

令和元年6月18日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19573

研究課題名(和文) B細胞から見たアレルギー発症機序

研究課題名(英文) B-cell mediated pathogenesis of allergic diseases

研究代表者

羽生田 圭 (Haniuda, Kei)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・講師

研究者番号：40734918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：IgE抗体はアレルギー疾患の発症や増悪因子としてよく知られる。IgE+B細胞が発現する膜型IgEが細胞上への発現のみで自発的にシグナルを発し、短命の形質細胞への分化を誘導してIgE型免疫記憶の形成を抑制する。本研究では、膜型IgEによる自発的シグナルの形成機構とB細胞の短命化誘導機構の解明を目的として研究を進めた。その結果、膜型IgEの細胞外ドメインに結合してシグナルを誘引する膜分子を同定し、膜型IgEがB細胞の代謝改変を誘導して形質細胞分化を誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、短命の形質細胞へと分化して一過性に抗体産生を誘導するが免疫記憶を形成しないというIgE+B細胞の特性は、膜型IgEによる自発的シグナルの形成と、その結果誘導されるB細胞内の代謝リプログラミングによって規定されることが判明した。このB細胞内因的なメカニズムにより、過剰産生によりアレルギー疾患発症の原因となるIgE抗体の産生が制御されていることが明らかとなった。したがって、IgE高値を示すアレルギー疾患患者では、何らかの要因により膜型IgEの自発的シグナルの形成異常やIgE+B細胞の代謝プログラムが変化している可能性が予想される。

研究成果の概要(英文)：IgE antibody is known as a cause and an exacerbating factor for allergic diseases. The membrane IgE, expressed on the surface of IgE+ B cells, autonomously transduces BCR-signaling and suppresses IgE-type memory formation by inducing short-lived plasma cell differentiation of IgE+ B cells. The aim of this study was the elucidation of the mechanism that induces spontaneous IgE-signaling and suppresses longevity of B cells. We identified a receptor that binds to the extracellular domain of membrane IgE and induces autonomous signaling. We also revealed that membrane IgE drives plasma cell differentiation through metabolic reprogramming of B cells.

研究分野：免疫学

キーワード：IgE B細胞 アレルギー 免疫記憶 抗体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgE 抗体は健常人の血清中にはごく微量しか存在せず、寄生虫感染等により一過性に産生されるが、血中半減期が約半日と短いので1週間程で検出できなくなる。マウスの免疫実験においても IgE 抗体の産生は一過性であり、さらに、IgE+のメモリーB 細胞や長期生存する抗体産生細胞 (IgE 型免疫記憶) が形成されないことが近年明らかにされている (Yang et al. *Immunity* 2012; He et al. *J Exp Med* 2013)。一方、重度のアレルギー喘息をはじめとした慢性のアレルギー疾患患者では、血清中 IgE 抗体価が高値のまま維持される場合が多く、IgE 抗体の半減期を考えると、何らかの異常で IgE+の長期生存する抗体産生細胞が形成され生体内に維持されていると考えざるを得ない。また、長期間 IgE 抗体価が低値であっても抗原再暴露により再発する花粉症や食物アレルギー等の場合には、IgE+のメモリーB 細胞が存在すると考えられる。しかし、何故このような IgE 型免疫記憶の異常形成が起きるのかは不明であった。

これまでに私たちは IgE+B 細胞が発現する膜型 IgE に着目して研究を行い、膜型 IgE が細胞上への発現のみで誘導するシグナル (自発的シグナル伝達) が IgE 型免疫記憶の形成を抑制することを見出し、そのシグナル経路を明らかにしている (Haniuda et al., *Nat Immunol.* 2016)。この結果から、膜型 IgE の自発的シグナルの形成または伝達に何らかの異常が起こり、それが IgE 型免疫記憶の異常形成をもたらしてアレルギー疾患を引き起こしているのではないかと予想された。しかしながら、どのようなメカニズムによって膜型 IgE が自発的シグナルを形成するのか、その自発的シグナルの制御機構は全く不明であった。さらに、膜型 IgE の自発的シグナルが如何にして IgE+B 細胞の短命化を誘導するのかについて、その分子機構には不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

IgE 抗体は、アトピー性皮膚炎や気管支喘息をはじめとしたアレルギー疾患の発症や増悪因子としてよく知られている。多くのアレルギー疾患では IgE+B 細胞が長期に生存し、健常人には認められないメモリーB 細胞や長期生存する抗体産生細胞 (Long-lived plasma cell, LLPC) への分化が起こり、すなわち IgE 型の免疫記憶形成が誘導されること、これが過剰な IgE 産生を誘導すると考えられる。したがって、通常は IgE 型の免疫記憶形成は抑制されており、その抑制機構の破綻が IgE の異常産生につながると考えられる。本研究では、この IgE 型の免疫記憶形成の抑制機構について B 細胞内因的なメカニズムを解明する。具体的には、IgE+B 細胞の短命化を誘導する膜型 IgE の自発的シグナル形成が如何にして起こるのか、また、膜型 IgE の自発的シグナルにより誘導される B 細胞の特性変化を明らかにする。これらを解明することにより、いかなる分子機構の破綻がアレルギー発症に繋がるのかを示し、アレルギー治療の新たな分子標的を見出すことを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

私たちは以前に、B 細胞の活性化・分化機構を解析するために induced germinal center B 細胞 (iGB 細胞) 培養系を構築した (Nojima et al., *Nat Commun.* 2011)。この系では、B 細胞の活性化因子である CD40 リガンドと B 細胞の生存因子である BAFF を発現するフィーダー (40LB) 細胞上で、ナイーブ B 細胞を IL-4 とともに培養する。この培養により、B 細胞は胚中心 B 細胞表現系を獲得して著しく増殖する iGB 細胞へと分化する。さらに、クラススイッチが高効率で誘導されて IgG1+ または IgE+ 細胞を大量に調整することが可能であり、90%以上の細胞で IgG1 領域の転写を強力に誘導することができる。本研究ではさらに、loxP 配列で挟まれたハプテン NP 抗原特異的な B1-8 免疫グロブリン重鎖 (IgH) と IgG1-Cre アレルを有するマウス (B1-8/Cy1-Cre) の B 細胞を iGB 細胞培養することで、Cre-loxP 組換えを誘導して内在性 IgH を欠損させ、NP 特異的膜型 IgH をレトロウイルスによって導入する実験系を用いた (IgH 置換系、Haniuda et al., *Nat Immunol.* 2016)。以上の方法により調整した B 細胞を用いて、定量的 PCR 解析、ウエスタンブロット解析、質量分析によるタンパク質同定およびメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

IgH 置換系を用いて種々のクラスの B 細胞受容体 (BCR) を iGB 細胞に発現させ、膜型 IgE の発現により変化する細胞の特性を解析したところ、膜型 IgG1 に比べて膜型 IgE を発現させた細胞では、解糖系の最終産物である乳酸を大量に産生することを明らかにした。さらに、IgH 置換系を用いて膜型 IgE または膜型 IgG1 を発現させた iGB 細胞をウエスタンブロット解析したところ、膜型 IgE を発現させた細胞では低酸素応答および解糖系を制御することで知られる転写因子 HIF1 α のタンパク質が増加していた。そこで、HIF1 α の活性化 B 細胞での機能を解析するために、iGB 細胞の cDNA から HIF1 α 遺伝子をクローニングしてレトロウイルスベクターに挿入し、野生型マウス由来の iGB 細胞に過剰発現させた。その結果、IgG1+細胞において形質細胞分化の亢進とアポトーシス細胞の増加が認められた。次に、膜型 IgE による解糖系の亢

進と形質細胞分化の関係性を調べるために、解糖系の阻害剤として知られるヘキソキナーゼ阻害剤 2-Deoxy-D-glucose を iGB 細胞培養系に添加したところ、IgE+細胞の自発的な形質細胞分化が抑制された。膜型 IgE により誘導される B 細胞内の代謝改変を同定するために、IgH 置換系により膜型 IgG1 または膜型 IgE を発現させた細胞について、メタボローム解析を行った。その結果、膜型 IgG1 発現細胞に比べて、膜型 IgE 細胞では前述のとおり乳酸産生の亢進が認められたとともに、TCA サイクルの中間体であるフマル酸が蓄積することが判明した。そこで、細胞膜透過性のフマル酸誘導體である Dimethyl fumarate および Diethyl fumarate を iGB 細胞培養系に添加したところ、IgG1+細胞において自発的な形質細胞分化が誘導された。以上の結果から、膜型 IgE の発現は HIF1 α の発現を恒常的に誘導して解糖系を活性化し、さらに TCA サイクルの中間体のフマル酸の蓄積を誘導して形質細胞分化を促進している可能性が明らかとなった。フマル酸は α -ケトグルタル酸に拮抗することで、 α -ケトグルタル酸依存性デオキシゲナーゼの活性を抑制することが知られており、その作用を介して形質細胞分化を誘導している可能性が考えられる。

私たちはこれまでに、膜型 IgE の自発的シグナル形成の責任領域が細胞外ドメインに存在することを見出しており (Haniuda et al., Nat Immunol. 2016)、その結果から、活性化 B 細胞に発現する何らかの細胞外分子が膜型 IgE と相互作用することで自発的なシグナル伝達が誘導されることが予想された。そこで、膜型 IgE の細胞外ドメインに結合する分子の同定を目的として、細胞外領域全てを膜型 IgE に置換して C 末端に FLAG タグを付加した NP 特異的な膜型 IgG1 変異体 (EctoE-FLAG)、および対応するドメインが膜型 IgE の CH1-2 に置換して C 末端に Flag タグを付加した NP 特異的な膜型 IgG1 変異体 (CH1-2E-FLAG) をそれぞれ IgH 置換系により iGB 細胞に発現させた。ウエスタンブロットにより、EctoE-FLAG は Syk のリン酸化に代表される自発的シグナルを誘導し、CH1-2E-FLAG は自発的シグナルを誘導しないことが確認された。それぞれの細胞溶解物から、抗原である NP をセファロースに共役した NP-ビーズを用いて BCR 複合体を免疫沈降し、導入した BCR に対して NP よりも高親和性を示す NIP で溶出した。さらにこの溶出物を、抗 FLAG 抗体を結合させたビーズで免疫沈降し、FLAG ペプチドで溶出した。この二段階の免疫沈降により精製したサンプルを SDS-PAGE で分離した後に銀染色を行い、EctoE-FLAG のみに認められる複数のバンド (膜型 IgE の細胞外ドメインに会合する分子) を切り出して質量分析法によりタンパク質を同定した。69kDa 付近バンドの質量分析の結果、IL-1 受容体の構成分子である IL-1RAP が同定された。次に、IL-1RAP と膜型 IgE の会合を検証するために、iGB 細胞の cDNA から IL-1RAP 遺伝子をクローニングし、タンパクの C 末端側に FLAG タグを付加したものをレトロウイルスベクターに挿入し、IgH 置換系を用いて膜型 IgE または膜型 IgG1 と共に iGB 細胞に共発現させた。それぞれの細胞溶解物から NP-ビーズを用いて BCR 複合体を免疫沈降し、その沈降物について、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット解析した。その結果、精製した膜型 IgE の複合体においてのみ FLAG シグナルが確認されたことから、IL-1RAP は恒常的に膜型 IgE と会合していることが明らかとなった。膜型 IgE と IL-1RAP との会合の生理的な意義を明らかにするために、IL-1RAP 欠損マウスを入手しその B 細胞を解析した。コントロールおよび IL-1RAP 欠損マウスの脾臓 B 細胞を精製し、iGB 細胞培養系で IL-4 存在下 5 日間培養して IgE へのクラススイッチを誘導した。その後、40LB 細胞を除去して iGB 細胞を単離し、その細胞溶解物を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、膜型 IgE の自発的シグナル伝達により活性化される、BCR 直下のキナーゼである Syk とその下流のアダプタータンパク質である BLNK のリン酸化が、IL-1RAP 欠損 B 細胞で減弱していることが明らかとなった。

以上の結果により、過剰産生によりアレルギー疾患を誘導する可能性を持つ IgE 抗体の産生は、B 細胞の内因的な抑制機構により厳密に制御されている。すなわち、短命の形質細胞へと分化して一過性に抗体産生を誘導するが免疫記憶を形成しないという IgE+B 細胞の特性は、膜型 IgE とその活性化因子となる IL-1RAP によって自発的シグナルが誘導されて決定される可能性が本研究により明らかとなった。その膜型 IgE と IL-1RAP との相互作用が破綻した場合、IgE 型の免疫記憶が形成されて長期の IgE 産生に至ることが予想される。さらに、膜型 IgE による自発的シグナルは細胞内の代謝プログラミングを誘導することで B 細胞の分化運命を制御することが明らかとなった。したがって、IgE 高値を示すアレルギー疾患患者では、何らかの要因により膜型 IgE の自発的シグナルの形成異常や IgE+ B 細胞の細胞内代謝プログラムが変化している可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) [Haniuda, K.](#) and Kitamura, D. Induced Germinal Center B Cell Culture System. BIO-PROTOCOL 9: 3163, 2019. 10.21769/BioProtoc.3163
- (2) Takatsuka, S., Yamada, H.*, [Haniuda, K.*](#), Ichihachi, M.*, Chiba, J. and Kitamura, D. DNA Immunization Using in vivo Electroporation for Generating Monoclonal Antibodies Against Mouse IL-9R. BIO-PROTOCOL 9: 3174, 2019. (*equally contributed). 10.21769/BioProtoc.3163

- (3) Takatsuka, S., Yamada, H.*, Haniuda, K.*, Saruwatari, H., Ichihachi, M., Renaud, JC. and Kitamura, D. IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses. *Nature Immunology* 19: 1025-1034, 2018. (*equally contributed). <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0177-0>
- (4) Haniuda, K., Nojima, T. and Kitamura, D. In vitro-induced germinal center B cell culture system. *Methods in Molecular Biology* 1623: 125-133, 2017.

[学会発表] (計 13 件)

- (1) Kei Haniuda, Saori Fukao and Daisuke Kitamura. Metabolic control of germinal center B cell and plasma cell differentiation. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡国際会議場、2018 年
- (2) Saori Fukao, Kei Haniuda and Daisuke Kitamura. The mechanism of B cell activation in T cell independent responses via metabolic reprogramming. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡国際会議場、2018 年
- (3) Shunsuke Amano, Saori Fukao, Kei Haniuda and Daisuke Kitamura. Inducing mechanisms of somatic hypermutation in germinal center B cells. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡国際会議場、2018 年
- (4) Kei Kato, Kei Haniuda and Daisuke Kitamura. Molecular mechanisms that trigger autonomous signaling from membrane IgE. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡国際会議場、2018 年
- (5) Hana Ebiko, Kei Haniuda, Kei Kato and Daisuke Kitamura. Regulation of B cell memory formation and metabolism by IgE-BCR. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡国際会議場、2018 年
- (6) Tadahiro Kodama, Yui Sakamoto, Kei Haniuda and Daisuke Kitamura. A role of membrane-bound IgG1 ubiquitination in B cell activation. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡国際会議場、2018 年
- (7) Yoshihito Nihei, Kei Haniuda, Mizuki Higashiyama, Yusuke Suzuki and Daisuke Kitamura. Characteristics of naïve B cells in murine IgA nephropathy. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡国際会議場、2018 年
- (8) Shoko Hosoda, Keiko Fujisaki, Yuta Ueno, Chiharu Nishiyama, Kei Haniuda, Akihisa Oda, Daisuke Kitamura and Ryo Goitsuka. Transcription factor Tlx1 regulates a niche for innate-like B cells in the spleen. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡国際会議場、2018 年
- (9) Kei Haniuda, Saori Fukao and Daisuke Kitamura. Germinal center B cell development by glycolysis and mitochondrial metabolism. KEYSTONE SYMPOSIA, B Cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity, Dresden, Germany. 2018.
- (10) Kei Haniuda, Saori Fukao, Daisuke Kitamura. Molecular mechanisms for prevention of IgE-memory formation by membrane IgE. 19th International Conference on Lymphatic Tissues and Germinal Centres in Immune Reactions, Venice, Italy. 2017.
- (11) Saori Fukao, Kei Haniuda, Hiroki Sasanuma, Nobuaki Yoshida, Daisuke Kitamura. Regulation of IgE production by an RNA binding protein. 第 46 回日本免疫学会学術集会、仙台国際センター、2017 年
- (12) Kei Haniuda, Saori Fukao, Daisuke Kitamura. Germinal center B cell development by glycolysis and mitochondrial metabolism. 第 46 回日本免疫学会学術集会、仙台国際センター、2017 年
- (13) 羽生田圭. 膜型 IgE による B 細胞記憶の制御機構. 第 26 回東京免疫フォーラム、東京大学医科学研究所、2017 年

〔図書〕（計 3 件）

- (1) 羽生田圭、北村大介：膜型 IgE による B 細胞記憶の形成制御とアレルギー抑制機構. 医学のあゆみ 265 (9): 762-766 2018 年 6 月 医歯薬出版
- (2) 羽生田圭、深尾紗央里、北村大介：IgE 産生の制御機構. 臨床免疫・アレルギー科 67 (5): 506-512 2017 年 科学評論社
- (3) 羽生田圭、北村大介：膜型 IgE による B 細胞記憶形成の制御機構. 感染・炎症・免疫 47 (2): 20-29 2017 年 鳥居薬品株式会社

〔その他〕

ホームページ等

<https://dai3kitamura.jimdofree.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。