

B 細胞特異的 Menin 欠損がインフルエンザワクチン誘導性胸腺依存性抗体応答に及ぼす影響

医科学研究 I レポート

氏名：河野真之介

学籍番号：5101043Y

所属研究室：感染防御学

指導教員氏名：新中須亮准教授、山下政克教授

【要約】

本研究では、細胞老化関連遺伝子 MENIN の B 細胞における役割を、インフルエンザワクチンに対する胸腺依存性(T cell dependent; TD)免疫応答を指標として解析した。C57BL/6 を背景とした対照群マウス及び B 細胞特異的 Menin 欠損マウスに対して A 型インフルエンザ H1N1 Narita 株由来ワクチンを腹腔へ投与した。免疫後 2 週及び 4 週の血清を用いて ELISA により抗体応答を評価し、免疫後 3 週の脾臓を用いてフローサイトメトリーにより B 細胞の分化状態を解析した。本研究によって Menin がワクチン誘導性液性免疫の成立過程において、B 細胞の活性化に影響を及ぼす可能性を検討した。

【緒言】

獲得免疫において、B 細胞は抗体を産生する主要な細胞であり、病原体への感染やワクチン接種によって誘導される液性免疫の中心的な役割を担っている。B 細胞は抗原による刺激を受けると活性化し、胚中心反応を経て、クラススイッチや体細胞高頻度突然変異を起こすことで、より高い親和性をもつ抗体を産生する形質細胞へと分化する。この過程には CD4 陽性 T 細胞、特に濾胞性ヘルパー T 細胞からのヘルプが必要であり、胸腺依存性 (T cell dependent; TD) 抗原応答として知られている。(文献 1.2)

一方、Menin は MEN1 遺伝子の産物であり、これまで主に腫瘍形成との関連から研究されてきた細胞老化関連遺伝子である。(文献 3) 近年では、免疫細胞においても重要な役割を果たすことが明らかになってきており、特に T 細胞では過剰な活性化や疲弊を抑制する因子として働くことが報告されている。(文献 4.5) しかし、B 細胞における Menin の機能については、抗原刺激後の分化過程や胚中心反応、形質細胞への分化などにどのような影響を与えるのかは不明である。

インフルエンザウイルスに対する防御免疫は主に抗体応答に依存しており、ワクチン接種によって誘導される抗体の量や質が免疫効果を左右する。そのため、インフルエンザワクチン応答を解析することは、B 細胞における胸腺依存性抗体応答の制御機構を理解するうえで有用であると考えられる。(文献 6.7)

そこで本研究では、B 細胞特異的 Menin 欠損マウス(mb1-cre を用いた Menin 欠損マウス)を用い、H1N1 Narita 株ワクチン接種後の中和抗体の標的になるヘマグルチン(HA)に対する抗体応答を血清 ELISA により評価するとともに、フローサイトメトリーを用いて HA 特異的 B 細胞分化の解析を行った。これらの結果から、Menin が胸腺依存性抗体応答において果たす役割について検討した。

【実験方法】

・使用動物および免疫誘導

動物は C57BL/6 バックグラウンド Menin flox マウス/Mb1-cre ノックインマウス交配マウス (B 細胞特異的 Menin 欠損マウス) 及び Mb1-cre ノックインマウス (対照マウス) 各 8 匹 (ELISA 用各 4 匹、フローサイトメトリー用各 4 匹) を使用した。本実験では A 型インフルエンザウイルス H1N1 Narita 株の不活性全粒子ビリオン(ワクチン) 5 μ g を腹腔内(IP)投与により接種し、免疫誘導を行った。

・抗体価測定

この実験では ELISA 法を用いて抗体価を評価した。ELISA 法とは試料溶液中に含まれる目的の抗原または抗体を、特異抗原あるいは抗体で捕捉するとともに、酵素反応を利用して検出、定量する方法である。(文献 8)

試料には、「ワクチン接種を行なった免疫誘導野生型マウス(対照)群および Menin 欠損マウス群各 4 匹から回収した 2 週、4 週の血清を用いた。アイソタイプ(サブクラス)についての評価は、IgM、総 IgG、IgG2b、IgG2c で行った。

ELISA 法の実験方法として、抗原抗体反応の組み合わせによって直接法、間接法、サンドウィッチ法、競合法があるが、本実験では(間接法)を用いた。まず、96 ウェル ELISA プレートの各ウェルに対してストレプトアビジンを 10u/ml 50 μ L/well ずつ加え、室温にて 2 時間静置し、プレート表面に固相化させた。反応終了後、Wash buffer(PBS-tween20 ; PBS-T) 200 μ L/well を用いてウェルを洗浄し、未結合のストレプトアビジンを除去した。その後、非特異的な吸着を防止するためにストレプトアビジンが結合していない余白部分を埋める目的で、ブロッキング buffer を 100 μ L/well で添加した。本実験ではブロッキング剤として 3%BSA(牛血清アルブミン)-PBS-T を使用した。室温 1 時間のブロッキング反応完了後、液を捨てて Wash buffer 200 μ L/well にて再度洗浄を行った。次にビオチン標識を行った Narita 株由来 HA(ヘマグルチニン)抗原(Biotin-Narita HA)を 100ng/well で各 well に添加した。ストレプトアビジンとビオチンは極めて強力に結合するため、これによって抗原がプレート上に抗原決定基(エピトープ) free の状態で安定して固定される。反応後、過剰な Biotin-Narita HA を除去するため、Wash buffer(200 μ L/well x3 回)による洗浄を行った。

対照群 4 匹及び Menin 欠損 4 匹由来の各血清について、50 倍希釈をスタートとしてブロッキングバッファーを用いて 7 倍希釈による 4 段階希釈で調整後、50 μ L/well 室温 2 時間で反応させた。また、定量的な比較を可能にするため、免疫 6 週後のコント

ロールマウス由来血清をプールし、任意単位(AU)のスタンダードとして使用した(30倍希釈をトップに3倍希釈の7段階希釈+empty 1 well)。反応後、プレートを wash buffer で洗浄し、それぞれのアイソタイプ抗体と対応する HRP 標識された二次抗体を添加した。二次抗体はブロッキングバッファーを用いて 3000 倍希釈し、50 μ L/well で室温 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄バッファーを用いて合計 3 回の洗浄を徹底して行い、未反応の二次抗体を完全に除去した。最後に酵素基質を添加し発色後、1N の塩酸にて反応を停止した。吸光度については ELISA プレートリーダー (OD450) (BioRad 社)で測定し、Excel(Microsoft 社)および GraphPad Prism(グラフパッド・ソフトウェア)を用いて抗体価および統計解析およびグラフ作成を行った。統計解析では、2 群間の比較には対応のない t 検定(unpaired t-test)を用い、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を統計学的有意差あり、また有意差なしの場合、ns(not significant)とした。

・フローサイトメトリー

この実験ではフローサイトメーター(ベックマン・コールター社 CytoFlex)を使用してワクチンにより活性化誘導された B 細胞の細胞レベルでの評価を行った。フローサイトメトリーは細胞を混濁したサンプルから、含まれる細胞数、個々の細胞が発現するタンパク質など複数のパラメーターを同時に測定することができる。細胞の特性を迅速に正確に読み取れることができ、不均一な細胞集団から個々の細胞に関する非常に多くの情報を得られる。フローサイトメトリーは細胞を一行に並べて抗原の前に流し、個々の細胞が通過した際の抗原の散乱や発する蛍光を様々な波長で計測できるフローサイトメーターという機械を用いて測定を行う。検出する粒子や細胞は検出するレーザー波長に合った傾向色素で標識されなければならない。(文献 9)

「実験動物及び免疫誘導」で示した対照群マウスおよび Menin 欠損マウス群各 4 匹については、免疫 3 週間後脾臓について解析を行った。脾臓をすりつぶしたのち RBC lysis buffer を用いて赤血球を溶血させ、その後フィルターを通して細胞を単離したものをサンプルとして使用する。各 2×10^6 個の細胞について、2 種類の組み合わせで染色を行い(染色 1 : 7-AAD、PE 標識インフルエンザ HA プローブ、APC 標識インフルエンザ HA プローブ、PE-Cy7 標識 GL7、BV421 標識 CD38、FITC 標識総 IgG、APC-Cy7 標識 IgD、BV510 標識 B220 / 染色 2 : 7-AAD、PE 標識インフルエンザ HA プローブ、APC 標識インフルエンザ HA プローブ、PE-Cy7 標識 IgG2b、BV421 標識 CD38、FITC 標識 IgG2c、APC-Cy7 標識 IgD、BV510 標識 B220)、染色は氷上で 30 分間染色後、Facs buffer (PBS+BSA+EDTA)で反応しなかった余剰抗体を洗浄して、フローサイトメーターを用いてデータの習得を行った。データの解析を行う際、

Flowjo(BD 社)解析用ソフトウェアを使用した。

【結果】

本実験では、B 細胞特異的 Menin がインフルエンザに対する胸腺依存性抗体応答に及ぼす影響を解析した。実験全体の解析スケジュールは図 1 に示す。ELISA による抗インフルエンザ HA 抗体価の解析では、まず免疫 2 週間後の抗 HA IgM および総 IgG の抗体価を評価したところ、Menin 欠損群の IgM について抗体価が 2.0 倍高かった(図 2A 左)。一方、総 IgG 抗体価では、Menin 欠損群は対照群よりも全体的に抗体価が低く、対照群に比べ、約 9.0 倍抗体価が低かった(図 2B 左)。また、4 週目の血清については、総 IgG 抗体価では、Menin 欠損群と対照群での差は認められなかった(図 2B 右)。4 週目の IgM 抗体価については、対照群については、2 週目に比べ、約 1/10 レベルに低下していたのに対し、Menin 欠損群の IgM については、2 週目に比べ約 2/3 程度の低下で、4 週目での Menin 欠損群と対照群の比較では、欠損群が 7.1 倍高い傾向(有意差なし)にあった(図 2A 右)。

次に、総 IgG 抗体内での抗体サブタイプのバランスについての評価を行う目的で、インフルエンザウイルスによる刺激により優位に誘導される IgG 2b と IgG2c(Balb/c における IgG2a)に着目し、それぞれ評価を行った。2 週目の血清においては、IgG2b、IgG2c とともに Menin 欠損群で対照群よりもそれぞれ 3.9 倍(有意差なし)、17.4 倍抗体価が低かった(図 2C 左、図 2D 左)。一方、4 週目の血清については、Menin 欠損群 IgG2b では対照群との差はみられず、IgG2c に関しては、Menin 欠損群で 3.9 倍抗体価が低い傾向(有意差なし)にあった(図 2C 右、図 2D 右)。

フローサイトメトリーによるワクチン接種後 3 週間の脾臓での B 細胞レベルでの解析では、まず、対照群と Menin 欠損群マウスにおける HA 反応性 B 細胞について評価をおこなった。その結果、対照群と Menin 欠損群マウスの間では HA 特異的 B 細胞数に差はみられなかった(図 3A 左)。その他にナイーブ/記憶 B 細胞分画(B220+HA+CD38+GL7-)および胚中心 B 細胞分画(B220+HA+CD38-GL7+)についても解析をおこなったところ、対照群と Menin 欠損群マウスの間で差は認められなかった(図 3A 中、図 3A 右)。

一方、IgG にクラススイッチした細胞の割合について評価したところ、胚中心 B 細胞での差が認められなかった(図 3B 左)のに対し、ナイーブ/記憶 B 細胞では Menin 欠損群で高かった(対照群 30%、欠損群 59%)。次にナイーブ/記憶 B 細胞分画および胚中心 B 細胞分画での IgG2b および IgG2c クラススイッチ細胞の割合について解析をおこなった。Menin 欠損群における IgG 2b 細胞の割合は、ナイーブ/記憶 B 細胞分画

(28%)および胚中心 B 細胞分画(55%)いずれにおいてもそれぞれ対照群のナイーブ/記憶 B 細胞分画(14%)および胚中心 B 細胞分画(35%)よりも高い傾向にあった。一方、Menin 欠損群での IgG 2c 細胞については、対照群に比べ胚中心 B 細胞においてやや低い割合傾向(有意差なし)ではあったものの大きな差は認められなかった。

なお、本課題における遺伝子改変マウスを用いた動物実験は担当教員(新中須先生)が実施し、私は野生型マウスを用いた模擬実験を行った。また、動物実験以外の実験操作および解析は、基本的に私が担当した。

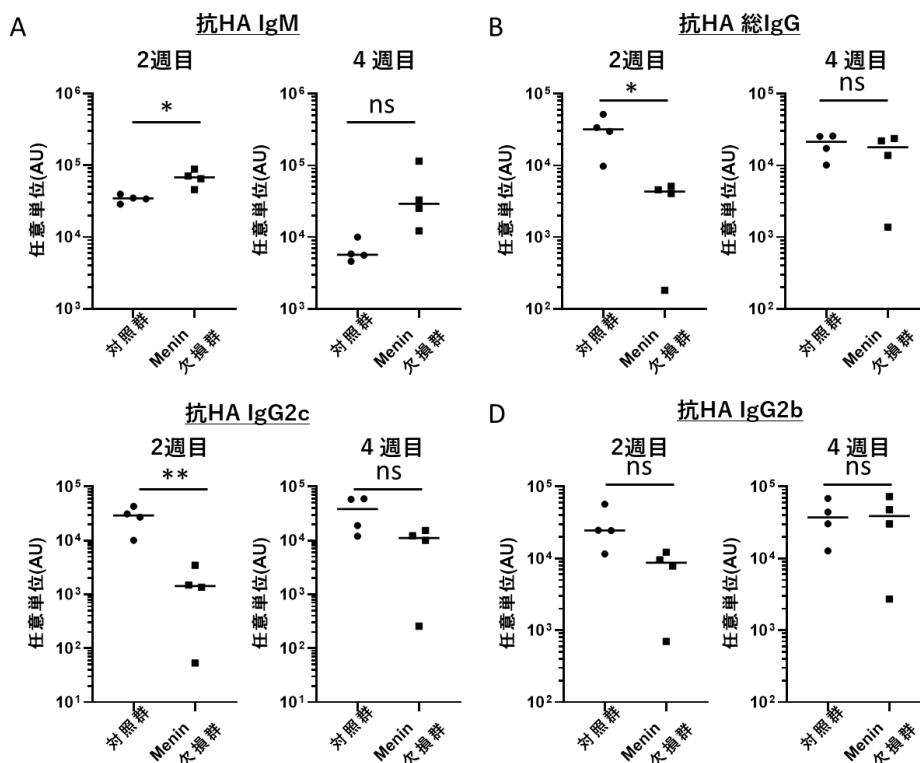
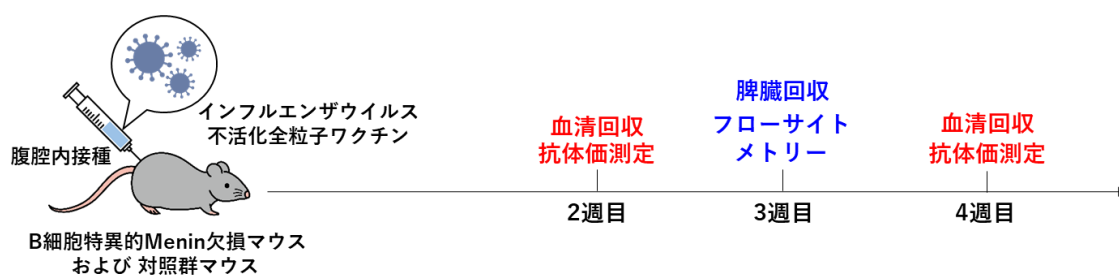
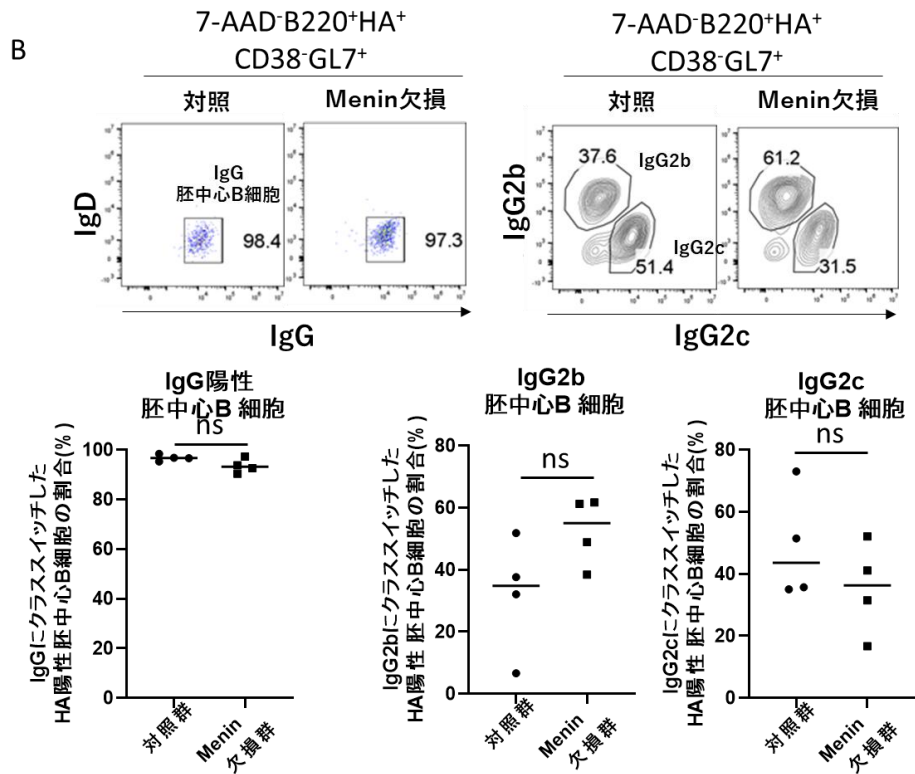
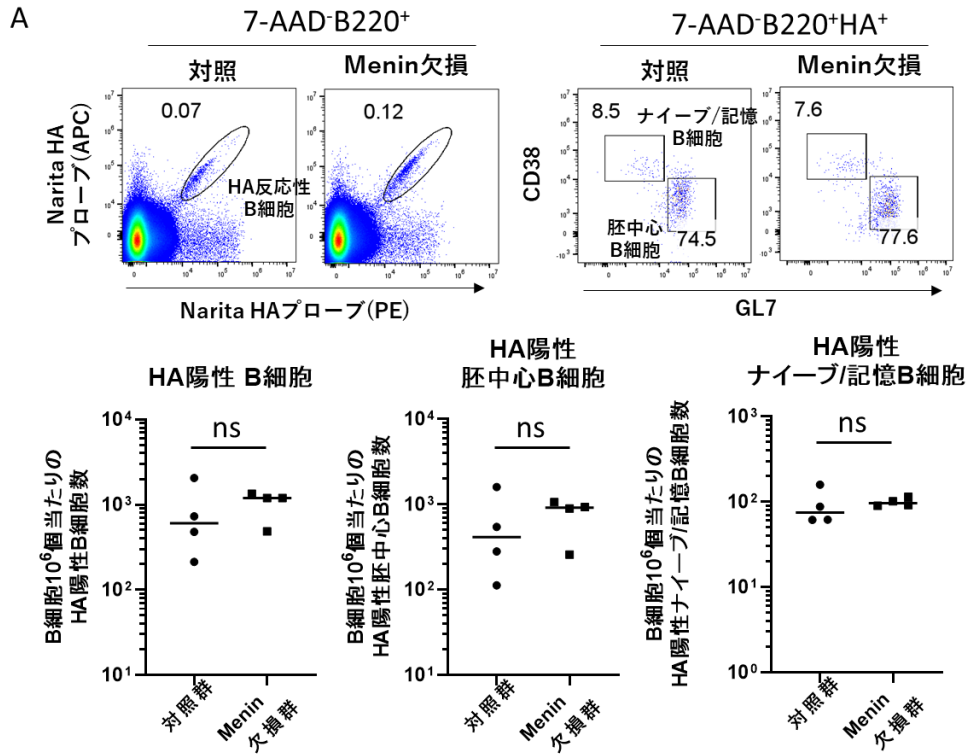


図2 ワクチン接種2週目および4週目におけるMenin欠損B細胞マウスの抗HA抗体応答の変化



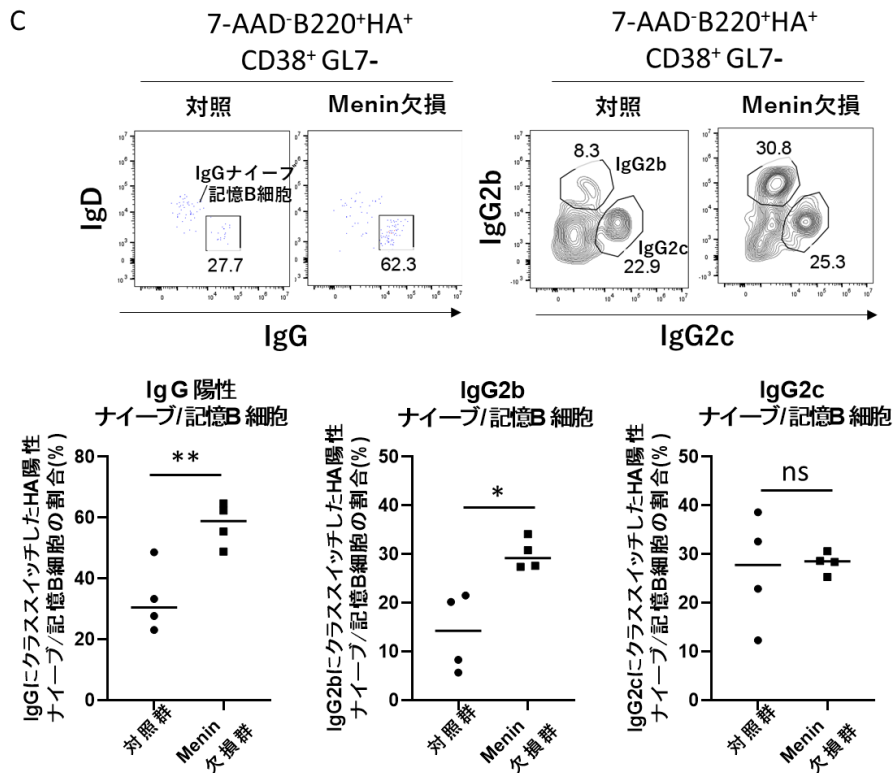


図3 ワクチン接種後の脾臓におけるB細胞応答の細胞学的評価

- A) インフルエンザウイルスHA特異的B細胞の代表的なFCMパターン(上図)と絶対数(下図)
 B) HA特異的胚中心B細胞分画におけるクラススイッチ(IgG)B細胞のFCMパターン(上図)と割合(下図)
 C) HA特異的ナイーブ/記憶B細胞分画におけるクラススイッチ(IgG)B細胞のFCMパターン(上図)と割合(下図)

【考察】

本実験では、B細胞特異的 Menin 欠損がインフルエンザワクチン(HA 抗原)に対する胸腺依存性(TD)抗体応答に及ぼす影響を解析した。その結果、ELISA による解析において、免疫 2 週間後では抗 HA IgM 抗体価は高い傾向を示したものの、抗 HA 総 IgG 抗体価においては欠損群に対して低い傾向にあった。また、免疫 4 週後では総 IgG 抗体価は差がほとんど見られず、回復する傾向にあることを示している一方で、IgM 抗体価は 2 週目と同様対照群よりも高い傾向にあった。これらの結果から Menin 欠損によって B 細胞の量そのものではなく、クラススイッチの分化の進行に影響があると解釈できる。免疫 2 週後の Menin 抗体価が減少した理由はクラススイッチや胚中心の進行が遅れている可能性が示唆される。4 週目で総 IgG 抗体価が回復していることから、Menin 欠損群では IgG が産生されないのではなく、誘導が遅れる形で応答が抑制されていることがわかる。

次に IgG サブクラス別 (IgG2b IgG2c) について抗体価をみる。まず、2 週目と 4 週目の IgG2b/2c の Menin 欠損群と対照群を比較すると、IgG 2b では強い回復傾向がみられる一方、IgG 2c では 4 週目に若干の差がみられる。これは Menin の欠損によってクラススイッチが全体的に抑制されたのではなく、ある特定のサブクラスに影響が及ぼされたと解釈できる。実際インフルエンザでは Th1(IFN- γ) 反応が起きやすく、IgG 応答が誘導されることが一般的に知られている。したがって、今回 Menin 欠損群で IgG 2c が低い傾向を示したことは、分化経路に何らかの影響が生じたことが考察できる。

また、Menin 欠損群における IgM 抗体価が 2 週目、4 週目のいずれにおいても対照群よりも高い傾向にあることから、クラススイッチが不十分であるため、IgM 産生が残存し、胚中心反応や IgG 産生形質細胞への分化が相対的に弱まり、結果として IgM が優位に応答していることが予想される。一方でフローサイトメーターの結果 (図 3) から、Menin 欠損群において IgM 型 B 細胞の細胞数が減少していることがわかり、この結果から血清 IgM 抗体価が上昇したのは IgM 細胞数が単純に増加したからではなく、少数の細胞の IgM 抗体の産生が強く行われている可能性が示唆される。さらに、IgM 型 B 細胞がクラススイッチを起こす前に短命型形質細胞へ分化し、抗体産生に進む可能性も考えられ、この場合ではフローサイトメトリーにおいて IgM 細胞数が減少していても、ELISA で Menin 欠損群における血清 IgM 抗体価が高く維持されていることが説明できる。

また、フローサイトメトリー解析では、HA 特異的 B 細胞数(HA 陽性 B 細胞の絶対数)、HA 特異的胚中心 B 細胞、HA 特異的ナイーブ/記憶 B 細胞には大きな差はみられなかった。一方で IgG 陽性細胞の割合および IgG 2b/2c 陽性分画のバランスの差には大きな差が見られた。このことから、Menin 欠損は抗原特異的 B 細胞の数よりも文化の質 (クラススイッチの偏り) に影響を及ぼす可能性が示唆される。

以上より、B 細胞特異的 Menin 欠損は、インフルエンザワクチンに対する T 細胞依存性抗体応答において、抗原特異的 B 細胞が形成される過程そのものには大きな影響を与えないと考えられた。一方で、クラススイッチや IgG サブクラスへの分化には影響を及ぼしている可能性があり、その結果として IgG 抗体の産生が遅れ、IgM が優位となる抗体応答が生じたと考えられる。今後は、免疫後 1~2 週といった早い時期における胚中心反応や形質芽細胞の解析、さらに親和性成熟の評価を行うことで、Menin が B 細胞分化のどの段階に参与しているのかを、より詳しく明らかにできると考えられる。

【参考文献】

1. エッセンシャル免疫学 第4版、ピーター パーラム著、メディカル・サイエンス・インターナショナル
2. 基礎免疫学 原著第6版 アバス-リックマン-ピレ 免疫系の機能とその異常 Abul K. Abbas (著), Andrew H. Lichtman
3. 糖尿病の分子標的 インスリン・グルカゴン分泌制御のシグナル機構から接触調節や慢性炎症、認知症の関与まで 実験医学 2011年5月号 Vol.29 No.8 新たな治療戦略につながる 錦田裕孝/企画
4. The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, Yamada T, Kanoh M, Matsumoto A, Maruyama S, Kometani K, Kurosaki T, Ohara O, Nakayama T, Yamashita M. *Nat Commun.* 2014 Apr 2;5:3555. doi: 10.1038/ncomms4555.
5. The tumor suppressor menin prevents effector CD8 T-cell dysfunction by targeting mTORC1-dependent metabolic activation. Suzuki J, Yamada T, Inoue K, Nabe S, Kuwahara M, Takemori N, Takemori A, Matsuda S, Kanoh M, Imai Y, Yasukawa M, Yamashita M. *Nat Commun.* 2018 Aug 17;9(1):3296. doi: 10.1038/s41467-018-05854-6.
6. Requirement for memory B-cell activation in protection from heterologous influenza virus reinfection. Leach S, Shinnakasu R, Adachi Y, Momota M, Makino-Okamura C, Yamamoto T, Ishii KJ, Fukuyama H, Takahashi Y, Kurosaki T. *Int Immunol.* 2019 Nov 8;31(12):771-779. doi: 10.1093/intimm/dxz049.
7. Influenza vaccination strategies targeting the hemagglutinin stem region. Fukuyama H, Shinnakasu R, Kurosaki T. *Immunol Rev.* 2020 Jul;296(1):132-141. doi: 10.1111/imr.12887. Epub 2020 Jun 1

8. 間接 ELISA による抗原特異的抗体検出法の開発手法 農研機構 広田次郎, 清水眞也* (平成 25 年 8 月 6 日)

9. フローサイトメトリー1. フローサイトメトリーの原理 米山 彰子 東京大学医学部附属病院検査部、検査と技術 28 巻 7 号 (2000 年 6 月発行) 増刊号 血液検査実践マニュアル Part 6