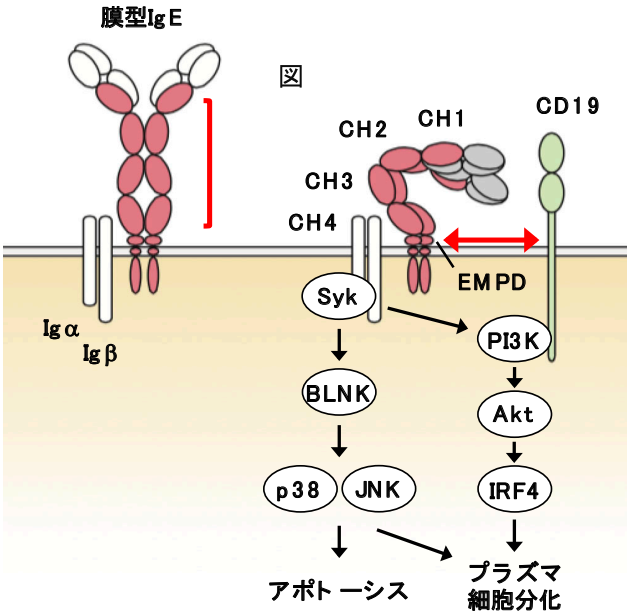
36　アレルギーの原因となるヒトIgE⁺B細胞分子異常の解明	北村　大介

【目的】これまでに膜型 IgE から BLNK と CD19 を介した自発的シグナルが胚中心 B 細胞の形質細胞への分化と死を誘導すること、そのシグナル経路の異常が IgE 型胚中心 B 細胞の増殖維持とその長期生存プラズマ細胞および記憶 B 細胞への分化に至り、長期高 IgE 血症に至ることをマウスの系で見出した。この一連の過程の分子機構の全容を解明し、それらがヒトアレルギー病の成因である可能性を探る目的で研究を進めた。

【方法】ナイーブ B 細胞を独自のフィーダー細胞上で IL-4 を加えて培養することによって、IgG1 および IgE にクラススイッチした胚中心 B 細胞（iGB 細胞）を著しく増殖させる系（iGB 細胞培養系）を用いた。この系で、内在性 IgH 遺伝子を除去した上で IgE を強制発現させたり、種々の遺伝子を導入して強制発現やノックダウンを行い、その結果をウェスタンブロット法やフローサイトメトリーにより解析した。また、アレルギー罹患者の末梢血 B 細胞を iGB 細胞培養系で IL-21 を加えて培養し、その中から膜型 IgE 陽性 iGB 細胞を独自の方法で選択的に増殖させ、その細胞と、コントロールとしての非 B 細胞白血球のエクソーム解析を行い、膜型 IgE 陽性 B 細胞に特異的な遺伝子変異を体細胞変異として抽出した。

【結果】転写因子 STAT3 が BLNK および CD19 を介した自発的膜型 IgE シグナルにより活性化すること、その活性化 STAT3 が *in vitro* で胚中心 B 細胞から形質細胞への分化を誘導し、*in vivo* では IgE 陽性胚中心 B 細胞の増殖維持を抑制することを見出した。また、アレルギー罹患者の IgE 陽性記憶 B 細胞に存在する種々の体細胞変異遺伝子を見出した。

IgE 型胚中心 B 細胞の排除を促す膜型 IgE シグナル経路



36. アレルギーの原因となるヒト IgE$^+$ B 細胞分子異常の解明

北村　大介

東京理科大学 生命医科学研究所 分子生物学研究部門

Key words：allergy，IgE，memory B cells，germinal center B cells

緒　言

アレルギー疾患の主な原因として知られる IgE 抗体は、B 細胞が IL-4 の刺激により IgE 型にクラススイッチし、プラズマ細胞に分化して産生する。アレルギー患者において血中 IgE 抗体価はしばしば高値であるが、IgE 自体の血中半減期は 2 日以下と非常に短く、健常個体の血中 IgE 濃度は極めて低い。また、寄生虫感染等により一過性に産生されてもすぐに元の血中濃度に戻る。さらに、 IgE 陽性 B 細胞は健常人はもちろんアレルギー患者においても、また実験動物においても血中やリンパ組織中には僅少であり、 そのため、IgE 陽性 B 細胞が個体内のどこでどのように産生されるかについては最近まで分かっていなかった。

T 細胞依存性免疫応答においては、抗原受容体（BCR）を介して始めて抗原を認識した IgM 型 B 細胞は活性化・増殖の後、クラススイッチを経て、主に IgG 型のプラズマ細胞か膜型（m）IgG 陽性の胚中心（GC）B 細胞へと分化する。さらに GC B 細胞の一部は記憶 B（memory B: Bm）細胞か長期生存プラズマ（long-lived plasma: LP）細胞へと分化し、免疫記憶を形成する。一方、mIgE$^+$ B 細胞は主に mIgG$^+$ GC B 細胞から更なるクラススイッチにより産生されるが、直ちに短命のプラズマ細胞へと分化して死に至るため、IgE 陽性の Bm 細胞や LP 細胞はほとんど形成されない、ということが mIgE のレポーターマウスを用いた解析により最近分かってきた（図 1）。しかし、アレルギー患者では血中 IgE が長期に高値であることが多く、 その場合、IgE の短い血中半減期を考慮すると、IgE を産生し続ける LP 細胞が存在すると考えざるを得ない。また、IgE が長期間低値であっても抗原再暴露により再発する花粉症や食物アレルギーの場合には mIgE$^+$ Bm 細胞の存在が想定される。mIgE$^+$ GC B 細胞が正常ではどういうメカニズムで短命のプラズマ細胞へと分化するのか、また、それにも拘わらず、長期的な IgE 産生および IgE 型免疫記憶を特徴とするアレルギー疾患がどうして発病するのかは大きな謎であった。

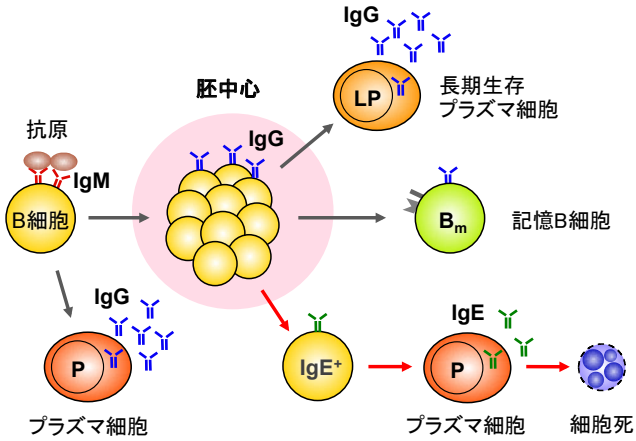


図 1. 正常な免疫応答において IgE 型 B 細胞は胚中心で産生されるが、免疫記憶担当細胞とはならない

私たちは、独自に開発した B 細胞培養系（iGB 培養系［1］）を用いて、増殖した GC 様 B（iGB）細胞に発現させた mIgE と他のクラスの機能を比較した結果、他と異なり mIgE は細胞表面に発現するだけでプラズマ細胞への急速な分化とアポトーシスを誘導することを見出した。この自発的な mIgE のシグナル伝達には Syk の下流の 2 つの独立した

経路が必要であり、BLNK-JNK/p38 経路はアポトーシスとプラズマ細胞分化を促進し、CD19-PI3K-Akt 経路はプラズマ細胞分化に必須であることを明らかにした。また、この mIgE 特有のシグナル誘導の責任領域は mIgE の細胞外領域にあり、mIgG1 とのドメイン置換実験から mIgE 定常領域 CH1~CH4 ドメインの全てが必要があった。さらに、CD19 経路の活性化には mIgE の細胞膜直上に位置する EMPD というドメインが必要であり、ここは CD19 との結合に必要十分であった（図 2）。BLNK 欠損マウスでは、免疫後早期の IgE 産生プラズマ細胞の形成が低下しただけでなく、$mIgE^{+}$ GC B 細胞が増加し IgE 陽性の Bm 細胞・LP 細胞が形成維持され、血中 IgE 抗体が長期に渡って高値で維持された。そのため、再免疫により激しいアナフィラキシー反応を起こした。CD19 ヘテロ変異マウスでも同様の異常が見られた［2］。

上記の結果から、mIgE の自発的シグナル伝達経路の欠陥による IgE 型の Bm 細胞・LP 細胞の形成が、少なくともマウスにおいてはアナフィラキシーの原因となることが分かった。同様のメカニズムがヒトのアレルギー疾患の発病にも働いている可能性がある。そこで本研究では、GC B 細胞上に発現した mIgE からどのように自発的なシグナルが誘導され下流へと伝達されるか、その全貌を解明することを目的とした。そして、その結果を基に、見出された自発的 mIgE シグナル誘導機構またはシグナル伝達経路のいずれかの欠陥が実際にヒトのアレルギー疾患の原因となっているのかについて明らかにすることを最終目標とした。

本研究により、転写因子 STAT3 が BLNK および CD19 を介した自発的膜型 IgE シグナルにより活性化すること、その活性化 STAT3 が *in vitro* で胚中心 B 細胞から形質細胞への分化を誘導し、*in vivo* では IgE 陽性胚中心 B 細胞の増殖維持を抑制することを見出した。また、アレルギー罹患者の IgE 陽性記憶 B 細胞に存在する種々の体細胞変異遺伝子を見出した。

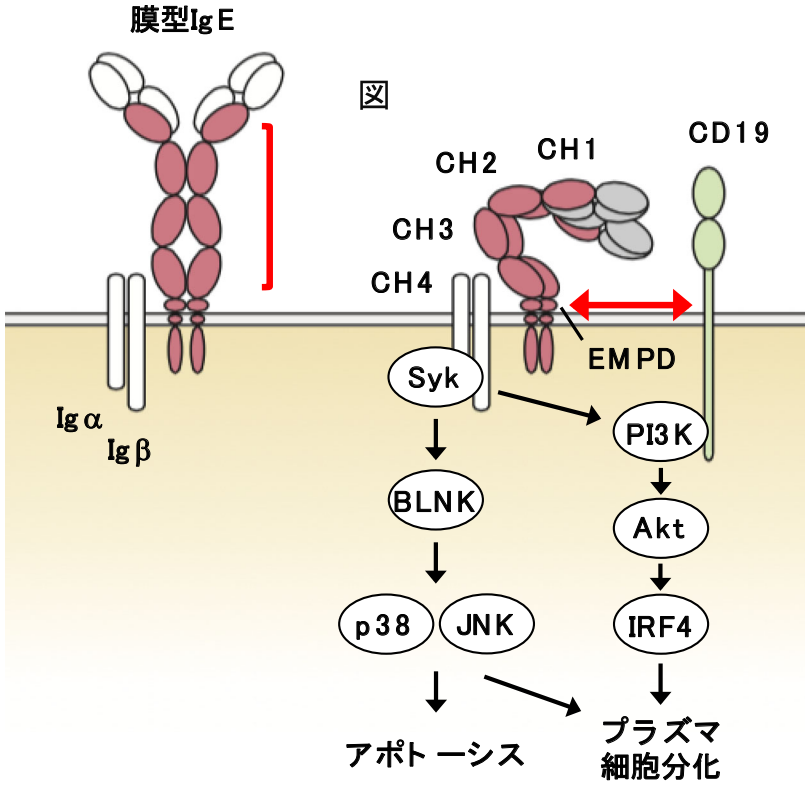


図 2. IgE 型胚中心 B 細胞の排除を促す膜型 IgE シグナル経路

方法および結果

1. 自発的 mIgE シグナルの誘導メカニズムの解明

重症のアトピー性皮膚炎や高 IgE 血症を呈する高 IgE 症候群（hyper-IgE syndrome: HIES）の一部で STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ型のヘテロ変異が見出されている。すなわち、STAT3 の機能不全がこのアレルギー疾患の原因の一つであると考えられた［3］。そこで、STAT3 が自発的 mIgE シグナル伝達の下流で働いていると想定し、上述のマウス iGB 細胞を用いて検討した。

まず、Cγ1-Cre および B1-8-flox という 2 つのノックイン IgH アレルを有するマウスの B 細胞を IL-4 存在下で iGB 細胞培養を行い、内在性 IgH 鎖が欠失した iGB 細胞に IgM、IgG1、IgE の各 mIgH 鎖を導入した。これらの細胞の BCR を種々の時間刺激し、ウェスタンブロット法にて STAT3 の活性化を調べた。その結果、mIgE を発現させた時だけ STAT3 の活性化を示すチロシンリン酸化が刺激前および刺激後 15 分までに誘導された（図 3）。したがって、mIgE の自発的シグナルは STAT3 の活性化を誘導することが分かった。

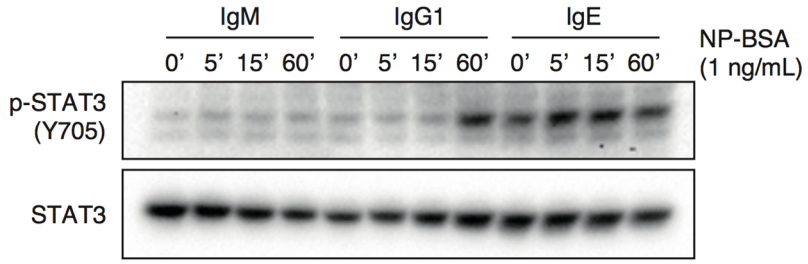


図 3. B 細胞表面に発現した膜型 IgE は STAT3 の活性化を誘導する

IgH$^{Cγ1\text{-}Cre/B1\text{-}8\text{-}flox}$ *Igκ* $^{-/-}$ マウスの脾臓 B 細胞を、40LB 細胞（CD40L と BAFF を発現させた Balb/c 3T3 細胞）フィーダー上で、IL-4 を加えて 2 日間培養した後、この細胞にレトロウィルスベクターを用いて IgM、IgG1、IgE の各 mIgH 鎖を導入した。その後 3 日間培養した各細胞からフィーダー細胞を除き、NP-BSA（牛血清アルブミン）により図に記した時間刺激し、その細胞溶解物を SDS-PAGE した後、抗チロシンリン酸化（pY705）STAT3 抗体、および、抗 STAT3 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

次に、mIgE の自発的シグナル伝達を担う BLNK と CD19 をそれぞれ欠損する B 細胞を iGB 細胞培養し、その細胞内の STAT3 の活性化をウェスタンブロット法にて調べたところ、それぞれにおいて活性化型チロシンリン酸化 STAT3 の量が正常 iGB 細胞と比べて減少していた（図 4）。よって、mIgE の下流で BLNK と CD19 が協調して STAT3 の活性化を誘導していると考えられた。

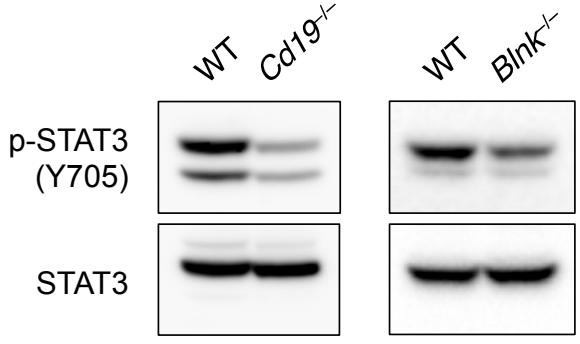


図 4. 膜型 IgE シグナルは CD19 と BLNK を介して STAT3 の活性化を誘導する

正常な C57BL/6（WT）マウス、*CD19* $^{-/-}$マウスあるいは *BLNK* $^{-/-}$マウスの B 細胞を 40LB 上で IL-4 を添加して 4 日間培養した後、フィーダー細胞を除いた各細胞の溶解物を SDS-PAGE した後、抗チロシンリン酸化（pY705）STAT3 抗体、および、抗 STAT3 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

さらに、恒常活性型 STAT3 あるいは STAT5, STAT6 を通常のマウス B 細胞由来の iGB 細胞に導入し、それぞれ GC B 細胞とプラズマ細胞のマーカーである BCL6 と CD138 の発現をフローサイトメトリーにより調べた。その結果、恒常活性型 STAT3 の強制発現により、BCL6 陽性細胞が著しく減少し CD138 陽性細胞が著しく増加した。恒常活性型 STAT5 も同様に BCL6 陽性細胞の抑制を引き起こしたが、CD138 陽性細胞の誘導の程度は弱かった。活性型 STAT6 は逆に BCL6 陽性細胞を増加させた（図 5）。

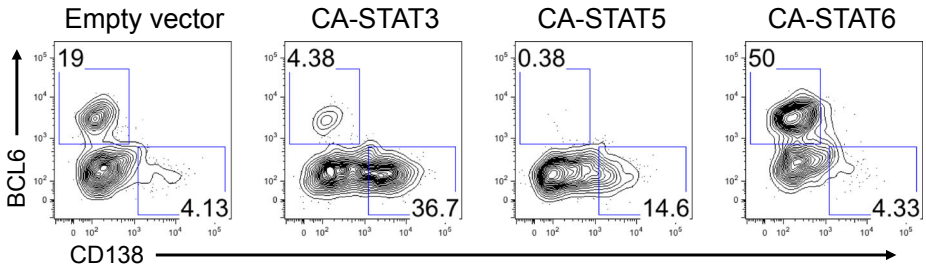


図 5. 恒常活性型 STAT3 は胚中心 B 細胞からプラズマ細胞への分化を誘導する

正常な C57BL/6 マウスの B 細胞を 40LB 上で IL-4 を添加して 2 日間培養して作製した iGB 細胞に、恒常活性型（CA）STAT3、STAT5、STAT6 の各 cDNA が組込まれた、あるいは空（Empty vector）のレトロウィルスベクターを感染させ、さらに 2 日間培養後、抗 CD138 抗体と抗 BCL6 抗体を用いてそれぞれ細胞表面、細胞内を染色し、フローサイトメトリーにより解析した。図には IgG1 陽性細胞のみにゲーティングした結果を示した。

最後に、ニトロフェニル（NP）抗原特異的な BCR を発現する B1-8hi ノックインマウス由来の iGB 細胞に STAT3 のノックダウンベクターあるいはコントロールベクターを導入し、これらの iGB 細胞をマウスに移入した後、マウスを NP-鶏γグロブリン（CGG）で免疫した。その 1 週後に脾臓のドナー由来の GC B 細胞について IgG1 と IgE の発現をフローサイトメトリーにより調べた。その結果、STAT3 がノックダウンされた方では IgE 陽性の GC B 細胞が著しく増加していることが見出された（図 6）。すなわち、自発的 mIgE シグナルによる IgE 陽性 GC B 細胞の排除には STAT3 が関与していることが示唆された。

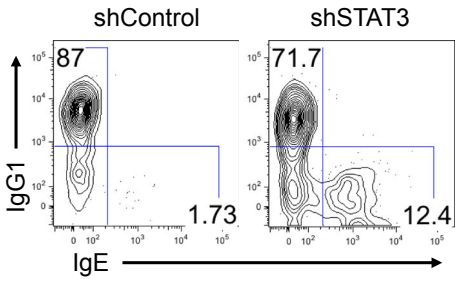


図 6. STAT3 は IgE 型胚中心 B 細胞の排除に必要である

IgH $^{B1\text{-}8hi}$ *CD45.1* $^{+/+}$ マウスの脾臓 B 細胞を 40LB 上で IL-4 を添加して 2 日間培養して作製した iGB 細胞に、STAT3 RNAi 配列（shSTAT3）あるいはコントロール配列が組み込まれたノックダウン用レトロウィルスベクター（感染マーカーとして GFP をもつ）を感染させ、さらに 1 日間培養後、各細胞を C57BL/6 マウス（*CD45.2* $^{+/+}$）に移入した。このマウスを NP-CGG で免疫し、1 週後の脾臓細胞を CD45.1、B220、GL7、IgG1、IgE に対する各抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。図にはドナー由来のベクターが感染した GC B 細胞（CD45.1^{+} GFP^{+} B220^{+} GL7^{+}）のみにゲーティングした結果を示した。

以上の結果より、mIgE の下流で BLNK と CD19 を介した GC B 細胞のプラズマ細胞への分化誘導による排除には少なくとも部分的に STAT3 が働いていると考えられた。

２． アレルギー患者の IgE 陽性 B 細胞における体細胞変異の同定

アレルギー患者のゲノムワイド相関解析（GWAS）からアレルギー病と関連する遺伝子多型がいくつか同定されているが、それらと発症率の関連性は低く、アレルギー病の疾患感受性を高める遺伝的背景とは考えられるが、アレルギー発病の直接の原因とは考えにくい。一方、胚中心 B 細胞では、低頻度ながら抗体以外の遺伝子にも体細胞変異が起こることが知られている。そこで、前述の BLNK や CD19、あるいは IgE 遺伝子自体など、自発的 mIgE シグナルに関わる因子に変異を起こした GC B 細胞が IgE へクラススイッチし、排除されずに IgE 陽性の Bm・LP 細胞となってアレルギー疾患を引き起こす可能性を想定した。これを検証するために、アレルギー病罹患者の末梢血の $mIgE^+$ Bm 細胞を単離し、そのエクソーム解析を行った。

まず、末梢血単核球から僅かな $mIgE^+$ Bm 細胞を選択的に増殖させた。すなわち、末梢血 B 細胞を 40LB 上で IL-21 を添加して増殖させ、この iGB 細胞をまず FcεRI の IgE 結合領域を表出する 40LB 上で培養し、次に FasL を表出する 40LB 上で培養した。すると $mIgE^+$ B 細胞のみが刺激を受け FasL 耐性となって生存し、その後 40LB 上で増殖した（図 7）。iGB 培養中には新たな体細胞変異は起こらず、IL-21 は IgE へのクラススイッチを起こさないので、この方法で選択した $mIgE^+$ iGB 細胞は培養前の $mIgE^+$ B 細胞のゲノム配列と基本的に同一のはずである。

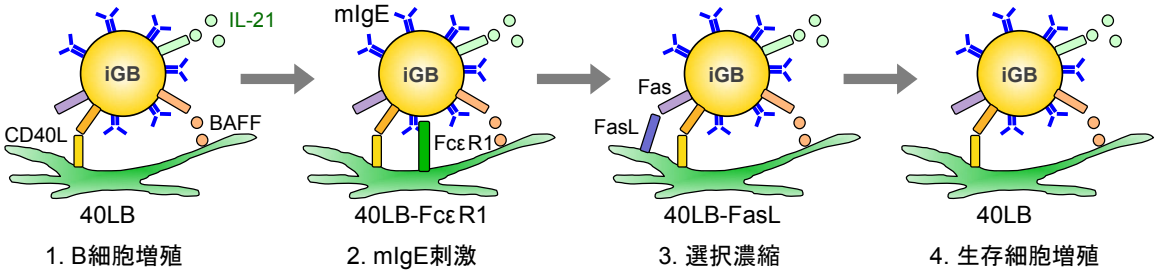


図 7. $mIgE^+$ B 細胞の選択法（Fas-mediated IgE^+ B cell selection: FEBS）

（1）単離したヒト B 細胞を 40LB 上で IL-2、IL-21 とともに培養すると増殖して iGB 細胞となり、アポトーシス誘導受容体である Fas を発現する。（2）次にこの iGB 細胞を、高親和性 IgE 受容体(FcεRI)を発現させた 40LB 細胞上に移し、mIgE を発現する iGB 細胞のみに刺激を入れる。（3）さらに、Fas リガンド(FasL)を発現させた 40LB 細胞上に移すと、第 2 段階で刺激を受けた $mIgE^+$ iGB 細胞だけが FasL 耐性となり生き残る。（4）生き残った細胞を 40LB 細胞上で培養して増殖させる。

この FEBS 法を 2 回繰り返したところ、末梢血 B 細胞の中で 0.05 %の割合で存在した $mIgE^+$ iGB 細胞を、1.5 %にまで濃縮することができ、さらにセルソーターを用いて最終的に 100 %にまで純化することができた。こうして得られた $mIgE^+$ B 細胞と、コントロールとして同一個体の非 B 細胞白血球からゲノム DNA を抽出し、エクソーム解析を行った。そして、両者の比較により、$mIgE^+$ Bm 細胞のみに見られた変異を体細胞変異と見なし、そのうち、アミノ酸配列を変化させる（欠失、挿入、フレームシフト、開始・終止コドンの喪失・新生、スプライシング異常、アミノ酸置換など）変異遺伝子を抽出した。その結果、PI3K-Akt シグナル経路、MAPK シグナル経路、種々の発がん等に関連する多数の遺伝子が見出された。これらの変異遺伝子がアレルギー病の病因となり得るかについて明らかにするには更に研究を続ける必要がある。

考　察

IgE は多くのアレルギー病の直接原因であることが古くから知られているが、IgE がどのように B 細胞から長期的に産生されるようになるのか、これまで分かっていなかった。B 細胞は IL-4 のシグナルを受けて免疫グロブリン H 鎖遺伝子の IgE（ε）H 鎖へのクラススイッチを起こし、プラズマ細胞に分化して IgE 抗体を産生することは知られているが、この細胞は *in vivo* でも *in vitro* でも短命である。よって、IgE 陽性の B 細胞を個体内から単離することはもちろん、*in vitro* で多数の IgE 陽性 B 細胞を作製することも困難で、IgE 陽性 B 細胞の生化学的・遺伝学的解析をすることは困難であった。しかし、私たちが確立した iGB 細胞培養系は多数の IgE 陽性 B 細胞を *in vitro* で作製することを可能にした。ナイーブ B 細胞を 40LB フィーダー上で IL-4 を加えて培養すると著しく増殖して GC B 細胞の表現型（$GL7^+$ Fas^+ : in-vitro-induced GC B［iGB］細胞）となり、その 30~40 %が IgE 陽性となった。また、iGB 細胞をマウス個体内に移入し、その免疫応答を解析することも可能である［1］。さらに、ヒト末梢血 B 細胞も同じフィーダー細胞を用いて同様に培養することができる。また、レトロウィルスベクターにより高率の遺伝子導入が可能で、Cre/loxP 系を利用して内在性 BCR を欠失させた上で、任意の BCR を導入することで上述の mIgE の特性の発見に至った［2］。本研究においても、iGB 細胞培養系を活用して、mIgE の発現により STAT3 が活性化すること、そのシグナル伝達には BLNK および CD19 が関与していること、STAT3 の活性化が iGB 細胞を GC 様 B 細胞からプラズマ細胞へ分化させること、また、*in vivo* でも STAT3 は IgE 陽性 GC B 細胞の増殖・維持を抑制する役割を果たすことを見出すことができた。これらの結果から、mIgE からの自発的シグナルは STAT3 の活性化を介して GC B 細胞の短期生存プラズマ細胞への分化を誘導し、そのため IgE 陽性の GC B 細胞の増殖が維持されず、これが、IgE 産生 LP 細胞や mIgE 陽性 Bm 細胞が産生されないメカニズムの 1 つと考えられる。

高 IgE 症候群（hyper-IgE syndrome: HIES）は重症のアトピー性皮膚炎や高 IgE 血症を呈する先天性免疫不全症であり、その一部の症例で STAT3 遺伝子のヘテロ変異が見出されている。これらの症例では親族に同じ変異が見つかっていないので、個体の接合子あるいは造血幹細胞の段階で変異が起こった可能性がある。この変異は STAT3 の DNA 結合ドメインに集中しており、その結果、変異 STAT3 はドミナントネガティブ型として働き、ヘテロでも STAT3 の機能不全を引き起こすと考えられている［3］。しかし、正常型 STAT3 が等量存在する中でこの変異 STAT3 が本当に STAT3 機能不全を起こし得るかは不明であり、また、アレルギーに重要な Th2 細胞分化に STAT3 が必要であることもあり［4］、この STAT3 の機能不全がどうしてアレルギー病を誘発するのかこれまで明確にされていなかった。今回の研究結果から、STAT3 の機能不全が B 細胞で起こることにより胚中心から IgE 型の LP 細胞や Bm 細胞が産生されることが HIES を引き起こす可能性が示された。このことから、上記のヘテロ変異の患者の胚中心において正常 STAT3 遺伝子アレルにも変異が入り、STAT3 ホモ変異となった B 細胞が IgE 型 GC B 細胞となって増殖した後、IgE 型 LP 細胞となり、長期 IgE 産生を引き起こしている可能性が考えられる。

この可能性を検証するには、HIES 患者の IgE 型 Bm 細胞を単離し、STAT3 遺伝子の塩基配列を調べれば良いが、これまでは僅少な IgE 型 Bm 細胞を単離することが困難であった。上述のように、私たちは iGB 培養系を基盤として、末梢血単核球から IgE 型 Bm 細胞を選択的に増殖する方法を確立した。本法は、特定の遺伝子に限らず、ヒト $mIgE^+$ Bm 細胞のオミクスアプローチを可能にし、アレルギー研究に新たな展開をもたらすものと期待される。実際、本研究で行ったエクソーム解析により、$mIgE^+$ Bm 細胞に起こった体細胞変異と思われる変異が相当数見出された。これらの中で、$mIgE^+$ GC B 細胞の生存および LP 細胞・Bm 細胞への分化に寄与した変異遺伝子を特定する研究を今後続けていかなければならない。

上述のようにGC B細胞においては免疫グロブリン以外の遺伝子にも変異が起こり、それはBリンパ腫の成因の1つとしても知られている。しかし、GC B細胞における体細胞変異がIgE陽性のBm・LP細胞の産生を促し、アレルギー疾患を引き起こすという概念はこれまでになく、その証明はアレルギー発病機構解明のブレイクスルーとなり得る。また、通常の免疫応答の過程で偶発的にIgEを産生するB細胞記憶が形成されることがアレルギー疾患の原因となるという仮説は、突然発病するアレルギー疾患を良く説明できる。この研究の成果は、アレルギー疾患の根本治療および予防のための新たな分子標的の発見に繋がり、社会的にも重要な貢献をするものと期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京理科大学生命医科学研究所北村研究室の羽生田圭、Nguyen Tien Dat、深尾紗央里、加藤圭、蛯子華と共に行われた。これらの人々に感謝の意を表する。

文　献

1) Nojima T, Haniuda K, Moutai T, Matsudaira M, Mizokawa S, Shiratori I, Azuma T, Kitamura D. In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. Nat Commun. 2011 Sep 6;2:465. PMID: 21897376　DOI: 10.1038/ncomms1475.

2) Haniuda K, Fukao S, Kodama T, Hasegawa H, Kitamura D. Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. Nat Immunol. 2016 Sep;17(9):1109-17. Epub 2016 Jul 18.　PMID: 27428827　DOI: 10.1038/ni.3508.

3) Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. Nature. 2007 Aug 30;448(7157):1058-62. Epub 2007 Aug 5.　PMID: 17676033　DOI: 10.1038/nature06096.

4) Stritesky GL, Muthukrishnan R, Sehra S, Goswami R, Pham D, Travers J, Nguyen ET, Levy DE, Kaplan MH.The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development.　Immunity.　2011　Jan 28;34(1):39-49. Epub 2011 Jan 6.　PMID: 21215659　DOI: 10.1016/j.immuni.2010.12.013.