

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19138

研究課題名(和文)膜型IgEシグナルによるB細胞の運命制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms for B-cell fate decision by membrane IgE signaling

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・助教

研究者番号：40734918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：過剰なIgEの産生はアレルギー発症の原因となる。通常、IgE+ B細胞では未知のメカニズムによって長期生存が抑制されており、メモリーB細胞や長期生存プラズマ細胞へと分化せずIgE産生は一過性に保たれている。本研究では、膜型IgEの自発的シグナル伝達がB細胞の短命化を誘導することの詳細なメカニズムを解明した。膜型IgEはCH1-4ドメインを介して、抗原非依存的にSyk-BLNK経路を活性化して細胞死、細胞膜直上のドメインを介してCD19経路を介してプラズマ細胞分化を誘導することを明らかにした。また、これら膜型IgEのシグナル伝達経路の異常がアレルギーの原因になることを同定した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that dysregulated production of IgE can be a cause of allergic disorders. Normally, the differentiation of IgE+ B cells into memory-B or long-lived plasma cells is suppressed by unknown mechanisms. However, it has been unclear how the propensity of IgE+ B cells toward short-lived fate is induced. In this study, I revealed molecular mechanisms how the autonomous signaling of membrane IgE (mIgE) suppresses B-cell maintenance. I found that CH1-4 domain of mIgE spontaneously induces cell death through the activation of Syk-BLNK axis and membrane proximal domain of mIgE promotes plasma cell differentiation through CD19-pathway. I also demonstrated that defects of the mIgE-signaling could be a cause of allergy.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 アレルギー IgE 胚中心メモリーB細胞 長期生存プラズマ細胞 免疫記憶

## 1. 研究開始当初の背景

I型アレルギー反応を誘導する IgE は、T細胞依存性免疫応答において誘導された、IgE<sup>+</sup> B細胞がプラズマ細胞へと分化することで産生される。抗原を認識した IgM<sup>+</sup> ナイーブ B細胞はヘルパーT細胞へ抗原を提示し、CD40LやIL-4等を介したシグナルを受けて活性化し、主にIgGへとクラススイッチする。その後、短期生存プラズマ細胞か胚中心(GC) B細胞へと分化する。GCでは、免疫グロブリン遺伝子の体細胞突然変異が導入され、選択された抗原高親和性クローンは、メモリーB細胞と長期生存プラズマ細胞という二種類の記憶細胞へと分化して免疫記憶を形成する。

今までに、IgE<sup>+</sup> B細胞は一過性にGC内に存在するが維持されず、直ちに短期生存プラズマ細胞へと分化してしまい、記憶細胞へとはほとんど分化せずIgE産生は長続きしない。実際に、健康人や正常な動物の血清中にIgEは殆ど検出されない。しかしながら、アレルギー患者では血中IgEが高い値で維持されることが多く、IgE型の長期生存プラズマ細胞が存在すると考えられる。また、長い年月をこえて記憶される食物アレルギー等にはIgE<sup>+</sup>メモリーB細胞が関与すると考えられる。したがって、通常は何らかのメカニズムによってIgE<sup>+</sup> B細胞の記憶細胞への分化が抑制されているが、その恒常性破綻がアレルギーの原因となる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

IgE<sup>+</sup> B細胞は短命であり、長期に生存する記憶細胞へとは分化せず、過剰なIgEの産生が抑制されている。しかし、何がその記憶細胞への分化を抑制しているのかは今まで不明であった。申請者は、IgE<sup>+</sup> B細胞が発現する膜型IgEが抗原非依存的な、自発的シグナル伝達を誘導することで、B細胞の短命化を誘導することを見出した。この知見をもとに、本研究では膜型IgEの自発的シグナル伝達が如何にして細胞の短命化を誘導するのかを明らかにし、IgE<sup>+</sup> B細胞の分化・維持の制御機構の解明することを目的に研究を進めた。

## 3. 研究の方法

IgE<sup>+</sup> B細胞を *in vitro* で解析するために、申請者らが以前に確立した、誘導性 GC B (induced germinal center B: iGB) 細胞培養系を用いた (Nojima, Haniuda et al. Nat. Commun. 2011)。この系では、CD40LとBAFFを発現するフィーダー細胞上でIL-4存在下ナイーブB細胞を培養する。その結果、GC B細胞表現型を示すiGB細胞が著しく増殖し、IgG1あるいはIgEへとクラススイッチする。

膜型IgEや、種々のBCR変異体の機能を解析するために、培養B細胞に任意のBCRのみを発現させる培養系を用いた。この系では、免疫グロブリン重鎖可変領域がloxP配列で挟まれた遺伝子とIgG1-Creという2つの改変

を有するノックインマウスB細胞をiGB培養する。その結果、Creリコンビナーゼの作用で重鎖可変領域遺伝子が欠損し、内在性BCRが消失する。その後、レトロウィルスベクターによって目的の重鎖遺伝子を導入して、任意のBCRを発現したB細胞を得る(クラススワッピング法)。このB細胞をフローサイトメトリー解析および免疫沈降やSDS-PAGE、ウエスタンブロットティングなどの生化学的な実験に用いた。また、BCR複合体を精製する際には、レトロウィルスベクターによってハプテンNP特異的な重鎖遺伝子を導入した細胞を用意し、その細胞溶解液からNP-ビーズを用いてBCRを精製した。

*in vivo* のIgE<sup>+</sup> B細胞を解析するために、ハプテンNPを多価に結合したニワトリガンマグロブリン(NP-CGG)をアラムアジュバントと混合したものを抗原として、マウスの両脇腹および尾根部の皮下に免疫を行った。その後、所属リンパ節である鼠径リンパ節を採取してフローサイトメトリー解析した。

マウスを免疫後の各リンパ組織における抗原特異的抗体産生細胞数をNP-BSAを固相化したプレートを用いてELISPOT法により算出した。

能動的アナフィラキシー反応を誘導する実験では、NP-CGGアラムで免疫後、100日後のマウスに、生理食塩水で希釈したNP-CGGを尾静脈より投与後、継時的に直腸温をモニターし、体温低下を評価した。

## 4. 研究成果

(1) iGB細胞培養系およびクラススワッピングを用いて、膜型IgEが抗原非依存的に細胞死を誘導することを見出した。さらにこの細胞死誘導には、アダプター分子BLNKを介したJNK及びp38 MAPKの活性化が重要であることを同定した。培養したBLNK欠損B細胞では、膜型IgEによる細胞死誘導がほとんど誘導されなかった。また、BLNK欠損B細胞では膜型IgEによる自発的なプラズマ細胞分化も若干抑制されており、阻害剤を用いた実験から、JNK及びp38 MAPKの活性化がプラズマ細胞分化を増強することが判明した。

また、マウスをNP-CGGアラムで免疫して *in vivo* のIgE<sup>+</sup> GC B細胞を解析した際には、BLNK依存的な細胞死の亢進が見られた。免疫後のBLNK欠損マウスではIgE<sup>+</sup> GC B細胞が長期に維持され、脾臓や腸間膜リンパ節においてIgE産生長期生存プラズマ細胞が多数蓄積した。このBLNK欠損マウスのIgE産生長期生存プラズマ細胞を単離して、免疫グロブリンの可変領域遺伝子の塩基配列を調べたところ、IgG1産生細胞と同程度に体細胞変異が導入されており、抗原に対する親和性が成熟していることが判明した。この結果は、BLNK欠損マウスで誘導されるIgE産生長期生存プラズマ細胞は胚中心由来であることを示唆している。

さらに、BLNK 欠損マウスを同一抗原で二次免疫した際には、野生型マウスに比べてより重篤なアナフィラキシー反応が誘導された。

(2) iGB 細胞培養系およびクラススイッチングを用いて、膜型 IgE が抗原非依存的にプラズマ細胞分化を誘導することを見出した。このプラズマ細胞分化の誘導には、膜分子 CD19 を介した PI3K-Akt 経路の活性化が重要であることを同定した。培養した CD19 欠損 B 細胞では、膜型 IgE によるプラズマ細胞誘導が全く誘導されなかった。さらに、CD19 欠損 iGB 細胞では、IgE<sup>+</sup> B 細胞における細胞死が抑制されないことから、膜型 IgE による細胞死誘導には CD19 を介したシグナル経路は関与しないことも明らかとなった。

(3) 膜型 IgE の細胞外ドメインの内、CH1-4 の全てのドメインが Syk-BLNK 経路の活性化を介した細胞死の誘導に必須であることを見出した。さらに、膜直上の小さな領域である Extracellular membrane proximal domain (EMPD) が CD19 との恒常的な会合に必須であり、自発的なプラズマ細胞分化に必要であった。また、膜型 IgE の細胞膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは、自発的なシグナル伝達に必須ではないことを明らかにした(増強に関与する可能性はある)。

(4) CD4 と CD19 とのキメラ分子を作成し、CD19 欠損 B 細胞に導入したところ、CD19 の細胞外ドメインは IgE<sup>+</sup> B 細胞の自発的なプラズマ細胞分化には必要ないことが判明した。従って、膜型 IgE の EMPD ドメインは何らかの分子を介して CD19 と会合していることが予想された。

(5) CD19 ヘテロ欠損マウスを NP-CGG アラムで免疫したところ (CD19 欠損マウスでは GC 形成が強く抑制されるためヘテロ欠損を用いている)、IgE<sup>+</sup> GC B 細胞が野生型マウスに比べて増加・維持されるとともに、血中 IgE 抗体価が長期に維持された。さらに、CD19 ヘテロ欠損マウスを同一抗原で二次免疫した際には、野生型マウスに比べてより重篤なアナフィラキシー反応が誘導された。

(6) 培養 B 細胞にハプテン NP 特異的膜型 IgG1 と膜型 IgE を発現させ、それぞれを精製して、共沈降物を SDS-PAGE で分離したのち比較解析した。その結果、膜型 IgE のみに会合するタンパク質が複数存在することを見出した。

(7) 膜型 IgE による抗原非依存的、自発的なプラズマ細胞分化および細胞死の誘導には、B 細胞が IL-4 刺激を受けることが必要であった。

本研究によって、GC に維持されず免疫記憶を形成しないという IgE<sup>+</sup> B 細胞の特性が、B 細胞に発現する膜型 IgE そのものによって決定されていることを見出した。すなわち、膜型 IgE の細胞表面への発現は、自発的シグナル伝達を誘導して短命なプラズマ細胞分化を誘導し、GC 内における親和性成熟を停止させ、ごく一過性の低親和性 IgE 抗体の産生にとどまらせる。

さらに、この自発的な膜型 IgE のシグナル伝達の破綻は IgE 型免疫記憶の形成を誘導して持続的な IgE の産生を惹起し、結果としてアレルギー発症を引き起こす可能性が明らかとなった。この自発的シグナル誘導の責任領域が細胞外領域にあることから、膜型 IgE は何らかの細胞外タンパクとの会合により自発的なシグナルを惹起することが想定される。

## 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 3 件)

- ① Haniuda, K., Fukao, S., Kodama, T., Hasegawa, H. and Kitamura, D. Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. *Nature Immunology* 17: 1109-1117, 2016. 査読有
- ② 羽生田圭、北村大介：自発的な膜型免疫グロブリン E のシグナルは免疫グロブリン E 型の免疫記憶の形成を抑制する。ライフサイエンス 新着論文レビュー doi:10.7875/first.author.2016.082 2016 年、査読無
- ③ 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 65 (4): 329-333 2016 年、査読無

[学会発表] (計 9 件)

- ① Kei Haniuda, Saori Fukao, Tadahiro Kodama, Hitoshi Hasegawa, Daisuke Kitamura. Molecular mechanisms for prevention of IgE-memory formation by membrane IgE. 第 45 回日本免疫学会学術集会、沖縄コンベンションセンター (沖縄・宜野湾市)、2016 年 12 月 7 日.
- ② Takuya Koike, Shu Horiuchi, Kei Haniuda, Daisuke Kitamura. The quantity of CD40 signaling in pre-GC phase determine the differentiation into functionally distinct memory B cell subsets via Mef2b expression. 第 45 回日本免疫学会学術集会、沖縄コンベンションセンター (沖縄・宜野湾市)、2016 年 12 月 7 日.
- ③ Tadahiro Kodama, Kei Haniuda, Daisuke Kitamura. A role of membrane-bound IgG1

ubiquitination in B cell activation. 第45回日本免疫学会学術集会、沖縄コンベンションセンター（沖縄・宜野湾市）、2016年12月6日。

- ④ 長谷川仁士、羽生田圭、北村大介：B細胞補助受容体 CD19 による胚中心形成メカニズムの解析、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）、2016年11月30日。
- ⑤ 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。
- ⑥ 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。
- ⑦ Takuya Koike, Shu Horiuchi, Kei Haniuda, 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。
- ⑧ 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.
- ⑨ 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.

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

■新聞報道

日刊工業新聞（朝刊 27面）「アレルギーの原因抗体細胞 免疫記憶形成 解明」2016年7月20日

薬事日報（朝刊 8面）「IgE型B細胞による免疫記憶 アレルギー発症の一要因 マウスモデルを用いて解明」2016年7月22日

日経産業新聞「アレルギー 仕組み解明」2016年7月26日

■ホームページ等

<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~ribsjm/kitamuralab/index.html>

6. 研究組織

(1) 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・助教

研究者番号：40734918

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )