

# 環境因子による IgE 型免疫記憶の制御機構

東京理科大学 生命医科学研究所

羽生田 圭

## 研究目的

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<sup>+</sup>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ている。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、何らかの異常で長期生存してIgEを産生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<sup>+</sup>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<sup>+</sup> B細胞が発現するIgE型のB細胞受容体（IgE-BCR）の機能について研究を行い、IgE-BCRが抗原非依存的に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きた。この結果から、IgE-BCRの自発的シグナルの機能異常が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す可能性が想定された。しかしながら、IgE-BCR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には依然として不明な点が多い。そこで本研究では、IgE-BCRの自発的シグナルによるB細胞内代謝改変に焦点を当てて研究を行い、どのような細胞内代謝機構およびそれを制御する因子がIgE型免疫記憶の形成を抑制しているのか、その分子メカニズムの解明を目指した。さらに、いかなる分子機構の破綻がアレルギー発症に繋がるのかを示してアレルギー治療の新たな分子標的を見出すことを目的として研究を行なった。

## 研究結果

### 1. IgE<sup>+</sup> B細胞では胚中心B細胞のマスター転写因子BCL6の発現誘導が抑制される

まず初めに、*in vivo*におけるIgE<sup>+</sup> B細胞の特性を調べるために、モデル抗原であるNP-CGG（ハプテンNPを結合させたニワトリガンマグロブリン）とアラムアジュバントをC57BL/6マウスの皮下に免疫し、その後経時的に所属リンパ節の細胞についてフローサイトメトリー解析を行った。その結果、IgG1<sup>+</sup> B細胞と比較してIgE<sup>+</sup> B細胞では、形質細胞のマスター転写因子として知られるIRF4を高発現する細胞の割合が免疫後初期の段階から多く、反対に胚中心B細胞のマスター転写因子として知られるBCL6を発現する細胞の割合が少ないことが判明した。胚中心はメモリーB細胞や長期生存形質細胞の分化の場として知られることから、IgE<sup>+</sup> B細胞ではBCL6の発現誘導が抑制されているために、IgE型免疫記憶の形成が抑制されている可能性が明らかとなった。

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（iGC細胞）

培養系を構築している (Nojima et al., *Nat Commun.* 2011)。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。以前に、IRF4はBCL6のプロモーター領域に結合することでBCL6の転写を抑制することが報告されている。そこで、IRF4をIgG1<sup>+</sup> iGB細胞に過剰発現したところ、BCL6の発現が強力に抑制された。したがって、IgE<sup>+</sup> B細胞におけるIRF4の高発現がBCL6の発現誘導を抑制することが判明した。

私たちはこれまでに、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組換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 (Haniuda et al., *Nat Immunol.* 2016) を構築している。このIgH置換系を用いれば、任意のBCR (クラススイッチしたものや変異体) を初代培養B細胞に発現することが可能となった。この系を用いた結果、IgG1-BCRを発現させた細胞に比べて、IgE-BCRを発現させた細胞ではIRF4の高発現が誘導されるとともに、BCL6の発現が抑制された。したがって、IgE-BCRは抗原非依存的な自発的シグナルによってBCL6の発現を抑制し、結果としてIgE型免疫記憶の形成を抑制している可能性が明らかとなった。

## 2. IgE-BCRの自発的シグナルは細胞内フマル酸蓄積を誘導し、STAT3の活性化を介してIRF4高発現を誘導する

私たちはこれまでに前述のIgH置換系を用いたメタボローム解析により、IgE-BCRが代謝中間体であるフマル酸の蓄積を誘導することを見出している。細胞膜透過性のフマル酸誘導体であるジエチルフマル酸を培地に添加してiGB細胞を誘導したところ、IgG1<sup>+</sup> iGB細胞においてIRF4の高発現およびBCL6の発現抑制が誘導されたことから、IgE<sup>+</sup> B細胞で蓄積するフマル酸が、IgE型免疫記憶の形成を抑制する重要な代謝中間体であることを見出した。

これまでに細胞内フマル酸の蓄積が、 $\alpha$ -ケトグルタル酸と拮抗することで $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性デヒドロゲナーゼを阻害して、マクロファージの機能を制御することが報告されている。しかしながら、細胞膜透過性の $\alpha$ -ケトグルタル酸誘導体であるジメチル $\alpha$ -ケトグルタル酸を培地に添加してiGB細胞を誘導したが、IRF4の高発現およびBCL6の発現抑制は解除されなかった。さらに、同じく $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性デヒドロゲナーゼを拮抗阻害すると知られるコハク酸誘導体、ジエチルコハク酸の添加はIRF4の高発現およびBCL6の発現抑制を誘導しなかった。以上から、IgE<sup>+</sup> B細胞で蓄積するフマル酸は既報の $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性デヒドロゲナーゼ阻害とは別のメカニズムでIRF4の高発現を誘導している可能性が示唆された。

そこでIgG1<sup>+</sup> iGB細胞において、ジエチルフマル酸の添加後に活性化するシグナル伝達経路を探索したところ、転写因子STAT3のチロシンリン酸化が亢進することを見出した。実際に、IgG1-BCR発現細胞に比べて、IgE-BCR発現細胞ではSTAT3のチロシンリン酸化が亢進していた。STAT3の恒常活性化変異体をIgG1<sup>+</sup> iGB細胞に強制発現させたところ、IRF4の高発現およびBCL6の発現抑制が認められ、さらに、クロマチン免疫沈降法を用いた解析から、IgG1<sup>+</sup> に比べてIgE<sup>+</sup> iGB細胞では、STAT3がIRF4のプロモーター領域に恒常的に高レベルで結合することを見出した。以上から、IgE<sup>+</sup> B細胞で蓄積するフマル酸はSTAT3の活性化を誘導することでIRF4の高発現を誘導し、IgE型免疫記憶の形成を抑制している可能性が明らかとなった。

## 3. IgE-BCRは解糖系-PPP-プリンヌクレオチド合成de novo経路を介してフマル酸蓄積を誘導する

如何なる代謝経路がフマル酸の蓄積に重要なのかを調べるために、前述のIgH置換系を用いてIgE-BCR

を発現させた細胞において、種々の代謝阻害剤を添加してフマル酸の蓄積が解除されるのかを検討した。フマル酸はTCAサイクルの中間体として知られるとともに、解糖系の最終産物であるピルビン酸、細胞に取り込まれたL-グルタミン、脂肪酸のβ酸化により産生されたアセチルCoAがTCAサイクルの代謝燃料になりうるということが知られている。意外にも、ピルビン酸のミトコンドリア輸送阻害剤であるUK-5099、グルタミナーゼGLS阻害剤であるCB-839、脂肪酸のβ酸化阻害剤であるetomoxir、または酸化的リン酸化の阻害剤oligomycinの添加は細胞内フマル酸量を低下させなかった。しかしながら、解糖系第一段階で働くヘキソキナーゼの阻害剤2-デオキシ-D-グルコースの添加は、細胞内フマル酸量を大幅に低下させた。

次に、IgG1-BCRまたはIgE-BCRをIgH置換系により発現させたiGB細胞において、解糖系に関連する種々の代謝産物量について解析したところ、ペントースリン酸回路（PPP）中間体のPRPP、プリン代謝関連分子であるアデノシンリン酸およびsuccinyl-AMP量がIgE-BCRを発現させた細胞で高レベルに存在することを見出した。さらに、IgE-BCR発現細胞ではグルコース取り込みが亢進していた。プリンヌクレオチド合成のde novo経路は、解糖系から分岐したPPPによって支持され、その過程において、アデニロコハク酸リアーゼの触媒によりフマル酸が生成されることが知られる。そこで、IgE-BCRを発現させたiGB細胞に、PPPの阻害剤である6-aminonicotinamide、アデニロコハク酸リアーゼの阻害剤であるAICARを添加したところ、細胞内フマル酸量が減少した。以上から、IgE-BCRの発現は解糖系-PPP-プリンヌクレオチド合成de novo経路を介してフマル酸の蓄積を誘導する可能性が判明した。

実際に、レトロウイルスベクターを用いてアデニロコハク酸リアーゼ遺伝子をノックダウンしたNP特異的B細胞を、レシピエントマウスに移入し、アラムアジュバントとともにNP-CGGを免疫したところ、対照群と比較してIgE<sup>+</sup> GC B細胞数の増加が認められたことから、アデニロコハク酸リアーゼによるフマル酸生成が*in vivo*におけるIgE<sup>+</sup> GC B細胞の抑制、ひいては免疫記憶形成の抑制に重要である可能性が示唆された。

#### 4. RNAスプライシング因子Ptpb1によるPKM2の発現誘導がIgE-BCRによるフマル酸蓄積を誘導する

これまでの結果から、IgE-BCR発現細胞ではグルコース取り込みの亢進、解糖系から分岐するPPPの活性化が認められた。このIgE-BCRの発現に起因する解糖系代謝流束の変化がいかん誘導されるかを明らかにするために、解糖系に関わる遺伝子の発現を調べたところ、IgG1-BCR発現細胞に比べてIgE-BCR発現細胞で、ピルビン酸キナーゼM2アイソフォーム（PKM2）の発現が上昇していることを見出した。PKMはRNAスプライシング因子であるPtpbファミリーによる制御を受け、RNAスプライシングによりPKM1またはPKM2の発現が規定される。PKM1と比べてPKM2はピルビン酸分解活性が低いため、ガン細胞においてPKM2の優位な発現が解糖系代謝中間体の蓄積を誘導すると考えられている。さらに、PKM1とは異なりPKM2はmTORC1の活性化やc-Myc発現を副的に誘導し、PPPを含めた解糖系代謝の側鎖経路の活性化を誘導することが報告されている。そこで、IgE<sup>+</sup> B細胞におけるPKM2の機能を調べるために、活性化B細胞においてPKM2を特異的に遺伝子ノックダウンしたところ、IgE<sup>+</sup> B細胞におけるフマル酸の蓄積が解除され、IRF4の高発現が抑制された。さらに、PKM2をノックダウンしたNP特異的B細胞を、レシピエントマウスに移入し、アラムアジュバントとともにNP-CGGを免疫したところ、対照群と比較してIgE<sup>+</sup> GC B細胞数の増加が認められたことから、IgE<sup>+</sup> B細胞で高発現するPKM2はフマル酸の蓄積に寄与し、IgE型免疫記憶の形成を抑制している可能性が判明した。

次に、PKM遺伝子のRNAスプライシング因子であるPtpbファミリーの発現を解析したところ、IgG1<sup>+</sup> に比べてIgE<sup>+</sup> B細胞でPtpb1が活性化していることを見出した。Ptpb1のB細胞特異的欠損マウスを作成し、アラムアジュバントとともにNP-CGGを免疫したところ、対照群と比べてPtpb1欠損マウスでは、IgE<sup>+</sup> GC B細胞数が増加し、IgE抗体産生が長期に維持されるとともに、抗原高親和性IgE抗体を産生する形質細胞

が脾臓などに維持されることが判明した。さらに、マウスを免疫後10週間後に同一抗原NP-CGGを静脈内投与したところ、対照群に比べてPtbp1欠損マウスでは重篤な全身性アナフィラキシー反応が観察された。したがって、IgE-BCRシグナルはPtbp1の高発現を誘導し、PKM2のRNAスプライシングを誘導してフマル酸の蓄積を誘導する。このPtbp1を介したメカニズムによりIgE型免疫記憶の形成が抑制されていることが明らかとなった。

## 考察

寄生虫などに対する感染防御に有用であるが、過剰産生によりアレルギー疾患を誘導する可能性を合わせ持つIgE抗体の産生は、IgE<sup>+</sup> B細胞内の代謝機構によって厳密に制御されていることが明らかとなった。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、胚中心には維持されずに免疫記憶を形成しないというIgE<sup>+</sup> B細胞の特性は、1) IgE-BCRの発現により規定されるPtbp1-PKM2の活性化、2) その下流における解糖系-PPP-プリンヌクレオチド合成de novo経路を介したフマル酸の蓄積、3) 蓄積したフマル酸によるSTAT3-IRF4の活性化、4) IRF4によるBCL6発現誘導の抑制によって決定されることが本研究により明らかとなった。さらに、本研究において実験的に示したように、これらIgE<sup>+</sup> B細胞の特性が破綻した場合には、IgE型の免疫記憶が形成されて長期のIgE産生に至る可能性がある。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IgE<sup>+</sup> B細胞の運命を規定する細胞内代謝プログラムが変化している可能性が考えられる。また、細胞内代謝は細胞をとりまく環境因子、例えば栄養素やO<sub>2</sub>などに大きく依存することが知られており、何らかの環境因子の変化がIgE<sup>+</sup> B細胞の運命決定を制御する可能性が考えられる。