

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05072

研究課題名（和文）代謝リプログラミングによるB細胞の分化運命決定機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms for B cell fate decision through metabolic reprogramming

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） 18,900,000円

研究成果の概要（和文）：抗原を認識して活性化したB細胞は、抗体を産生するプラズマ細胞や、高親和性メモリーB細胞の前駆体である胚中心（GC）B細胞へと分化する。これらは、細菌やウイルス感染防御において重要な役割を果たす。しかし、どのような要因が活性化B細胞の分化方向を決定し、プラズマ細胞やGC B細胞への分化を誘導するのかは未だ不明な点が多い。本研究では、細胞内の代謝リプログラミングがB細胞の分化運命を決定することを示し、その詳細なメカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、液性免疫を担うB細胞の分化運命は細胞内の代謝リプログラミングによって決定されるという新規の分化制御機構を明らかにした。この成果は、B細胞応答を人為的にコントロールする手段および、効果的なワクチン療法の開発に繋がる重要な知識基盤になると思われる。

研究成果の概要（英文）：Upon antigen-recognition, activated B cells differentiate into antibody-secreting plasma cells or germinal center (GC) B cells, precursors of memory B cells with high affinity for antigen, both of which play an important role in protective immunity against bacterial and viral infection. However, it has been unclear what factors determine B cell fate and induce plasma cell or GC B cell differentiation. In this study, we demonstrated that cellular metabolic reprogramming can determine B cell fate and revealed the underlying molecular mechanisms.

研究分野：免疫学

キーワード：胚中心 プラズマ細胞 代謝プログラム 抗体産生 B細胞 免疫記憶 細胞内代謝 分化制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗原に反応した B 細胞は、T 細胞ヘルプを受けて活性化する。活性化した一部の細胞はマスター転写因子 *Blimp1* を発現し、プラズマ細胞へと分化して抗体を産生する。別の一部はマスター転写因子 *BCL6* を発現し、クローン増殖を続けて GC を形成する。GC B 細胞には免疫グロブリン遺伝子に体細胞突然変異が導入され、抗原に対する親和性成熟を経て、選択されたクローンがメモリー B 細胞へ分化して B 細胞記憶を形成する。したがって、GC は高親和性のメモリー B 細胞形成に重要である。しかし、どのような要因が B 細胞の分化方向を決定し、マスター転写因子の発現を誘導・維持するのかが殆ど明らかになっていない。

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。近年、免疫細胞において細胞の活性化や分化に伴う、代謝リプログラミングが盛んに研究されており、代謝リプログラミングが免疫細胞の分化・機能発現に重要な役割を果たすことが徐々に明らかになっている。B 細胞においては、抗原受容体刺激や LPS 刺激後に解糖系が活性化して細胞増殖を促進するとの報告はあるが、代謝リプログラミングが B 細胞の分化自体を制御するかについては全く不明であった。

これまでに私たちは、免疫応答早期の B 細胞の代謝活性化を解析したところ、GC/プラズマ細胞形成以前の早期活性化 B 細胞で、グルコース取り込みとミトコンドリア活性が共に亢進していること、その後分化してくる GC B 細胞ではミトコンドリア活性が高く、一方でプラズマ細胞ではミトコンドリア活性が低くグルコース取り込みが亢進することを明らかにしていた。さらに *in vitro* の B 細胞培養系を用いた解析から、ミトコンドリア活性の阻害は *BCL6* 発現を強力に抑制し、解糖系を阻害した場合にはプラズマ細胞分化が抑制されることを見出ししていた。以上から、B 細胞は活性化初期に解糖系・ミトコンドリア活性を増大する。その後、ミトコンドリア高活性を維持したものが GC B 細胞へ、解糖系高活性-ミトコンドリア低活性のものがプラズマ細胞へ分化することが示唆された。これら一連の結果は、B 細胞の代謝リプログラミングがマスター転写因子を誘導・維持する可能性を示唆していた。すなわち、代謝リプログラミングが B 細胞の強力な分化決定因子である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

どのような要因が B 細胞のマスター転写因子を誘導して、B 細胞分化を決定するのが不明瞭である。そこで本研究では、「代謝リプログラミングが分化運命を決定する」という仮説のもと、刺激後の B 細胞の代謝リプログラミングを詳細に解析することでその分化決定機構の解明を目的として研究を行った。具体的には、GC B 細胞およびプラズマ細胞への分化機構について、分化時に誘導される代謝リプログラミングを明らかにし、マスター転写因子の発現を誘導・維持し分化運命を決定する代謝機構の同定を試みた。

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) 培養系を構築している (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 細胞は著しく増殖して iGB 細胞へと分化する。この iGB 細胞を、40LB 細胞を除いて IL-4 存在下 1 日間培養すると *BCL6* を高発現し (GC B 細胞様)、または B 細胞受容体 (BCR) 刺激抗体を加えて 1 日間培養すると *Blimp1* を高発現してプラズマ細胞分化が誘導される。この培養法において、フィーダー細胞を除去した直後の細胞 (刺激前) と、IL-4 または抗 BCR 刺激抗体を添加して 6 時間後の細胞 (GC B 細胞前駆体およびプラズマ細胞前駆体) を回収し、それらの細胞内代謝産物の量をメタボローム解析により定量した。メタボローム解析の結果同定した、GC B 細胞前駆体またはプラズマ細胞前駆体に特徴的な代謝産物について、また、その産生に関与する酵素遺伝子のノックダウンおよび過剰発現を iGB 細胞について行い、B 細胞分化への影響を解析した。

また、これまでに私たちは、膜分子 CD19 を会した PI3K-Akt 経路が *BCL6* の発現誘導に必須であることを見出ししており、*BCL6* 誘導機構の解明を目的として CD19 欠損マウスを免疫した際の B 細胞応答および CD19 欠損 iGB 細胞の細胞内代謝を解析した。

4. 研究成果

1) メタボローム解析による GC B 細胞およびプラズマ細胞前駆体特異的代謝産物の同定

前述の GC B 細胞前駆体およびプラズマ細胞前駆体のメタボローム解析の結果、GC B 細胞前駆体 (IL-4 刺激細胞) では TCA サイクルの代謝中間体である α -ketoglutarate (α -KG) が他の細胞に比べて高度に蓄積すること、また、プラズマ細胞前駆体 (BCR 刺激細胞) では解糖系の最終代謝産物である乳酸や TCA サイクルの代謝中間体であるコハク酸およびフマル酸が高度に蓄積することが明らかとなった。

2) 解糖系によるプラズマ細胞分化の制御

解糖系とプラズマ細胞分化の関連を調べる目的で、解糖系酵素として PGAM1、PKM2 を iGB 細胞に過剰発現させたところ、BCR 刺激非存在下において、乳酸産生の亢進とともに、転写因子 IRF4 の発現上昇およびプラズマ細胞分化の亢進が認められた。酸化的リン酸化を阻害して解糖系亢進を誘導すると知られる、ミトコンドリア電子伝達系複合体 IV 阻害剤である NaN3、複合体 V 阻害剤であるオリゴマイシン添加は、BCR 刺激非存在下において、乳酸産生の亢進とともに IRF4 の発現とプラズマ細胞分化を亢進させた。したがって、解糖系の亢進は何らかのメカニズムによりプラズマ細胞のマスター転写因子である IRF4-Blimp1 の発現を上昇させ、プラズマ細胞分化を誘導する可能性が示唆された。

3) TCA サイクル代謝中間体による GC B 細胞分化の制御

メタボローム解析の結果、GC B 細胞前駆体で蓄積していた α -KG に着目して研究を進めた。 α -KG は α -KG 依存性デヒドロゲナーゼであるヒストン脱メチル化酵素などの基質分子として働き、その酵素反応に必須の分子として知られる。そこで、GC B 細胞とナイーブ B 細胞からヒストンを精製し、ウエスタンブロット法によりヒストン修飾を解析したところ、GC B 細胞ではヒストン H3 の K27 トリメチル化 (H3K27me3) レベルが低下していることが明らかとなった。さらに、パブリックデータから GC B 細胞とナイーブ B 細胞の H3K27me3 のクロマチン免疫沈降シーケンスのデータを入手して解析したところ、GC B 細胞の Bcl6 遺伝子の遠位エンハンサー領域ではナイーブ B 細胞に比べて H3K27me3 レベルが低下していることが判明した。以上から、GC B 細胞への分化の過程で、Bcl6 遺伝子エンハンサー領域の H3K27 が脱メチル化され、Bcl6 の発現が誘導されることが予想された。そこで、H3K27me3 の脱メチル化酵素である UTX に着目した。前述の iGB 細胞を IL-4 で刺激後にクロマチン免疫沈降-定量的 PCR 法を用いて解析したところ、Bcl6 の遠位エンハンサーには転写因子 STAT6 と UTX が結合することが明らかとなった。また免疫共沈降法により、STAT6 と UTX が会合することが判明し、さらに遺伝子ノックダウンと UTX 阻害剤である GSK-J4 を用いた結果から、UTX が遠位エンハンサーの H3K27me3 の脱メチル化に重要であることが判明した。以上の結果から、IL-4 刺激は Bcl6 の発現を誘導して GC B 細胞への分化を誘導するが、その過程で、活性化した STAT6 が Bcl6 の遠位エンハンサーに結合し、UTX をリクルートする。同時に、IL-4 刺激は TCA サイクルの代謝中間体 α -KG の蓄積を誘導して UTX によるヒストン脱メチル化を促進することが明らかとなった。さらに、 α -KG 蓄積メカニズムを解析したところ、酸化的 TCA サイクルにおいて α -KG の産生酵素となるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ 2 の活性が IL-4 刺激により上昇すること、 α -KG の分解酵素となる α -KG デヒドロゲナーゼの活性が IL-4 刺激により低下することが明らかとなった。すなわち、IL-4 刺激が TCA サイクルの酵素活性を変化させることで代謝リプログラミングを誘導することが判明した。

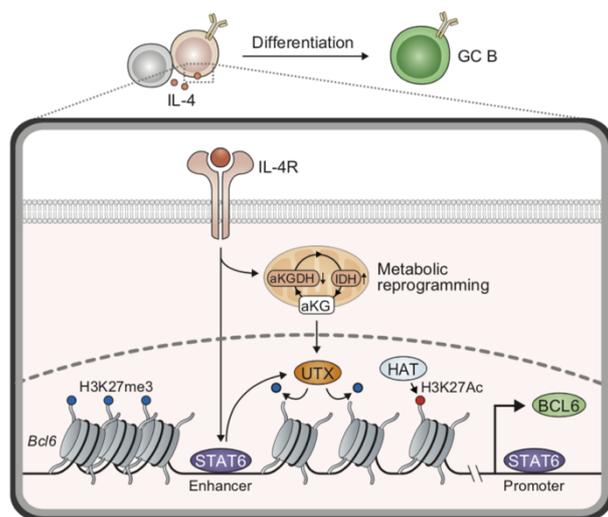


図 1. IL-4 刺激によるミトコンドリア代謝リプログラミングを会した BCL6 発現誘導と GC B 細胞分化機構

4) CD19 による GC B 細胞分化機構

CD19 欠損マウスでは、抗原により活性化された B 細胞が GL7+CD38+のプレ GC B 細胞までは正常に分化するが、その段階で BCL6 発現が誘導されず、GC B 細胞への移行に障害があることが判明した。CD19 欠損 iGB 細胞における細胞内代謝特性を解析したところ、細胞質中のアセチル CoA レベルが低下しており、また、ミトコンドリア活性酸素産生の亢進が認められた。アセチル CoA を回復させる目的で、酢酸ナトリウムまたはジクロロ酢酸を添加したところ、BCL6 発現が一部回復した。

これら一連の結果により、細胞内代謝が B 細胞分化のマスター転写因子を誘導・維持する強力な分化決定因子であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takatsuka Shogo, Yamada Hiroyuki, Haniuda Kei, Saruwatari Hiroshi, Ichihashi Marina, Renauld Jean-Christophe, Kitamura Daisuke	4. 巻 19
2. 論文標題 IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1025 ~ 1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41590-018-0177-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Haniuda Kei, Kitamura Daisuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Induced Germinal Center B Cell Culture System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 3163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takatsuka Shogo, Yamada Hiroyuki, Haniuda Kei, Ichihashi Marina, Chiba Joe, Kitamura Daisuke	4. 巻 9
2. 論文標題 DNA Immunization Using in vivo Electroporation for Generating Monoclonal Antibodies Against Mouse IL-9R	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 3174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Haniuda Kei, Nojima Takuya and Kitamura Daisuke	4. 巻 1623
2. 論文標題 In Vitro-Induced Germinal Center B Cell Culture System	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 125-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7095-7_11	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kei Haniuda, Saori Fukao and Daisuke Kitamura.
2. 発表標題 Metabolic control of germinal center B cell and plasma cell differentiation.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saori Fukao, Kei Haniuda and Daisuke Kitamura.
2. 発表標題 The mechanism of B cell activation in T cell independent responses via metabolic reprogramming.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunsuke Amano, Saori Fukao, Kei Haniuda and Daisuke Kitamura.
2. 発表標題 Inducing mechanisms of somatic hypermutation in germinal center B cells.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei Kato, Kei Haniuda and Daisuke Kitamura.
2. 発表標題 Molecular mechanisms that trigger autonomous signaling from membrane IgE.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hana Ebiko, Kei Haniuda, Kei Kato and Daisuke Kitamura.
2. 発表標題 Regulation of B cell memory formation and metabolism by IgE-BCR.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadahiro Kodama, Yui Sakamoto, Kei Haniuda and Daisuke Kitamura.
2. 発表標題 A role of membrane-bound IgG1 ubiquitination in B cell activation.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihito Nihei, Kei Haniuda, Mizuki Higashiyama, Yusuke Suzuki and Daisuke Kitamura.
2. 発表標題 Characteristics of naive B cells in murine IgA nephropathy.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shoko Hosoda, Keiko Fujisaki, Yuta Ueno, Chiharu Nishiyama, Kei Haniuda, Akihisa Oda, Daisuke Kitamura and Ryo Goitsuka.
2. 発表標題 Transcription factor Tlx1 regulates a niche for innate-like B cells in the spleen.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei Haniuda, Saori Fukao and Daisuke Kitamura.
2. 発表標題 Germinal center B cell development by glycolysis and mitochondrial metabolism.
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA, B Cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei Haniuda, Saori Fukao and Daisuke Kitamura
2. 発表標題 Molecular mechanisms for prevention of IgE-memory formation by membrane IgE
3. 学会等名 19th International Conference on Lymphatic Tissues and Germinal Centres in Immune Reactions (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saori Fukao, Kei Haniuda, Hiroki Sasanuma, Nobuaki Yoshida and Daisuke Kitamura
2. 発表標題 Regulation of IgE production by an RNA binding protein
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kei Haniuda, Saori Fukao and Daisuke Kitamura
2. 発表標題 Germinal center B cell development by glycolysis and mitochondrial metabolism
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 羽生田圭
2. 発表標題 膜型IgEによるB細胞記憶の制御機構
3. 学会等名 第26回東京免疫フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 羽生田圭、北村大介	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 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	

1. 著者名 羽生田圭、深尾紗央里、北村大介	4. 発行年 2017年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 IgE産生の制御機構、臨床免疫・アレルギー科67 (5): 506-512	

1. 著者名 羽生田圭、北村大介	4. 発行年 2017年
2. 出版社 鳥居薬品株式会社	5. 総ページ数 10
3. 書名 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	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京理科大学 生命医科学研究所
<https://www.ribs.tus.ac.jp>
東京理科大学 生命医科学研究所 分子生物学研究部門 北村研究室
<https://dai3kitamura.jimdofree.com>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----