

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590493
研究課題名（和文） I g E 陽性 B 細胞活性化・維持および抗体産生機構の解析
研究課題名（英文） Analysis of activation, maintenance and antibody production of IgE positive B cells
研究代表者 安達 貴弘（ADACHI TAKAHIRO） 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授 研究者番号：50222625

## 研究成果の概要：

花粉症など I 型アレルギーは IgE を介して発症するが、IgE 産生細胞についてはよくわかっていない。そこで、マウスの IgE 陽性 B 細胞についての解析を行い、リンパ組織である脾臓および骨髄中の IgE 陽性細胞を調べたところ、脾臓では数百程度の IgE 陽性 B 細胞が存在することが確認された。これらは長期間存在する IgG 陽性の記憶 B 細胞と類似したものが主要であった。一方骨髄では IgE 陽性細胞は存在するものの、IgE 陽性 B 細胞はごく少数であった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：IgE, シグナル伝達, B リンパ球

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに B 細胞抗原受容体(BCR)を介したシグナル伝達制御機構についての解析を行ってきており、B 細胞膜分子 CD72 が抑制性共受容体として BCR シグナリングを負に制御することを見出した(安達ら J. Immunol. 1998)。また、CD72 以外の抑制性共受容体 CD22 は IgM-あるいは IgD-BCR シグナリングを負に制御するが、IgG-BCR シグナリングを負に制御しないことを見出し、免疫グロブリンクラス特異的なシグナル伝達制

御機構が存在することを世界に先駆けて証明した(若林、安達ら Science 2002 298:2392)。さらに CD22/CD72 が抗原刺激を受けた B 細胞の運命決定の分子スイッチとなっていることを示した(外園ら J. Immunol. 2003)。さらに、CD22 は IgA-BCR シグナリングを負に制御するが、IgE-BCR シグナリングを負に制御しないことを示した(佐藤ら、J. Immunol. 2003)。これらのことは IgG あるいは IgE 陽性 B 細胞は IgM/IgD からクラススイッチすることで活性化されやすくなることを示唆し、IgG や IgE 陽性記

憶細胞による迅速で強い抗体産生の機序となっていると推測される。

IgE は寄生虫感染や即時型アレルギーに関与していることが知られている。先進国では約 20% の人が気管支喘息、花粉症など IgE による I 型アレルギーを患っており、大きな社会問題となっている。CD4 陽性細胞のバランスが Th1<Th2 に傾く→Th2 細胞による IL-4 の産生→B 細胞の IgE へのクラススイッチの誘導→IgE の産生→IgE 受容体を持つマスト細胞、好塩基球、好酸球の活性化→炎症:といった機構で I 型アレルギーが引き起こされる。IL-4 産生 Th2 細胞やマスト細胞・好酸球などに関する解析に比べ、B 細胞自体に対する解析は遅れている。B 細胞が IgE へのクラススイッチを受ける環境、また IgE 産生細胞の局在・維持についても、他のクラスの Ig と比べて不明な点が多い。寄生虫感染防御においても、IgE が重要であることは知られているが、宿主との相互関係により免疫応答が誘導されにくいことや IgE 陽性細胞数が少ないことなどから、2 次免疫応答の有効性、記憶 B 細胞や長寿命形質細胞についてもほとんどその詳細は解明されていない。

## 2. 研究の目的

IgG 陽性となった活性化 B 細胞は記憶 B 細胞や形質細胞に分化し、2 次リンパ組織の濾胞を離れ、長寿命形質細胞は骨髄に、記憶 B 細胞は骨髄や 2 次リンパ組織の濾胞辺縁体などに局在することから、それらの微小環境が生存・維持および抗体産生に重要であると考えられる。記憶 B 細胞による迅速で強い抗体産生の機序を理解するには、IgG や IgE 陽性細胞の BCR シグナル制御を解明するとともに、Ig クラス特異的な微小環境による記憶 B 細胞の空間的制御を明かにする必要がある。

記憶 B 細胞や長寿命形質細胞は長期にわたり IgE 抗体産生誘導に関わり、アレルギー疾患と密接な関係があると考えられ、それら細胞についての解析がアレルギー疾患全容の解明ひいては効果的な治療法の確立には必要不可欠である。しかしながら IgE 陽性 B 細胞の生体内での活性化・維持の分子機構についてはほとんど知られていない。そこで本研究ではマウスを用いて各リンパ組織での IgE 陽性 B 細胞の同定を目的とした。またこれまでの細胞株を用いた実験より抗原受容体の免疫グロブリンのクラスによりシグナル伝達に差異があることが示唆されているので、

その分子機構解明、およびマウスの正常 B 細胞を用いた IgG や IgE 陽性 B 細胞の活性化機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) クラススイッチを起こした B 細胞の抗原受容体シグナル伝達

細胞株を用いた実験では IgG あるは IgE を含む抗原受容体を介したシグナル伝達はナイーブ B 細胞が発現している IgM/IgD を含む抗原受容体より強い。実際にマウスよりクラススイッチを起こした細胞を時期ビーズにより細胞分離とフローサイトメーターでソーティングを組み合わせて調製し、抗原受容体を介したシグナル伝達機能をフローサイトメーターを用いた細胞内カルシウムの動員や MAP キナーゼの活性化を活性化型 MAP キナーゼ特異抗体により指標にして調べる。

(2) 抗原受容体のシグナリングに関する解析

IgM や IgD を含む抗原受容体を IgG や IgE を含むもののほうが強いシグナル伝達が起こる。その機序を明らかにするために、抗原受容体架橋によるシグナル分子のチロシンリン酸化を抗チロシンリン酸化抗体を用いたウエスタンブロット解析により比較し、両抗原受容体での差異を調べる。マウスより IgG 陽性細胞や IgE 陽性細胞を大量に調製するのは困難なため、抗原受容体を再構築した B 細胞株を用いる。

(3) IgE 陽性 B 細胞の同定

IgE 陽性の B 細胞はきわめて少量でその存在場所も詳細な解析がされていない。マウスより各リンパ組織を摘出し、磁気ビーズによる細胞分離とフローサイトメーターによるソーティングを組み合わせ、IgE 陽性、B 細胞マーカーとして B220 陽性の細胞の同定を行う。またこれまでに知られている IgG 陽性の長寿命形質細胞や記憶細胞と各種細胞表面マーカーを用いて比較検討する。

## 4. 研究成果

(1) クラススイッチを起こした B 細胞の抗原受容体シグナル伝達

IgE 陽性 B 細胞はごく少数しか存在しないことや IgE と IgG でシグナル伝達の亢進や細胞内領域の長さや配列などで類似性が高いことからマウスより調製した IgG 陽性 B

細胞について抗原受容体を介したシグナル伝達機能を調べたところ、細胞内カルシウムの動員、MAP キナーゼの1つである ERK の活性化ともに、マウス脾臓の IgM/IgD 陽性の正常 B 細胞と比べ、ほぼ同程度起こることが明らかとなった。正常マウスより調製した IgG 陽性 B 細胞について抗原受容体シグナル伝達を直接解析したものはこれまでにほとんどなく、クラススイッチした少数の B 細胞についてもシグナリング解析を可能にした。今後は免疫グロブリンの他のクラスの B 細胞を含め、さらに詳細に解析することにより正常 B 細胞のシグナリング機能についての理解が期待される。

### (2) 抗原受容体のシグナリングに関する解析

抗原受容体を再構築したマウス B 細胞株を用いてシグナリングを誘導後、抗原受容体を免疫沈降し、会合するシグナル分子について抗チロシンリン酸化抗体を用いて調べたところ、IgM とは異なり、IgG のみに会合する分子が存在することが示された。この分子の分子量はドイツのグループより最近報告された Grb2 とは異なっていた。IgE についても細胞内領域の配列に類似性が高いことから、同様にこのような分子の会合が推測される。これらの分子が同定されれば、IgE や IgG 陽性 B 細胞の抗原受容体シグナル伝達が IgM のものと異なる分子機構解明への大きな手がかりとなると考えられる。

### (3) IgE 陽性 B 細胞の同定

磁気ビーズあるいはフローサイトメーターによる細胞分離で T 細胞や IgM/IgD 陽性 B 細胞を除き、IgE 陽性 B 細胞を含む画分を濃縮後、フローサイトメーターにより解析したところ、SPF 環境下の非免疫マウスの脾臓では数百程度の IgE 陽性 B 細胞が存在することが確認された。さらに細胞表面マーカー分子を調べると、IgG 陽性記憶 B 細胞と類似して CD38 陽性 Fas 陽性のものが主要であったが、細胞表面の IgE などの発現にばらつきがあり、IgG 陽性記憶細胞とは異なる点もあった。一方骨髄では IgE 陽性細胞は存在するものの、ほとんどが B 細胞以外の顆粒系細胞で、IgE 陽性かつ B 細胞のマーカーとなる B220 陽性細胞はごく少数であった。骨髄に存在する IgE 陽性 B220 陽性の細胞は IgE 陽性の長寿命形質細胞かはさらなる解析が必要である。また IgE 陽性 B 細胞が維持される場所として他の器官についても調べる必要がある。脾臓で見られたものを含め、これらの細胞の移入実

験によりこれらが実際の IgE 記憶 B 細胞かを同定することが可能であり、I 型アレルギーの機序解明の新たな切り口となることが期待される。

### 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 8 件)

1. Hou, R., Ohtsuji, M., Ohtsuji, N., Zhang, L., Adachi, T., Hirose, S., Tsubata, T.: Centromeric interval of chromosome 4 derived from C57BL/6 mice accelerates type 1 diabetes in NOD.CD72b congenic mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009. 380:193-197.
2. Toda, M., Hisano, R., Yurugi, H., Akita, K., Maruyama, K., Inoue, M., Adachi, T., Tsubata, T. and Nakada, H.: Ligation of tumor-produced mucins to CD22 dramatically impairs splenic marginal zone B cells. **Biochem J.** 2009. 417:673-683 (査読の有)
3. Abdu-Allah, H.H., Tamanaka, T., Yu, J., Zhuoyuan, L., Sadagopan, M., Adachi, T., Tsubata, T., Kelm, S., Ishida, H. and Kiso, M.: Design, synthesis, and structure-affinity relationships of novel series of Sialosides as CD22-Specific Inhibitors. **J Med Chem.** 2008. 51:6665-6668. (査読の有)
4. Adachi, T. and Tsubata, T.: FRET-based Ca<sup>2+</sup> measurement in B lymphocyte by flow cytometry and confocal microscopy. **Biochem Biophys Res Commun,** 2008. 367:377-82. (査読の有)
5. Yan, B-C., Adachi, T. and Tsubata, T.: ER stress is involved in B cell antigen receptor ligation-induced apoptosis.

**Biochem Biophys Res Commun**, 2008.

365:143-148. (査読の有)

6. Zhu, C., Sato, M., Yanagisawa, T., Fujimoto, M., Adachi, T. and Tsubata, T. : Novel binding site for Src homology 2-containing protein-tyrosine phosphatase-1 in CD22 activated by B lymphocyte stimulation with antigen. **J Biol Chem**, 2008. 283: 1653-1659. (査読の有)
7. Yu, J., Sawada, T., Adachi, T., Gao, X., Takematsu, H., Kozutsumi, Ya., Ishida, H., Kiso, M. and Tsubata, T. Synthetic glycan ligand excludes CD22 from antigen receptor-containing lipid rafts. **Biochem Biophys Res Commun**, 2007. 360:759-764. (査読の有)
8. Adachi, T., Wienands, J., Tsubata, T. and Kurosaki, T. Interdomain A is crucial for ITAM-dependent and -independent regulation of Syk. **Biochem Biophys Res Commun**, 2007. 364:111-117. (査読の有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 安達貴弘、CD22による糖鎖リガンド依存のおよびひ依存的なB細胞抗原受容体シグナル伝達制御, 日本免疫学会、2008年12月1日、京都
2. 安達貴弘、CD22によるアイソタイプ特異的抗原受容体シグナル伝達制御には多価の蛋白質抗原が必要である、日本免疫学会、2007年12月3日、東京

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

安達 貴弘 (ADACHI TAKAHIRO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授  
研究者番号：50222625

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし