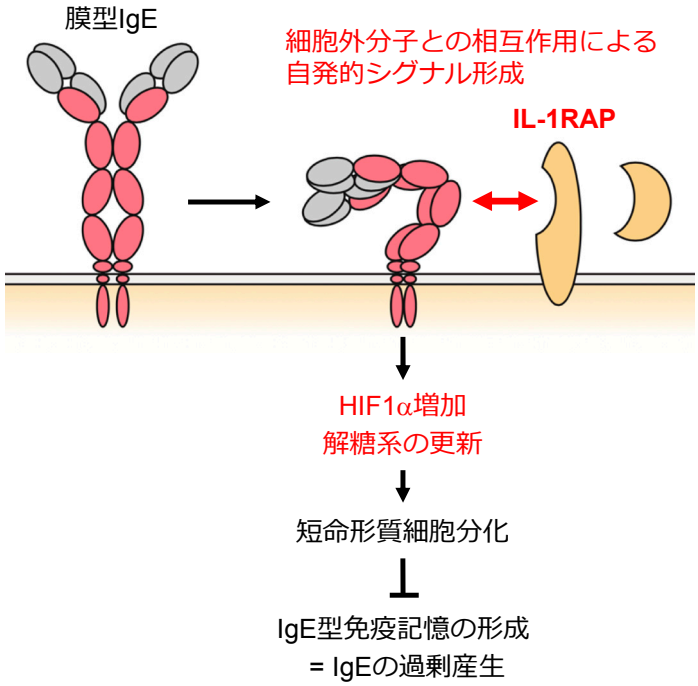
167　IgE型免疫記憶の制御因子の解明	羽生田　圭

【目的】IgE 抗体は、アトピー性皮膚炎や気管支喘息をはじめとしたアレルギー疾患の発症や増悪因子としてよく知られている。IgE 抗体は健常人の血清中にごく微量しか存在せず、寄生虫感染等により一過性に産生されるが IgE^{+}のメモリーB 細胞や長期生存する抗体産生細胞（IgE 型免疫記憶）が形成されない。その理由は、IgE^{+} B 細胞が発現する膜型 IgE が細胞上への発現のみで自発的にシグナルを発し、短命の形質細胞への分化を誘導して IgE 型免疫記憶の形成を抑制するためである。したがって、IgE 高値を示すアレルギー疾患では、膜型 IgE の自発的シグナルの形成や伝達に異常が起こり、それが IgE 型免疫記憶の異常形成をもたらしている可能性が予想される。しかしながら、膜型 IgE の自発的シグナルによる免疫記憶形成の抑制メカニズムおよび膜型 IgE が自発的シグナルを形成するメカニズムには依然として不明な点が多く、本研究ではそれらの解明を目的とした。

【方法】CD40 リガンドと BAFF を発現するフィーダー細胞を用いる独自の培養系である induced germinal center B 細胞培養系と、目的のクラスの免疫グロブリン重鎖（IgH）のみを培養 B 細胞に発現させることが可能な IgH 置換系を用いて、活性化 B 細胞に膜型 IgE を発現させて細胞の特性変化を解析した。さらに、膜型 IgE の細胞外領域に会合する分子を IgH の部分置換体を用いた免疫沈降法により同定した。

【結果】膜型 IgE の発現は転写因子 HIF1 α の発現を恒常的に誘導すること、解糖系を活性化して形質細胞分化を促進することが明らかとなった。さらに、膜型 IgE の細胞外領域には IL-1 受容体の構成分子である IL-1RAP が恒常的に会合することで B 細胞受容体シグナル伝達経路を活性化することが判明した。

膜型 IgE による B 細胞記憶の制御メカニズム



167. IgE 型免疫記憶の制御因子の解明

羽生田　圭

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 : IgE, B 細胞受容体, アレルギー, B 細胞, 免疫記憶

緒　言

IgE 抗体は、アトピー性皮膚炎や気管支喘息をはじめとしたアレルギー疾患の発症や増悪因子としてよく知られている。IgE 抗体は健常人の血清中にごく微量しか存在せず、寄生虫感染等により一過性に産生されるが IgE^{+}のメモリー B 細胞や長期生存する抗体産生細胞（IgE 型免疫記憶）が形成されないことが近年明らかにされた［1〜3］。一方、重度のアレルギー喘息をはじめとした慢性のアレルギー疾患患者では、持続的に血中 IgE 抗体価が高く、何らかの異常で IgE^{+}の長期生存する抗体産生細胞が形成・維持されていると考えざるを得ない。また、長期間 IgE 抗体価が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等の場合には、IgE^{+}のメモリーB 細胞が存在すると考えられる。しかし、何故このような IgE 型免疫記憶の異常形成が起きるのかは不明であった。

私たちはこれまでに IgE^{+} B 細胞が発現する膜型 IgE（IgE 型の B 細胞受容体）に着目して研究を行い、膜型 IgE が細胞上への発現のみで誘導するシグナル（自発的シグナル）が、短命の形質細胞への分化を誘導して IgE 型免疫記憶の形成を抑制することを見出している［4］。この結果から、膜型 IgE の自発的シグナルの形成に異常が起こり、それが IgE 型免疫記憶の異常形成をもたらしてアレルギー疾患を引き起こしている可能性が予想された。しかしながら、膜型 IgE の自発的シグナルによる免疫記憶形成の抑制メカニズムおよび膜型 IgE が自発的シグナルを形成するメカニズムには依然として不明な点が多く、本研究ではそれらの解明を目的とした。

方法および結果

1.　膜型 IgE の自発的シグナルは解糖系の活性化を誘導して短命形質細胞への分化を促進する

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）培養系を構築した［5］。この系では、CD40 リガンドと 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とで、胚中心 B 細胞表現系を有する iGB 細胞が著しく増殖し、クラススイッチが高効率で誘導されて IgG1 領域の転写を強力に誘導することができる。さらに本研究では、loxP 配列で挟まれたハプテン NP 抗原特異的な B1-8 免疫グロブリン重鎖（IgH）と IgG1-Cre アレルを有するマウスの B 細胞を iGB 細胞培養して、Cre-loxP 組替えを誘導して内在性 IgH を欠損させ、NP 特異的膜型 IgH をレトロウイルスによって導入する実験系を用いた（IgH 置換系、図 1a）。

IgH 置換系を用いて種々のクラスの B 細胞受容体（BCR）を iGB 細胞に発現させ、膜型 IgE の発現により変化する細胞の特性を解析したところ、膜型 IgG1 に比べて膜型 IgE を発現させた細胞では、解糖系の最終産物である乳酸産生が亢進していた。さらに、IgH 置換系を用いて膜型 IgE または膜型 IgG1 を発現させた iGB 細胞をウエスタンブロット解析したところ、膜型 IgE を発現させた細胞では低酸素応答および解糖系を制御することで知られる転写因子 HIF1α のタンパク量が増加していた（図 1b）。HIF1α の活性化 B 細胞での機能を解析するために、iGB 細胞の cDNA から *HIF1α* 遺伝子をクローニングしてレトロウイルスベクターに挿入し、C57BL/6 マウス由来の iGB 細胞に過剰発現させた。その結果、IgG1^{+}細胞において形質細胞分化の亢進とアポトーシス細胞の増加が認められた（図 1c）。次に、膜型 IgE による解糖系の亢進と形質細胞分化の関係性を調べるために、解糖系の阻害剤として知られるヘキソキナーゼ阻害剤 2–DG を iGB 細胞培養系に添加したところ、IgE^{+}細胞の自発的な形質細胞分化が強力に抑制された（図 1d）。

以上の結果から、膜型 IgE の発現は HIF1α の発現を恒常的に誘導して解糖系を活性化し、形質細胞分化を促進している可能性が示唆された。

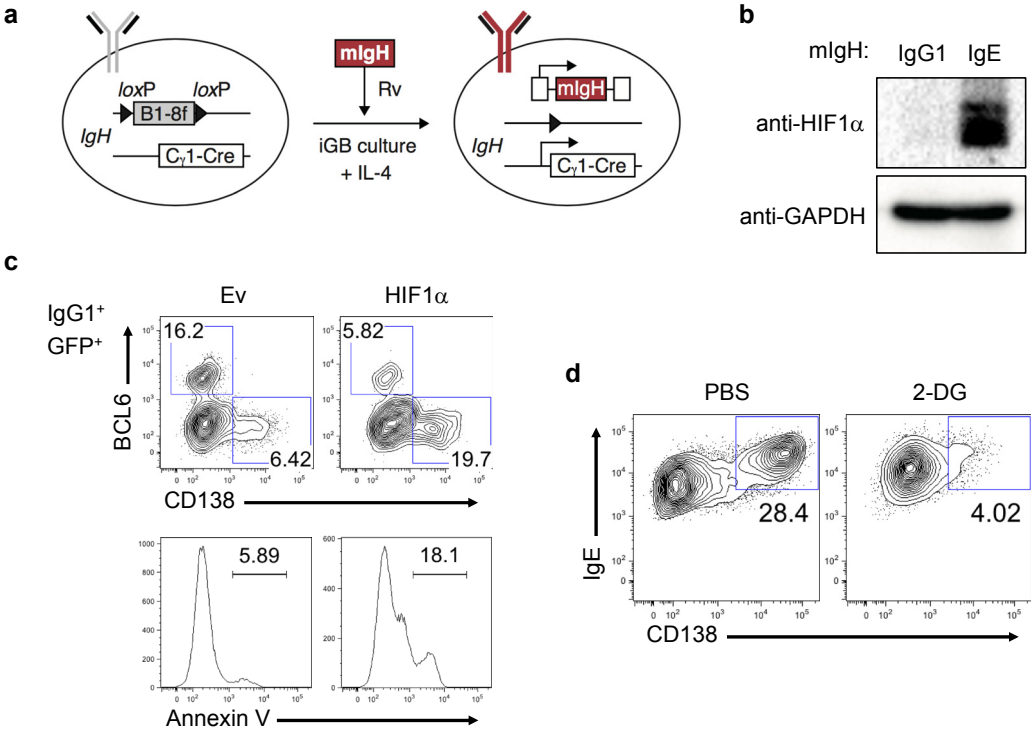


図 1. 膜型 IgE による HIF1α 誘導と短命形質細胞分化の誘導

a) IgH 置換系の概略図。B1-8 と IgG1-Cre アレルの 2 つの IgH ノックインアレルを有するマウスの B 細胞を IL-4 存在下に iGB 細胞培養し、ハプテン NP に特異的な膜型 IgH（mIgH）を導入した。

b) IgH 置換系を用いて膜型 IgG1 または膜型 IgE を発現させた細胞の溶解物をウエスタンブロット法により解析した。mIgH：膜型 IgH。

c) C57BL/6 マウス由来の iGB 細胞にレトロウイルスベクターを用いて HIF1α を過剰発現させ、または空ベクター（Ev）を導入し、フローサイトメトリー解析によって IgG1$^+$GFP$^+$細胞における CD138$^+$BCL6$^-$の形質細胞の割合および Annexin V$^+$アポトーシス細胞の割合を解析した。

d) 培養 4 日目の C57BL/6 マウス由来 iGB 細胞を精製し、2-DG を添加して 24 時間培養した後、IgE$^+$細胞における CD138$^+$形質細胞の割合を解析した。

2. 膜型 IgE の細胞外に会合する分子の同定

私たちは、膜型 IgE の自発的シグナル形成の責任領域が細胞外ドメインに存在することを見出しており［4］、その結果から、活性化 B 細胞に発現する何らかの細胞外分子が膜型 IgE と相互作用することで自発的なシグナル伝達が誘導されることが予想された。

膜型 IgE の細胞外ドメインに結合する分子の同定を目指すために、自発的シグナルを誘導することを確認した、細胞外領域全てを膜型 IgE に置換して C 末端に FLAG タグを付加した膜型 IgG1 変異体（EctoE-FLAG）、および、自発的シグナルを誘導しないコントロールとして、対応するドメインが膜型 IgE の CH1-2 に置換して C 末端に Flag タグを付加した膜型 IgG1 変異体（CH1-2E-FLAG）をそれぞれ IgH 置換系を用いて iGB 細胞に発現させた（図 2a）。それぞれの細胞溶解物から、NP をセファロースに共役した NP-ビーズを用いて BCR 複合体を免疫沈降し、導入した BCR に対して NP よりも高親和性を示す NIP で溶出した。さらにこの溶出物を、抗 FLAG 抗体を結合させたビーズで免疫沈降し、FLAG ペプチドで溶出した。この二段階の免疫沈降により精製したサンプルを SDS-PAGE で分離した後に銀

染色を行い、EctoE-FLAG のみに認められる複数のバンド（膜型 IgE の細胞外ドメインに会合する分子）を切り出して質量分析法によりタンパク質を同定した（図 2b）。69 kDa 付近バンドの質量分析の結果、IL-1 受容体の構成分子である IL-1RAP が同定された。

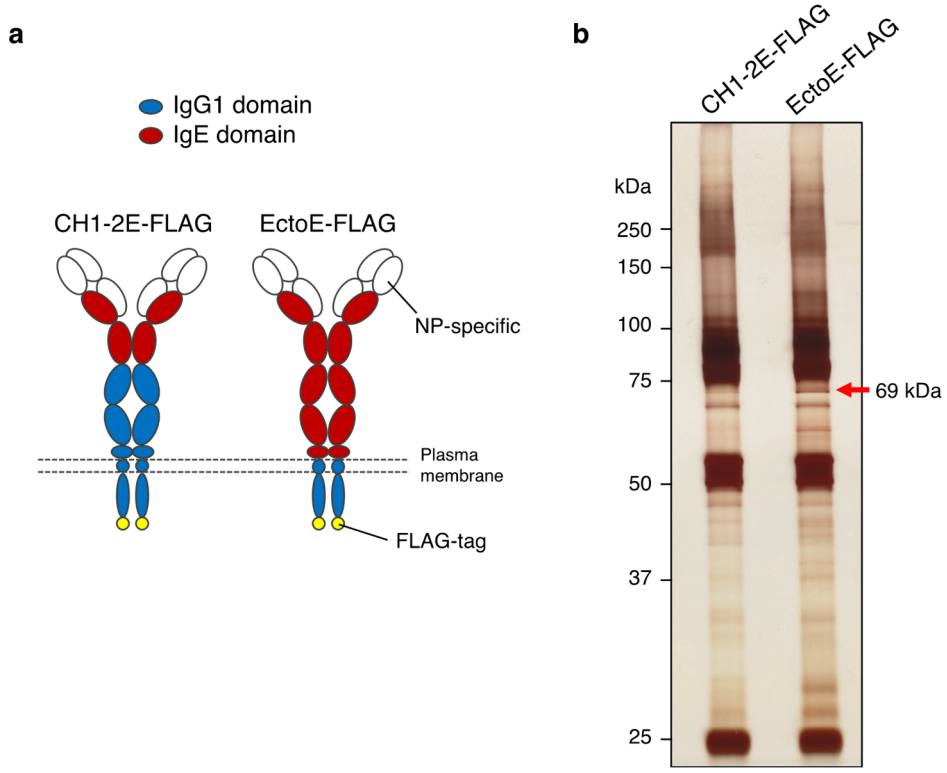


図 2. IgH 置換系を用いた膜型 IgE の細胞外領域に会合する分子の同定

a）実験に用いた膜型 IgG1 変異体の模式図。青い領域は膜型 IgG1、赤い領域は膜型 IgE、白い領域は可変領域および軽鎖、黄色の部分は FLAG タグを表す。

b）CH1-2E-FLAG および EctoE-FLAG を、IgH 置換系により iGB 細胞に発現させ、それぞれの溶解物から NP-ビーズおよび抗 FLAG 抗体を共役したビーズを用いた二段階の免疫沈降により BCR 複合体を精製し、その精製物を SDS-PAGE ゲルで分離した後に銀染色によりタンパク質を染色した。

3. IL-1RAP による膜型 IgE シグナルの誘導

IL-1RAP と膜型 IgE の会合を検証するために、iGB 細胞の cDNA から *IL-1RAP* 遺伝子をクローニングし、タンパクの C 末端側に FLAG タグを付加したものをレトロウイルスベクターに挿入し、IgH 置換系を用いて膜型 IgE または膜型 IgG1 と共に iGB 細胞に共発現させた（図 3a）。それぞれの細胞溶解物から NP-ビーズを用いて BCR 複合体を免疫沈降し、その沈降物について、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット解析した。その結果、精製した膜型 IgE の複合体においてのみ FLAG シグナルが確認されたことから、IL-1RAP は恒常的に膜型 IgE と会合していることが明らかとなった（図 3b）。膜型 IgE と IL-1RAP との会合の生理的な意義を明らかにするために、*IL-1RAP* 欠損マウスを入手しその B 細胞を解析した。コントロールおよび *IL-1RAP* 欠損マウスの脾臓 B 細胞を精製し、iGB 細胞培養系で IL-4 存在下 5 日間培養して IgE へのクラススイッチを誘導した。その後、40LB 細胞を除去して iGB 細胞を単離し、その細胞溶解物を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、膜型 IgE の自発的シグナル伝達により活性化される、BCR 直下のキナーゼである Syk とその下流のアダプタータンパク質である BLNK のリン酸化が、*IL-1RAP* 欠損 B 細胞で減弱していることが明らかとなった。

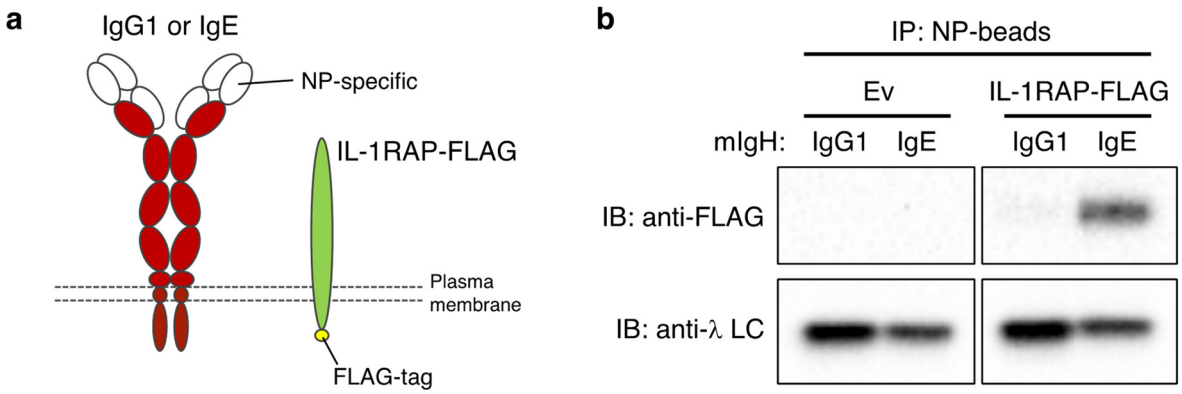


図 3. 膜型 IgE は IL-1RAP と恒常的に会合する

a）IgH 置換系を用いて、iGB 細胞に NP 特異的な膜型 IgG1 または膜型 IgE と FLAG タグを付加した IL-1RAP（IL-1RAP-FLAG）を共発現させた。

b）膜型 IgG1 または膜型 IgE と、空ベクター（Ev）または IL-1RAP-FLAG を共発現させたそれぞれの細胞溶解物から NP-ビーズを用いて BCR 複合体を免疫沈降した。その沈降物を SDS-PAGE で分離後、抗 FLAG 抗体により IL-1RAP を、抗 lambda 軽鎖（λLC）抗体により沈降した BCR 量をそれぞれウエスタンブロット解析した。

考　察

過剰産生によりアレルギー疾患を誘導する可能性を持つ IgE 抗体の産生は、B 細胞の内因的な抑制機構により厳密に制御されている。すなわち、短命の形質細胞へと分化して一過性に抗体産生を誘導するが免疫記憶を形成しないという IgE^+ B 細胞の特性は、膜型 IgE とその活性化因子となる IL-1RAP によって自発的シグナルが誘導されて決定される可能性が本研究により明らかとなった。その膜型 IgE と IL-1RAP との相互作用が破綻した場合、IgE 型の免疫記憶が形成されて長期の IgE 産生に至ることが予想される。さらに、膜型 IgE による自発的シグナルは細胞内の代謝リプログラミングを誘導することで B 細胞の分化運命を制御することが明らかとなった。したがって、IgE 高値を示すアレルギー疾患患者では、何らかの要因により膜型 IgE の自発的シグナルの形成異常や IgE^+ B 細胞の細胞内代謝プログラムが変化している可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京理科大学生命医科学研究所分子生物学研究部門の北村大介博士と深尾紗央里博士である。本研究の遂行に協力いただいた両博士に心より感謝する。また、質量分析解析においてご協力いただいた、東京医科歯科大学難治疾患研究所免疫疾患分野教授の鍔田武志博士に心より感謝する。

文 献

1) Talay O, Yan D, Brightbill HD, Straney EE, Zhou M, Ladi E, Lee WP, Egen JG, Austin CD, Xu M, Wu LC. IgE^+ memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. Nat Immunol. 2012 Feb 26;13(4):396-404. PMID: 22366892 DOI: 10.1038/ni.2256.

2) Yang Z, Sullivan BM, Allen CD. Fluorescent in vivo detection reveals that IgE^+ B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition. Immunity. 2012 May 25;36(5):857-72. PMID: 22406270 DOI: 10.1016/j.immuni.2012.02.009.

3) He JS, Meyer-Hermann M, Xiangying D, Zuan LY, Jones LA, Ramakrishna L, de Vries VC, Dolpady J, Aina H, Joseph S, Narayanan S, Subramaniam S, Puthia M, Wong G, Xiong H, Poidinger M, Urban JF, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. The distinctive germinal center phase of IgE^+ B lymphocytes limits their contribution to the classical memory response. J Exp Med. 2013 Nov 18;210(12):2755-71. PMID: 24218137 DOI: 10.1084/jem.20131539.

4) 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. PMID: 27428827 DOI: 10.1038/ni.3508

5) 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.