

「新型コロナウイルス感染症における自己抗体産生機序の解明と制御」

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 教授

鈴木 一博

要旨

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染により濾胞外 B 細胞応答を介して自己抗体が産生され、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の重症化に寄与することが示唆されている。本研究では、走化性因子受容体のシグナル伝達分子である COMMD3/8 複合体を切り口として、SARS-CoV-2 感染により自己抗体が産生される機序を解明し、COVID-19 の重症例に対する新規治療法の可能性を検証することを目的とした。我々は、SARS-CoV-2 感染を模した自己免疫モデルの解析により、抗体産生細胞の前駆細胞の性質を有する病原性 B 細胞の亜集団を新たに同定した。その上で、走化性因子受容体 EBI2 を介する濾胞外ニッチへの細胞移動が、この細胞亜集団の生成と自己抗体産生細胞への分化を促進することを明らかにした。さらに、このプロセスが COMMD3/8 複合体によって媒介されることを見出した。本研究により、病原性 B 細胞の移動に基づく自己免疫病態の形成機序、およびそれを標的とした新規治療法の可能性が示された。

背景・目的

SARS-CoV-2 の感染により自己抗体が産生され、COVID-19 の重症化に寄与することが示唆されている¹。SARS-CoV-2 は一本鎖 RNA をゲノムとし、その感染は宿主細胞の一本鎖 RNA センサーである Toll-like receptor 7 (TLR7) を活性化する。活性化 B 細胞は抗体産生細胞である形質芽細胞 (plasmablast, PB) および形質細胞 (plasma cell, PC) に分化するが、その経路には胚中心応答と濾胞外応答がある。濾胞外応答では加齢随伴 B 細胞 (age-associated B cell, ABC) と呼ばれる非典型的な B 細胞が出現する。B 細胞における TLR7 の活性化により ABC の生成、PB および PC への分化が促進されることから^{2,3}、SARS-CoV-2 の感染は濾胞外応答における自己反応性 ABC の抗体産生細胞への分化を促し、自己抗体の産生を亢進させると考えられている⁴。しかし、濾胞外応答において自己抗体産生細胞に分化する ABC の亜集団の実態は未解明である。

我々は、ケモカイン受容体に代表される走化性因子受容体のシグナル伝達分子として、copper metabolism gene MURR1 domain-containing (COMMD) 3 と COMMD8 を構成要素とするタンパク複合体 (COMMD3/8 複合体) を同定し、COMMD3/8 複合体が B 細胞の移動と液性免疫応答の誘導に重要な役割を果たすことを明らかにした^{5,6}。さらに、我々の予備的な検討から、マウスに TLR7 作動薬 レシキモド (resiquimod, RSQ) を投与することによって誘発される自己免疫モデル (TLR7 誘発性自己免疫モデル) において COMMD3/8 複合体の機能を欠損させることにより、自己抗体産生細胞の生成が抑制されるのに伴って、病態が著明に改善されることがわかった (図 1)。このことから、COMMD3/8 複合体が自己抗体産生細胞の生成を促進することが示唆されたが、その機序は不明である。

以上の研究背景のもと、本研究では COMMD3/8 複合体を切り口として SARS-CoV-2 感染により自己

抗体が産生される機序を解明し、COVID-19 の重症例に対する新規治療法の可能性を検証することを目的とした。

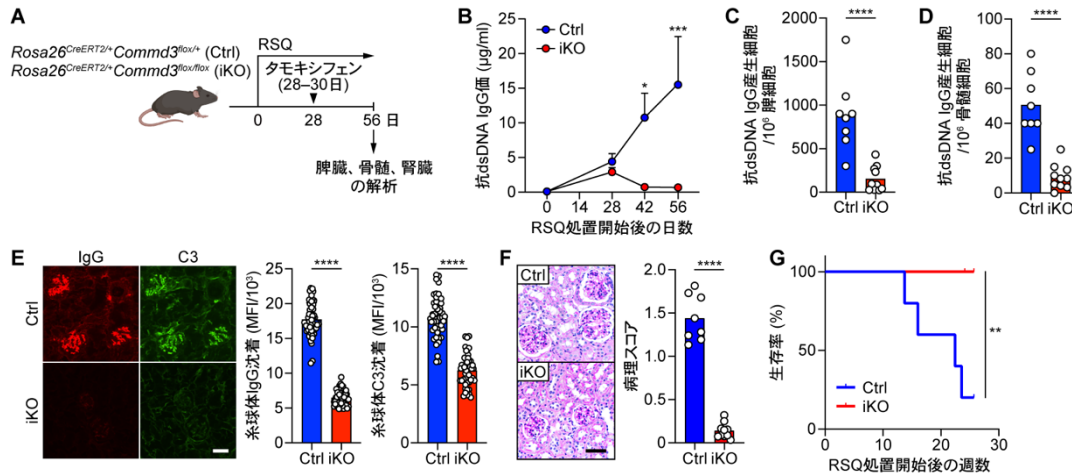


図 1. COMMD3/8 複合体の機能欠損が TLR7 誘発性自己免疫モデルに及ぼす影響。(A) 実験の概要。RSQ 処置を開始して 28 日後に COMMD3/8 複合体の機能を遺伝学的に欠損させ、56 日後に脾臓、骨髄、腎臓を解析した。(B) 抗二本鎖 DNA (dsDNA) IgG 価の推移 ($n = 8$ Ctrl, 10 iKO)。(C, D) 脾臓(C)および骨髄(D)における抗 dsDNA IgG 産生細胞の数。(E) 糸状体における IgG および C3 の沈着。(F) 腎病理スコア。(G) 生存率 ($n = 5$ Ctrl, 7 iKO)。データ表示: 平均値と標準誤差(B), 平均値と各マウスの値(C, D, F), 平均値と 5 匹のマウスの各糸状体の値(E)。有意差判定: Sidak の事後検定を伴う two-way ANOVA (B), 両側 t 検定 (C-F), log-rank 検定 (G)。

方法

マウス: C57BL/6 および Balb/c の遺伝的背景を持つ野生型マウスは日本クレアから購入した。C57BL/6 背景の *Gpr183^{flx/flx}* マウス⁷は Tim Willinger 博士 (カロリンスカ研究所、スウェーデン) から提供された。C57BL/6 背景の *Commd3^{flx/flx}* マウスは我々の研究室で作製した⁵。これらのマウスを *Rosa26^{CreERT2/+}* マウスと交配し、タモキシフェン誘導性に *Gpr183* または *Commd3* を欠損させることが可能なマウス (*Rosa26^{CreERT2/+}Gpr183^{flx/flx}* または *Rosa26^{CreERT2/+}Commd3^{flx/flx}*) を作製した。

TLR7 誘発性自己免疫モデル: C57BL/6 背景のマウスの左耳の皮膚に 20 μ g の RSQ (Merck, SML0196) を 1 日または 2 日間隔で週 3 回塗布した。

フローサイトメトリー: マウスの脾臓または骨髄から細胞懸濁液を調製し、蛍光標識抗体で染色した後、LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) を用いてデータを取得した。取得したデータは FlowJo (v10.10.0, BD Biosciences) で解析した。セルソーティングには FACS Aria Fusion を用いた。

シングルセル RNA シークエンス (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq): TLR7 誘発性自己免疫モデルの脾臓から濾胞性 B 細胞 (follicular B cell, FoB)、胚中心 B 細胞 (germinal center B cell, GCB)、ABC、PB をソーティングし、それぞれハッシュタグ抗体で標識し、同数の細胞を混合した。細胞懸濁液を 10x Genomics 社のプラットフォームで処理し、得られた cDNA ライブラリーについて NovaSeq X Plus (Illumina) を用いてシークエンス解析した。

蛍光免疫染色: 4% パラホルムアルデヒドで固定した脾臓から凍結切片 (厚さ 10 μ m) 作製し、蛍光標識抗体で染色した後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV3000 (EVIDENT) で観察・撮影した。

走化性試験：TLR7 誘発性自己免疫モデルの脾臓から調製した細胞懸濁液をトランスウェル（Corning, 3421）の上側のウェルに添加し、下側のウェルに走化性因子を添加した。37°Cで3時間静置した後、下側のウェルに移動した細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて測定した。

SARS-CoV-2 感染モデル：Balb/c 背景の野生型マウスに SARS-CoV-2 (7×10^4 TCID₅₀) を経鼻感染させ、感染2日後と4日後にセラストロール（1 mg/kg）を腹腔内投与し、体重変化を解析した。

統計解析：統計解析は GraphPad Prism 9（GraphPad Software）を用いて実施した。統計学的有意差は、両側 *t* 検定、Dunnett の事後検定を伴う一元配置分散分析（one-way ANOVA）、あるいは Sidak の事後検定を伴う二元配置分散分析（two-way ANOVA）により判定した。生存曲線の比較には log-rank 検定を用いた。*P* 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした（**P* < 0.05；***P* < 0.01；****P* < 0.001；*****P* < 0.0001；ns, not significant）。

結果

自己抗体産生細胞に分化し得る ABC 亜集団の同定

まず我々は、自己免疫病態において自己抗体産生細胞に分化する ABC の亜集団を同定することを目的として、TLR7 誘発性自己免疫モデルの脾臓に含まれる B 系列細胞について scRNA-seq を実施した（図 2A）。その結果、ABC が 3 つの亜集団（ABC-1、ABC-2、ABC-3）から構成されることを見出した（図 2B）。さらに、ABC-3 の一部が PB の分化に必須の転写因子をコードする遺伝子、および細胞増殖に関連する遺伝子を発現することから、PB の前駆細胞（pre-PB）の性質を持つことが示唆された（図 2C）。これらの pre-PB ABC をフローサイトメトリーで検出することを試みた結果、特定のマーカー分子の発現に基づいて同定し得ることがわかった（図 2D）。さらに、pre-PB ABC が他の ABC 亜集団に比べて DNA 結合性（自己反応性）細胞を多く含むことがわかった（図 2E）。

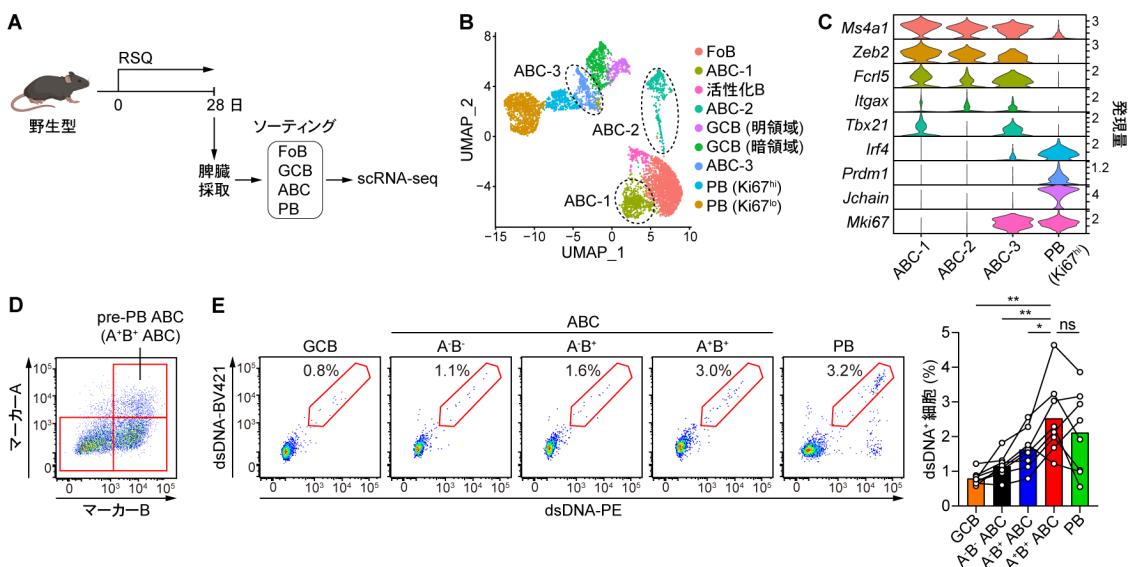


図 2. TLR7 誘発性自己免疫モデルにおける pre-PB ABC の同定. (A) 実験の概要. RSQ 処置を開始して 28 日後に脾臓から各 B 系列細胞をソーティングし、scRNA-seq に供した。(B) 細胞のクラスタリング。(C) 各細胞亜集団における遺伝子発現。(D) フローサイトメトリーによる pre-PB ABC の同定。(E) 各細胞亜集団の DNA 結合性. データ表示: 平均値と各マウスの値. 有意差判定: Dunnett の事後検定を伴う one-way ANOVA.

細胞移動に基づく pre-PB ABC の生成機序の解明

次に我々は、自己免疫病態において pre-PB ABC が生成する機序について解析した。脾臓において赤脾髄と白脾髄が接する領域は、連結帯 (bridging channel) と呼ばれ、PB および PC の生存因子を産生する樹状細胞が存在することから、抗体産生細胞の生成を促進する濾胞外ニッチとして機能すると考えられている⁸。連結帯には走化性因子受容体 EB12 (Epstein-Barr virus-induced gene 2 ; GPR183 としても知られる) のリガンドが豊富に存在するため⁹、我々は EB12 を介する ABC の濾胞外ニッチへの移動が pre-PB ABC の生成を促進すると考えた。

まず、TLR7 誘発性自己免疫モデルの脾臓に含まれる B 系列細胞において、EB12 の発現をフローサイトメトリーを用いて解析したところ、ABC に最も強い発現が認められた (図 3A)。この結果と一致して、ABC が EB12 リガンドに対して濾胞性 B 細胞に比べて高い走化性を示すことがわかった (図 3B)。次に、ABC の濾胞外ニッチへの移動に EB12 が関与するか検証するため、TLR7 誘発性自己免疫モデルにおいて EB12 欠損 ABC の移入実験を行った (図 3C)。その結果、EB12 欠損 ABC は連結帯への局在および PB への分化が不全であった (図 3D, E)。さらに、TLR7 誘発性自己免疫モデルにおいて B 細胞特異的に EB12 を欠損させたところ、pre-PB ABC および PB の減少が認められた (図 3F-H)。これらの結果から、EB12 を介する ABC の濾胞外ニッチへの移動が pre-PB ABC の生成に寄与することが示唆された。

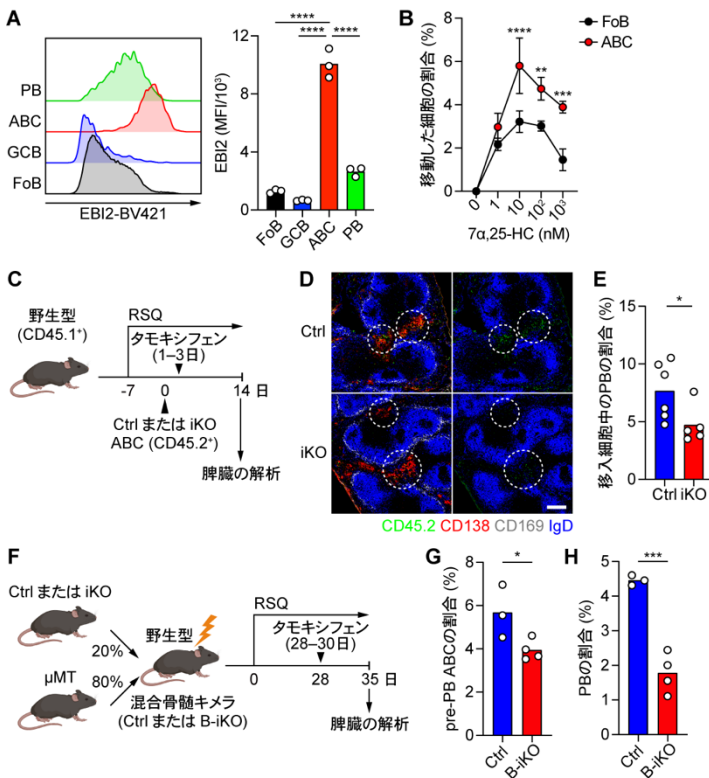


図 3. ABC の濾胞外ニッチへの移動と pre-PB ABC の生成における EB12 の役割の解析. (A) TLR7 誘発性自己免疫モデルの脾臓に含まれる B 系列細胞における EB12 の発現. (B) EB12 リガンド 7 α ,25-dihydroxycholesterol (7 α ,25-HC) に対する ABC および FoB の走化性. (C-E) RSQ を処置した *Rosa26^{CreERT2/+}Gpr183^{flax/+}* マウス (control, Ctrl) および *Rosa26^{CreERT2/+}Gpr183^{flax/flax}* マウス (inducible knockout, iKO) から ABC を単離し、RSQ を処置した野生型マウスに移入した (C). レシピエントマウスにタモキシフェンの投与を開始して 7 日後に、脾臓における移入細胞 (CD45.2⁺) の局在 (D)、および PB に分化した移入細胞の割合 (E) を解析した。連結帯を点線で囲んだ (D)。 (F-H) Ctrl または iKO マウスの骨髄細胞と B 細胞欠損マウス (μ MT) の骨髄細胞を用いて混合キメラマウス (Ctrl または B-iKO) を作製し、RSQ を処置した (F)。タモキシフェンの投与を開始して 7 日後に、脾臓の ABC に占める pre-PB ABC の割合 (G)、および脾臓細胞に占める PB の割合 (H) を解析した。データ表示: 平均値と各マウスの値 (A, E, G, H), 3 ウェルの平均値と標準偏差。有意差判定: Dunnett の事後検定を伴う one-way ANOVA (A), Sidak の事後検定を伴う two-way ANOVA (B), 両側 *t* 検定 (E, G, H)。

COMMD3/8 複合体の自己免疫病態における作用点の解明

我々の研究から COMMD3/8 複合体が EB12 のシグナル伝達に関与することが示されている⁵。事実、COMMD3/8 複合体の機能を遺伝学的に欠損させた ABC は、EB12 リガンドに対する走化性の低下を示した (データ不掲載)。そこで、TLR7 誘発性自己免疫モデルにおいて、COMMD3/8 複合体の機能欠損が ABC の濾胞外ニッチへの移動および pre-PB ABC の生成に及ぼす影響を解析した。COMMD3/8 複合体の機能を欠損する ABC は、連結帯への局在および PB への分化が不全であった (図 4A-C)。また、B 細胞特異的な COMMD3/8 複合体の機能欠損により、pre-PB ABC および PB が減少した (図 4D-F)。

これらの結果は、COMMD3/8 複合体が ABC の濾胞外ニッチへの移動と pre-PB ABC の生成に関与することを示している。

自己免疫病態において、ケモカイン受容体 CXCR4 を介する抗体産生細胞の骨髄への移動は、自己抗体を持続的に産生する長寿命の PC の生成を促す¹⁰。また、CXCR3 を介する ABC の腎臓への移動が、腎炎を増悪させることが示唆されている¹¹。そこで我々は、COMMD3/8 複合体の機能欠損がこれらの病原性 B 細胞の移動に及ぼす影響について検討した。その結果、CXCR4 を介する自己抗体産生細胞の走化性および CXCR3 を介する ABC の走化性が低下するのに伴い、自己抗体産生細胞の骨髄への移動および ABC の腎臓への移動が抑制された (図 3G-J)。これらの結果は、COMMD3/8 複合体が病原性 B 細胞の複数の移動過程を媒介することによって自己免疫病態の形成に寄与することを示唆している。

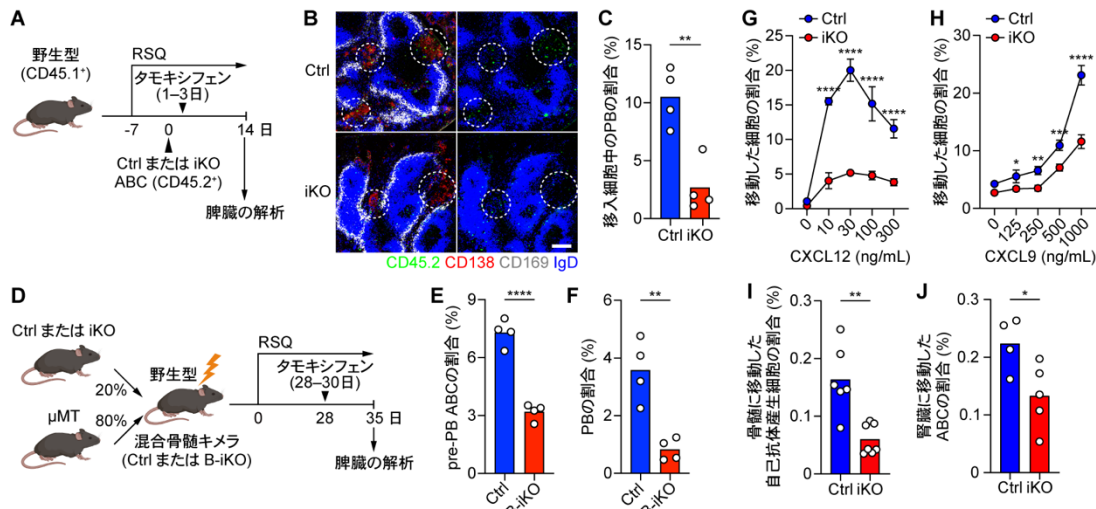


図 4. TLR7 誘発性自己免疫モデルにおける COMMD3/8 複合体の作用点の解析。(A-C) RSQ を処置した *Rosa26^{Cre}ERT2⁺ Commd3^{lox/lox}* マウス (control, Ctrl) および *Rosa26^{Cre}ERT2⁺ Commd3^{lox/lox}* マウス (inducible knockout, iKO) から ABC を単離し、RSQ を処置した野生型マウスに移入した (A)。レシピエントマウスにタモキシフェンの投与を開始して 7 日後に、脾臓における移入細胞 (CD45.2⁺) の局在 (B)、および PB に分化した移入細胞の割合 (C) を解析した。連結帯を点線で囲んだ (B)。(D-F) Ctrl または iKO マウスの骨髄細胞と μMT マウスの骨髄細胞を用いて混合キメラマウス (Ctrl または B-iKO) を作製し、RSQ を処置した (D)。タモキシフェンの投与を開始して 7 日後に、脾臓の ABC に占める pre-PB ABC の割合 (E)、および脾臓細胞に占める PB の割合 (F) を解析した。(G, H) RSQ を処置した Ctrl および iKO マウスの脾臓に含まれる抗 dsDNA IgG 産生細胞 (G) および ABC (H) の CXCL12 (CXCR4 リガンド) および CXCL9 (CXCR3 リガンド) に対する走化性。(I, J) RSQ を処置した Ctrl および iKO マウスの脾臓に含まれる抗 dsDNA IgG 産生細胞 (I) および ABC (J) をレシピエントマウスに移入し、骨髄および腎臓への移動を解析した。データ表示: 平均値と各マウスの値 (C, E, F, I, J), 3 ウェルの平均値と標準偏差。有意差判定: 両側 *t* 検定 (C, E, F, I, J), Sidak の事後検定を伴う two-way ANOVA (G, H)。

COMMD3/8 複合体の機能阻害が COVID-19 の重症化に及ぼす影響の検討

以上の研究により自己免疫病態における COMMD3/8 複合体の役割が明らかになったことから、COMMD3/8 複合体の COVID-19 重症化への関与を検討した。我々はこれまでに、抗炎症性の生薬ライコウトウの主要な薬効成分とされるセラストロールが、COMMD3/8 複合体を阻害することによって薬理作用を発揮することを明らかにしている⁶。そこで、セラストロールによる COMMD3/8 複合体の機能阻害が、マウスにおける COVID-19 の重症化に及ぼす影響を解析した。しかし、セラストロールによる COVID-19 重症化の抑止効果は認められなかった (図 5)。

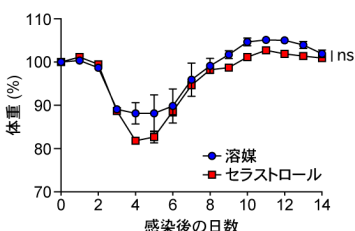


図 5. COMMD3/8 複合体の機能阻害が COVID-19 の重症化に及ぼす影響の解析。マウスに SARS-CoV-2 を感染させた 2 日後および 4 日後にセラストロールを投与し、体重変化を解析した ($n = 5$)。有意差判定: Sidak の事後検定を伴う two-way ANOVA。

考察

本研究における自己免疫モデルの解析から、PB 前駆細胞の性質を有し、自己反応性細胞を多く含む ABC 亜集団として pre-PB ABC が同定されるとともに、EBI2 を介する ABC の濾胞外ニッチへの移動がその生成を促進することが明らかになった。さらに、COMMD3/8 複合体が ABC の移動を媒介することにより pre-PB ABC の生成に寄与するのみならず、病原性 B 細胞の他の移動過程を媒介することによっても自己免疫病態の形成に寄与することが示唆された (図 6)。一方、本研究においては、COMMD3/8 複合体の機能を阻害することによる COVID-19 重症化の抑止効果を示すには至らなかった。

本研究で用いた SARS-CoV-2 感染モデルは、COVID-19 の重症化を抑止する薬物の同定に使用されるモデルであるが、感染後早期に一過性に重症化が認められるため、薬物を感染後早期に投与する必要がある。しかし、一般的にマウスにおいてウイルス感染後に血清抗体価の上昇が認められるまでには 1 週間程度の時間を要するため、今回用いた感染モデルでは自己抗体の産生に伴う重症化に対する薬物の効果を評価できなかったものと考えられる。今後は、より長期にわたって重症化の病態を追跡可能な SARS-CoV-2 感染モデルを樹立した上で、COMMD3/8 複合体の機能阻害の影響を解析する必要がある。

しかし、本研究から COMMD3/8 複合体が自己抗体によって媒介される自己免疫病態の形成に寄与することが示唆された。したがって、同複合体が COVID-19 の重症例のみならず、その病態に液性免疫が深く関与する全身性エリテマトーデスをはじめとする自己免疫疾患の治療標的となる可能性がある。今後は、本研究で得られたマウスにおける知見をヒトにおいて検証し、病原性 B 細胞の移動というこれまでにない作用点を有する自己免疫病態の治療薬の開発を進める。

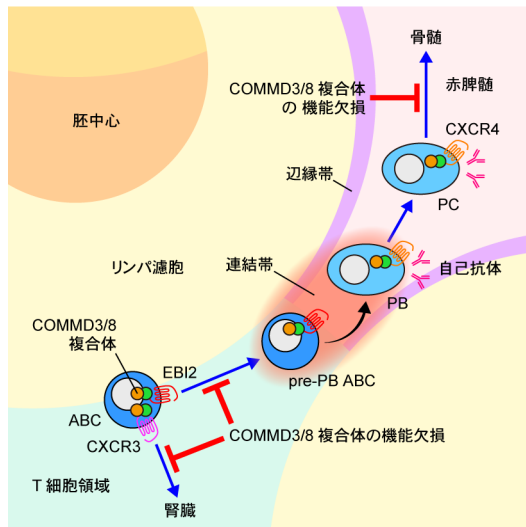


図 6. 自己免疫病態における濾胞外 B 細胞応答と COMMD3/8 複合体の作用点。

自己免疫病態における濾胞外 B 細胞応答では ABC が出現する。これまでの研究から自己抗体産生細胞に分化する ABC 亜集団の存在が示唆されていたが、その実態は未解明であった。本研究から、PB 前駆細胞の性質を有し、自己反応性に富む ABC 亜集団として pre-PB ABC が同定された。また、脾臓における pre-PB ABC の生成が、EBI2 を介する ABC の連結帯 (濾胞外ニッチ) への移動によって促進されることが示唆された。COMMD3/8 複合体の機能欠損により、EBI2 を介する ABC の連結帯への移動、CXCR3 を介する ABC の腎臓への移動、および CXCR4 を介する自己抗体産生細胞の骨髄への移動が抑制されたことから、COMMD3/8 複合体は病原性 B 細胞の複数の移動過程を媒介することで自己免疫病態の形成に寄与すると考えられる。

共同研究者

黒崎 知博 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター 特任教授)

松浦 善治 (大阪大学感染症総合教育研究拠点 特任教授)

白井 太一郎 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター 助教)

引用論文

- [1] Woodruff MC, Ramonell RP, Haddad NS, et al. Dysregulated naive B cells and de novo autoreactivity in severe COVID-19. *Nature* 2022. 611: 139-147.
- [2] Rubtsov AV, Rubtsova K, Fischer A, et al. Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c⁺ B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood* 2011. 118: 1305-1315.
- [3] Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, et al. Distinct effector B cells induced by unregulated Toll-like receptor 7 contribute to pathogenic responses in systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2018. 49: 725-739.e726.
- [4] Vinuesa CG, Grenov A, and Kassiotis G. Innate virus-sensing pathways in B cell systemic autoimmunity. *Science* 2023. 380: 478-484.
- [5] Nakai A, Fujimoto J, Miyata H, et al. The COMMD3/8 complex determines GRK6 specificity for chemoattractant receptors. *J. Exp. Med.* 2019. 216: 1630-1647.
- [6] Shirai T, Nakai A, Ando E, et al. Celastrol suppresses humoral immune responses and autoimmunity by targeting the COMMD3/8 complex. *Sci. Immunol.* 2023. 8: eadc9324.
- [7] Emgård J, Kammoun H, García-Cassani B, et al. Oxysterol sensing through the receptor GPR183 promotes the lymphoid-tissue-inducing function of innate lymphoid cells and colonic inflammation. *Immunity* 2018. 48: 120-132.e128.
- [8] MacLennan ICM, Toellner K-M, Cunningham AF, et al. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 2003. 194: 8-18.
- [9] Lu E, Dang EV, McDonald JG, et al. Distinct oxysterol requirements for positioning naïve and activated dendritic cells in the spleen. *Sci. Immunol.* 2017. 2: eaal5237.
- [10] Hiepe F and Radbruch A. Plasma cells as an innovative target in autoimmune disease with renal manifestations. *Nat. Rev. Nephrol.* 2016. 12: 232-240.
- [11] Wang S, Wang J, Kumar V, et al. IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c^{hi}T-bet⁺ B cells in SLE. *Nat. Commun.* 2018. 9: 1758.

助成研究に関連した発表論文

- [1] Shirai T, Nakai A, Ando E, Fujimoto J, Leach S, Arimori T, Higo D, van Eerden FJ, Tulyeu J, Liu Y-C, Okuzaki D, Murayama MA, Miyata H, Nunomura K, Lin B, Tani A, Kumanogoh A, Ikawa M, Wing JB, Standley DM, Takagi J, and Suzuki K. Celastrol suppresses humoral immune responses and autoimmunity by targeting the COMMD3/8 complex. *Sci. Immunol.* 2023. 8: eadc9324.
- [2] Shirai T, Nakai A, and Suzuki K. Chemoattractant receptor signaling in humoral immunity. *Int. Immunol.* 2024. 36: 429-438.
- [3] Ise W, Koike T, Shimada N, Yamamoto H, Tai Y, Shirai T, Kawakami R, Kuwabara M, Kawai C, Shida K, Inoue T, Hojo N, Ichiyama K, Sakaguchi S, Shiroguchi K, Suzuki K, and Kurosaki T.

KLF2 expression in IgG plasma cells at their induction site regulates the migration program. J. Exp. Med. 2025. 222: e20241019.