

図 6. マーカー遺伝子の発現パターンに基づくクラスター解析

図 5 で解析したマーカー遺伝子の発現パターンの類似性から、クラスター解析を行ったところ、製法の異なる virosome 型ワクチンはその他ワクチンとは異なる遺伝子発現パターンを示し、独立したクラスターを形成した。

SA; 生理食塩水、HA; 国産 HA ワクチン、cell; 培養細胞由来 HA ワクチン、viro; virosome 型 HA ワクチン

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業)
分担研究報告書

インフルエンザワクチン安全性に関するバイオマーカー発現細胞の
同定に関する研究

研究分担者：水上拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

インフルエンザウイルスは抗原変異により短い周期の小規模流行を引き起こす感染症である。近年、家禽等で高病原性トリインフルエンザ(H5N1)が東南アジアを中心に発生し、世界的パンデミックの発生が懸念されており、本邦では全粒子インフルエンザワクチンにアルミニウムゲルを加えたワクチンが既に認可されているが、主反応に加え副反応の発生が予測されるため、迅速でより科学的な安全性評価法の開発が急務であった。そこで、我々はパンデミックインフルエンザワクチンの安全性評価法を開発する目的でDNAマイクロアレイ法を用いた解析を行い、体重減少や白血球減少と相関して全粒子インフルエンザワクチンやパンデミックインフルエンザワクチンで発現が有意に上昇する肺組織のバイオマーカーを同定する事に成功した。しかしこれらの遺伝子が肺組織に発現しているのか、あるいは肺組織に浸潤しているリンパ球等に発現しているかについては不明であった。そこで本研究では同定したバイオマーカーに関しラット肺組織を用いて発現部位を明らかにする事を研究目的とした。その結果、我々の同定したバイオマーカーの内、IRF-7, LGALS9, NGFR, TIMP1, CXCL9においては蛋白質レベルでの発現上昇が確認され、細気管支上皮細胞や肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ及び集簇しているリンパ球など、発現細胞が同定された。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは抗原変異により短い周期の小規模流行を引き起こす感染症である。近年、家禽等で高病原性

トリインフルエンザ(H5N1)が東南アジアを中心に発生し、世界的パンデミックの発生が懸念されており、各国ではパンデミックに備えたワクチン開発と臨床試験が行われ、その有効性と安全性が示さ

れている。本邦では全粒子インフルエンザワクチンにアルミニウムゲルを加えたワクチンが既に認可されているが、主反応に加え副反応の発生が予測されるため、迅速でより科学的な安全性評価法の開発が急務であった。そこで、我々はパンデミックインフルエンザワクチンの安全性評価法を開発する目的で DNA マイクロアレイ法を用いた解析を行った。その結果、体重減少や白血球減少と相関して全粒子インフルエンザワクチンやパンデミックインフルエンザワクチンで発現が有意に上昇する肺組織のバイオマーカーを同定する事に成功した (Mizukami et al., Vaccine. 2008; 26: 2270-2283)。現在、これらの遺伝子を用いてワクチン安全性試験を実施することが可能となりつつある (本研究課題)。しかしこれらの遺伝子が肺組織に発現しているのか、あるいは肺組織に浸潤しているリンパ球等に発現しているかについては不明であった。また、遺伝子発現のみなのか、実際に蛋白質として発現しているかについても未検証であった。そこで本研究では同定したバイオマーカーに関しラット肺組織を用いて発現部位を明らかにする事を研究目的とした。

B. 研究方法

1) 動物

ウィスターラット (8 週齢オス) を SLC より購入して実験に用いた。

2) ワクチン

ワクチンはマウス白血球数減少試験用の毒性参照品(RE)を用いた。またコントロールとして生理食塩水 (日本薬局方) を用いた。

3) 動物実験

試験は、生物学的製剤基準の異常毒性否定試験法に準じて行った。即ち、動物を導入後、1 週間 健康状態を確認し、健康で体重推移が正常であったラットに 5mL の検体を接種した。ワクチン接種後 1 日目に遺伝子発現が有意に上昇することから、接種後 1 日目の肺組織をサンプリングした。肺組織は PBS にて表面を洗浄した後、ブアン固定液に浸し 4°C で 2 時間固定した。その後、攪拌しながら新しいブアン固定液で 4°C 一晩固定し、常法に従いパラフィンブロックを作製した。

動物実験は国立感染症研究所動物実験指針に則り、所内で承認された方法により実施した。

4) 免疫組織化学

作製されたパラフィンブロックをリラトーム REM-710(大和光機工業(株))を用いて 4um の切片を作製した。切片は MAS コートスライドガラス(松浪硝子工業株式会社)に張り付け一晩以上乾燥させ、免疫組織化学に用いた。実験に用いた抗体は表 3 に示す。

染色は常法に従い実施した。即ち、Xylene にて脱パラフィンした組織を 100%EtOH で脱水し、5%BSA にてブロッキングし、一次抗体 (表 3) を 4°C 一晩反応させた。一次抗体を洗浄し、更に

5%BSAにてブロッキングした後、二次抗体を用いて検出した。二次抗体は一次抗体を作製した動物種のIgG抗体を用いた。蛍光染色にはDylight 488標識IgG (Jackson Immuno Research)を用いた。またDAB発色用にはビオチン標識IgG抗体を用いた(Jackson Immuno Research)。DAB発色用には一次抗体ブロッキングの前に内因性ペルオキシダーゼ除去処理を施した。蛍光染色ではHoechst33342で核染色を行った。試験実施前に各抗体を1:50より1:1000までの希釈系列を作製し、至適濃度を設定した(表3)。また、Isotype抗体及び一次抗体(-)のコントロールを用い、非特異反応の有無を確認した。

C. 研究結果

同定されたバイオマーカーの内、ラット抗体が入手可能なIRF-7, LGALS9, NGFR, TIMP1, CXCL9を用いて肺組織における免疫組織化学を実施した。毒性参照品(RE)を投与した肺組織でリンパ球の集簇が一部、気管支周辺に認められた。肺胞上皮組織等の変化はRE接種群及び生理食塩水(SA)投与群では認められなかった。

IRF-7は細気管支上皮細胞において非常に強い発現を認めた。また肺上皮細胞及び肺胞マクロファージにおいても高い発現が認められた(図7-A, B)。また、気管の上皮においても発現が認められた。一方、SA投与群では、細気管支上皮細胞で

の発現は認められたものの、肺上皮細胞及び肺胞マクロファージにおいて発現は微弱か、殆ど認められなかった(図8A)。LGALS9も同様に細気管支上皮細胞に強い反応を認めた。また、LGALS9は肺胞上皮細胞、マクロファージではびまん性の反応性を示した(図7C)。SA投与群では、細気管支上皮細胞での発現は認められたものの、肺上皮細胞及び肺胞マクロファージにおいて発現は微弱か、殆ど認められなかった(図8B)。NGFRは細気管支上皮細胞や、肺胞上皮細胞では発現が殆ど認められなかったが、肺胞マクロファージ及び集簇しているリンパ球に反応が認められた。SA投与群では、微弱か、殆ど認められなかった(図7D, 8C)。TIMP1は一部の肺胞マクロファージに反応が微弱ながら認められる。また、血管内皮内のリンパ球にも反応が認められた(図7E)。SA投与群では、発現は殆ど認められなかった。CXCL9は細気管支上皮細胞に強い反応性を認めたが、肺胞上皮細胞ではその発現は非常に弱かった。また、CXCL9は集簇リンパ球に強い発現が認められた(図7F~H)。一方、SA投与群では、細気管支上皮細胞での発現は認められたものの、肺上皮細胞及び肺胞マクロファージにおいて発現は殆ど認められなかった(図8D)。

以上の結果より、今回調べた5つのバイオマーカーの発現に関しては、SA接種群と比較してRE接種群で上昇していた。

D. 考察

本研究課題では、インフルエンザワクチンの安全性試験法の開発で同定されたバイオマーカーの発現細胞の同定を行った。その結果、SA に比べ有意に発現上昇が認められた遺伝子の内、IRF-7, LGALS9, NGFR, TIMP1, CXCL9 においては蛋白質レベルでの発現上昇が確認された。特に、IRF-7, LGALS9 及び CXCL9 は細気管支上皮細胞に強い発現が認められた。よってこれらの遺伝子は肺組織自体がメインの産生場所であることが示唆される。

一方で IRF-7, LGALS9, NGFR は肺胞マクロファージにおいても強い発現が認められた。また IRF-7, NGFR, CXCL9 は集簇リンパ球においても強い発現が認められた。よってこれらの遺伝子は肺組織のみならず、一部のリンパ球やマクロファージにも同様に発現していることが示唆された。NGFR は細気管支上皮細胞には発現しておらずリンパ球のみ発現が認められることから、NGFR の発現上昇は集簇したリンパ球によるものと考えられる。

IRF-7 は MyD88 と結合し、TLR7,8,9 を介したインターフェロン α 産生に強く関わっている因子として明らかとなっている。今回の研究によって IRF-7 がリンパ球のみならず、細気管支上皮細胞においても強く誘導されていることから、なんらかの免疫反応が起こっていると言える。インフルエンザ感染において、ヒトの細気管支及び 2 型肺胞上皮細胞にはトリ由来のウイルスが認識する SA α

2.3Gal が存在していることが明らかとなっており、インフルエンザ感染における場である細気管支上皮細胞がワクチン接種によっても活性化されていることは興味深い。

一方、LGALS9 は肺組織に発現が認められる分子で、活性化 T 細胞のアポトーシス誘導や好酸球の遊走因子、細胞接着に関わる事が明らかとなっている。本研究においては、過去の報告の通り、肺組織、とりわけ細気管支上皮細胞での発現が認められ、RE 投与群で発現上昇が認められた。今後は、これらの分子の機能と共に、ワクチンのデリバリー経路、気管支上皮における TLR の発現などを比較しながら、検討する必要がある。

CXCL9 は細気管支上皮細胞に加えて、リンパ球、マクロファージでの発現が認められたことから、炎症箇所への白血球等のリクルートに関与していることが推測される。

本研究では、ラットで用いる事の可能な抗体が無いなどの技術的な限界より、これらの発現遺伝子が、リンパ球やマクロファージのどのサブセットに発現しているかについては明らかにすることが出来なかった。特に、リンパ球やマクロファージに発現していた分子に関しては、肺組織よりリンパ球を分離し、フローサイトメトリーによって分離することで、より詳細な遺伝子発現解析が実施できるものと推測され、迅速試験法への応用等が可能となると考える。

E. 結論

我々の同定したバイオマーカーの内、IRF-7, LGALS9, NGFR, TIMP1, CXCL9 においては蛋白質レベルでの発現上昇が確認され、発現細胞が同定された。今後は、フローサイトメトリー等によってより詳細なサブセット解析を行い、遺伝子発現細胞の同定を行うことで、迅速試験法への応用を試みる必要がある。また、ラットは抗体等の制限が多いため、可能であればマウスにおいても検討する事が望ましいと考える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T,

Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. Blood. In press

2. 学会発表

1. 水上 拓郎、倉光 球、百瀬 暖佳、滝沢 和也、益見 厚子、石井 健、浜口 功. 網羅的遺伝子発現法を用いた経鼻インフルエンザワクチンの安全性試験法の開発. 第15回 日本ワクチン学会 2011年度

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

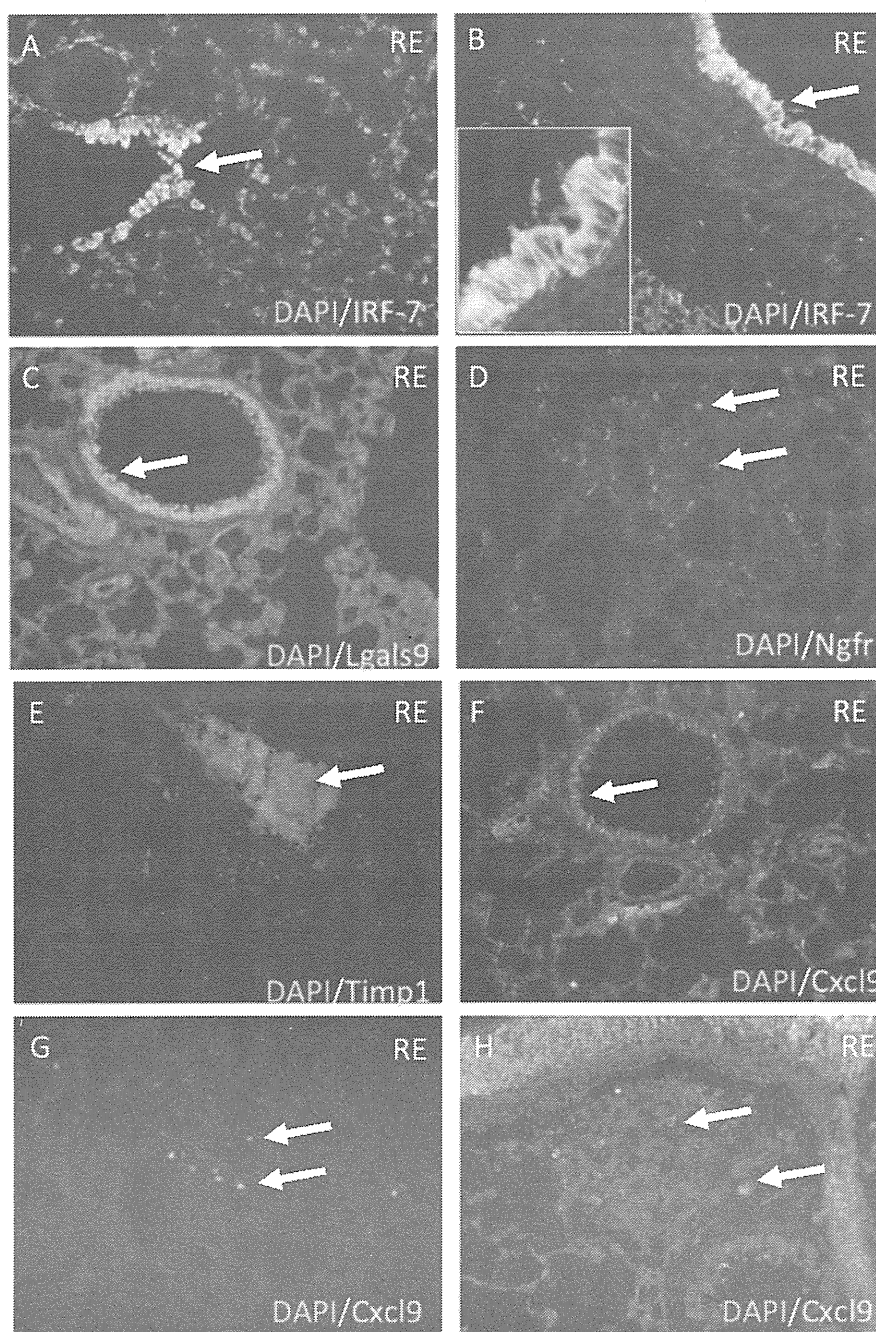
なし

3. その他

なし

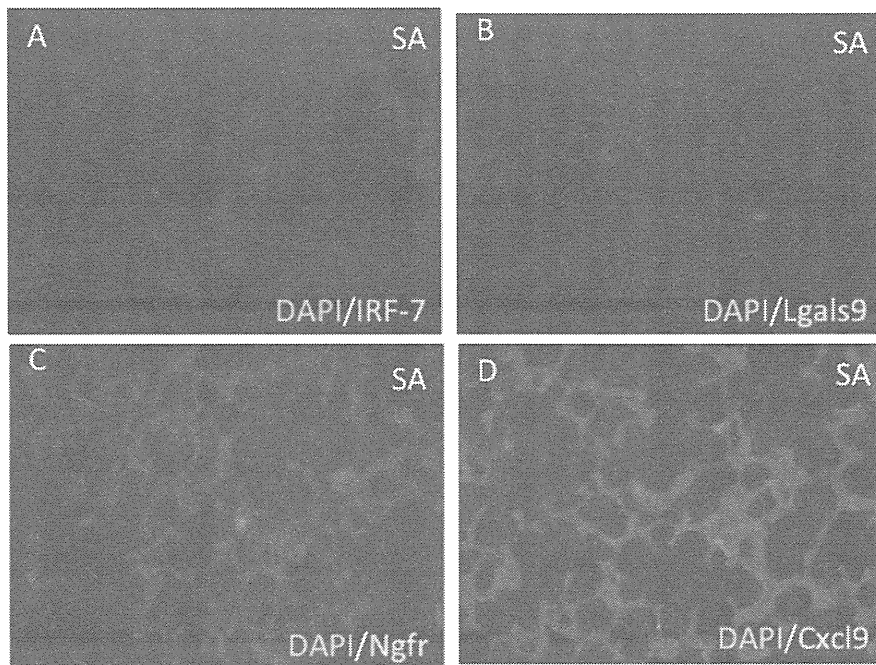
表 3 本試験に用いた抗体とその反応性のまとめ

名前	抗体			肺組織			
	製造会社	Cat No	希釈	細気管支上皮	肺胞上皮細胞	肺胞マクロファージ	集簇リンパ球
IRF-7	Abcam	ab62505	1:800	+++	++	+++	++
Lgals9	Abcam	ab69630	1:400	++	++	++	-
NGFR	Chemicon	MAB365	1:200	-	-	++	++
TIMP1	R&D	AF580	1:200	-	-	+	-
CXCL9	BioLegend	515601	1:200	+++	+	+	+++



**図 7 : 毒性参照品(RE)接種後 1 日目の肺組織における
バイオマーカーの免疫組織化学**

A)肺胞上皮細胞における IRF-7 の発現 B) 細気管支上皮細胞における IRF-7 の発現
 C) 細気管支上皮細胞における LGALS9 の発現 D)肺胞マクロファージにおける NGFR
 の発現 E)血管内のリンパ球における Timp1 の発現 F)細気管支上皮細胞における
 CXCL9 の発現 G)マクロファージにおける CXCL9 の発現 H)集簇リンパ球における
 CXCL9 の発現



**図 8 : 生理食塩水(SA)接種後 1 日目の肺組織における
バイオマーカーの免疫組織化学**

A)肺胞上皮細胞における IRF-7 の発現 B) 肺胞上皮細胞における LGALS9 の発現

C)肺胞マクロファージにおける NGFR の発現 D)肺胞上皮細胞における CXCL9 の発現

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

インフルエンザワクチンによる白血球減少のメカニズムに関する研究

研究分担者 阿戸 学 国立感染症研究所・免疫部・第二室長
研究協力者 高橋宜聖 国立感染症研究所・免疫部・第四室長
研究協力者 小林和夫 国立感染症研究所・免疫部・部長

研究要旨

インフルエンザワクチンの安全性試験としてのマウス白血球減少試験における白血球減少が、循環白血球自体の変動によるか否かについて解析を行った。インフルエンザ全粒子ワクチンを C57BL/6 マウスに投与したところ、末梢血白血球に高頻度のアポトーシスを認め、白血球減少を起こさないインターフェロン(IFN) α/β レセプター欠損マウスにはアポトーシスを認めなかった。以上のことから、インフルエンザワクチン投与後の白血球減少は、I型 IFN 依存的に起こる細胞死が原因であることが示された。

A. 研究目的

インフルエンザワクチンは近年接種者の増加と、接種対象者が学童から高齢者を中心としたハイリスク者に変化したことから、ワクチンの安全性の確保と安定供給が、国民の健康を守るため、厚生労働政策上重要な課題となってきた。我が国でのワクチン安全性試験の一つとして、マウスに HA ワクチン接種後 16 時間で対照群の 80% を下回る白血球減少を起こしてはならないとする、マウス白血球減少試験が行なわれているが、海外ではこの試験は行われておらず、その意義に関しては議論がある。一方、アメリカ

では我が国ではみられないワクチン接種後の副反応によるとも考えうる死亡例が報告され、我が国ではマウス白血球減少活性を管理して現在まで副反応の低いワクチン供給を続けて来た現状を考え、この試験の有用性を慎重に検討する必要がある。しかし、この白血球減少活性の実体についてはほとんど明らかにされていない。このため我々は、ワクチンの安全性に関係すると考えられているマウス白血球減少試験について免疫学的に検証し、より精度の高いマウス白血球減少試験の方法を確立するとともに、白血球減少活性を誘導する要因について明らかにする

目的で解析を行なった。本研究の遂行は、本活性とワクチン本体との関係を明らかにし、ワクチンの安全性向上のための品質管理の技術を向上させる。

B. 研究方法

(1) インフルエンザワクチンの調整

白血球減少試験参照品不活化全粒子ワクチン A1/PR8 (H1N1) は、現行ワクチンと同様に HA 濃度が 90 μ g/ml となるよう生理食塩水で希釈し、接種した。

(2) マウス白血球減少

国家検定に準じて、C57BL/6 マウスまたは I 型インターフェロン(IFN) α/β 細胞内シグナルが欠損する IFN α/β レセプター欠損(IFN α/β RKO)マウス(メス、4 週齢)の腹腔内に、500 μ l のワクチン溶液または生理食塩水を投与し、5 時間後に尾静脈より 10 μ l 採血して末梢血細胞を蛍光標識された抗 B220, 抗 CD3, Gr-1 のそれぞれの抗体、および細胞死を検出する Annexin-V と Propidium iodine を用いて染色し、フローサイトメトリー(FACS Calibur、ベクトンディッキンソン社)を用いて総細胞数および各細胞分画の実数を測定した。動物実験については、国立感染症研究所が定めた動物実験指針を遵守し、実験動物の愛護に十分考慮して苦痛を与えないように配慮しながら行なわれた。

C. 研究結果

マウスに白血球減少を引き起こすことがわかっているインフルエンザ全粒子ワク

チン、もしくは生理食塩水を接種し、接種後に末梢血の各細胞分画の実数を測定した。その結果、核数の計測による現行検定と同様に、HA ワクチン全粒子ワクチン投与群で 16 時間後に末梢血細胞の有意な減少を認めた。また、FACS による解析から、減少する細胞の分画は、主として T 細胞と B 細胞であることが示唆された。末梢血白血球の減少が細胞死によるか否かを検索する目的で、白血球減少の誘導に必須な I 型 IFN 細胞内シグナル伝達が欠損する IFN α/β RKO マウスと野生型マウスに、ワクチンを接種 5 時間後に末梢血より細胞を調整し、FACS を用いた蛍光染色により T リンパ球、B リンパ球および顆粒球の細胞数を計測した。その結果、野生型マウスでは、生理食塩水を投与した群に比べて、ワクチン接種群で、末梢血白血球数の有意な低下とアポトーシス細胞の増加が認められた。(図 9) 一方、IFN α/β RKO マウスにおいては、ワクチン投与群においても白血球減少は認められず、アポトーシス細胞の割合も生理食塩水投与群と差が認められなかった。また、各細胞分画におけるアポトーシスを解析した結果、アポトーシス細胞の割合は、主として T 細胞と B 細胞であることが判明した。これにより、全粒子ワクチン投与によって、IFN α/β 依存的に末梢血白血球にアポトーシスが起り、白血球減少をきたすことが示唆された。

D. 考察

インフルエンザワクチン投与後の白血

球減少の機序を明らかにすることは、白血球減少試験の改善もしくはこの試験に代替可能な新規安全性試験の開発に重要である。白血球減少の機序として、1)インフルエンザワクチンの成分によって誘導される白血球走化因子の濃度勾配に従い、臓器内に移動する。2)インフルエンザワクチンによって誘導されるサイトカインなどが、末梢血白血球に作用して、細胞死を誘導する。という2つの可能性が考えられる。昨年度、我々は、1)の可能性について、末梢血白血球の走化因子受容体シグナルの阻害によっても、白血球減少が認められることから、当試験で認められる末梢白血球の減少は、走化因子による白血球の移動によるものではないことを明らかにした。今回、全粒子ワクチン投与によって誘導されるI型IFNが末梢白血球自体に作用して、アポトーシスが誘導されることが明らかとなった。アポトーシスに陥った細胞はマクロファージなどにより速やかに循環から排除され、これが白血球減少の主要な機序であると考えられる。しかし、I型IFNがどのような機序により、末梢血白血球にアポトーシスを誘導するかは不明である。今後、インフルエンザワクチンによる詳細な白血球減少分子機構を明らかにし、白血球減少試験に変わるより精度の高い分子マーカーを同定し、新規迅速安全評価法の開発に貢献することを目指す。

E. 結論

インフルエンザワクチンの安全性試験としてのマウス白血球減少試験における、接種後の白血球減少活性の実体について解析した。その結果、白血球減少は白血球の移動ではなく、I型IFNシグナルによって誘導されるアポトーシスによって起こることが考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

原著論文

- 1) Onodera T, Takahashi Y, Yokoi Y, Ato M, Kodama Y, Hachimura S, Kurosaki T, Kobayashi K. 2012. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 109(7):2485-90.
- 2) Matsumura T, Ato M, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K. 2012. Interferon- γ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A Streptococcus infections. **Nat Commun**. 3, 678.
- 3) Ohnishi K, Takahashi Y, Kono N, Nakajima N, Mizukoshi F, Misawa S, Yamamoto T, Mitsuki YY, Fu S, Hirayama N, Ohshima M, Ato M, Kageyama T, Odagiri T, Tashiro M, Kobayashi K, Itamura S, Tsunetsugu-Yokota Y. 2012. Newly Established Monoclonal

Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus. **Jpn J Infect Dis.** 65(1):19-27.

4) Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto S, Kaji T, Tsunetsugu-Yokota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, Takemori T. HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. 2011. **Int Immunol.** 23(7):433-41.

5) Murase Y, Konnai S, Hidano A, Githaka W.N, Ito T, Takano A, Kawabata

H,Ato M, Tajima T,Tajima M,Onuma M, Murata S and Ohashi K. Molecular detection of Anaplasma phagocytophilum in cattle and Ixodes persulcatus ticks. **Vet. Microbiol.**, 149(3-4):504-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

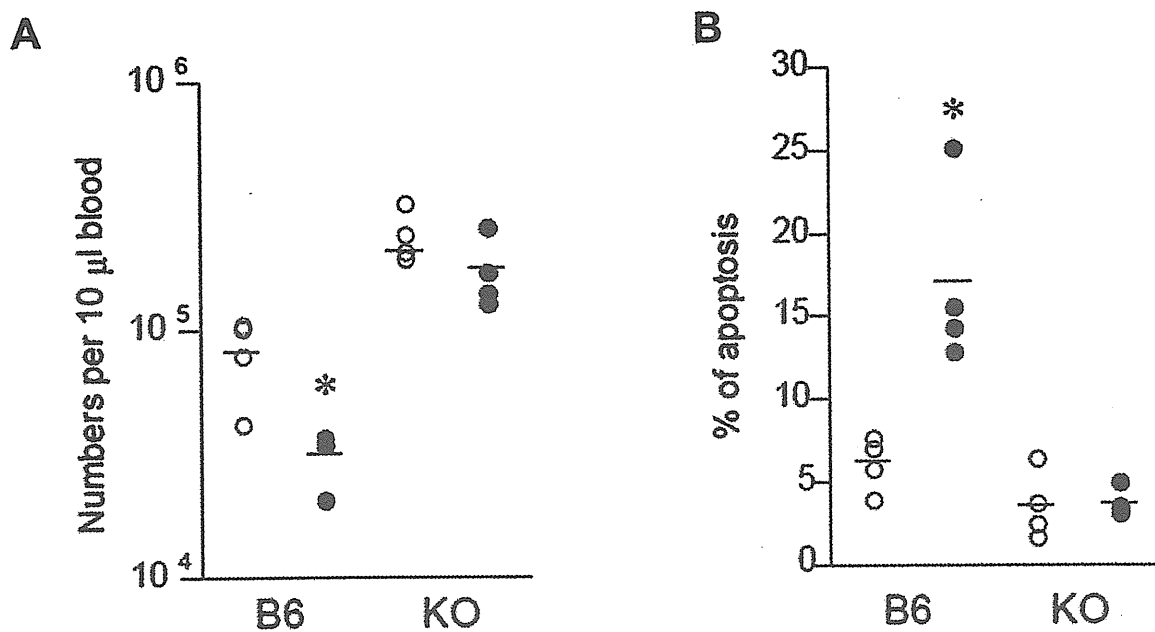


図9. インフルエンザワクチンによる末梢血白血球減少とアポトーシスの相関

野生型(B6)マウスまたはI型インターフェロンレセプター欠損(KO)マウスに、生理食塩水(O)または不活化全粒子ワクチン(●)を投与し、5時間後の末梢血中白血球数 A. 白血球にしめるアポトーシス細胞の割合 B.をフローサイトメトリーを用いて解析した。*P<0.05

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Onodera T, Takahashi Y, Yokoi Y, Ato M, Kodama Y, Hachimura S, Kurosaki T, Kobayashi K.	Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection.	Proceedings of the National Academy of Sciences	109(7)	2485-2490	2012
Matsumura T, Ato M, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K.	Interferon- γ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A Streptococcus infections.	Nature communications	3	678	2012
Ohnishi K, Takahashi Y, Kono N, Nakajima N, Mizukoshi F, Misawa S, Yamamoto T, Mitsuki YY, Fu S, Hirayama N, Ohshima M, Ato M, Kageyama T, Odagiri T, Tashiro M, Kobayashi K, Itamura S, Tsunetsugu-Yo	Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus.	Japanese Journal of Infectious Diseases	65(1)	19-27	2012

kota Y					
Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto S, Kaji T, Tsunetsugu-Yo kota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, Takemori T	HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice.	International Immunology	23(7)	433- 441	2011

Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection

Taishi Onodera^a, Yoshimasa Takahashi^{a,1}, Yusuke Yokoi^{a,b}, Manabu Ato^a, Yuichi Kodama^a, Satoshi Hachimura^b, Tomohiro Kurosaki^{c,d}, and Kazuo Kobayashi^a

^aDepartment of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan; ^bResearch Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan; ^cLaboratory of Lymphocyte Differentiation, World Premier International Immunology Frontier Research Center, and Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan; and ^dLaboratory for Lymphocyte Differentiation, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

Edited* by Michel C. Nussenzweig, The Rockefeller University, New York, NY, and approved December 29, 2011 (received for review September 18, 2011)

After pulmonary virus infection, virus-binding B cells ectopically accumulate in the lung. However, their contribution to protective immunity against re-infecting viruses remains unknown. Here, we show the phenotypes and protective functions of virus-binding memory B cells that persist in the lung following pulmonary infection with influenza virus. A fraction of virus-binding B-cell population in the lung expressed surface markers for splenic mature memory B cells (CD73, CD80, and CD273) along with CD69 and CXCR3 that are up-regulated on lung effector/memory T cells. The lung B-cell population with memory phenotype persisted for more than 5 mo after infection, and on reinfection promptly differentiated into plasma cells that produced virus-neutralizing antibodies locally. This production of local IgG and IgA neutralizing antibody was correlated with reduced virus spread in adapted hosts. Our data demonstrates that infected lungs harbor a memory B-cell subset with distinctive phenotype and ability to provide protection against pulmonary virus reinfection.

lung memory B cells | viral immunity

B-cell memory is bipartite, consisting of both long-lived plasma cells and memory B cells. Immediate protection against reinfection is mediated by long-lived plasma cells that are present in the bone marrow and secrete antibodies in an antigen-independent fashion. Recall responses are mediated by memory B cells that rapidly proliferate and differentiate in response to antigenic stimulation (1, 2). The accessibility of memory B cells to re-infecting pathogens is, therefore, likely a significant factor in determining the effectiveness of humoral protection against reinfection. Thus, it is fundamentally important to determine the protective functions of pathogen-specific memory B cells that reside at the sites of infection after the resolution of a primary infection.

In the case of influenza virus, the initial infection and replication occur in the respiratory tract. These elicit immune responses in associated secondary lymphoid organs, e.g., mediastinal lymph nodes (MLNs), which support the initial rounds of B-cell priming that follow a pulmonary infection (3). In addition, nonlymphoid organs, including the lungs, participate in these primary responses. Indeed, after primary infection with influenza virus, infected lungs often support the development of ectopic tertiary lymphoid structures known as induced bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) that contain germinal centers (GCs) and plasma cells (4). Moreover, infected lungs harbor the precursors of virus-binding plasma cells as revealed after *in vitro* stimulation of lung cells (5, 6), suggesting the existence of virus-binding memory B cells in the lungs. However, virus-binding memory B cells in the lungs have not been identified at cellular level, thereby their phenotypic and functional characterization is still lacking.

In this study, we characterized the phenotypes and functions of class-switched, influenza-specific B cells in the lungs. We show that

a fraction of class-switched, influenza-specific B cells in the lungs possess a memory phenotype, persist for a long period, and respond to virus reinfection by promoting rapid viral clearance. Our data demonstrate that local tissues are important sites for the maintenance and reactivation of protective humoral memory responses.

Results

Infection with Influenza Virus Induces Antigen-Specific Memory-Like B-Cell Population in Lung. Pulmonary infection with influenza viruses induces precursors of antigen-specific, class-switched plasma cells in the lungs (5, 6); however, the phenotypes of these cells have not been determined. To characterize the phenotype and persistence of influenza-specific B cells in lungs, we labeled B cells recovered from lung tissue with recombinant hemagglutinin (rHA) conjugated to PE. Non-B cells, transitional B cells, B1 cells, and plasma cells were excluded from our analyses by colabeling with 12 mAbs specific for their surface markers (*SI Materials and Methods* and Fig. S1). IgM/D⁺ cells were also excluded from the present analysis to reduce the risk of including naïve HA-binding B cells present in the preimmune repertoire (7). This staining procedure resulted in the clear visualization of HA-binding, class-switched B cells in mice infected with the X31 influenza virus but not with other influenza virus subtypes (Fig. S1), confirming our methods' specificity and sensitivity. Among the HA-binding IgM/D⁻ lung B cells was a CD38⁺ subset that could represent a memory B-cell population (8, 9). We first traced the numbers of both CD38⁺ and CD38⁻ B cells in lung, MLN, and spleen for 160 d after a primary infection (Fig. 1*A* and *B*). The numbers of HA-binding IgM/D⁻CD38⁻ B cells rapidly but transiently increased in lung, MLN, and spleen. However, CD38⁻ B cells in MLNs persisted for a longer period than those in lungs and spleens, similar to splenic or MLN GCs following vesicular stomatitis or influenza virus infection, respectively (10, 11).

HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B cells were found in the lung, MLN, and spleen, but lung CD38⁺ B cells required more time to reach equilibrium than that required for CD38⁺ B cells in other organs (Fig. 1*B*). This process resembles the slower accumulation of plasma cells in the lungs after influenza virus infection (11) and may reflect a requirement for structural alteration and/or niche formation in the infected lungs for B-cell localization.

Author contributions: Y.T., M.A., S.H., T.K., and K.K. designed research; T.O., Y.T., Y.Y., and Y.K. performed research; T.O. and Y.T. analyzed data; and Y.T., T.K., and K.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: ytakahas@nih.gov.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1115369109/-DCSupplemental.

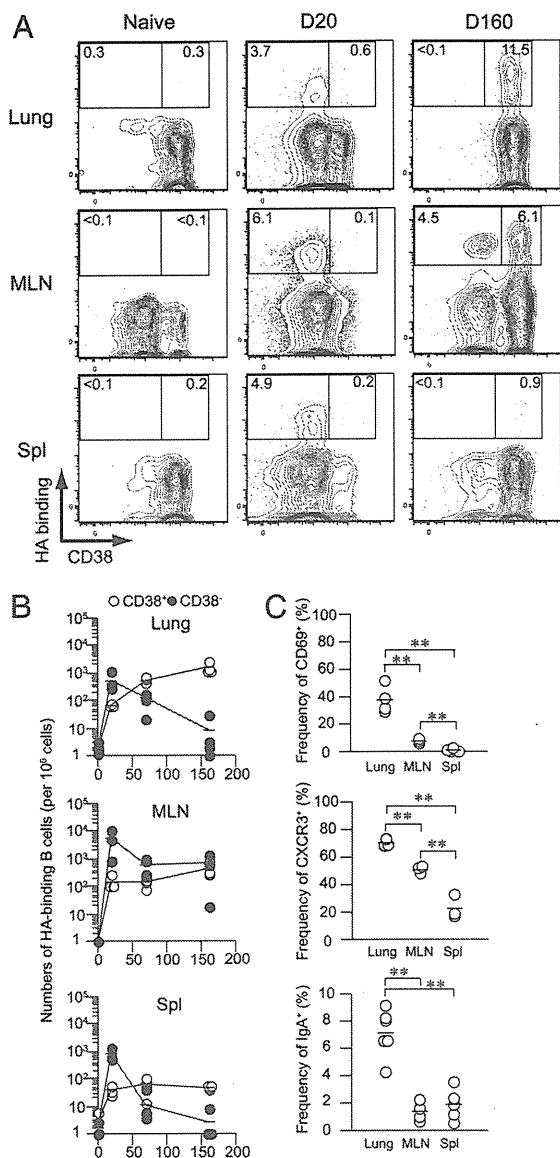


Fig. 1. Kinetics and surface phenotypes of HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B-cell populations. (A) Cells recovered at the indicated time points after infection were subjected to flow-cytometric analysis ($n = 4-5$). Representative flow data for HA-binding/CD38 expression by IgM/D⁻CD38⁺ B cells (Fig. S1) are shown. (B) Absolute cell number of CD38⁺ and CD38⁻ cells within the lymphocyte gate was plotted. (C) The frequencies of cells expressing CD69, CXCR3, or IgA are plotted. In B and C, each circle represents the result for an individual mouse (lung and spleen) and two to four pooled mice (MLN). ** $P < 0.01$.

Once generated, HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B cells stably persisted for 160 d after infection in all organs.

Although definitive markers of murine memory B cells remain to be identified (12, 13), CD73, CD80, and CD273 (PD-L2) are expressed at higher levels on splenic memory than on naive B cells (14, 15). It is also postulated that the proportions of CD80⁺ and/or CD273⁺ cells reflect the maturation of memory B cells, because CD80⁺ and/or CD273⁺ cells express isotype-switched, somatically mutated B cell receptors more frequently than CD80⁻CD273⁻ cells (15). HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B cells in the lung, MLN, and spleen expressed increased levels of CD73, CD80, and CD273 than naive B cells (IgD⁺CD38⁺B220⁺) from the same tissue (Fig. S2). The phenotypic similarity of these HA-binding B cells to hapten-binding memory B cells (14, 15)

supports our hypothesis that HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B cells represent a memory population. Significantly, HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ lung B cells expressed CD73, CD80, and CD273 at higher frequencies than comparable populations in the MLN and spleen (Fig. S2); however, CD80 expression in the lung and MLN did not differ significantly. Considering the slow and steady accumulation of HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ lung B cells, they may suggest that these lung B cells develop after progressive acquisition of mature memory phenotypes.

Further characterization revealed distinctive features of HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ lung B cells. These lung B cells showed elevated expression of CD69 and CXCR3, a chemokine receptor governing effector T-cell migration to inflamed lung tissue (16), compared with the comparable populations in MLN and spleen (Fig. 1C and Fig. S3). Notably, Lee et al. (17) recently suggested that CD69 regulates lung localization of CD8⁺ T cells following influenza virus infection. Thus, HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ lung B cells expressed elevated levels of localization factors that direct the infiltration and residence of T cells in response to lung inflammation; however, the contribution of these to lung B-cell localization is not yet known. Together, phenotypic characterization of HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ lung B cells revealed their unique phenotypes sharing surface markers for murine memory B cells with lung localization factors. Hereafter, we putatively define HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B-cell population as memory-like B-cell population.

After pulmonary influenza virus infection, IgA-secreting plasma cells develop in the lung concomitantly with the presence of IgA Ab in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) (6, 18). To know the relative distribution of virus-specific IgA⁺ B cells in lung and other organs, we compared the frequencies of IgA⁺ cells among HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B cells in lung, MLN, and spleen. As expected, the memory-like B-cell population in lung expressed IgA isotype more frequently than the comparable populations in MLN and spleen; however, the average frequency of IgA⁺ cells represented only 7% of the lung B-cell population (Fig. 1C and Fig. S3). The minor composition of IgA⁺ cells among IgM/D⁻ memory-like B cells in lungs is also supported by the previous estimation of IgA:IgG ratio (~1:10) in the precursors of plasma cells in lungs (6). This result suggests that IgA switching is enhanced but is not a major event during the development of the lung memory-like B-cell population following primary infection.

Memory-Like B-Cell Population in Lung Rapidly Differentiates into IgG- or IgA-Secreting Plasma Cells on Pulmonary Challenge.

Accelerated responses to antigen challenge are a defining feature of memory B cells. To examine whether the memory-like B-cell population in lung are indeed responding to secondary infection, we detected lung B cells proliferating shortly after virus challenge by BrdU-incorporation assay. The memory-like B-cell population in the lungs did not incorporate detectable levels of BrdU at day 80 after primary infection (labeling period: 2 d) (Fig. 2A), consistent with the maintenance as a stable B-cell population in the absence of frequently dividing precursors. In contrast, by 2-3 d after secondary infection, BrdU⁺ memory-like B-cell populations appeared in the lungs and MLNs, but not in the spleens (Fig. 2A). By day 4 postinfection, HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ cells expressing plasmablasts/plasma cell markers accumulated in the lungs, and about half of these expressed IgA (Fig. 2B). ELISPOT analysis confirmed the prompt appearance of plasma cells in the lungs consisting of comparable frequencies of IgG- or IgA-secreting plasma cells (Fig. S4). These results suggest that, in response to virus reinfection, the memory-like B-cell population in lung divided and developed into plasma cells. In addition, regardless of infrequent expression of surface IgA on the memory-like B-cell populations, HA-binding class-switched plasma cells expressed IgG or IgA isotypes at similar frequencies following secondary challenge.

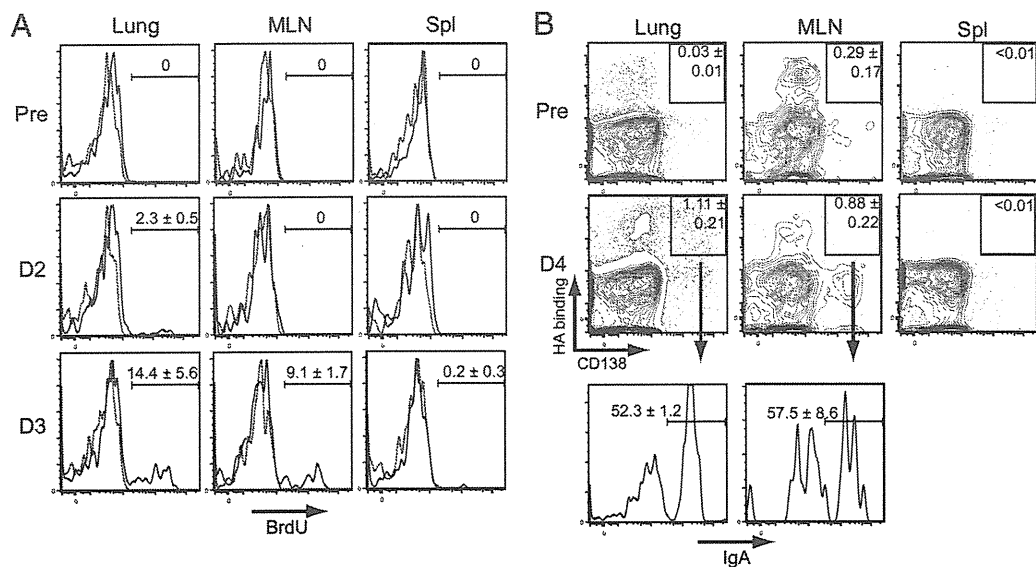


Fig. 2. Reactivation and terminal differentiation of the memory-like B-cell population in lung following secondary infection. (A) BALB/c mice were infected twice, with an 80-d interval. Mice were treated intraperitoneally with 1 mg BrdU for 48 h before analysis, and cells from the indicated organs were subjected to intracellular analysis for BrdU. Representative flow data for BrdU staining of HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B cells are presented ($n = 3$). (B) HA-binding/CD138 expression among B220^{dim}dump⁻ cells and IgA expression among HA-binding CD138⁺ cells are presented ($n = 3-5$).

Protective Function of the Memory-Like B-Cell Population in Lung. To examine the protective capacity of the memory-like B-cell population against reinfection, HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B cells were highly purified from the lungs and spleens of the mice >2 mo after primary infection, and then transferred into *scid* mice together with CD4⁺ T cells isolated from the same donors. MLNs provided too few cells for adoptive transfer experiments and were not used. Accumulating evidence indicates that iBALT serves not only a site for initiating respiratory immune responses but also as a homing site for plasma cells (18, 19). Therefore, we considered that performing iBALT structure might be required for reconstitution of local, secondary Ab responses to virus infection in adoptive hosts. To generate iBALTs in recipient mice before memory B-cell transfer, recipient *scid* mice were subjected to intranasal CpG treatment and i.v. transfer of spleen cells. As expected, this treatment generated peribronchial B-cell clusters 10 d later (Fig. 3A and B). The treated mice were inoculated with challenging viruses 1 d after transfer of purified HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B cells (Fig. 3C), and then we determined virus titers in BALFs 6 d after infection. Remarkably, the mice reconstituted with the memory-like B-cell population in lung significantly reduced virus titers in BALFs, whereas those given splenic counterparts were similar to controls (Fig. 3D). Moreover, the protective ability of lung memory-like B-cell population was not observed in recipient mice without pre-CpG treatment (Fig. 3E).

To address whether adoptive transfer of the memory-like B-cell population in lung accelerated the Ab production in the respiratory tract, the numbers of HA-binding lung plasma cells and the levels of anti-HA Abs in BALFs were evaluated at the same time point. Adoptive transfer of lung memory-like B-cell population generated sixfold more IgG- and IgA-secreting plasma cells in the lungs compared with splenic counterparts in a manner depending on pre-CpG treatment of recipient mice (Fig. 3F and G). Consistent with the results in secondary challenged BALB/c mice, the frequencies of IgA-secreting plasma cells were comparable to those of IgG-secreting plasma cells. These results support the contention that the enhanced IgA response following secondary infection reflects the increased supply of IgA-secreting plasma cells from memory and not naïve B

cells. In accordance with ELISPOT data, anti-HA IgG and IgA Ab titers in BALFs were elevated in the mice reconstituted with the lung B-cell population after CpG treatment but not in those given the splenic B-cell population (Fig. 3H). Together, these data indicate that HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ lung B cells are able to generate large amounts of Abs at the site of virus replication to confer protection more effectively than splenic counterparts. Moreover, given the successful reconstitution of local, secondary Ab responses in adoptive hosts, we conclude that HA-binding IgM/D⁻CD38⁺ B cells represent memory B cells in both phenotypes and functions.

Protective Functions of IgG Versus IgA Abs in Respiratory Tracts. Although it is established that secretory IgA can provide protection more effectively than IgG in upper respiratory tracts (20, 21), it is not known whether IgA in lower respiratory tracts contributes to protection in the presence of IgG. To estimate the contribution of IgG and IgA Abs in BALFs to virus neutralization, we first determined the titers of HA-binding IgG and IgA Abs. Consistent with comparable accumulation of IgG- and IgA-secreting plasma cells in the lungs (Figs. 2 and 3), BALFs in secondary challenged mice contained both HA-binding IgG and IgA Abs (Fig. 4A). The relative contributions of IgG and IgA to virus neutralization were estimated using BALFs depleted of either IgG or IgA Abs by affinity chromatography. We observed that removal of either IgG or IgA reduced virus-neutralizing activity of BALFs by two- to threefold (Fig. 4B), indicating partial, but not complete, reduction in activity. Moreover, removal of both IgG and IgA reduced virus-neutralizing activity to levels close to the detection limit. These data suggest that concomitant production of IgG and IgA Abs is required to achieve maximum neutralization activity.

Virus Particles Enhance Secondary IgA Response by Recruiting IgA-Secreting Plasma Cells from IgA⁺ Memory B Cells. To explore the mechanisms for enhanced IgA secretion following secondary infection, we first examined whether the enhanced IgA response depends on intranasal infection by live viruses. Similar to Fig. 3, *scid* mice were reconstituted with either lung or splenic memory B cells and then subjected to i.p. boosting with formalin-inactivated

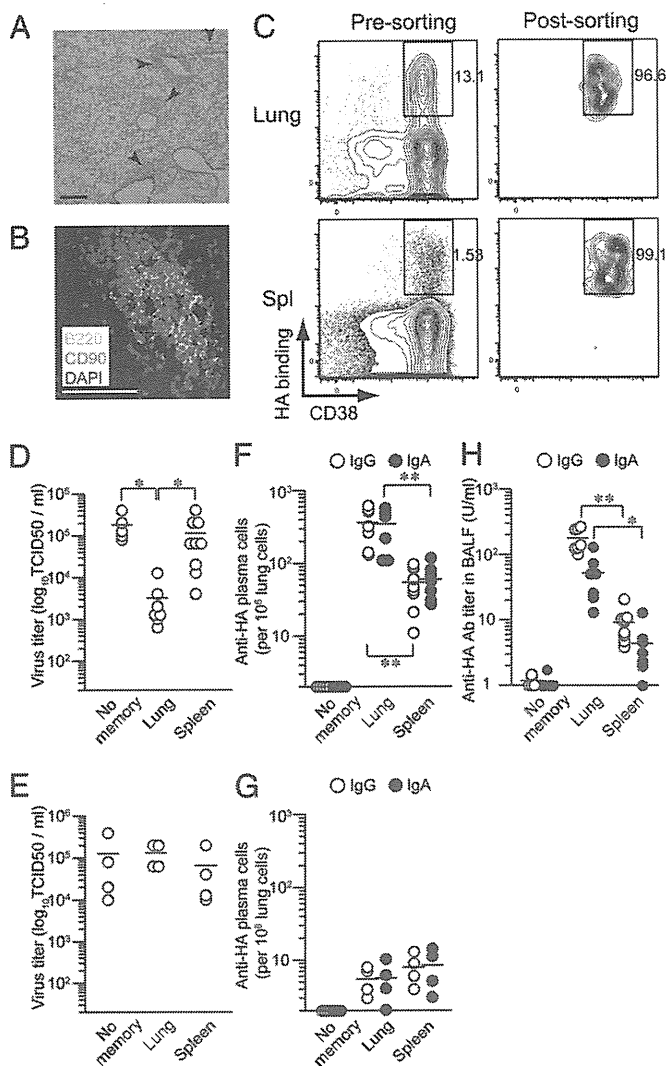


Fig. 3. Protective function of the memory-like B-cell population against secondary infection. (A) CB17-*scid* mice were injected intranasally with CpG and i.v. with BALB/c splenocytes. Ten days after treatment, lung sections were stained with HE (A) or B220 (green), CD90 (red), and DAPI (blue) (B). A representative section ($n = 6$) is presented. Arrowheads indicate iBALT-like structures. (Scale bar: 500 μm in A and 100 μm in B). (C) HA-binding IgM⁺CD38⁺ B cells were sorted from pooled lungs and spleens ($n = 10$). (D and E) CpG-treated (D) or untreated (E) CB17-*scid* mice were reconstituted with either lung or splenic memory-like B-cell population (3,000 cells per mouse) together with splenic B cells from naïve mice and CD4⁺ T cells from infected mice. Splenic naïve B cells were added to prevent the loss of small numbers of memory-like B-cell population after sorting. On day 6 postinfection, virus titers in BALFs were determined. (F and G) HA-binding IgG and IgA-secreting plasma cells in the lungs of CpG-treated (F) or untreated (G) mice were enumerated by ELISPOT. (H) HA-binding IgG and IgA Ab titers in BALFs of CpG-treated mice were estimated by ELISA. In D–H, each circle represents the result for an individual mouse. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

viruses, which are defective in replication but retain structure of virus particles. Reactivated lung memory B cells generated IgA-secreting plasma cells at increased frequencies of 40% among class-switched plasma cells (Fig. 5A and B). Although the numbers were lower than those of lung memory B cells, reactivated splenic memory B cells also increased the frequencies of IgA-plasma cells upon secondary challenge (Figs. 1C and 5B; $2.2 \pm 1.0\%$ ($n = 4$) vs. $12.1 \pm 5.4\%$ ($n = 4$), $P < 0.05$). These data indicate that enhanced IgA secretion from restimulated memory B cells does not require live virus infection or a mucosal environment.

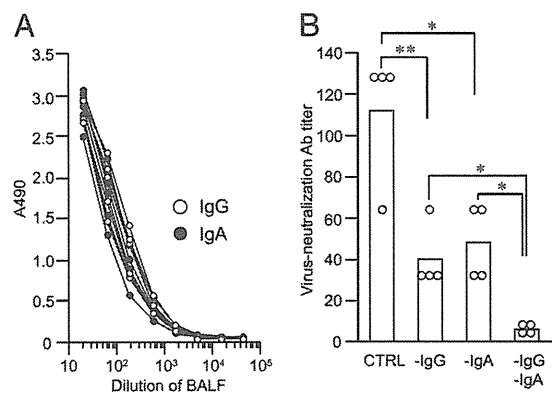


Fig. 4. Relative contribution of IgG and IgA Abs in BALFs to virus-neutralization. (A) Seven days after secondary challenge of BALB/c mice, anti-HA IgG and IgA Ab titers in BALFs were detected by ELISA. Each line represents the result for an individual mouse. (B) Virus-neutralization Ab titers in BALFs were determined by in vitro assay using MDCK cells. In B, each circle represents the result for an individual mouse. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

To examine how virus particles enhance IgA responses of re-stimulated memory B cells, HA-binding IgA⁺ and IgA[−] memory B cells in the lungs were separately transferred into recipient mice at 200 cells per mouse (Fig. 5C). Single-cell RT-PCR analysis revealed that only 2.1% of sorted IgA[−] population express J_H -C α mRNA (Fig. S5). The reactivated lung IgA[−] memory B cells generated both IgG- and IgA-secreting plasma cells approximately at a ratio of 3:1 (Fig. 5D), suggesting the recruitment of IgA-secreting plasma cells from IgA[−] memory B cells after secondary stimulation with virus particles. Moreover, IgA production through IgA[−] memory B cells required the restimulation with virus particles, as rHA proteins could not elicit IgA-secreting plasma cells from IgA[−] memory B cells, whereas IgG-secreting plasma cells were comparably generated (Fig. 5E). Together, these data show that secondary IgA production is enhanced by recruitment of IgA-secreting plasma cells from IgA[−] memory B cells in a manner dependent on virus particles.

Discussion

Here, we have demonstrated that infected lungs harbor antigen-specific, class-switched B cells expressing CD38, CD73, CD80, and CD273, which are the most reliable surrogate markers for murine memory B cells. Moreover, two lines of evidences support that they promptly differentiate into mature plasma cells upon reinfection. First, lung memory B cells started to proliferate on day 2 after reinfection, when memory B cells in MLNs and spleens were still inert (Fig. 2A). Second, transferred lung memory B cells were able to generate IgG and IgA-secreting plasma cells in the lungs of adopted hosts after reinfection. Together, we conclude that antigen-specific memory B cells localize and respond to antigenic challenge in the lungs following pulmonary influenza virus infection.

The most striking feature of lung memory B cells is their ability to reduce virus spread in lower respiratory tracts of recipient mice. Given that lung memory B cells provided local IgG and IgA Ab in recipient mice following virus challenge, it is conceivable that both isotypes contribute to virus neutralization in situ. This idea is supported by the fact that virus neutralization depends on both IgG and IgA Abs in vitro (Fig. 4). Dispensability of IgA for providing protection in the lower respiratory tracts was previously suggested as vaccinated, IgA-deficient mice were found to be fully resistant to pulmonary influenza virus infection (22). However, IgA-deficient mice might use compensatory mechanisms that lead to altered expression of other Ab isotypes (23, 24). Given that systemic injection of anti-HA IgA

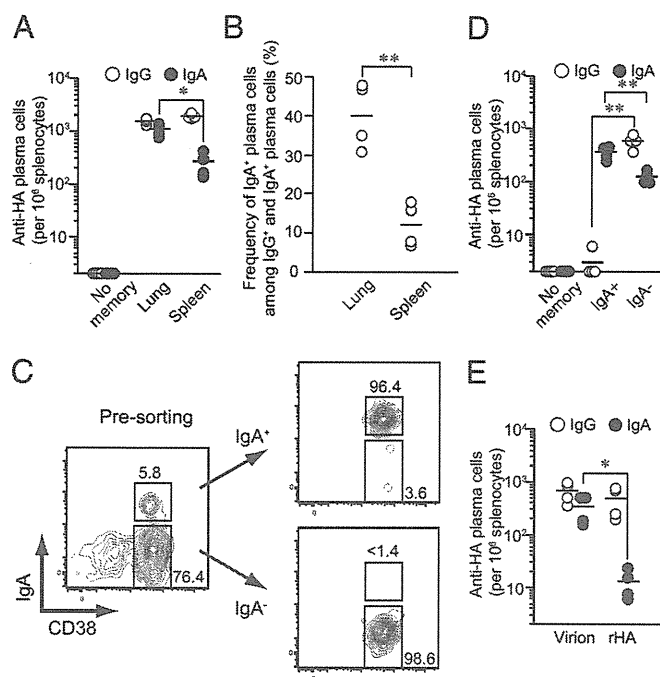


Fig. 5. Virus-dependent recruitment of IgA-secreting plasma cells from IgA⁻ memory B cells. (A) CB17-*scid* mice were reconstituted similarly to Fig. 3D and boosted with inactivated viruses. At day 7 after boosting, the numbers of HA-binding IgG⁺ and IgA⁺ plasma cells were enumerated and plotted. (B) The frequencies of IgA⁺ plasma cells among IgG⁺/IgA⁺ plasma cells are shown. (C) IgA⁺ and IgA⁻ memory B cells were sorted from pooled lung cells and splenocytes ($n = 10$). (D) The recipient mice were reconstituted with 200 IgA⁺ or IgA⁻ memory B cells in the lungs together with B cells and CD4⁺ T cells, and the numbers of IgG⁺ and IgA⁺ plasma cells were determined after boosting. (E) Mice were reconstituted with IgA⁻ memory B cells in the lungs, and the numbers of IgG⁺ and IgA⁺ plasma cells were determined after boosting with inactivated viruses or rHA. In A, B, D, and E, each circle represents the result for an individual recipient mouse. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

mAbs was effective to prevent the initial infection in lung airways (25), we prefer the idea that both IgG and IgA Abs in lung airways contribute to virus neutralization.

The mechanism underlying the ability of lung memory B cells to supply local IgG and IgA Abs remains an important question to be addressed. Lung memory B cells express CD69 and CXCR3, possible mediators of lung localization. Thus, one possibility is that transferred lung memory B cells home back to the lung, wherein they could generate IgG- and IgA-secreting plasma cells at virus replication sites. This possibility is supported by requirement for intranasal CpG treatment before memory B-cell

transfer. CpG-induced inflammation would trigger the local expression of several ligands (e.g., CXCL9 and CXCL10) for chemokine and/or homing receptors expressed on lung memory B cells. However, without pre-CpG treatment, the reduction of virus spread was not observed in the mice reconstituted with lung memory B cells (Fig. 3D–G). The alternative possibility is that transferred lung memory B cells home to the MLNs, where they supply plasma cells in the lungs upon reinfection. Although we made tremendous efforts for in vivo tracing of transferred memory B cells, our attempts were unsuccessful due to a paucity of memory B cells.

B-cell intrinsic recognition of intact viruses is often hampered by the tissue tropisms of virus replication in nonlymphoid organs. Following pulmonary influenza virus infection, lung localization of memory B cells is one way to facilitate B cell intrinsic recognition for shaping the magnitude and quality of protective effector functions. Better understanding of the generation, maintenance, and reactivation of memory B cells in lung provides important insights for the development of vaccines for protection against influenza virus and other respiratory pathogens.

Materials and Methods

Mice and Viruses. Mice and viruses used in this study are described in *SI Materials and Methods*.

Cell Preparation and Flow Cytometry. Lung cells were isolated by Percoll gradient centrifugation after digestion with collagenase D and DNase I. Single-cell suspensions from lungs, MLNs, and spleens were stained with mixtures of biotinylated mAbs, followed by fluorescence-conjugated mAbs. BrdU-labeled cells were detected by using BrdU Flow kit (BD Biosciences). Stained cells were analyzed or purified using FACS Canto II or FACS Aria (BD Bioscience). Detailed methods are included in *SI Materials and Methods*.

Quantification of Anti-HA Abs and Plasma Cells. HA-binding Abs and plasma cells were quantified by ELISA and ELISPOT using rHA as coating antigens and anti-mouse IgG- or IgA Abs as secondary Abs. Virus-neutralization Ab titers were quantified by microneutralization assay using MDCK cells and X31 virus (100 TCID₅₀) (26). Detailed methods are included in *SI Materials and Methods*.

Statistical Analyses of Data. Statistical significance was determined by an unpaired two-tailed Student *t* test. $P < 0.05$ were considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Dr. G. Kelsoe (Duke University) for critical reading of the manuscript; Dr. T. Tsubata (Tokyo Medical and Dental University) for providing the X31 virus; and Ms. E. Watanabe, E. Izumiya, and K. Fukuhara for technical assistance. This study was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology in Japan (to Y.T. and T.K.), the Japan Science and Technology Agency, Core Research for Evolutional Science and Technology (to Y.T. and T.K.); and the Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases and Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices of the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan (to Y.T. and K.K.).

- Dörner T, Radbruch A (2007) Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity* 27:384–392.
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R (2010) From vaccines to memory and back. *Immunity* 33:451–463.
- Coro ES, Chang WL, Baumgarth N (2006) Type I IFN receptor signals directly stimulate local B cells early following influenza virus infection. *J Immunol* 176:4343–4351.
- Moyron-Quiroz JE, et al. (2004) Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med* 10:927–934.
- Jones PD, Ada GL (1987) Persistence of influenza virus-specific antibody-secreting cells and B cell memory after primary murine influenza virus infection. *Cell Immunol* 109: 53–64.
- Joo HM, He Y, Sangster MY (2008) Broad dispersion and lung localization of virus-specific memory B cells induced by influenza pneumonia. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3485–3490.
- Baumgarth N, et al. (1999) Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2250–2255.
- Ridderstad A, Tarlinton DM (1998) Kinetics of establishing the memory B cell population as revealed by CD38 expression. *J Immunol* 160:4688–4695.

- Takahashi Y, Ohta H, Takemori T (2001) Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* 14:181–192.
- Bachmann MF, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM (1996) Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* 183:2259–2269.
- Rothaeuser K, Baumgarth N (2010) B cell fate decisions following influenza virus infection. *Eur J Immunol* 40:366–377.
- Bhattacharya D, et al. (2007) Transcriptional profiling of antigen-dependent murine B cell differentiation and memory formation. *J Immunol* 179:6808–6819.
- Tomayko MM, et al. (2008) Systematic comparison of gene expression between murine memory and naive B cells demonstrates that memory B cells have unique signaling capabilities. *J Immunol* 181:27–38.
- Anderson SM, Tomayko MM, Ahuja A, Haberman AM, Shlomchik MJ (2007) New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J Exp Med* 204:2103–2114.
- Tomayko MM, Steinel NC, Anderson SM, Shlomchik MJ (2010) Cutting edge: Hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *J Immunol* 185:7146–7150.
- Kohlmeier JE, et al. (2009) CXCR3 directs antigen-specific effector CD4⁺ T cell migration to the lung during parainfluenza virus infection. *J Immunol* 183:4378–4384.