

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293116

研究課題名(和文) IgE陽性B細胞の特異な分化・維持・動態の制御機構の解明

研究課題名(英文) A study of the regulational mechanisms for IgE+ B cell development and maintenance

研究代表者

北村 大介 (KITAMURA, DAISUKE)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：70204914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：IgEはアレルギーの主因であるが、IgE陽性B細胞の分化機構、そのアレルギー疾患との関連は不明である。正常マウスの免疫応答ではIgE陽性B細胞は短命のプラズマ細胞に分化しやすく記憶B細胞や長期生存プラズマ細胞にはならない。本研究では、膜型IgEが胚中心B細胞上に発現するだけで短命のプラズマ細胞への分化を誘導し、そのシグナル伝達にはSykの下流でBLNKとCD19を介する2つの経路が重要であること、また、mIgEがCD19と結合し、CD19-PI3K-Akt経路を介してプラズマ細胞分化を誘導すること、BLNK, CD19を介したシグナル経路の欠陥がアレルギーの原因となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：IgE is critical in the pathogenesis of allergic diseases, but it emerge only transiently during the immune response and kept low in healthy individuals. B cells switch to IgE in germinal center (GC), but that the IgE+ B cells immediately become short-lived plasma cells (PCs) and not differentiate into long-lived (LL) PCs or memory B cells. We found that the expression of membrane IgE (mIgE) spontaneously induces PC differentiation and apoptosis through signaling pathways from Syk via BLNK or CD19. Notably, mIgE binds to CD19 and activates CD19-PI3kinase-Akt pathway leading to the PC differentiation. In the BLNK-deficient mice, IgE+ GC and memory B cells remained high in number during immune response, and more IgE+ LLPCs and serum IgE were produced, rendering the mice hypersensitive to a secondary challenge. A similar phenotype was also observed in CD19+/- mice. These results suggest that somatic defects of the mIgE signaling pathways through BLNK and CD19 can cause allergic diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 獲得免疫 アレルギー IgE 胚中心 シグナル伝達 免疫記憶

1. 研究開始当初の背景

IgE の血中半減期は約 12 時間と短いにも拘らず、アレルギー患者では血清 IgE が長期に高い値で維持されていることが多いことから IgE を産生する長期生存プラズマ (LP) 細胞が存在すると考えられる。さらに、長い無症候期間を経ても抗原暴露により再発する花粉症や食物アレルギー等には IgE 陽性の記憶 B (B_{mem}) 細胞の関与が疑われる。一方、生理的には IgE は寄生虫感染により産生されるが、健康なヒトおよびマウス血清中には微量しか存在せず、マウスを免疫しても IgE 陽性 B 細胞の検出は非常に難しい。マウスを T 細胞依存性 (TD) 抗原で免疫すると、抗原特異的 IgM/D 陽性ナイーブ B 細胞がヘルパー T (Th) 細胞より活性化シグナルを受けて増殖し、短期生存プラズマ (SP) 細胞からクラススイッチした IgG 陽性の胚中心 B 細胞へと分化する。そして、胚中心 B 細胞では体細胞突然変異が起こり、その中から選択された高親和性クローンが IgG 陽性の記憶細胞 (B_{mem} 細胞か LP 細胞) へと最終分化し、免疫記憶を形成する。一方、IgE 陽性 B 細胞は主に IgG 陽性胚中心 B 細胞からクラススイッチを経て産生されるが、直ちに SP 細胞へと分化し、IgE 陽性の記憶細胞はほとんど形成されない。私たちは、 B_{mem} 細胞移入実験により、記憶 (2 次) 応答において産生される高親和性 IgE 抗体は IgG1 陽性 B_{mem} 細胞由来であることを示している (未発表)。以上より、免疫応答における IgE 陽性 B 細胞の分化は IgG 陽性 B 細胞とは異なった機構で制御されていると考えられる。

2. 研究の目的

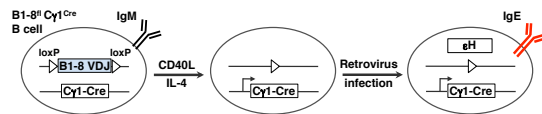
BLNK (BASH/SLP-65) は B 細胞受容体 (BCR) の下流で Btk, PLC γ 2 等多くのシグナル因子と結合することでシグナル伝達の核となるアダプター分子である。BLNK 欠損マウスでは T 細胞非依存性 (TI) 抗原の免疫による抗体産生は全く起こらない。TD 抗原に対しても IgM 抗体はほとんど産生されないが、IgG 抗体は遅れて産生され 4 週以降には正常マウスと同程度の抗体価を示す。この後期 IgG 抗体の抗原親和性や突然変異率は正常である。しかし、2 次免疫の直後にマウスがアナフィラキシーショックで死亡することが見出された。この原因として、BLNK 欠損マウスでは初回免疫後長期経過した後も、血中の抗原特異的 IgE 抗体価が高値のまま維持され、脾臓中の IgE 陽性プラズマ細胞・ B_{mem} 細胞も維持されていた。よって、BLNK を介したシグナルは IgE 陽性の B_{mem} 細胞および LP 細胞の形成を負に制御していると考えられた。以上のことから、IgE 陽性 B 細胞の特異な分化誘導には IgE 型 BCR 自体からの細胞内シグナルが関わっているのではないかと考えられた。これを検証し、そのシグナル伝達経路を解明し、また、その破綻によるアレルギー発症機序を解明することを目的として、本

研究を開始した。

3. 研究の方法

免疫実験では、ハプテン抗原として知られる (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl (NP) を鶏 γ グロブリン (CGG) と結合させたものを抗原として用いた。特に IgE 陽性 B 細胞を誘導する場合は体幹部・尾基部の皮下に免疫し、鼠径リンパ節をフローサイトメトリーで解析した。

任意の BCR を発現させる培養系として、NP 特異的抗原受容体の V_H 鎖遺伝子 $B1-8^{lox}$ および $C\gamma$ 領域 $C\gamma$ -Cre の 2 つの改変を有するノックインマウスの脾臓 B 細胞を用いた。 $B1-8$ H 鎖は λ L 鎖とペアになると、NP 抗原に特的に結合する抗原受容体を形成する。CD40L と BAFF を発現させた Balb/c 3T3 細胞 (40LB) をフィーダーとして、この B 細胞を IL-4 存在下で 5 日間培養する (iGB 細胞培養) すると、Cre の作用により、loxP 配列で囲まれた $B1-8$ V 遺伝子が欠失し、内在性 BCR が消失する。培養 2 日目に任意の H 鎖遺伝子をレトロウィルスベクターにより導入すると、任意の BCR を発現させる事ができる。これをクラススワッピング (CS) 法とよぶことにした。プラズマ細胞分化およびアポトーシスを検証する場合は、5 日目にフィーダーとサイトカインを抜いたただの培地で 1 日間培養した。



4. 研究成果

(1) 上記 CS 法を用いて、全てのクラス・サブクラスの BCR を iGB 細胞に発現させたところ、mIgE のみが強くプラズマ細胞分化およびアポトーシスを誘導した。また、mIgE 発現により、抗原非依存的に、Src family, Syk, BLNK, JNK, p38, CD19, PI3K(p85) の活性化 (リン酸化) および IRF4 の発現が亢進した。

(2) CS 法にて種々の mIgE と mIgG1 の H 鎖キメラ受容体を強制発現させたところ、mIgE 発現によるアポトーシスの誘導には mIgE の細胞外領域 $C\epsilon 1$ - $C\epsilon 4$ ドメインのすべてが、プラズマ細胞分化にはそれに加えて mIgE の細胞膜直上の EMPD ドメインが必要であることが分かった。いずれにも、mIgE の膜貫通・細胞内ドメインは必要でなかった。

(3) 上記のキメラ受容体による自発的シグナル伝達を生化学的に解析した結果、mIgE による Syk と BLNK のリン酸化には $C\epsilon 1$ - $C\epsilon 4$ ドメインのすべてが、CD19 のリン酸化および mIgE と CD19 との結合には EMPD のみが必要であることが分かった。

(4) iGB 細胞を用いた解析により、mIgE 発

現によるアポトーシスおよびプラズマ細胞分化の誘導には Syk, BLNK, JNK, p38 が必要であり、また、プラズマ細胞分化誘導には加えて CD19, PI3K, Akt, IRF4 が必要であることが分かった。

(5) CD19^{+/-}マウスの免疫応答を解析したところ、CD19^{+/+}マウスと比べて mIgE 陽性の胚中心 B 細胞が有意に増加し、血清 IgE 抗体が長期に維持された。

(6) BLNK^{-/-}マウスに免疫後長期に維持される IgE⁺ LP 細胞と、IgG1⁺ LP 細胞を分離して、V 遺伝子の塩基配列を調べたところ、IgE 抗体は IgG1 と同程度に変異が導入されて親和性が成熟していることが分かった。

(7) BLNK^{-/-}マウスおよび CD19^{+/-}マウスでは2次免疫によるアナフィラキシー応答(体温低下)が亢進していた。

以上、mIgE の発現による自発的な B 細胞のアポトーシスおよびプラズマ細胞分化を誘導するシグナル伝達機構の全貌を解明することができた。すなわち、mIgE H 鎖の Cε1-Cε4 全体が Syk 活性化に始まるこのシグナルの惹起に必要で、さらに EMPD を介した CD19 の結合により、CD19-PI3K-Akt 経路が活性化され、プラズマ細胞分化が増強されることが分かった。このメカニズムにより、T 細胞依存性免疫応答において生じる IgE 陽性胚中心 B 細胞は抗原非依存的な mIgE シグナルにより、直ちに短命のプラズマ細胞に分化し、死に至る。それにより、IgE 陽性の記憶 B 細胞や長期生存プラズマ細胞が形成されず、アレルギー発症が予防されていると考えられる。そのことは、BLNK 欠損マウスや CD19 ヘテロ変異マウスの解析結果により証明された。さらに、BLNK 欠損マウスは抗原再暴露によりアナフィラキシーを起こすことから、IgE が関わる人のアレルギー疾患のモデル動物として有用であると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 羽生田 圭、深尾 紗央里、北村 大介、膜型 IgE の自発的シグナル伝達による B 細胞記憶形成の制御、臨床免疫・アレルギー科、査読無、65 巻、2016、329-333
- ② Kuraoka, M., Schmidt, A.G., Nojima, T., Feng, F., Watanabe, A., Kitamura, D., Harrison, S.C., Kepler, T.B. and Kelsoe, G. Complex antigens drive permissive clonal selection in germinal centers. *Immunity* 44 (3): 542-552, 2016. 査読有 doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.010.
- ③ Webb, L.M., Datta, P., Bell, S.E., Kitamura, D., Turner, M. and Butcher, G.W. GIMAPI

is essential for the survival of naive and activated B cells in vivo. *J. Immunol.* 196 (1): 207-216, 2016. 査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1501582.

- ④ Purwada, A., Jaiswal, M.K., Ahn, H., Nojima, T., Kitamura, D., Gaharwar, A.K., Cerchietti, L. and Singh, A. Ex vivo engineered immune organoids for controlled germinal center reactions. *Biomaterials* 63: 24-34, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.002.
- ⑤ Kitabatake, M., Soma, M., Zhang, T., Kuwahara, K., Fukushima, Y., Nojima, T., Kitamura, D. and Sakaguchi, N. JNK Regulatory Molecule G5PR Induces IgG Autoantibody-Producing Plasmablasts from Peritoneal B1a Cells. *J. Immunol.* 194(4):1480-1488, 2015. 査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1401127.
- ⑥ Wu, L., Parekh, V.V., Hsiao, J., Kitamura, D. and Van Kaer, L. Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (43): E4638-E4647, 2014. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1324052111.
- ⑦ Fukao, S., Haniuda, K., Nojima, T., Takai, T. and Kitamura, D. Gp49B-mediated negative regulation of antibody production by memory and marginal zone B cells. *J. Immunol.* 193 (2): 635-644, 2014. 査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1302772.
- ⑧ Moutai, T., Yamana, H., Nojima, T. and Kitamura, D. A novel and effective cancer immunotherapy mouse model using antigen-specific B cells selected *in vitro*. *PLoS One* 9 (3): e92732, 2014. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0092732.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Saori Fukao, Kei Haniuda, Daisuke Kitamura: A new primary B cell culture system that can induce somatic hypermutation of immunoglobulin genes. 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)、2015 年 11 月 20 日
- ② Daisuke Kitamura, Shogo Takatsuka, Hiroshi Saruwatari, Hiroyuki Yamada, Saori Fukao, Kei Haniuda: Regulatory mechanisms for memory B cell generation and function. 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)、2015 年 11 月 19 日
- ③ Takuya Koike, Kei Haniuda, Shu Horiuchi, Daisuke Kitamura: CD40-regulated differentiation of memory B cell subsets is independent of isotype and affinity of B-cell antigen receptors. 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)、2015 年 11 月 18 日。

- ④ Shogo Takatsuka, Hiroyuki Yamada, Daisuke Kitamura: A role of IL-9 receptor on B cells in the T-dependent immune responses. 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)、2015年11月18日。
- ⑤ Saori Fukao, Kei Haniuda, Daisuke Kitamura: A novel regulatory role of gp49B in TD immune response. The 3rd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum. Berlin (Germany), October 30-31, 2015.
- ⑥ Kei Haniuda, Saori Fukao, Tadahiro Kodama, Hitoshi Hasegawa, Daisuke Kitamura: Autonomous signaling from IgE B cell receptor suppresses B cell memory formation. The 3rd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum. Berlin (Germany), October 30-31, 2015.
- ⑦ Daisuke Kitamura: IL-9 as a positive regulator of memory B cells. The 3rd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum (IIMVF). Berlin (Germany), October 30 - 31, 2015.
- ⑧ Daisuke Kitamura: BLNK-knockout mice as a model of allergic diseases. International Symposium of the Center for Animal Disease Models 2015. 学士会館(東京), July 21, 2015.
- ⑨ Masahiro Kitabatake, Miho Soma, Tianli Zhang, Takuya Nojima, Daisuke Kitamura, Nobuo Sakaguchi: JNK regulatory molecule G5PR induces peritoneal B1a cells into IgG autoantibody-producing plasmablasts. 第43回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府、京都)、2014年12月12日。
- ⑩ Hiroshi Saruwatari, Shogo Takatsuka, Daisuke Kitamura: A role of IL-9 receptor on B cells in the T-dependent immune responses. 第43回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府、京都)、2014年12月11日。
- ⑪ Kei Haniuda, Saori Fukao, Daisuke Kitamura: BLNK regulates IgE B-cell receptor signaling and B-cell memory formation. 第43回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府、京都)、2014年12月11日。
- ⑫ Takuya Koike, Shu Horiuchi, Daisuke Kitamura: CD40 signaling quantity may determine the fate of germinal center B cells. 第43回日本免疫学会学術集会、京都国際会館(京都府、京都)、2014年12月10日。
- ⑬ Daisuke Kitamura: Molecular mechanisms for the development of B-cell memory. The 2nd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum. La Jolla (USA), August 25-26, 2014.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：B細胞集団の製造方法
 発明者：北村 大介、中石 智之
 権利者：学校法人 東京理科大学、株式会社 カネカ
 種類：特許
 番号：2014-136631
 出願年月日：2014年7月2日
 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~ribsjm/kitamura/ab/indexj.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 大介 (KITAMURA, Daisuke)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号：70204914