

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15295

研究課題名(和文)代謝プログラムによるB細胞記憶の形成機構

研究課題名(英文)Regulation of B-cell memory formation by metabolic programs

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗原に反応したB細胞は活性化して胚中心を形成する。胚中心B細胞では体細胞超突然変異が誘導されて抗原受容体の親和性が多様化する。その中で、高親和性B細胞は優先的にT細胞ヘルプを受けて選択され、最終的にメモリーB細胞へと分化する。メモリーB細胞は長期生存能を有し、再活性化後にはすぐに自己複製と形質細胞産生を開始する。本研究では独自の胚中心様B細胞培養系を駆使して解析し、胚中心B細胞の高増殖能を維持する機構、メモリーB細胞の長期生存能および迅速な応答性を保証する分子機構について、特に代謝プログラムの観点から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：During immune responses, antigen-responding B cells are activated and form germinal centers (GC) in the lymphoid organs. The GC B cells undergo somatic hypermutation in their immunoglobulin genes encoding B-cell receptors (BCR), and diversify the BCR affinity to antigen. High affinity B cells are then selected in the GC through T-cell help and finally differentiate into memory B cells. Memory B cells have abilities to survive for a long time and to rapidly respond to antigen to proliferate and differentiate into plasma cells. In this study, we elucidated mechanisms for how GC B cells maintain proliferation and how memory B cells live long and respond rapidly in terms of mitochondrial and glycolysis metabolisms, utilizing our original methodology, the induced GC B (iGB) cell culture system.

研究分野：免疫学

キーワード：胚中心 メモリーB細胞 ミトコンドリア代謝 解糖系 BCL6

1. 研究開始当初の背景

(1) 記憶形成の場、胚中心における B 細胞の増殖・維持とエピゲノム制御

胚中心は B 細胞のクローン増殖と高親和性メモリー B 細胞形成の場である。胚中心 B 細胞は抗原受容体 (BCR) によって獲得した抗原を濾胞ヘルパー T (T_{fh}) 細胞に提示し、CD40L 等の T 細胞ヘルプを受けてクローン増殖を開始する。胚中心での細胞増殖は体細胞超突然変異 (SHM) の導入に必須であり、長期にわたる増殖は変異の高度な蓄積を誘導する。これはインフルエンザウイルス等の防御に有効な、広域中和抗体の産生源となるメモリー B 細胞形成に重要である。胚中心 B 細胞は 6-8 時間程度で 1 分裂という早いスピードで細胞周期が回転するが、細胞疲弊・老化は抑制されている (*Nat Immunol* 6:964, 2005)。転写抑制因子である BCL6 は胚中心 B 細胞分化のマスターレギュレーターとして知られ、がん抑制遺伝子 p53 の発現を抑制して細胞増殖を正に制御することが知られているが、B 細胞において BCL6 発現を誘導・維持する機構は全く明らかになっていない。

B 細胞では、ゲノム全体のヒストンアセチル化およびメチル化が亢進している。ポリコム複合体の構成タンパクで、転写抑制に働くヒストン H3K27 メチル化を触媒するメチル基転移酵素 EZH2 は、胚中心 B 細胞の増殖維持に必要である (*J Clin Invest* 123:5009, 2013)。ヒストンアセチル基転移酵素 MOZ を欠損するマウスでは、胚中心 B 細胞の増殖能が減弱して細胞数が減少することが報告されている (*PNAS* 111:9585, 2014)。

古くから、活発に増殖を続けるがん細胞において代謝研究が盛んに行われ、その代謝様式や悪性化への関与が解析されてきた。その中で、メチオニンの代謝産物である S-アデノシルメチオニンがヒストンメチル化時にメチル基供与体として働くこと、TCA 回路等に利用されることで有名なアセチル CoA がヒストンアセチル化の際のアセチル基供与体として働くことが明らかにされており、代謝プログラムがヒストン修飾を介してエピジェネティクスの制御をすることが広く知られている。胚中心 B 細胞における高度なヒストンメチル化とアセチル化は、その増殖維持に必須であるが、それらの供与体である S-アデノシルメチオニンとアセチル CoA が胚中心 B 細胞の如何なる代謝プログラムによって供給されているのかは不明である。

(2) 幹細胞的性質を持つメモリー B 細胞の長期生存と再活性化の制御機構

メモリー B 細胞は細胞周期が静止期にあり、抗原非依存的に生体内で長期生存する。同様に長期生存能を有する造血幹細胞では、ミトコンドリアでの酸化リン酸化を抑えて解糖系の活性化を示す代謝プロファイルが得られており、活性酸素種による細胞障害を抑制して幹細胞性を維持する。一方、長期生存・自己複製能を有する CD8 陽性メモリー T 細胞では、ミトコンドリアが非常に発達しており、取り込んだグルコースから生

合成した脂肪酸のβ酸化-TCA 回路-酸化リン酸化を用いて細胞を維持することが示されている (*Immunity* 41:75, 2014)。メモリー B 細胞も何らかの特殊な代謝プログラムによって長期生存すると考えられるが、明らかにはなっていない。

記憶応答時において、メモリー B 細胞は迅速に活性化して、エフェクターであるプラズマ細胞へ分化するとともに、再び胚中心を形成して自己複製し、さらなる抗原受容体の多様化を誘導すると考えられてきた。最近、CD80 および PD-L2 の発現で大別できる二種類のメモリー B 細胞が存在し、記憶応答時にプラズマ細胞または胚中心 B 細胞へとそれぞれ分化することが示された (*Nat Immunol* 15:631, 2014)。ここではそれぞれ、エフェクターメモリー B、セントラルメモリー B 細胞と呼ぶ。セントラルメモリー B 細胞は高い幹細胞能を有しており、活性化時には胚中心での自己複製によりメモリー B 細胞プールを維持する。一方、エフェクターメモリー B 細胞はエフェクター細胞を迅速に供給する機能に特化した細胞であり、それぞれ異なる幹細胞性を有すると考えられる。しかし、これらメモリー B 細胞の幹細胞能の差異を規定するメカニズムも全く不明である。

以上のように、胚中心 B 細胞やメモリー B 細胞の特殊な性質の根底には何らかの特殊な代謝プログラムが関与すると予想されるが、明らかにはなっていない。しかし、生体内で活性化した B 細胞は *in vitro* で生存率よく維持・増殖させることが難しく、これは代謝研究を行う上で困難な点となる。とりわけ胚中心 B 細胞は *ex vivo* での生存率が非常に悪いことも知られている。また、免疫後に誘導されるメモリー B 細胞はごく僅かであり、単離することも容易ではない。このような理由もあり、胚中心 B 細胞がどうして高い増殖能を維持できるのか、メモリー B 細胞がどのようにして長期生存性を獲得し、また迅速な応答性を有するのか、これらのメカニズムは未だ謎のままであり、免疫学の重要課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、B 細胞記憶の根底を支えると考えられる、1) 胚中心 B 細胞の増殖・維持を制御する代謝プログラム、2) メモリー B 細胞の幹細胞性を決定する特徴的な代謝プログラムの同定を目指した。B 細胞記憶の全容解明は免疫学に残された重要課題の 1 つであり、本研究による成果は、効果的なワクチン療法の開発に繋がる重要な知識基盤となる。

3. 研究の方法

胚中心 B 細胞は *ex vivo* での生存率が非常に悪く、十分な細胞数が得られない。胚中心 B 細胞の増殖・分化機構を *in vitro* で解析するために、私たちは誘導性胚中心 B (iGB) 細胞培養系を構築した (*Nat Commun* 2:465, 2011)。この系では、CD40L と BAFF を発現するフィーダー細胞 (40LB) 上で、ナイーブ B 細胞を IL-4 とともに培養すると、胚中心 B 細胞表現系を有する iGB 細胞が著しく増殖する。さらに、免疫したマウスに抗原特異的な iGB 細胞を移入すると、その胚

中心内に入り増殖を続ける。また、レトロウイルスベクターを用いて iGB 細胞に高効率での遺伝子導入が可能であり、*in vivo* の胚中心 B 細胞に対する分子生物学的アプローチが可能となった。この iGB 細胞を用いて B 細胞の代謝プログラムと増殖・分化機構の関係を解析した。

また、iGB 細胞を半致死量の放射線照射したマウスに移入すると、メモリー B 細胞と同じ形質を有する、誘導性メモリー B (iMB) 細胞となり、長期に生存する。iMB 細胞は移入後 50 日目の脾臓に数十万個存在し、その特性の解析は生理的メモリー B 細胞より格段に容易となる。

4. 研究成果

(1) 免疫実験に汎用される抗原であるニトロフェニル (NP) と鶏 γ グロブリン (CGG) との共役物 (NP-CGG) でマウスを免疫した後、脾臓細胞を解析した。免疫後 3 日目のプレ胚中心 B 細胞ではナイーブ B 細胞に比べてグルコースの取り込みが亢進し、ミトコンドリア活性の上昇が認められた。一方、免疫後 6 日目には胚中心 B 細胞が形成されているが、その胚中心 B 細胞では解糖系が抑制され、ミトコンドリア代謝が活性化していることが分かった。

(2) マウスを免疫した後、脾臓のプレ胚中心 B 細胞、胚中心 B 細胞、プラズマ細胞をフローサイトメトリー解析した。解析の 16 時間前にオリゴマイシンを投与することにより、胚中心 B 細胞数は減少したが、プレ胚中心 B 細胞数やプラズマ細胞数は変化しなかった。以上から、胚中心 B 細胞はミトコンドリア活性に依存して増殖するまたは維持されることが明らかとなった。

(3) 胚中心 B 細胞の代わりに iGB 細胞を用いて B 細胞の代謝プログラムと増殖・分化機構の関係を解析した。ナイーブ B 細胞を 40LB フィーダー上で、IL-4 の有無で 3 日間 iGB 培養し、その後培地のみで 1 日間培養したところ、iGB 細胞は IL-4 に依存して、胚中心 B 細胞のマスター転写因子である BCL6 を強く発現した。また、IL-4 存在下で 3 日間培養した iGB 細胞 (iGB-4 細胞) を、40LB 細胞を除去して 1 日間、IL-4 存在下で培養した細胞ではミトコンドリア代謝が活性化し、BCL6 の発現が増強された。以上より、活性化 B 細胞において IL-4 刺激はミトコンドリアの活性化と BCL6 発現を誘導することが示された。

(4) iGB-4 細胞を、40LB 細胞を除去してミトコンドリア電子伝達系複合体 IV の阻害剤であるアザイドまたは複合体 V 阻害剤であるオリゴマイシン存在下 1 日間培養した結果、BCL6 の発現が強く抑制された。一方、iGB-4 細胞を、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼの阻害剤でありミトコンドリア代謝を活性化するジクロロ酢酸ナトリウム存在下で培養すると BCL6 の発現が強力に誘導された。以上より、活性化 B 細胞においてミトコンドリア代謝の活性化が BCL6 発現を増強することを見出した。

(5) iGB 細胞を用いた解析により、CD19-Akt 経路がミトコンドリア電子伝達系の複合体 I と複合体 IV の活性を正に制御すること、BCL6 の発現に重要であることを明らかにした。さらに、CD19 欠損 iGB-4 細胞ではアセチル CoA 産生が低下していた。CD19 欠損 iGB-4 細胞に、アセチル CoA の前駆体となる酢酸ナトリウム、または HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A を培養中に添加すると Bcl6 mRNA の発現が部分的に回復したことから、CD19-Akt 経路によるミトコンドリア代謝の活性化はヒストンアセチル化を介して Bcl6 発現を正に制御する可能性が示唆された。

(6) RNA スプライシング制御因子である PTBP1 が B 細胞の活性化に伴って発現誘導されることを見出し、PTBP1 を欠損する iGB 細胞では、解糖系酵素 PKM1 の発現量がコントロールに比べて数倍に増加し、スプライシングアイソフォームである PKM2 の存在比が減少することを見出した。また、PTBP1 の B 細胞特異的欠損マウスを作成して免疫したところ、胚中心 B 細胞数が減少することが判明した。PKM2 は解糖系-同化経路を活性化してがん細胞増殖を促進することが報告されている。したがって、活性化 B 細胞に高発現する PTBP1 は PKM アイソフォームの発現を制御して、胚中心 B 細胞の増殖または維持を制御する可能性が考えられた。

(7) NP 特異的 B1-8 重鎖ノックインマウス B 細胞をレシピエントマウスに移入して NP-CGG で免疫し、免疫後 3 ヶ月後のドナー由来メモリー B 細胞について、種々の代謝特性をフローサイトメトリー解析した。その結果、エフェクターメモリー B 細胞が大多数を占める IgG1⁺メモリー B 細胞では、ナイーブ B 細胞や胚中心 B 細胞に比べて、遊離脂肪酸の受容体である CD36 を高発現するとともに、ミトコンドリア量が増大していることを見出した。一方で、セントラルメモリー B 細胞を多く含む IgM⁺メモリー B 細胞では、CD36 発現およびミトコンドリア量はナイーブ B 細胞と同程度であった。CD36 は脂肪酸取り込みを介して CD8⁺tissue residentメモリー T 細胞の生存性に関するとの報告がある (*Nature* 543:252, 2017)。以上の結果から、エフェクターメモリー B 細胞は特殊な代謝プログラムを有する可能性が示唆され、その生存に必要な代謝燃料の要求性がセントラルメモリー B 細胞やナイーブ B 細胞とは異なる可能性が考えられた。

(8) iGB 細胞培養系を改良し、セントラルメモリー B 細胞、エフェクターメモリー B 細胞と類似した特徴を持つ iMB 細胞の誘導系を構築した。CD40L を低または高発現した 40LB 亜株上で培養した iGB 細胞をマウスに移入すると、それぞれセントラルメモリー B 細胞とエフェクターメモリー B 細胞と同じ形質を有する iMB 細胞へと分化する。各シグナル伝達経路の阻害剤を用いた実験から、CD40 を介した NF- κ B 経路の活性化がエフェクターメモリー B 細胞の形質獲得に重要である可能性が明らかとなった。今後は、本培養

法を用いて、セントラルメモリーB細胞とエフェクターメモリーB細胞の代謝特性を同定していく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Li, X., Gadzinsky, A., Gong, L., Tong, H., Calderon, V., Li, Y., Kitamura, D., Klein, U., Langdon, W.Y., Hou, F., Zou, Y.R. and Gu, H. Cbl ubiquitin ligases control B cell exit from the germinal-center reaction. **Immunity** 48: 530-541, 2018. 査読有.
DOI: 10.1016/j.immuni.2018.3.006.
- ② Jiménez-Alcázar, M., Rangaswamy, C., Panda, R., Bitterling, J., Simsek, Y.J., Long, A.T., Bilyy, R., Krenn, V., Renné, C., Renné, T., Kluge, S., Panzer, U. Mizuta, R., Mannherz, H.G., Kitamura, D., Herrmann, M., Napirei, M. and Fuchs, T.A. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. **Science** 358: 1202-1206, 2017. 査読有
DOI: 10.1126/science.aam8897.
- ③ Haniuda, K., Nojima, T. and Kitamura, D. In vitro-induced germinal center B cell culture system. **Methods Mol. Biol.** 1623: 125-133, 2017. 査読有
DOI: 10.1007/978-1-4939-7095-7_11.
- ④ Kuraoka, M., Snowden, P.B., Nojima, T., Verkoczy, L., Haynes, B.F., Kitamura, D. and Kelsoe, G. BCR and endosomal TLR signals synergize to increase AID expression and establish central B cell tolerance. **Cell Rep.** 18:1627-1635, 2017. 査読有 DOI: 10.1016/j.celrep.2017.01.050.
- ⑤ Lee, P., Zhu, Z., Hachmann, J., Nojima, T., Kitamura, D., Salvesen, G. and Rickert, R.C. Differing requirements for MALT1 function in peripheral B cell survival and differentiation. **J. Immunol.** 198:1066-1080, 2017. 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1502518.
- ⑥ Haniuda, K., Fukao, S., Kodama, T., Hasegawa, H. and Kitamura, D. Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. **Nature Immunol.** 17 (9): 1109-1117, 2016. 査読有 DOI: 10.1038/ni.3508
- ⑦ Domeier, P.P., Chodisetti, S.B., Soni, C., Schell, S.L., Elias, M.J., Wong, E.B., Cooper, T.K., Kitamura, D. and Rahman, Z.S. IFN- γ receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal

center formation and autoimmunity. **J. Exp. Med.** 213 (5): 715-732, 2016. 査読有
DOI:10.1084/jem.20151722

[学会発表] (計 16 件)

- ① 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、2017年.
- 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、2016年.
- ③ 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、2016年.
- ④ Daisuke Kitamura: How do different classes of B cell receptors signal differently? Symposium hosted by Klaus Rajewsky: Mechanisms of Molecular and Cellular Immunity 1964-2016. Max Delbrück Center for Molecular Medicine, 2016.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: B細胞集団の製造方法、及びそれを用いたモノクローナル抗体の製造方法
発明者: 北村大介, 馬渡達也, 中石智之, 北寛士, 北野光昭
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: 特願 2017-004860
出願年月日: 平成 29 年 1 月 16 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

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