された。一方で、培養 3 日目の結果より、iMB-hi 細胞はより形質細胞に分化することが明らかとなった。iMB-mid はそれらの中間的な性質を示した (Fig. 3g, h)。次に、免疫応答におけるこれらの iMB 細胞の *in vivo* での分化運命を調べた。アロタイプにより識別可能な B1-8 ノックインマウス(IgH 鎖がノックインされており、 λ 軽鎖と結合することで NP 抗原を認識する BCR ができるマウス) 由来の iGB-lo 及び

iGB-hi 細胞から作成された NP 結合性 iMB-lo 及び iMB-hi 細胞を同数とキャリア抗原 (CGG) で感作された T 細胞を共に野生型マウスに移入し、脾臓細胞を免疫後 10 日目に FCM で解析した (Fig. 3i, j)。その結果、大多数のドナー由来 B_{mem} 及び GC B 細胞は iMB-lo 細胞に由来していた (Fig. 3k)。NP 抗原特異的形質細胞はこの時点ではほとんど検出されなかった。これらの *in vitro* 及び *in vivo* のデータから、iMB-hi と iMB-lo は機能的にもそれぞれ B_{EM} 細胞と B_{CM} 細胞と同等であることが示された。これらのデータは、CD40 シグナルの強度が B_{mem} 亜集団の表面マーカーの発現だけではなく、二次応答時の分化方向も決定していることを示唆している。

抗原高親和性 BCR は B_{EM} 細胞への分化を促進する

上述の結果より、B 細胞が受ける CD40 刺激の量は同種抗原認識 T 細胞の CD40L の発現量によって決定されている可能性が高い。T 細胞の CD40L の発現は抗原量依存的に誘導されることが知られているので (Jaiswal and Croft, 1997)、B 細胞の抗原提示量が T 細胞の CD40L の発現量を決定し、これが最終的には B_{mem} 亜集団の方向付けをするという可能性が高いと思われる。B 細胞の抗原提示量が T 細胞の CD40L の発現を抗原量依存的に誘導することを確認するために、OT-II マウス由来 T 細胞を様々な濃度の OVA ペプチドと共に B 細胞と共培養した (Fig. 4a)。T 細胞の CD40L の発現は抗原量と正に相関して迅速に誘導され (Fig. 4b)、培養 2 日目の B 細胞の CD80 の発現もこれに相関した (Fig. 4c)。この CD80 の誘導は阻害的抗 CD40L 抗体の添加により抑制され、CD40L/CD40 相互作用が B 細胞の CD80 の誘導を引き起こすことが確認された。

免疫応答においては、抗原高親和性 BCR を持つ B 細胞が、低親和性のものより、抗原をより獲得しやすく MHC 上に抗原を提示しやすいので、高レベルの CD40L の発現を誘導できると考えられる (Schwickert et al., 2011)。BCR の親和性とこれらの分化運命の相関を調べるために、私は λ^+ B 細胞の NP 抗原への親和性が B1-8 ki λ^+ B 細胞より 10 倍高い B1-8^{hi} ki マウスを使用した (Allen et al., 1988)。アロタイプにより識別可能な B1-8^{hi} ki 及び B1-8 ki マウス由来 B 細胞を野生型マウスに共移入し、NP-CGG/alum で免疫した。免疫後 7 日において、B1-8^{hi} ki B 細胞由来 IgG1⁺ B_{mem} 細胞における B_{EM} 細胞の割合は B1-8 ki B 細胞由来のものより多かった (Fig. 4e, f)。次の実験では、低い価数で NP を結合させ、高親和性抗 NP BCR にのみ結合できるようにした NP_{med}-allophycocyanin (APC)

(Nishimura et al., 2011) を用いて、親和性の異なる BCR を発現する B 細胞を FCM にて区別した。B1-8 ki B 細胞を移入されたマウスを NP-CGG/alum で免疫し、10 日後に FCM で解析した。NP_{med} により強く染色された (NP_{med}^{hi}) ドナー由来 IgG1⁺ B_{mem} 細胞は低レベルに染色された細胞 (NP_{med}^{lo}) より B_{EM} 細胞を高頻度を含んでいた (Fig. 4g, h)。これらのデータから、高親和性の B 細胞は B_{CM} 細胞よりも B_{EM} 細胞へとより分化することが示され、これは T 細胞へより多くの抗原を提示することで高レベルの CD40L を誘導しているためである可能性が示唆された。それゆえ、BCR の親和性は CD40 シグナルの強度に依存する異なる B_{mem} 亜集団形成を初めに決定する因子である可能性が示された。

GC B 細胞から B_{EM} 細胞への分化を促進する CD40 シグナル伝達機構

私は次に B_{EM} 細胞の形成に関与する CD40 シグナルのメカニズムを探索した。NF- κ B は CD40 刺激で誘導される典型的な転写因子であり (Berberich et al., 1994)、p50/p65 ヘテロダイマーは B 細胞を刺激した際に CD80 遺伝子領域に結合し、CD80 の発現を誘導することが知られている (George et al., 2006)。これらのデータと一致して、CD40 刺激により誘導されることが知られているタンパク質キナーゼの恒常活性化 (CA) 型のうち、典型的 NF- κ B 経路を活性化する CA-IKK β は iGB-lo 細胞において CD80 の発現を誘導したが、CA-Akt または CAMKK4 は誘導しなかった (Fig. 5a)。また、抗 CD40 抗体による脾臓 B 細胞の刺激は NF- κ B サブユニットである p65/RelA の核移行を誘導し (Fig. 5b)、iGB-hi 細胞における RelA の遺伝子発現のノックダウンは細胞表面の CD80 の発現を抑制した (Fig. 5c,d)。最後に、RelA ノックダウンまたはコントロールベクターを導入した NP 特異的 B 細胞を野生型マウスに移入し、免疫すると、RelA のノックダウンは B_{EM} 細胞の形成を抑制した (Fig. 5e,f)。これらのデータから、CD40 刺激により誘導される古典的 NF- κ B シグナルは B_{EM} 細胞の形成に重要であることが示唆された。

CD40 刺激は B 細胞において IRF4 を誘導するという報告及び IRF4 欠損マウスからの骨髄由来樹状細胞では LPS 刺激後の CD80 の誘導が減弱するという報告が存在する (Saito et al., 2007; Suzuki et al., 2004)。また、一過性または中程度の IRF4 の発現は BATF や PU.1 とのヘテロダイマーを形成することで GC 関連遺伝子を誘導し、一方で持続的または高レベルの発現は IRF4 のホモダイマーを介して形質細胞関連遺伝子を誘導することも報告されている (Ochiai et al.,

2013)。それゆえ、私はこれらの転写因子が GC B 細胞において CD40 シグナルによって誘導されるか調べた。GC B 細胞を抗 CD40 または抗 BCR 抗体、または様々なサイトカインと共に培養すると、IRF4 の発現は高濃度の抗 CD40 または抗 BCR 抗体による誘導が観察されが、一方で BATF の発現は選択的に高濃度の抗 CD40 抗体で誘導された (Fig. 6a, b)。次に私は BATF および IRF4 が CD80 の誘導に関与するか調べるために、タモキシフェンで活性誘導可能な ER^{T2}-BATF あるいは ER^{T2}-IRF4 の発現ベクターを用いた。BATF の誘導的活性化は iGB-lo 細胞において CD80 の発現を誘導したが、IRF4 単独では誘導しなかった。さらに、BATF と IRF4 の共活性化は BATF 単独よりわずかに CD80 の発現を亢進させた (Fig. 6c)。加えて、IRF4 との結合が消失する BATF の変異体 (BATF-HKE) の誘導は CD80 の発現を誘導しなかった (Tussiwand et al., 2012)。これは外在的 BATF が内在的 IRF4 とヘテロダイマーを形成し、CD80 の発現を誘導していることを示唆する (Fig. 6d)。これらのデータをまとめると、強い CD40 刺激により誘導される BATF-IRF4 ヘテロダイマーが CD80 の発現を誘導することが示唆される。CD40 誘導的 CD80 の誘導と同様に、BATF 及び IRF4 の発現も IKK β の阻害剤で抑制されるため、古典的 NF- κ B 経路が BATF 及び IRF4 の発現上昇に関与している可能性がある (Fig. 6e)。

NF- κ B 経路が iGB 細胞の CD80 の発現を誘導し、in vivo で B_{EM} 細胞の形成を促進していることから、BATF-IRF4 ヘテロダイマーが強い CD40 刺激時の GC B 細胞の B_{mem} 細胞への分化に関与する可能性が考えられる。これを支持すること、免疫後 10 日の GL7⁺ Efnb1⁺ CD38⁺ GC 由来記憶 B 前駆細胞 (pre-B_{mem}) (Laidlaw et al., 2017) では、GL7⁺ Efnb1⁺ CD38⁻ GC B 細胞と比較して、BATF、IRF4、及び CD80 がより高く発現していた (Fig. 6f, g)。

考察

本研究において解析を単純化するために、 B_{mem} 亜集団を単に $CD80$ の発現によって再定義した。 B_{EM} 細胞と名付けた $CD80^+ B_{mem}$ 細胞は、その多くが $CD73^+$, $PD-L2^+$, $CD62L^{low}$ であり、形質細胞へと分化しやすく、一方で、 B_{CM} 細胞と名付けた $CD80^- B_{mem}$ 細胞は $CD73$ 及び $PD-L2$ を発現している集団と発現していない集団を含み、 $CD62L^{high}$ であり、GC B 細胞へと分化しやすかった。よって、それぞれの亜集団の表現型は以前の報告と多くの点で一致していると言える (Dogan et al., 2009; He et al., 2017b; Pape et al., 2011; Zuccarino-Catania et al., 2014)。 B_{EM} 細胞と一致する B_{mem} 細胞は、 B_{CM} 細胞と一致する B_{mem} 細胞と比較して、抗原高親和性 BCR を持つという報告、及び高親和性 B 細胞は形質細胞へと分化しやすいという報告から、親和性の違いから生じる BCR シグナルの強度の違いが B_{EM} 細胞と B_{CM} 細胞の二次応答時の分化運命を決定している可能性が考えられた (Phan et al., 2006; Zuccarino-Catania et al., 2014)。しかし、私の抗原非存在化の培養実験によって、再刺激後のこれらの B_{mem} 亜集団の分化運命は BCR のアイソタイプや親和性には依存しないことが明らかとなった。それゆえ、転写またはエピジェネティクスのプロファイルなどの細胞の状態がそれぞれの B_{mem} 亜集団の機能を定義づけている可能性が示唆される (He et al., 2017b; Kometani et al., 2013; Zuccarino-Catania et al., 2014)。

過去に、 $CD40L$ 抗体による GC の除去によって B_{EM} 細胞の割合が減少すること、及び、 B_{EM} 細胞の転写的特徴が $CD40$ 刺激をした B 細胞と相関することが報告されている (He et al., 2017b; Weisel et al., 2016)。本研究では B_{EM} 細胞の形成は T_{FH} 細胞の存在に依存し、 T_{FH} 細胞は、ナイーブ T 細胞や他のエフェクター T 細胞と比較して、 $CD40L$ を高発現していることを示した。これらの観察を基に、次に、様々な *in vitro* 及び *in vivo* の実験により、 $CD40$ 刺激の強さが B 細胞の異なる B_{mem} 亜集団への分化を決定すること、すなわち、T-B 相互作用の時の相対的に強い $CD40$ 刺激は B_{EM} 細胞への分化を引き起こし、一方で、弱い $CD40$ 刺激は B_{CM} 細胞への分化に寄与することを発見した。特筆すべきことに、私は iGB 細胞培養系を用いて、高度に複雑である GC 微小環境と $CD40$ 刺激を分離し、GC 環境に非依存的に $CD40$ 刺激の強さが異なる B_{mem} 亜集団の形成を決定することを証明した。しかし、一度活性化 B 細胞が GC 環境に入ると、 $CD40L$ を高度に発現した T_{FH} 細胞により、強く、反復した $CD40$ 刺激を受けるので、 B_{EM} 細胞へと分化することが示唆される。

強い CD40 刺激が B_{EM} 細胞の形成に重要であるという私の発見は記憶 T 細胞の形成モデルとある側面では類似する。T 細胞において、シグナルの強度が T_{EM} または T_{CM} 細胞への運命を決定する仮説が提唱されている (Daniels and Teixeira, 2015)。この仮説では、強い TCR 刺激が T_{EM} 細胞を誘導し、弱い TCR 刺激は T_{CM} 細胞を誘導すると言われている。さらに、CD4⁺ T_{EM} または T_{CM} 細胞への分化はそれぞれ転写因子である T-bet 及び BCL6 の発現により決定されるということ (Pepper et al., 2011)、及び、低親和性 TCR は BCL6 の発現を高レベルで誘導し、T-bet を抑制することも報告されている (Knudson et al., 2013)。これらのことから、TCR の親和性及びシグナルの強度が異なる転写因子を介して、記憶 T 細胞亜集団の方向を決定しているように考えられる。B 細胞の場合においては、私は BCR の親和性は、異なる抗原提示量による同種 T 細胞の CD40L の異なる発現からの異なる CD40 刺激の強さを介して、間接的に B_{EM} 及び B_{CM} の方向を決定していることを提唱する。CD40-NF- κ B-IRF4 経路が転写因子 BCL6 を抑制するという報告 (Saito et al., 2007)、及び *Bcl6* mRNA が B_{EM} 細胞と比較して B_{CM} 細胞で発現が高いという報告がされている (Zuccarino-Catania et al., 2014)。NF- κ B や下流の IRF4-BATF ヘテロダイマーが B_{EM} 細胞の形成に関わることを示す本研究のデータと共に考えると、B_{EM} と B_{CM} 細胞の形成は CD40 刺激により制御される IRF4, BATF, 及び BCL6 などの転写因子の発現レベルのバランスにより決定しているかもしれない。

B_{CM} 細胞が T_{FH} 細胞と強い CD40 刺激に非依存的に形成されることを示す本研究のデータは、大多数の B_{CM} 細胞が GC 形成前に生じるという過去の報告と一致する (Weisel et al., 2016)。しかし、体細胞超突然変異の結果、低親和性 BCR を発現する GC B 細胞が出現する可能性があり、これにより T 細胞の低レベルの CD40L の発現を誘導する可能性があるにもかかわらず、なぜ GC B 細胞は B_{CM} 細胞を供給できないのであろうか。それに関して、GC B 細胞の半分が 6 時間毎にアポトーシスを引き起こすこと (Mayer et al., 2017)、及び CD40 刺激により誘導される c-Myc の発現によりこのアポトーシスが回避できることが報告されている (Luo et al., 2018; Mayer et al., 2017)。これらのデータから、GC 期の弱い CD40 刺激はアポトーシスを回避できず、そのため B_{CM} 細胞を誘導できないことが考えられる。

本研究のデータは GC における強い CD40 刺激は B_{EM} 細胞の形成を誘導することを示している。一方で、*in vivo* における強い T 細胞ヘルプや強い CD40 刺激

が GC B 細胞の形質細胞分化を誘導するという報告がされている (Ise et al., 2018; Schwickert et al., 2011)。しかし、*in vitro* において CD40 刺激は形質細胞分化を抑制するという事実から (Randall et al., 1998; Satpathy et al., 2010)、強い CD40 刺激は直接的に形質細胞分化を誘導していないことが示唆される。CD40 刺激は ICAM-1 と SLAM の発現上昇を介して T_{FH} 細胞と GC B 細胞の継続的な相互作用を誘導することが報告されているので (Ise et al., 2018)、これにより、GC B 細胞は T_{FH} 細胞により産生されるサイトカインを高濃度で受ける可能性が生じる。IL-21 は B 細胞の形質細胞への分化を誘導し、一方で IL-21R 欠損は形質細胞分化を減弱し、B_{mem} 細胞の形成を促進することが知られている (Zotos et al., 2010)。T_{FH} 細胞は亜集団によって異なるサイトカイン産生を行うという報告から (Weinstein et al., 2016)、強い CD40 刺激は単に特定の T_{FH} サブセットからのサイトカインの影響を高めているだけかもしれない。それゆえ、IL-21 産生 T_{FH} 細胞との GC B 細胞の相互作用は、強い CD40 刺激を受けた時に、形質細胞分化を誘導すると考えられる。B_{EM} 細胞形成を誘導する T_{FH} 細胞サブセットとサイトカインは未だ明らかではないが、IL-4 と共に培養した iGB 細胞が B_{EM} 様 iMB 細胞へと分化するという私のデータから、IL-4 が一つの可能性として考えられる。

生体にとって、感染時に二つの B_{mem} 亜集団が形成される利点は何であろうか。B_{EM} 細胞は高親和性 BCR を持つので (Zuccarino-Catania et al., 2014)、高親和性抗体を産生することができる。一方で、B_{CM} 細胞は低親和性 BCR を持つが、二次応答時において、増殖能が高く、また、GC を再形成することで BCR のレパトアを再構成することができる。それゆえ、高親和性の B_{EM} 細胞とは異なり、B_{CM} 細胞は、病原体の突然変異により多様化した、より広範囲の抗原を認識することが期待される。以上をまとめると、B_{EM} 細胞による大量で迅速な高親和性抗体産生が大部分の再感染した病原体を排除し、一方で、変異を介してエピトープが変化することによりこの応答を回避した病原体は GC を介して進化した B_{CM} 細胞由来の抗体により排除されることが考えられる。

最後に、本研究の知見は新たなワクチン方法の開発に応用できるかもしれない。すなわち、免疫応答中の B 細胞の CD40 刺激を制御することにより、B_{CM} 細胞を促進することで広範囲のエピトープに応答する抗体を誘導でき、一方で、B_{EM} 細胞を促進することで迅速に応答する高親和性抗体を誘導できる可能性が期待される。

実験方法

マウス及び免疫

C57BL/6 NCrSlc (B6)マウスは三協ラボサービスより購入した。 B1-8 ki (Lam et al., 1997)、B1-8^{hi} ki (Shih et al., 2002)、*Bcl6*^{fl/fl} (Kaji et al., 2012)、*Cd4-Cre* (Lee et al., 2001)、*Cd40lg*^{-/-} (Xu et al., 1994)、OT-II マウス (Barnden et al., 1998)は B6 マウスまたはコンジェニックマウスである B6 CD45.1⁺マウスとバッククロスした。アラムアジュバンドで沈降した 100 μ g の NP₃₂-CGG または NP₁₄-OVA を i.p. でマウスに免疫した。すべての実験では、性別が一致した、7 週齢以上のマウスを使用している。すべてのマウスは SPF 環境下で飼育され、すべての動物実験は東京理科大学における動物実験規程に従っている。

フローサイトメトリー

すべてのフローサイトメトリー (FCM)において、細胞懸濁液から赤血球を ACK により除き、CD16/32 (Fc γ RII/III)抗体によって Fc レセプターへの抗体の結合を阻害した後、0.5% BSA、2 mM EDTA、及び 0.05% sodium azide を添加した PBS で希釈した Supplementary Table 1 に記述した抗体により染色した。染色した細胞は FACSCalibur または FACSCantoII (BD Biosciences)を用いて解析した。これらのデータは Flowjo (Tree Star)によって解析された。Propidium iodide または Fixable Viability Dye (eBioscience)を用いて死細胞を検出し、すべての FCM 実験においてゲートアウトした。細胞内染色には Foxp3 staining kit (eBioscience)を用いて染色の前に固定及び透過性処理した。

細胞精製及び培養

ナイーブ B 細胞は以前示した方法により精製した (Nojima et al., 2011)。ナイーブ T 細胞は OT-II マウスの脾臓細胞から赤血球を除いた後、蛍光標識された CD4、CD25、CD44、及び CD62L に対する抗体で染色し、FACSAriaII または FACSAriaIII (BD Biosciences)を用いて CD4⁺ CD25⁻ CD44⁻ CD62L⁺を単離することにより精製した。GC B 細胞は NP-CGG/alum で免疫後 7 日のマウスから以下のように精製した。いくつかの脾臓をプールした細胞を FITC 標識 GL7 抗体と抗 FITC マイクロビーズ (Miltenyi Biotec)で染色した後、GL7⁺ 細胞を MACS システム (Miltenyi Biotec)により濃縮した。濃縮した細胞は anti-CD19、anti-CD38、および anti-CD138 で染色し、GC B 細胞 (CD19⁺ CD38⁻ CD138⁻ GL7⁺)を

FACSAriaII または FACSAriaIII で単離した。

B 及び T 細胞は完全培地 [10% 非働化 fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 10 mM HEPES pH7.5, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (GIBCO) を添加した RPMI-1640 培地(Wako)]で 37°C/5% CO₂ の環境下で培養した。ナイーブ B 細胞 (5×10^6 /ml) は抗 CD40 (1C10; Southern Biotech) または IKK β 阻害剤 (BAY11-7082; Merck) と共に培養した。ソートされた T 細胞亜集団 (2.5×10^5 /ml) は PMA (20 ng/ml; Sigma) 及び ionomycin (1 μ g/ml; Sigma) で 2 時間刺激した。Th0 細胞の作成のために、ナイーブ OT-II T 細胞 (2.5×10^5 /ml) を抗 CD3 ϵ (8 μ g/ml; 145-2C11; Biolegend) 及び抗 CD28 (8 μ g/ml; 37.51; Biolegend) をコートした 6-well プレート (Corning) で 3 日間培養した後、抗体非存在下で 1 日培養した。この Th0 細胞 (1×10^6 /ml) はナイーブ B 細胞 (1×10^6 /ml) と OVA ペプチドと共に共培養された (Fig. 4a)。GC B 細胞 (1×10^6 /ml) は抗 IgM (10 or 1 μ g/ml; Jackson ImmunoResearch), 抗 IgG (10 or 1 μ g/ml; Jackson ImmunoResearch), 抗 CD40 (1C10; 10 or 1 μ g/ml), IL-4 (10 ng/ml; PeproTech), IL-21 (10 ng/ml; PeproTech) または BAFF (10 ng/ml) と 6 時間培養した。

養子免疫及び記憶 B 細胞の精製

ナイーブ B 細胞を B1-8 ki CD45.1 マウスから精製し、FCM で NP⁺細胞の割合を決定した。1 匹あたり 1×10^4 NP⁺ B 細胞を含むナイーブ B 細胞を B6 マウスに移入し、翌日 NP-CGG/alum で免疫した。4 週後、B_{mem} 細胞は以下の 2 ステップネガティブソーティングでプールした脾臓細胞から濃縮された。ビオチン標識された CD4、CD8a、CD11b、CD43、CD45.2、CD49b、及び Ter119 抗体で細胞を染色し、次に streptavidin particle DM で染色した後、iMag (BD) 及び MACS システムを用いてネガティブソーティングした。濃縮された細胞は蛍光標識された CD19、CD38、CD45.1 抗体、及び NP-BSA で染色され、B_{mem} 細胞 (すべて陽性) を FACSAriaII または FACSAriaIII で単離した。

In vivo における抗体投与

CD40 刺激を阻害するために、CD40L 抗体である MR-1 (ハイブリドーマから精製; 30 μ g/マウス) またはコントロール IgG (IR-AHT-GF, Innovative Research) を s.c. で免疫前 1 日から免疫後 5 日まで毎日投与した。CD40 刺激を活性化するために、CD40 抗体 (FGK4.5, Bio X Cell; 250 μ g/マウス) または PBS を免疫後 8 日に

i.p.で投与した。

iGB 細胞培養と iMB 細胞の作成

iGB 細胞培養と iMB 細胞作成は以前報告した方法で行った (Nojima et al., 2011)。40LB-hi は CD40L 発現ベクター(pMXs-CD40L-IRES-GFP)を 40LB に再び導入することにより作成した(Takatsuka et al., 2018)。40LB-mid 及び 40LB-lo はソーティング及び限界希釈法を用いて 40LB から作成した。40LB-mid の CD40L の発現は親株である 40LB と同等である。

In vivo での免疫のための iMB 細胞養子移入

iGB 細胞を移入して 2 週間後のマウスの脾臓細胞を FCM にて解析し、ドナー由来 (CD45.1⁺) iMB 細胞の数を同定した。In vivo における NP 抗原への応答性を調べるために、B1-8 マウス由来の iMB 細胞を含む脾臓細胞をキャリア抗原 (CGG)で感作された脾臓細胞と共に B6 マウスに共移入し、翌日 NP-CGG/alum で免疫した。

プラスミドの構造

iGB 細胞の mRNA から BATF 及び IRF4 cDNA を PCR にてクローン化した。ER^{T2} の配列を BATF 及び IRF4 cDNA の 5'-末端に PCR により形成された制限酵素配列を用いて結合させた。BATF-HKE 変異体 (H55Q、K63D、及び E77K)は PCR を用いた突然変異の導入により作成した。それぞれ ER^{T2} を融合した BATF または BATF-HKE は pMXs-IRES-GFP ベクターに組み込んだ。また、ER^{T2} を融合した IRF4 は pMXs-IRES-CFP ベクター (pMXs-IRES-GFP ベクター由来で、GFP を CFP に置換したベクター)に組み込んだ。CA-IKK β (S177E 及び S188E)、CA-Akt (E40K) 、及び CA-MKK4 (S257E, T261D)は pMXs-IRES-GFP ベクターに組み込んだ。RNAi のために、Supplementary Table 2 に羅列した shRNA の標的配列は pSIREN-GFP ベクター (pSIREN-RetroQ ベクター(Clontech)のピューロマイシン耐性遺伝子を GFP に置換したもの)に挿入した。

レトロウイルスによる形質導入

iGB 細胞におけるレトロウイルスによる形質導入は以前示した方法を用いた (Haniuda et al., 2016)。T 細胞への導入のために、ナイーブ T 細胞をプレートにコ

ートした抗 CD3 ϵ (8 μ g/mL) and 抗 CD28 (8 μ g/mL)で 36 時間刺激し、前述したスピニンフェクション法によりレトロウイルスベクターを形質導入した。In vivo において、

活性化した B 細胞へのレトロウイルスによる形質導入とそれに続くマウスへの移入は以前示された方法により実施した (Inoue et al., 2017)。簡潔に説明すると、B1-8^{hi} ki マウスを NP-Ficoll (50 μ g)により i.p.で免疫し、6 時間後にこのマウスの脾臓から B 細胞を精製し、抗 CD40 (2 μ g/ml) で 18 時間刺激する。培養した B 細胞をスピニンフェクション法によりレトロウイルスベクターを形質導入し、さらに 3 時間培養した。この B 細胞 (1×10^6)を B6 マウスに移入し。翌日 NP-CGG/alum で免疫した。

免疫ブロット解析

細胞質抽出 (CE) バッファー (10 mM HEPES pH 7.9、10 mM KCl、0.1 mM EDTA pH 8.0、0.1 mM EGTA、及び 1 mM DTT)を 4°Cで 10 分処理した後、NP-40 を最終濃度が 0.5%になるよう添加して細胞を溶解した。細胞溶解液を遠心し、上清を細胞質分画とした。沈殿物を CE バッファーで 2 回洗浄し、最終的な沈殿物を核抽出バッファー (20 mM HEPES pH7.9、400 mM NaCl、1 mM EDTA pH 8.0、1 mM EGTA、25% glycerol、及び 1 mM DTT)に懸濁後、10 分間に 1 回攪拌しながら 40 分間 4°Cで放置し、溶解した。この溶解液を遠心して上清を核分画とした。細胞質及び核分画をサンプルバッファーと混ぜ、ボイルし、そして SDS-PAGE に使用した。その後 Supplementary Table 1 に示した抗体を用いて免疫ブロット法にて解析した。

定量的 RT-PCR

RNA 抽出と cDNA への逆転写は以前に報告した方法で行った (Nojima et al., 2011)。定量的 RT-PCR は 7500 fast Real-time PCR system または QuantStudio 3 (Applied Biosystems)で行った。遺伝子の発現レベルは相対的スタンダードカーブ法で検出し、*Gapdh* の発現で標準化した。

ELISA

NP 特異的 IgG1 は以前に示した方法でプレートにコートした NP-BSA を用いて ELISA により検出した (Nojima et al., 2011)。

謝辞

本研究は東京理科大学生命科学研究所分子生物学研究部門で行われました。本研究を進めるにあたり、熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました北村大介教授に深く感謝いたします。卒業研究時より多くのご指導、ご助言を賜りました生命医学研究所堀内周助教及び羽生田圭助教に厚く御礼申し上げます。また、本研究において多くのご指導、ご助言、ご協力を賜りました、生命科学研究所の諸先生方に深く感謝いたします。実験の技術的協力をしていただいた、船津正紀氏、野本真菜氏、原田浩志氏に深く感謝します。また、きぼうプロジェクト免疫学博士課程学生支援採択者として、日本免疫学会から補助をしていただいたことに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Allen, D., Simon, T., Sablitzky, F., Rajewsky, K., and Cumano, A. (1988). Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti- hapten response. *EMBO J.* 7, 1995–2001.
- Anderson, S.M., Tomayko, M.M., Ahuja, A., Haberman, A.M., and Shlomchik, M.J. (2007). New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J. Exp. Med.*
- Arpin, C., Banchereau, J., and Liu, Y. (1997). Memory B Cells Are Biased Towards Terminal Differentiation: A Strategy That May Prevent Repertoire Freezing. *J. Exp. Med.* 186, 931–940.
- Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA- based α - and β -chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* 76, 34–40.
- Berberich, I., Shu, G.L.G., and Clark, E.E.A. (1994). Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J. Immunol.* 153, 4357–4366.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* 192, 1545–1552.
- Daniels, M.A., and Teixeira, E. (2015). TCR signaling in T cell memory. *Front. Immunol.* 6, 1–10.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 10, 1292–1299.
- Engels, N., König, L.M., Heemann, C., Lutz, J., Tsubata, T., Griep, S., Schrader, V., and Wienands, J. (2009). Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat. Immunol.* 10, 1018–1025.

- George, A.A., Sharma, M., Singh, B.N., Sahoo, N.C., and Rao, K.V.S. (2006). Transcription regulation from a TATA and INR-less promoter: Spatial segregation of promoter function. *EMBO J.* 25, 811–821.
- Green, J.A., Suzuki, K., Cho, B., Willison, L.D., Palmer, D., Allen, C.D.C., Schmidt, T.H., Xu, Y., Proia, R.L., Coughlin, S.R., et al. (2011). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P₂ maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Publ. Gr.* 12, 672–680.
- Haniuda, K., Fukao, S., Kodama, T., Hasegawa, H., and Kitamura, D. (2016). Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. *Nat. Immunol.* 17, 1109–1117.
- He, J.-S., Subramaniam, S., Narang, V., Srinivasan, K., Saunders, S.P., Carbajo, D., Wen-Shan, T., Hidayah Hamadee, N., Lum, J., Lee, A., et al. (2017a). IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nat. Commun.* 8, 641.
- Inoue, T., Shinnakasu, R., Ise, W., Kawai, C., Egawa, T., and Kurosaki, T. (2017). The transcription factor Foxo1 controls germinal center B cell proliferation in response to T cell help. *J. Exp. Med.*
- Ise, W., Fujii, K., Shiroguchi, K., Ito, A., Kometani, K., Takeda, K., Kawakami, E., Yamashita, K., Suzuki, K., Okada, T., et al. (2018). T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate. *Immunity* 48, 702–715.e4.
- Jaiswal, A.I., and Croft, M. (1997). CD40 Ligand Induction on T Cell Subsets by Peptide-Presenting B Cells. *J. Immunol.* 159, 2282–2291.
- Kaisho, T., Schwenk, F., and Rajewsky, K. (1997). The roles of γ 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* (80-.). 276, 412–415.
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., et al. (2012). Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J. Exp. Med.* 209, 2079–2097.

- Knudson, K.M., Goplen, N.P., Cunningham, C.A., Daniels, M.A., and Teixeira, E. (2013). Low-Affinity T cells are programmed to maintain normal primary responses but are impaired in their recall to low-affinity ligands. *Cell Rep.* 4, 554–565.
- Kometani, K., Nakagawa, R., Shinnakasu, R., Kaji, T., Rybouchkin, A., Moriyama, S., Furukawa, K., Koseki, H., Takemori, T., and Kurosaki, T. (2013). Repression of the Transcription Factor Bach2 Contributes to Predisposition of IgG1 Memory B Cells toward Plasma Cell Differentiation. *Immunity* 39, 136–147.
- Laidlaw, B.J., Schmidt, T.H., Green, J.A., Allen, C.D.C., Okada, T., and Cyster, J.G. (2017). The Eph-related tyrosine kinase ligand Ephrin-B1 marks germinal center and memory precursor B cells. *J. Exp. Med.* 214, 639-649.
- Lam, K.P., Kühn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073–1083.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290, 92–97.
- Lee, P.P., Fitzpatrick, D.R., Beard, C., Jessup, H.K., Lehar, S., Makar, K.W., Pérez-Melgosa, M., Sweetser, M.T., Schlissel, M.S., Nguyen, S., et al. (2001). A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15, 763–774.
- Lenschow, D.J., Sperling, A.I., Cooke, M.P., Freeman, G., Rhee, L., Decker, D.C., Gray, G., Nadler, L.M., Goodnow, C.C., and Bluestone, J.A. (1994). Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J. Immunol.* 153, 1990–1997.
- Liu, W., Chen, E., Zhao, X.W., Wan, Z.P., Gao, Y.R., Davey, A., Huang, E., Zhang, L., Crocetti, J., Sandoval, G., et al. (2012). The Scaffolding Protein Synapse-Associated Protein 97 Is Required for Enhanced Signaling Through Isotype-Switched IgG Memory B Cell Receptors. *Sci. Signal.* 5, ra54-ra54.
- Luo, W., Weisel, F., and Shlomchik, M.J. (2018). B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the c-Myc Transcription Factor in Germinal

Center B Cells. *Immunity* 48, 313–326.e5.

Lutz, J., Dittmann, K., Bosl, M.R., Winkler, T.H., Wienands, J., and Engels, N. (2015). Reactivation of IgG-switched memory B cells by BCR-intrinsic signal amplification promotes IgG antibody production. *Nat. Commun.* 13, 8575.

Mayer, C.T., Gazumyan, A., Kara, E.E., Gitlin, A.D., Golijanin, J., Viant, C., Pai, J., Oliveira, T.Y., Wang, Q., Escolano, A., et al. (2017). The microanatomic segregation of selection by apoptosis in the germinal center. *Science*. 358, 1–14.

McHeyzer-Williams, L.J., Milpied, P.J., Okitsu, S.L., and McHeyzer-Williams, M.G. (2015). Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat. Immunol.* 16, 296–305.

Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2013). Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 137–161.

Nishimura, M., Murakami, A., Hara, Y., and Azuma, T. (2011). Characterization of memory B cells responsible for affinity maturation of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies. *Int. Immunol.* 23, 271–285.

Nojima, T., Haniuda, K., Moutai, T., Matsudaira, M., Mizokawa, S., Shiratori, I., Azuma, T., and Kitamura, D. (2011). In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat. Commun.* 2, 465.

Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A.S., Klein, U., Dinner, A.R., Singh, H., et al. (2013). Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity* 38, 918–929.

Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O’Garra, A., Cahalan, M.D., and Cyster, J.G. (2005). Antigen-Engaged B Cells Undergo Chemotaxis toward the T Zone and Form Motile Conjugates with Helper T Cells. *PLoS Biol.* 3, e150.

Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., and Jenkins, M.K. (2011). Different B Cell Populations Mediate Early and Late Memory During an Endogenous Immune

Response. *Science* (80-.). *331*, 1203–1207.

Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* *203*, 1081–1091.

Pepper, M., Pagán, A.J., Igyártó, B.Z., Taylor, J.J., and Jenkins, M.K. (2011). Opposing Signals from the Bcl6 Transcription Factor and the Interleukin-2 Receptor Generate T Helper 1 Central and Effector Memory Cells. *Immunity* *35*, 583–595.

Pereira, P., Kelly, L.M., Xu, Y., and Cyster, J.G. (2009). EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *460*.

Phan, T.G., Paus, D., Chan, T.D., Turner, M.L., Nutt, S.L., Basten, A., and Brink, R. (2006). High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* *203*, 2419–2424.

Randall, T.D., Heath, A.W., Santos-Argumedo, L., Howard, M.C., Weissman, I.L., and Lund, F.E. (1998). Arrest of B Lymphocyte Terminal Differentiation by CD40 Signaling: Mechanism for Lack of Antibody-Secreting Cells in Germinal Centers. *Immunity* *8*, 733–742.

Ranheim, E.A., and Kipps, T.J. (1993). Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J. Exp. Med.* *177*, 925–935.

Rodda, L.B., Lu, E., Bennett, M.L., Luster, A.D., Ye, C.J., Cyster, J.G., Rodda, L.B., Lu, E., Bennett, M.L., Sokol, C.L., et al. (2018). Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Resource Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. *Immunity* *48*, 1014–1028.e6.

Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2007). A Signaling Pathway Mediating Downregulation of BCL6 in Germinal Center B Cells Is Blocked by BCL6 Gene Alterations in B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* *12*, 280–292.

Satpathy, S., Shenoy, G.N., Kaw, S., Vaidya, T., Bal, V., Rath, S., and George, A.

(2010). Inhibition of terminal differentiation of B cells mediated by CD27 and CD40 involves signaling through JNK. *J. Immunol.* *185*, 6499–6507.

Schwickert, T.A., Victora, G.D., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Mugnier, M.R., Gitlin, A.D., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2011). A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J. Exp. Med.* *208*, 1243–1252.

Sciammas, R., Li, Y., Warmflash, A., Song, Y., Dinner, A.R., and Singh, H. (2011). An incoherent regulatory network architecture that orchestrates B cell diversification in response to antigen signaling. *Mol. Syst. Biol.* *24*, 495.

Shih, T.A.Y., Roederer, M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Role of antigen receptor affinity in T cell-independent antibody responses in vivo. *Nat. Immunol.* *3*, 399–406.

Suzuki, S., Honma, K., Matsuyama, T., Suzuki, K., Toriyama, K., Akitoyo, I., Yamamoto, K., Suematsu, T., Nakamura, M., Yui, K., et al. (2004). Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b^{high}CD8⁻ dendritic cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 8981–8986.

Takatsuka, S., Yamada, H., Haniuda, K., Saruwatari, H., Ichihashi, M., Renauld, J.C., and Kitamura, D. (2018). IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses. *Nat. Immunol.* *19*, 1025–1034.

Taylor, J.J., Pape, K.A., and Jenkins, M.K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* *209*, 597–606.

Tomayko, M.M., Steinell, N.C., Anderson, S.M., and Shlomchik, M.J. (2010). Cutting Edge: Hierarchy of Maturity of Murine Memory B Cell Subsets. *J. Immunol.* *185*, 7146–7150.

Tussiwand, R., Lee, W.L., Murphy, T.L., Mashayekhi, M., Kc, W., Albring, J.C., Satpathy, A.T., Rotondo, J.A., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., et al. (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* *490*, 502–507.

Wang, Y., Shi, J., Yan, J., Xiao, Z., Hou, X., Lu, P., Hou, S., Mao, T., Liu, W., Ma, Y., et al. (2017). Germinal-center development of memory B cells driven by IL-9 from follicular helper T cells. *Nat. Immunol.* *18*, 921–930.

Weinstein, J.S., Herman, E.I., Lainez, B., Licona-Limón, P., Esplugues, E., Flavell, R., and Craft, J. (2016). T FH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat. Immunol.* *17*, 1197–1205.

Weisel, F.J., Zuccarino-Catania, G. V, Chikina, M., and Shlomchik, M.J. (2016). A temporal switch in the germinal center determines differential output of memory B and plasma cells. *Immunity* *44*, 1–15.

Xie, J.H., Yamniuk, A.P., Borowski, V., Kuhn, R., Susulic, V., Rex-Rabe, S., Yang, X., Zhou, X., Zhang, Y., Gillooly, K., et al. (2014). Engineering of a Novel Anti-CD40L Domain Antibody for Treatment of Autoimmune Diseases. *J. Immunol.* *192*, 4083–4092.

Xu, J., Foy, T.M., Laman, J.D., Elliott, E. a, Dunn, J.J., Waldschmidt, T.J., Elsemore, J., Noelle, R.J., and Flavell, R. a (1994). Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* *1*, 423–431.

Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D’Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* *207*, 365–378.

Zuccarino-Catania, G. V, Sadanand, S., Weisel, F.J., Tomayko, M.M., Meng, H., Kleinstein, S.H., Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat. Immunol.* *15*, 631–637.

図表

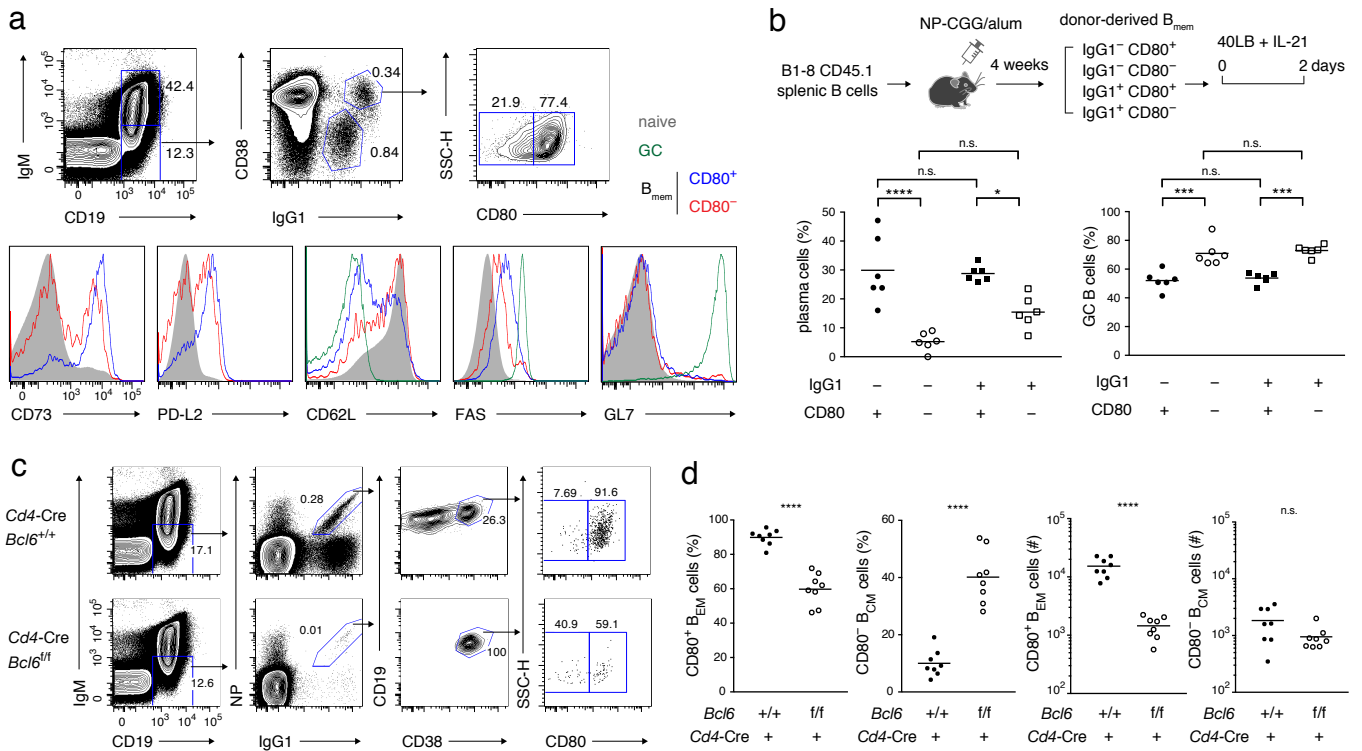


Figure 1. CD80⁺及び CD80⁻記憶 B 細胞の特徴

(a) NP-CGG/alum で免疫後 4 週の B6 マウスの脾臓細胞をフローサイトメトリー (FCM) で解析した。ナイーブ B 細胞 (CD19⁺ IgM⁺)、GC B 細胞 (CD19⁺ IgM⁻ IgG1⁺ CD38⁻)、及び CD80⁻ と CD80⁺ B_{mem} 細胞 (CD19⁺ IgM⁻ IgG1⁺ CD38⁺) のゲート法を上段に示し、それぞれの分画における各細胞表面分子の発現を下段に示した。これらのデータは 2 回の独立した実験で同様の結果が得られた。

(b) 実験プロトコルの概要 (上段)。CD45.1 B1-8 ki マウスの脾臓細胞を B6 マウス (CD45.2) に移入し、NP-CGG/alum で免疫した。4 週間後、ドナー由来 B_{mem} 細胞 (CD45.1⁺ CD19⁺ CD38⁺) を IgG1 及び CD80 の発現で 4 つの亜集団に分類し、これらをソートした後、IL-21 存在下 40LB 細胞上で 2 日間培養し、FCM で解析した。各サブセットにおける CD138⁺ 形質細胞及び CD138⁻ GL7⁺ GC B 細胞の割合を点で示した (下段; 2 回の実験を組み合わせたデータ)。

(c) 免疫後 6 週の Cd4-Cre, Bcl6^{+/+} or Bcl6^{lf} マウスの脾臓細胞を FCM で解析した。ゲートされた分画の割合は再現性のあるデータである。

(d) (c) で解析した各レシピエントの脾臓中の IgG1⁺ B_{mem} 細胞における CD80⁺ (B_{EM}) 及び CD80⁻ (B_{CM}) 細胞の割合 (%) 及び実数をプロットした (n = 8)。

各グループにおける平均値を平行線で示した (**b, d**)。 n.s.、 有意差なし($P > 0.05$); *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; One-Way ANOVA 後の Tukey's multiple comparisons test (**b**) および unpaired Student's t test (**d**)により統計解析を行った。 b 及び d 以外の全てのデータは2回の独立した実験によって再現されている。b 及び d は2つの独立した実験を組み合わせたものである。

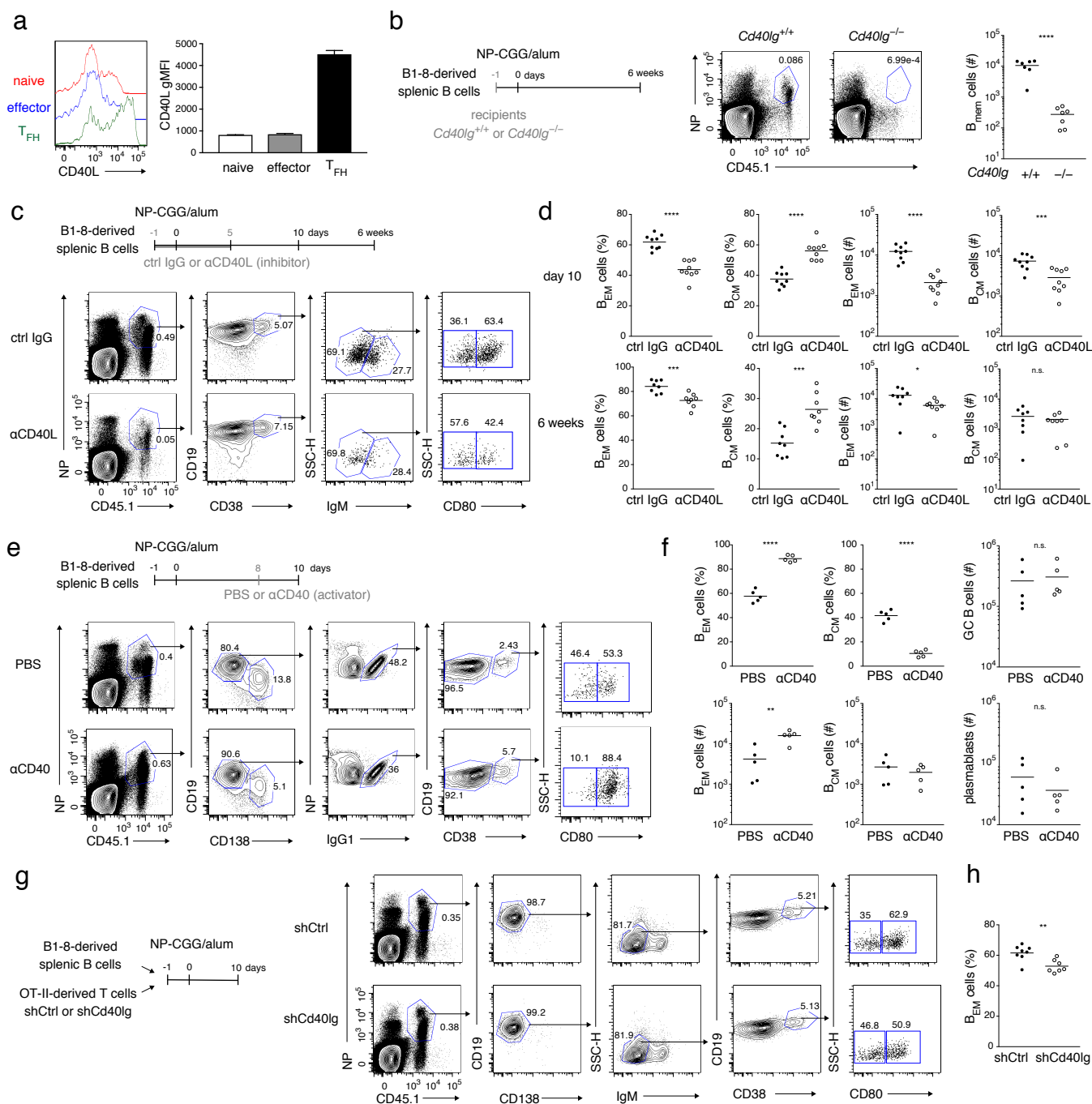


Figure 2. 強い CD40 刺激は B_{EM} 細胞の形成を促進する

(a) ナイーブ T ($CD4^+ CD62L^+ CXCR5^- PD-1^-$)、エフェクター T ($CD4^+ CD62L^- CXCR5^- PD-1^-$)、及び T_{FH} ($CD4^+ CD62L^- CXCR5^+ PD-1^+$) 細胞を NP-CGG/alum で免疫後 7 日のマウスの脾臓からソートし、PMA 及びイオノマイシンで 2 時間刺激した。各 T 細胞サブセットの CD40L の発現を FCM (左図) で解析し、中間蛍光強度 (gMFI、右図) を示した (3 サンプルの平均 + s.d.)。

(b) B1-8 ki マウス由来の脾臓 B 細胞を移入された $Cd40lg^{+/+}$ または $Cd40lg^{-/-}$ マウスを NP-CGG/alum で免疫した。6 週間後、ドナー由来 ($CD45.1^+$) NP^+ $CD19^+$ B 細胞の割合 (代表的なデータ、左図) と各個体におけるドナー由来 B_{mem} 細胞 ($CD19^+$ $CD45.1^+$ NP^+ $CD38^+$; 右図; $n = 7$) の数を FCM で解析した。

(c, d) B1-8 ki マウス由来の脾臓 B 細胞を移入された B6 マウスを NP-CGG/alum で免疫し、加えて免疫前 1 日から免疫後 5 日まで毎日、阻害的 CD40L 抗体 (MR-1; 1 mg/kg; $\alpha CD40L$) または (ctrl IgG) を皮下注射で投与した。免疫後 10 日または 6 週間後、レシピエントマウスの脾臓細胞を FCM で解析した。(c) 免疫後 10 日の代表的なデータのゲート法を示した。(d) 免疫後 10 日 (上図、 $n = 9$) または 6 週間後 (下図、 $n = 8$) のドナー由来のクラススイッチした B_{mem} 細胞 ($CD45.1^+$ NP^+ $CD19^+$ $CD38^+$ IgM^-) における B_{EM} ($CD80^+$) 及び B_{CM} ($CD80^-$) の割合 (%) 及び実数 (#) を示した。

(e, f) B1-8 ki マウス由来の脾臓 B 細胞を移入された B6 マウスを NP-CGG/alum で免疫し、加えて免疫後 8 日に PBS または CD40 mAb ($\alpha CD40$) (FGK4.5; 250 $\mu g/ml$) を i.p. で投与した。免疫後 10 日にレシピエントマウスの脾臓細胞を FCM で解析した。(e) 代表的なデータのゲート法を示した。(f) ドナー由来 $IgG1^+$ B_{mem} 細胞 ($CD45.1^+$ NP^+ $CD138^-$ $CD19^+$ $IgG1^+$ $CD38^+$) の割合 (%) 及び実数 (#)、さらにドナー由来 GC B 細胞 ($CD45.1^+$ NP^+ $CD19^+$ $IgG1^+$ $CD38^-$) または形質芽細胞 ($CD45.1^+$ NP^+ $CD138^+$) の数を示した ($n = 5$)。

(g, h) B1-8 ki B 細胞 (1×10^5) とコントロール (shCtrl) または shCd40lg を導入された OT-II T 細胞 (1×10^5) を移入された B6 マウスを NP-OVA /alum で免疫した。免疫後 10 日後、レシピエントマウスの脾臓細胞を FCM で解析した。(g) 代表的なデータのゲート法を示した。(h) (d) で定義されたドナー由来のクラススイッチした B_{mem} 細胞の割合を示した ($n = 8$)。

各グループにおける平均値を平行線で示した(b, d, f, h). 有意差なし($P > 0.05$); *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; unpaired Student's t test (b, d, f, h) により統計解析を行った。b、d、及び h 以外の全てのデータは 2 回の独立した実験によって再現されている。b、d、及び h は 2 つの独立した実験を組み合わせたものである。

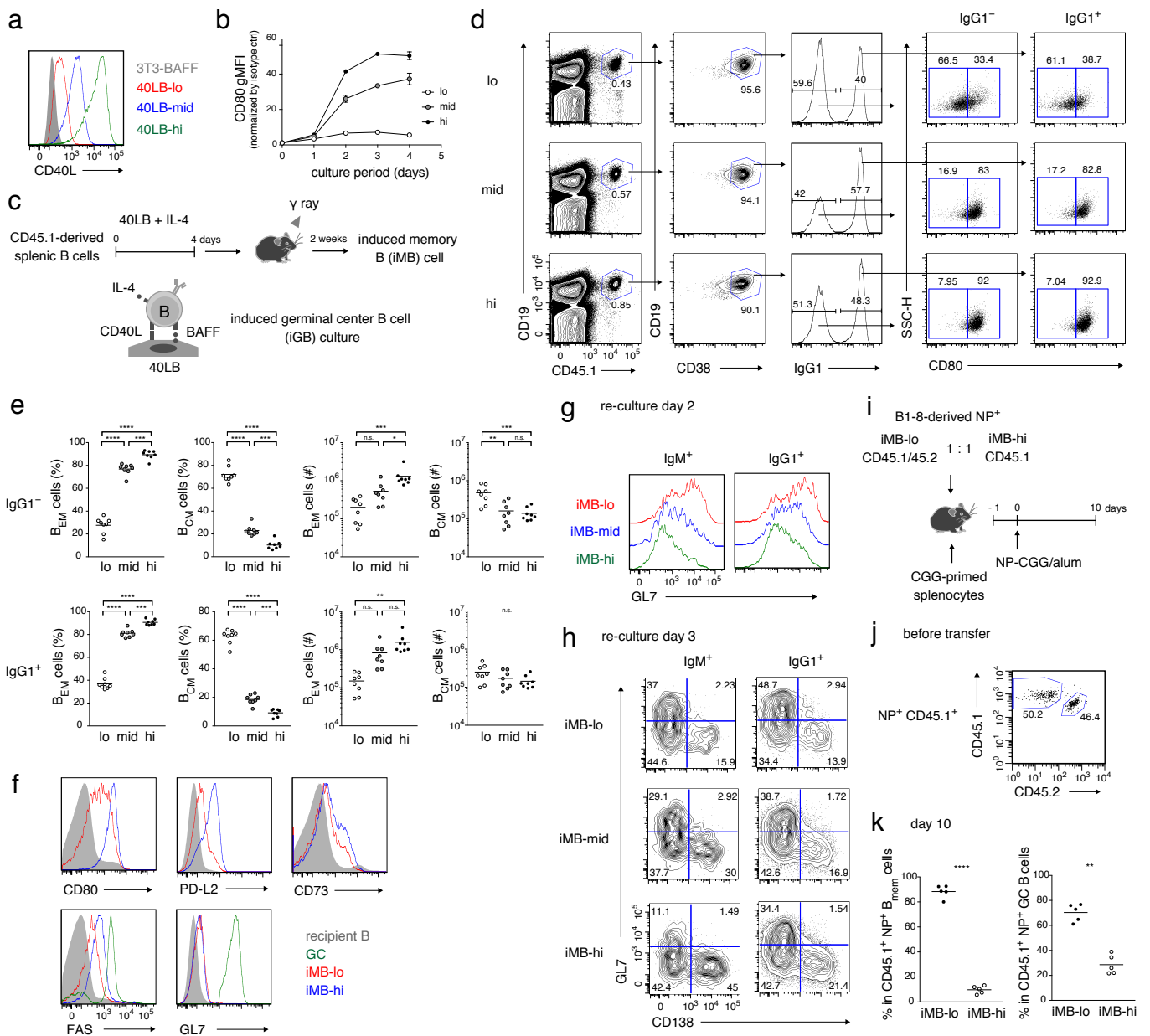


Figure 3. CD40 刺激の強度が異なる記憶 B 細胞亜集団への分化を決定する

(a) 3T3-BAFF 細胞と 40LB サブラインにおける CD40L の発現を FCM で解析した。

(b) 脾臓 B 細胞を各 40LB サブライン上で記述された日数培養し、増殖した B (iGB)細胞の CD80 の発現を FCM で解析し、gMFI を示した (3 サンプルの平均値と s.d.)。

(c) 誘導性記憶 B (iMB)細胞の作製方法の概略図。CD45.1⁺コンジェニック B6 マウス由来の脾臓 B 細胞を(b)のように 4 日間培養し、iGB-lo、 iGB-mid、または iGB-hi 細胞を γ 線照射したマウ

ス (CD45.2⁺)に移入すると、移入後 2 週において、ドナー由来 B_{mem} 様細胞 (CD19⁺ CD45.1⁺ CD38⁺)がレシピエントの脾臓で検出され、それぞれ iMB-lo、 iMB-mid、または iMB-hi 細胞と名付けられた。

(d-f) (c)の様に作成された IgG1⁺または IgG1⁻ iMB 細胞 (iMB-lo、 iMB-mid、または iMB-hi) における CD80 の発現を FCM により解析した。(d) 代表的なデータのゲート法を示した。(e) IgG1⁺または IgG1⁻ iMB 細胞における B_{EM} (CD80⁺)及び B_{CM} (CD80⁻)細胞の割合 (%)とこれらの細胞の脾臓中の実数 (#)を示した。(f)レシピエントの全 B 細胞 (CD45.1⁻ CD19⁺)、自発的に形成された GC B 細胞 (CD45.1⁻ CD19⁺ CD38⁻ GL7⁺)、iMB-lo、及び iMB-hi 細胞 (CD19⁺ CD45.1⁺ CD38⁺)における各表面マーカーの発現

(g, h) iMB 細胞を含む脾臓 B 細胞を IL-21 と共に 40LB 細胞上で 2 日または 3 日間培養した。CD45.1⁺ (iMB cell 由来) IgM⁺または IgG1⁺細胞における GL7 (g, h)及び CD138 (h)の発現を FCM により解析した。

(i-k) B1-8 ki CD45.1/CD45.2 または B1-8 ki CD45.1 iGB 細胞から (d)の様にそれぞれ誘導された iMB-lo 及び iMB-hi 細胞を NP⁺細胞を 1×10⁴ ずつ 1:1 で混合し、1×10⁷ CGG で感作された脾臓細胞と B6 マウスに共移入した。これらのレシピエントマウスを NP-CGG/alum で免疫し、10 日後に解析した。(j) 移入前の CD45.1⁺ NP⁺細胞における iMB-lo (CD45.2⁺)および iMB-hi (CD45.2⁻)の割合。(k) CD45.1⁺ NP⁺ B_{mem}細胞 (CD138⁻ GL7⁻ CD38⁺)及び GC B 細胞 (CD138⁻ GL7⁺ CD38⁻)における iMB-lo または iMB-hi 由来細胞の割合を示した。

各グループにおける平均値を平行線で示した (e, k)。有意差なし($P > 0.05$); *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; One-Way ANOVA 後の Tukey's multiple comparisons test (e)および paired Student's *t* test (k)により統計解析を行った。(e)以外の全てのデータは 2 回の独立した実験によって再現されている。(e)は 2 つの独立した実験を組み合わせたものである。

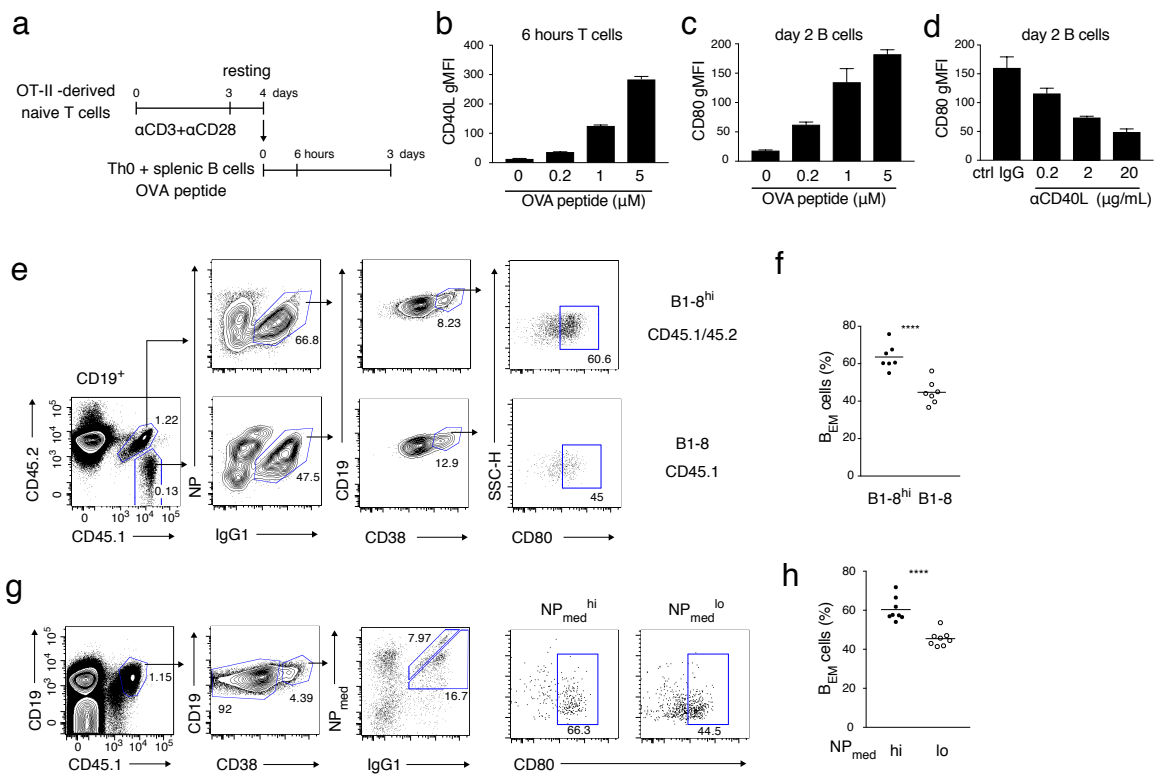


Figure 4. 高親和性 B 細胞は B_{EM} 細胞へとより分化しやすく、これは T 細胞の CD40L の発現を強く誘導するからかもしれない。

(a-d) 様々な OVA ペプチドの濃度で OT-II 由来 Th0 細胞と脾臓 B 細胞を 6 時間または 2 日間共培養し、FCM で解析した。(a) T-B 共培養の実験概要図 (b) 培養 6 時間の CD4⁺ T 細胞における CD40L の発現を gMFI で示した (3 サンプルの平均値 + s.d.)。 (c) 培養 2 日における CD19⁺ B 細胞の CD80 の発現を gMFI で示した (3 サンプルの平均値 + s.d.)。 (d) 図示された濃度の CD40L 阻害抗体存在下 5 μ M OVA ペプチドと共に 2 日間共培養した CD19⁺ B 細胞の CD80 の発現を (c) の様に gMFI で示した。

(e, f) B1-8^{hi} ki (CD45.1/45.2) および B1-8 ki (CD45.1) マウス由来の NP⁺ 脾臓 B 細胞をそれぞれ 1×10^5 ずつ B6 マウスに移入した後 NP-CGG/alum で免疫し、7 日後に FCM で解析した。(e) 代表的な FCM データのゲート法を示した。(f) それぞれ B1-8^{hi} ki または B1-8 ki 細胞由来の IgG1⁺ B_{mem} 細胞 (CD19⁺ CD38⁺) における B_{EM} 細胞 (CD80⁺) の頻度 (%) を示した (n = 7)。

(g, h) B1-8 ki B 細胞を移入した B6 マウスを NP-CGG/alum で免疫し、10 日後に FCM で免疫した。(g) 代表的な FCM データのゲート法を示した。(h) NP^{med} hi または NP^{med} lo IgG1⁺ B_{mem} 細胞 (CD19⁺ CD45.1⁺ CD38⁺) における B_{EM} 細胞 (CD80⁺) の割合 (%) を示した (n = 8)。

各グループにおける平均値を平行線で示した (f, h)。****、 $P < 0.0001$; paired Student's *t* test (f, h)

により統計解析を行った。(f)及び(h)以外の全てのデータは2回の独立した実験によって再現されている。(f)及び(h)は2つの独立した実験を組み合わせたものである。

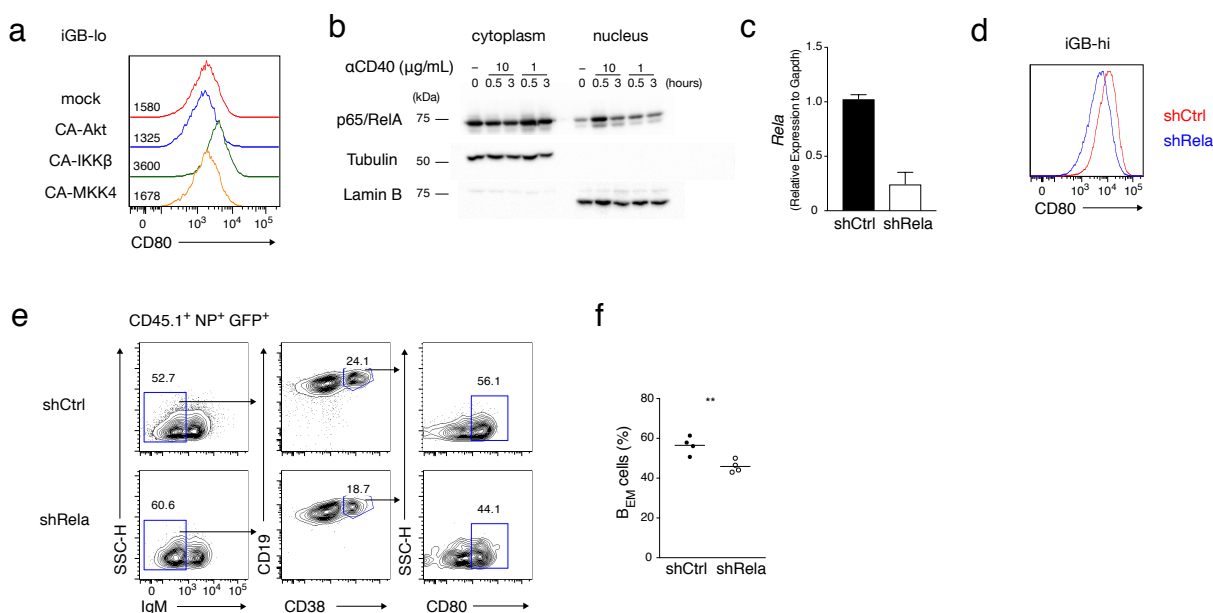


Figure 5. NF-κB シグナルは B_{EM} 細胞の形成に関わる

(a) Akt、IKKb、または MKK4 の恒常活性化 (CA)変異体を 40LB-lo 細胞上で培養した B 細胞 (iGB-lo 細胞)にレトロウイルスを用いて培養 2 日目に導入した。5 日目に FCM を用いて IgG1⁺ CD138⁻ 感染マーカー陽性 iGB-lo 細胞における CD80 の発現を解析した。それぞれのヒストグラムの数字は gMFI を示す。

(b) 図示された時間 CD40 mAb (1 または 10 mg/ml) で刺激した B 細胞の細胞質及び核抽出物を p65/RelA、Tubulin、及び Lamin B に対する抗体を用いて免疫ブロット法により解析した。

(c) shCtrl または shRela を導入した 40LB-hi 細胞上で培養した B 細胞 (iGB-hi 細胞)における RelA mRNA の発現を qRT-PCR により解析した (3 サンプルの平均値と s.d.)。

(d) (c)のように遺伝子導入した iGB-hi 細胞の CD80 の発現を FCM により解析した。

(e, f) B1-8^{hi} ki マウス由来の *In vivo* で活性化した B 細胞に shCtrl or shRela 発現ベクターを方法で示したように導入し、この B 細胞 (1×10⁶)を野生型マウスに移入した。翌日これらのマウスを NP-CGG/alum で免疫し、免疫後 10 日に脾臓細胞を FCM で解析した。(e) 代表的な FCM データのゲート法を示した。(f) 免疫後 10 日におけるドナー由来のベクターが導入されたクラススイッチした B_{mem}細胞 (CD45.1⁺ NP⁺ GFP⁺ IgM⁻ CD19⁺ CD38⁺)における B_{EM} (CD80⁺)細胞の割合 (%) (n = 4)。

各グループにおける平均値を平行線で示した(f, h)。 **, $P < 0.01$; unpaired Student's *t* test によって統計解析された。全てのデータは 2 回の独立した実験によって再現されている。

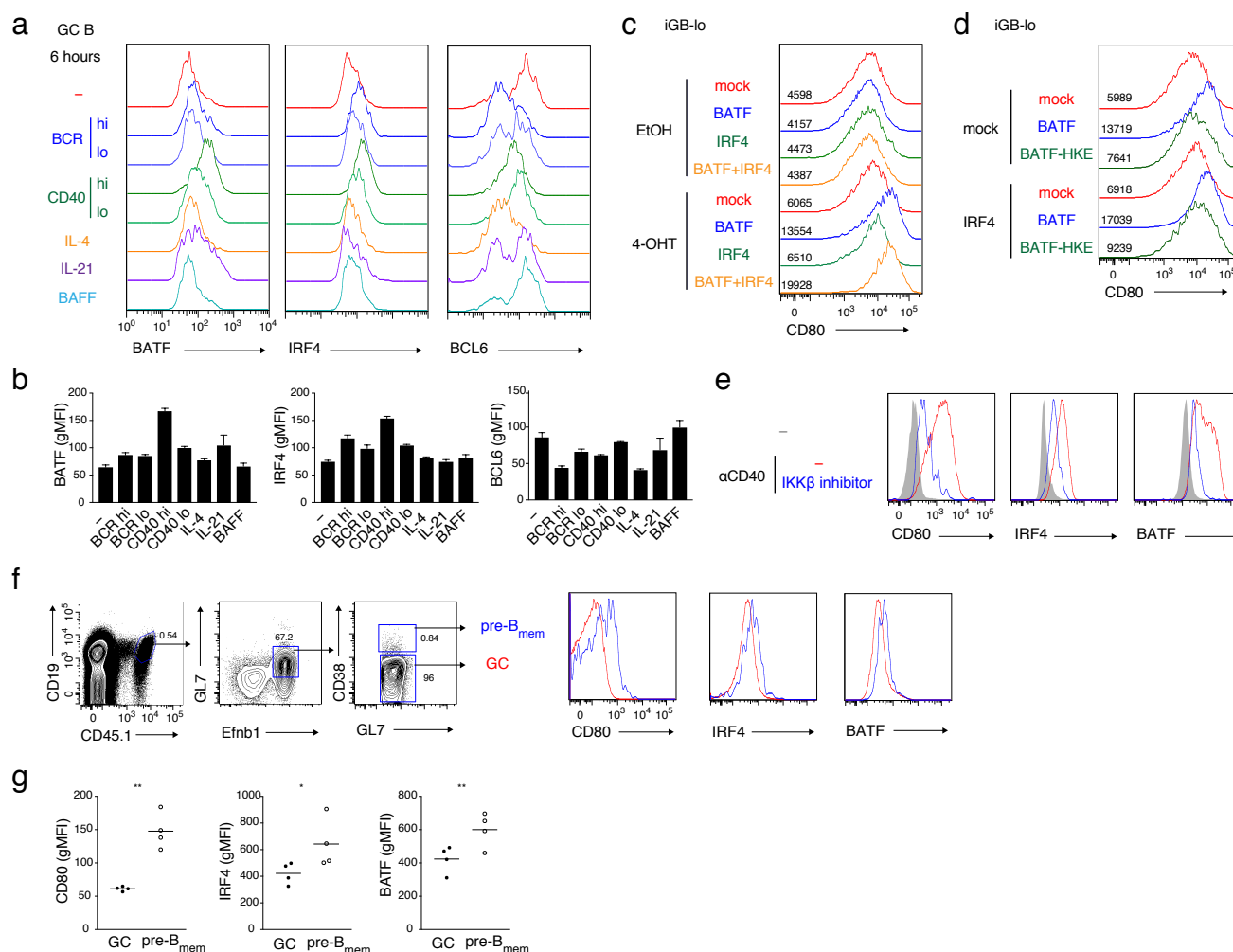


Figure 6. GC-記憶 B 前駆細胞において強い CD40 刺激が BATF-IRF4 ヘテロダイマーを誘導する

(a,b) GC B 細胞 ($CD19^+ CD138^- CD38^- GL7^+$)を NP-CGG/alim で免疫後 7 日のマウスの脾臓細胞からソートし、以下の試薬を添加または未添加 (-)で 6 時間培養した: 抗 IgM + 抗 IgG 抗体 (BCR, hi: 10 μ g/ml; lo: 10 μ g/ml)、抗 CD40 抗体 (CD40, hi: 10 μ g/ml; lo: 10 μ g/ml)、IL-4 (10 ng/ml), IL-21 (10 ng/ml)または BAFF (10 ng/ml)。これらの B 細胞 ($CD19^+ CD138^-$) における各タンパク質の発現を FCM において解析した。(a) 代表的なヒストグラム。(b) (a)で示したヒストグラムの gMFI (3 サンプルの平均値と s.d.)。

(c) 40LB-lo 細胞上で培養した脾臓 B 細胞 (iGB-lo 細胞)に培養 2 日で空ベクターまたは ER^{T2} と融合した図示された因子を導入し、3 日目から 5 日目まで 4-OHT または溶媒である EtOH を添加した。培養 5 日におけるこれらの細胞の CD80 の発現を FCM で解析し、Fig. 5(a)の様にヒス

トグラムで示した。

(d) iGB-lo 細胞に空ベクターまたは ER^{T2} と融合した図示された因子を導入し、(c)のように 4-OHT を添加した。これらの細胞の CD80 の発現を(c)のように解析した。

(e)抗 CD40 抗体 (20 µg/ml)存在下、脾臓 B 細胞を IKKβ 阻害剤 (BAY11-7082)を添加または未添加 (-) で 2 日間培養した。これらの細胞における図示されたタンパク質の発現を FCM で解析した。陰で示されたヒストグラムは培地のみで培養した細胞である。

(f, g) B1-8 ki CD45.1 マウスの脾臓 B 細胞を野生型マウスに移入し、翌日 NP-CGG/alum で免疫した。免疫後 10 日において、これらのマウスの脾臓細胞を FCM で解析した。(f) 代表的な FCM データのゲート法を示した (左図)。ドナー由来 GC B (CD19⁺ CD45.1⁺ GL7⁺ Ephrin B1⁺ CD38⁻) および pre-B_{mem} (CD19⁺ CD45.1⁺ GL7⁺ Ephrin B1⁺ CD38⁺)細胞における図示されたタンパク質の発現 (右図) (g) (f)で示したヒストグラムにおける gMFI (n = 4).

各グループにおける平均値を平行線で示した(f)。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.01$; paired Student's *t* test によって統計解析された。全てのデータは 2 回の独立した実験によって再現されている。

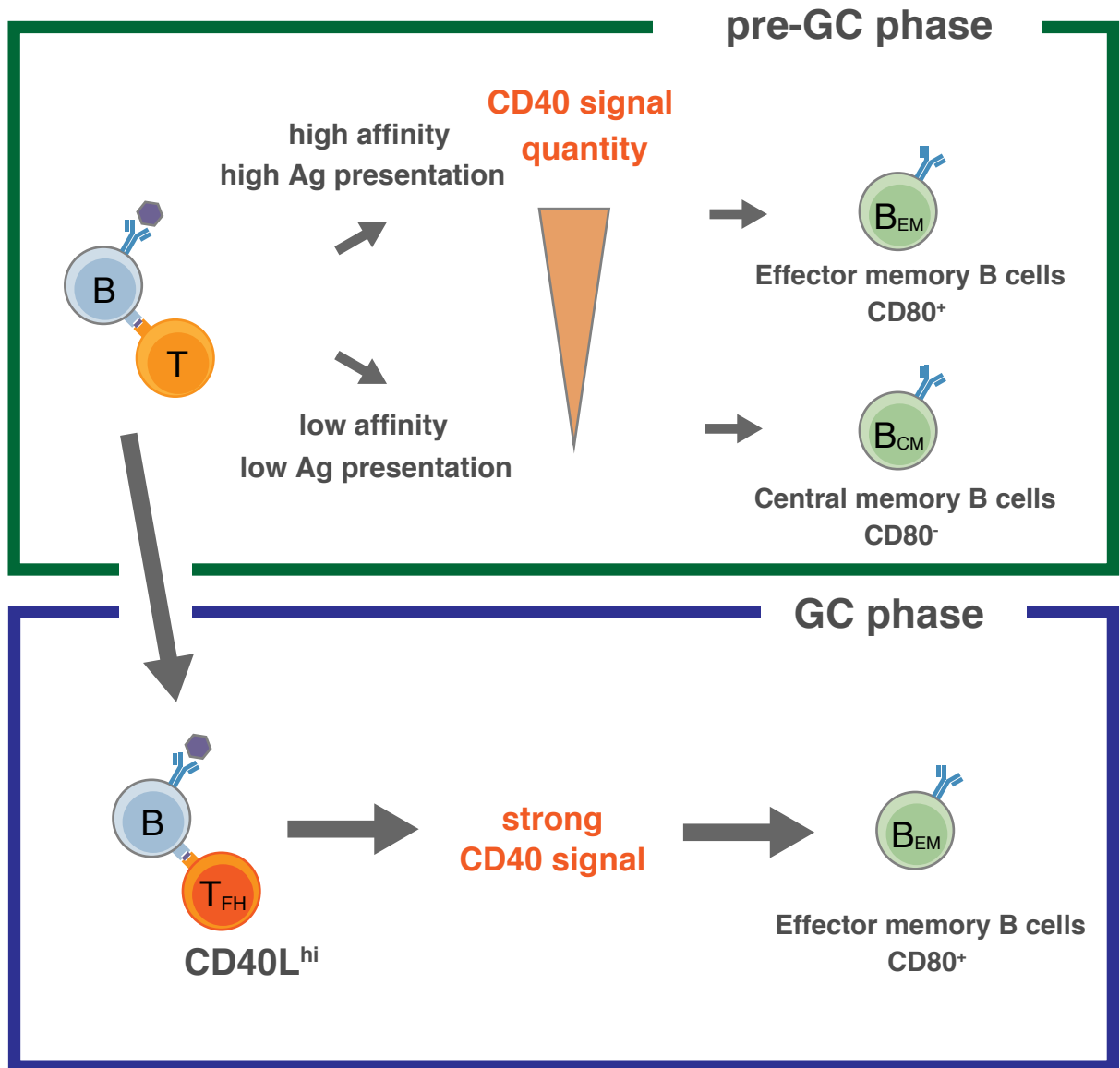


Figure 7. 本論文から提唱される B_{EM} および B_{CM} 細胞の形成モデル

pre-GC 期において、BCR の親和性や獲得された抗原の量によって T 細胞への抗原提示量が決定し、これに従い T 細胞の CD40L の発現量が決定する。これにより決定された B 細胞の CD40 刺激の量が異なる B_{mem} 細胞亜集団への分化を方向付ける。相対的に強い CD40 刺激は B_{EM} 細胞の分化に寄与し、弱い CD40 刺激は B_{CM} 細胞へ導く。一方で、GC 形成以降は T_{FH} 細胞が TCR 刺激後に高レベルの CD40L の発現を誘導するので、T_{FH} 細胞が強いレベルの CD40 刺激を誘導し、B_{EM} 細胞の分化を促進する。

Supplementary Table 1

List of antibodies and reagents used in this study.

Target or material name	Conjugates	Manufacture	Clone or product code	Application	Dilution
BATF	Unconjugated	Cell Signalling	D7C5	Flow	1:100-200
BCL6	APC	Biolegend	7D1	Flow	1:100
CD138	PE, Biotin	Biolegend	281-2	Flow	1:600
CD38	PE/Cy7, PB	Biolegend	90	Flow	1:600
CD40L	PE	Biolegend	MR1	Flow	1:600
CD45.1 (Ly5.1)	BV421	Biolegend	A20	Flow	1:600
CD45.1 (Ly5.1)	FITC	eBioscience	A20	Flow	1:200
CD45.2 (Ly5.2)	PE, BV421	Biolegend	104	Flow	1:600
CD62L	APC	Biolegend	MEL-14	Flow	1:200-600
CD80	PE	Biolegend	16-10A1	Flow	1:300
CD95 (FAS)	Biotin	BD Biosciences	Jo2	Flow	1:600
CXCR5	Biotin	Biolegend	L138D7	Flow	1:100
Efnb1	Unconjugated	R&D SYSTEMS	AF473	Flow	1:100
GL7	Biotin, PerCP-eFluor 710	eBioscience	GL7	Flow	1:120-600
GL7	FITC	Biolegend	GL7	Flow	1:120
Goat IgG	AF647	Jackson ImmunoReserch	705-605-147	Flow	1:2000
IgG1	FITC, BV421	BD Biosciences	A85-1	Flow	1:200-600
IgM	eFluor 450, FITC	eBioscience	II/41	Flow	1:200-600
IRF4	PE	eBioscience	3E4	Flow	1:2000
NP14-BSA	APC, Biotin	(In house; Fukao et al., 2014)	—	Flow	1:600
NPmed	APC	(In house; Tashiro et al., 2015)	—	Flow	1:600
PD-1	PE/Cy7	Biolegend	RMP1-30	Flow	1:200
PD-L2	Biotin	Biolegend	TY25	Flow	1:300
PD-L2	BV510	BD Biosciences	TY25	Flow	1:300
Rabbit IgG	APC	Cell Signalling	4414S	Flow	1:2000
SA	BV421, BV510	Biolegend	405226, 405233	Flow	1:200-600
CD19	APC/Cy7, Biotin	Biolegend	6D5	Flow, Purification	1:200-600
CD4	FITC, Biotin	Biolegend	GK1.5	Flow, Purification	1:200-500
GL7	BV421, FITC	BD Biosciences	GL7	Flow, Purification	1:100-600
TER-119	PerCP/Cy5.5, Biotin	Biolegend	TER-119	Flow, Purification	1:200-600
CD11b	Biotin	Biolegend	M1/70	Purification	1:200
CD43	Biotin	BD pharmingen	S7	Purification	1:173
CD49b	Biotin	Biolegend	DX5	Purification	1:500
CD8a	Biotin	Biolegend	53-6.7	Purification	1:200-500
Gr-1	Biotin	Biolegend	RB6-8C5	Purification	1:200
H-2Kd	Biotin	Biolegend	SF1-1.1	Purification	1:100
IgD	Biotin	Biolegend	11-26c.2a	Purification	1:100
IgM	Biotin	Biolegend	RMM-1	Purification	1:100
Lamin B	Unconjugated	Santa Cruz biotechnology	B-10	Immunoblotting	1:1000
mouse κ light chain	HRP	Southern Biotech	1050-05	Immunoblotting	1:5000
p65/RelA	Unconjugated	Cell Signalling	D14E12	Immunoblotting	1:2000
Rabbit IgG	HRP	Jackson ImmunoReserch	711-035-152	Immunoblotting	1:5000
Tubulin	Unconjugated	Sigma	T-6074	Immunoblotting	1:1000

Supplementary Table 2

List of primers for qRT-PCR

Target	sence or antisence	sequence (5'-3')
Gapdh	sence	GGAGAAACCTGCCAAGTATGA
	antisence	CCCTGTTGCTGTAGCCGTATT
Rela	sence	CCCAGACCGGAGTATCCAT
	antisence	GCTCCAGGCTCTCGCTTCTT

List of target sequences of shRNA

Target	Taget sequence (5'-3')
shCtrl (shLuciferase)	GTGCGTTGCTAGTACCAA
shCd40lg	GAATTACAAGCTGGTGCTTCT
shRela	GGACCTATGAGACCTTCAAGA