アレルギー病態惹起における長期生存型抗体産生細胞の形成機構の解明

稲嶺 絢子¹, 岡本 美孝¹, 有馬 雅史², 徳久 剛史²¹千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科教室²千葉大学大学院医学研究院分化制御教室

スギ花粉症はIgE抗体を介して誘導される季節性のI型アレルギー疾患である。スギ花粉がアレルゲンとして体内で認識されると体液性免疫応答によりスギ花粉特異的IgE抗体が誘導される。このスギ花粉特異的IgE抗体は血中や粘膜上のマスト細胞や好塩基球に結合し、さらにその抗体上にスギ花粉が結合することで、アレルギー性鼻炎などの症状が誘発される。このような発症機序に深く関与する抗原特異的IgE抗体は血清中での半減期が2-3日と他のサブクラス抗体に比べても非常に短いにも関わらず、スギ花粉症患者では花粉飛散期以外の時期においても血清中にスギ花粉特異的IgE抗体価が維持されている。この長期に渡る特異抗体維持機構は、長期生存型抗体産生 (Long-lived Plasma) 細胞が中心的な役割を担っていると考えられている。しかしながら、これらの細胞の分化経路についての詳細はまだ完全には明らかになっておらず、特にIgEクラスのLong-lived (LL)-Plasma細胞については、その存在さえも不明である。

本稿では、筆者がこれまで行ってきたLL-Plasma細胞の維持に関する研究成果を述べるとともに、現在解析進行中である抗原特異的IgE⁺ LL-Plasma細胞の分化経路とその制御機構について概説したい。

キーワード：アレルギー、花粉症、IgE、免疫記憶、長期生存型抗体産生細胞

略語：AID, activation-induced cytidine deaminase; Tfh, Follicular helper T cells; FDC, Follicular dendritic cells; LL, Long-lived; ICOS, Inducible costimulator; NP, 4-hydroxy-3-nitrophenyl; CG, Chicken gamma globulin

I. 長期生存型抗体産生細胞

A. 分化経路

これまでの報告から高親和性のLL-Plasma細胞は、脾臓やリンパ節内の胚中心を経由して分化すると考えられている (図1)¹⁻⁴⁾。この胚中心形成は、抗原免疫後7日以内から始まり、T細胞領域近傍で活性化されたB細胞の一部がCentroblastとしてFollicle内で増殖する^{5,6)}。このCentroblast内ではAIDを発現誘導することにより、抗体V領域遺伝子において高率に体細胞突然変異を起こして抗原に対する抗原親和性を変化させる⁷⁾。その後、抗原免疫後10日以内に、Centroblastは濾胞ヘルパーT (Tfh) 細胞や濾胞樹状細胞 (FDC) からの刺激によりCentrocyteに分化する^{8,9)}。CentrocyteではクラススイッチによりIgG抗体を細胞表面に発現させ、抗原に対して親和性がより高いクローンが

FDC上の抗原と選択的に反応し増殖する¹⁰⁾。この体細胞突然変異の過程で偶発的に自己と反応するようになった抗体をもつCentrocyteは、アポトーシスにより除去されると考えられている^{11,12)}。次に、この抗原を取り込んだ高親和性のCentrocyteは、Tfh細胞にその抗原を提示することにより、Tfh細胞からのヘルプを受けて、LL-Plasma細胞やメモリーB細胞へと分化する^{4,13,14)}。その後、LL-Plasma細胞は骨髄へ局在し、長期生存してIgG抗体を産生し続ける¹⁵⁾。またメモリーB細胞は、同一抗原に再感作されたときに起きる二次免疫応答において、すばやくIgG抗体を産生することにより重要な役割を果たすと考えられている^{16,17)}。

しかしながら、高親和性のCentrocyteがTfh細胞からのどのような因子を受けてLL-Plasma細胞もしくはメモリーB細胞へと分化していくのかについての詳細はまだ完全には明らかになっていない。

B. 濾胞ヘルパーT細胞とIL-21

Tfh細胞は活性化B細胞と共に胚中心に局在し、胚中心B細胞の増殖、抗原に対する親和性の成熟および抗体産生を促進させる重要な役割を担っている¹³⁾。Tfh細胞はCXCR5の発現上昇によりB細胞領域にある胚中心に入り、

2011年8月29日受稿
別冊請求先：稲嶺絢子
〒260-8670 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1
千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科教室
TEL: 043-226-2137, FAX: 043-226-3442
E-mail: ainamine@faculty.chiba-u.jp

図1 高親和性 LL-Plasma 細胞細胞への分化経路。ナイーブ B 細胞は抗原刺激を受けると、その後胚中心を形成し、体細胞突然変異により抗原に対する高い親和性を獲得し、メモリー B 細胞もしくはこのような分化過程を経て、炎症局所および一部脾臓、また主に骨髄へ移行し LL-Plasma 細胞へと分化する。

Inducible costimulator (ICOS) などの補助刺激分子およびサイトカイン産生を介して胚中心 B 細胞と相互作用することにより補助機能を発揮する^{13,18)}。このような Tfh 細胞への分化にはナイーブ B 細胞から胚中心 B 細胞への分化と同様にナイーブ T 細胞においても転写因子である Bcl6 の発現上昇が必須である¹⁹⁻²¹⁾。

IL-21 受容体 (IL-21R) は、T 細胞、B 細胞、および NK 細胞に発現するサイトカインレセプターとして同定され、そのリガンドである IL-21 は主に活性化 CD4⁺ T 細胞や NKT 細胞に発現が認められている²²⁾。また、IL-21 は活性化 CD4⁺ T 細胞の中でも Tfh 細胞および Th17 細胞から強く産生され²²⁾、活性化 CD4⁺ T 細胞の分化、活性化及び増殖への作用²³⁾ および B 細胞の形質細胞への分化の促進作用が報告されている²⁴⁻²⁶⁾。

C. IL-21 と長期生存型抗体産生細胞分化

筆者らは、IL-21 が胚中心に局在する Tfh 細胞から大量に産生されることから、胚中心 B 細胞の最終分化に重要な役割を果たしている可能性があると考え、IL-21 における LL-Plasma 細胞分化への関与について着目し、詳細に解析を行った。

IL-21 が *in vivo* において LL-Plasma 細胞への分化に重要な役割をはたしているかどうかを調べる目的で、4-hydroxy-3-nitrophenyl (NP) ハプテンを Chicken Gamma Globulin (CG) に結合させた NP-CG 抗原を用いて C57BL/6 マウスに免疫し、一次免疫応答において産生される NP 抗原特異的な各 B 細胞サブセット上の IL-21R の発現量について検討した。

その結果、IL-21R はナイーブ B 細胞に比べて胚中心 B

細胞上で発現の上昇が認められ、さらに LL-Plasma 細胞への次の分化段階にある Pre-plasma blast 細胞においては胚中心 B 細胞に比べてより発現が上昇していた。LL-Plasma 細胞への後期の分化段階にある plasma blast 細胞では、Pre-plasma blast 細胞に比べて発現が顕著に減少し、骨髄に局在している Plasma 細胞においては発現を消失していた (図2)。この結果から、IL-21R 刺激は胚中心 B 細胞および Pre-plasma 細胞の段階において、その後の分化に強く影響を及ぼす可能性が示唆された。

そこで、筆者らは IL-21R 欠損 (IL-21R-KO) マウスを NP-CG 抗原と Alum を用いて免疫して、血清中の高親和性の抗原特異的 IgG1 抗体価を経時的に解析した。その結果、野生型 (WT) マウスでは抗原特異的 IgG1 抗体価が免疫後 80 日目においても維持されているのにも関わらず、IL-21R-KO では抗体価が 10 日目をピークに顕著に減少した。また、免疫後 80 日目の骨髄中の抗原特異的 IgG1 産生細胞数においても同様に、WT マウスでは検出されたが、IL-21R-KO マウスではほとんど検出されなかった。さらに、IL-21 が胚中心反応において産生される plasma blast 細胞の分化成熟に重要な役割を果たしているかどうかを解析する目的で、WT マウスおよび IL-21R-KO マウスにおける免疫 10 日目の抗原特異的な plasma blast 細胞の産生頻度を測定すると、Pre-plasma blast 細胞および plasma blast 細胞は共に減少しており、特に plasma blast 細胞が顕著に減少していた。これらの結果から、IL-21 が抗原特異的 IgG1⁺ LL-Plasma 細胞の分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

さらに、*in vitro* において IL-4 と抗 CD40 抗体等を用い

図2 NP抗原特異的なB細胞サブセット上のIL-21Rの発現。C57BL/6マウスにNP-CGで免疫し、NP抗原特異的な各B細胞サブセット上のIL-21Rの発現量について検討した。IL-21RはナイーブB細胞に比べて胚中心B細胞において発現が上昇し、Pre-plasma blast細胞ではより顕著に発現が上昇していた。その一方でplasma blast細胞では、逆に発現が減少しており、骨髄中のPlasma細胞においては発現が消失していた。

て3日間活性化させた脾臓B細胞をさらにIL-21のみで刺激して3日後に正常マウスに移植すると、IgG1⁺ LL-Plasma細胞への分化が誘導できるが、IL-21R-KOマウス由来の脾臓B細胞では誘導できなかった。

以上のことから、胚中心B細胞だけでなく活性化B細胞がIL-21刺激を受けることによりLL-Plasma細胞が分化誘導されることが明らかとなった(論文投稿準備中)。

II. 長期生存型高親和性IgE⁺抗体産生細胞の分化経路

A. アレルギー疾患とIgE⁺抗体産生細胞

前述の通り、スギ花粉症はIgE抗体を介して誘導される季節性アレルギー疾患である。スギ花粉に特異的IgE抗体は血清中での半減期が非常に短いにも関わらず、スギ花粉症患者では花粉飛散期以外の時期においても血清中にスギ花粉特異的IgE抗体価が維持されている²⁷⁾。そのため、アレルゲン感作成立後(予備軍)およびアレルギー患者では高親和性IgE抗体を産生するLL-Plasma細胞が優先的に分化誘導されており、その後IgE⁺ LL-Plasma細胞が長期に渡り維持されることはアレルギー疾患の病因の一つになりうるのではないかと推察した²⁸⁾。しかしながら、IgE⁺ LL-Plasma細胞の産生経路については未だ詳細には解析されておらず、非常に不明な点が多い。

これまでのIgE⁺ Plasma細胞に関する報告によると、副鼻腔炎患者の鼻茸でIgEを産生するPlasma細胞が多数検出されたが、末梢血単核球(PBMC)からはIgE産生Plasma細胞(前駆細胞も含めて)は検出できなかった^{29,30)}。さらに、筆者らは正常マウスを用いたアレルギー性鼻炎モデルマウスにおいて抗原特異的IgE⁺ Plasma細胞の局在を検討したところ、鼻炎発症時の局所リンパ節では抗原特異的IgE⁺ Plasma細胞が検出されたが、骨髄中にはIgE⁺ Plasma細胞がほとんど認められなかった。このことから、IgE⁺ LL-Plasma細胞はこれまでに報告されているIgG1⁺ LL-Plasma

図3 高親和性IgE⁺ LL-Plasma細胞産生経路における疑問点。胚中心の形成維持に必須であるBcl-6はIgEへのクラススイッチを阻害するためIgE⁺細胞への分化は胚中心外で誘導される。さらには、LL-Plasma細胞への分化に重要なIL-21もIgEへのクラススイッチを阻害するため、高親和性のIgE⁺ LL-Plasma細胞の産生経路には不明な点が多い。

図4 高親和性 IgE⁺ LL-Plasma 細胞の産生経路モデル。IL-21 は GC 内における B 細胞の終末分化機構において、高親和性 B 細胞への分化、さらには Pre-plasma blast 細胞および plasma blast 細胞への分化に必須である。

細胞の分化経路とは異なった経路を経て産生されている可能性が示唆された。

B. IgE⁺ 長期生存型高親和性抗体産生細胞の分化経路の解明

これまでの報告から、ナイーブ B 細胞から IgE⁺ 細胞への分化は、胚中心の外で起こると考えられている³¹⁾。胚中心の形成維持に必須である Bcl-6 は IgE へのクラススイッチを阻害すること³²⁾、また組織学的な解析から、胚中心応答時において IgE⁺ 細胞は胚中心外に局在しているという事も報告されている³¹⁾。さらには、LL-Plasma 細胞への分化に重要な IL-21 も IgE へのクラススイッチを阻害するため^{33,34)}、どのような経路をたどって IgE⁺ 細胞は高親和性の LL-Plasma 細胞へと分化できるのかについては依然不明のままである (図3)。

そこで、筆者らは先述した *in vitro* の LL-Plasma 細胞分化誘導系を用いて、IgG1⁺ 細胞と同様に IgE⁺ 細胞についても LL-Plasma 細胞へと分化誘導できるかどうかについての検討を行った。WT 由来の脾臓中のナイーブ B 細胞を IL-4 と抗 CD40 抗体等を用いて 3 日間活性化させた後に IgE⁺ 細胞を分離し、IL-21 を添加した培地で 3 日培養した。その結果、IL-21 を添加すると IgG1⁺ 細胞と同様に、IgE⁺ 細胞においても Plasma 細胞への分化が促進されていた (論文投稿準備中)。

現在、IgE にクラススイッチした活性化 B 細胞が IL-21 の刺激を受けて IgE 抗体産生 LL-Plasma 細胞に分化する場を詳細に解析している (図4)。

このような研究成果から、その分化を阻害することにより IgE をターゲットにしたアレルギー性鼻炎に対する新たな根治免疫療法が確立できると考えられる。

III. おわりに

IgE 抗体を介して病態が惹起される気管支喘息やアレルギー性鼻炎などの新しい治療戦略として抗 IgE 抗体療法が期待され、各臨床試験におけるその有効性についても高く評価されている。その一方で、アレルゲン感作後の抗原特異的 IgE 陽性細胞の分化経路や感作発症後の長期に及ぶ抗原特異的 IgE 抗体価の維持機構についての詳細は明らかになっていない。今後、この研究において、これまでの長期生存型抗体産生細胞の維持に関する研究と IgE 産生 Plasma 細胞に関する研究成果を踏まえ、抗原免疫後に誘導される抗原特異的長期生存型 IgE 産生細胞の分化経路および IgE Plasma 細胞の局在を明らかにし、長期生存型 IgE 産生細胞を直接抑制する新しい抗原特異的免疫療法の確立を目指していきたい。

本研究は文部科学省科学研究費 (若手 B) の助成および千葉大学グローバル COE プログラム「免疫システム統御治療学の国際教育研究拠点」のサポートを受けて行いました。

文 献

- 1) Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996; 381(6585): 751–8.
- 2) Oracki SA, Walker JA, et al. Plasma cell development and survival. *Immunol Rev*. 2010; 237(1): 140–59.
- 3) Radbruch A, Muehlinghaus G, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(10): 741–50.
- 4) Nutt SL, Tarlinton DM. Give and take in the germinal center. *Nat*

- Immunol. 2010 11(6): 464–6.
- 5) Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*. 1999; 286(5447): 2098–102.
- 6) Garside P, Ingulli E, et al. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science*. 1998; 281(5373): 96–9.
- 7) Martin A, Bardwell PD, et al. Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature*. 2002; 415(6873): 802–6.
- 8) Allen CD, Ansel KM, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol*. 2004; 5(9): 943–52.
- 9) Yoshida N, Kitayama D, et al. CXCR4 expression on activated B cells is downregulated by CD63 and IL-21. *J Immunol*. 2011; 186(5): 2800–8.
- 10) MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*. 1994; 12: 117–39.
- 11) Kelsoe G. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity*. 1996; 4(2): 107–11.
- 12) Takahashi Y, Ohta H, et al. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity*. 2001; 14(2): 181–92.
- 13) Nutt SL, Tarlinton DM. Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol*. 2011; 12(6): 472–7.
- 14) Good-Jacobson KL, Szumilas CG, et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*. 2010; 11(6): 535–42.
- 15) Manz RA, Thiel A, et al. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*. 1997; 388(6638): 133–4.
- 16) Tarlinton D. B-cell memory: are subsets necessary? *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(10): 785–90.
- 17) Good-Jacobson KL, Shlomchik MJ. Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J Immunol*. 2010; 185(6): 3117–25.
- 18) Inamine A, Takahashi Y, et al. Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *Int Immunol*. 2005; 17(5): 581–9.
- 19) Yu D, Rao S, et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*. 2009; 31(3): 457–68.
- 20) Choi YS, Kageyama R, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*. 2011; 34(6): 932–46.
- 21) Kitano M, Moriyama S, et al. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity*. 2011; 34(6): 961–72.
- 22) Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(9): 688–98.
- 23) Nurieva RI, Chung Y, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*. 2008; 29(1): 138–49.
- 24) Ozaki K, Spolski R, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science*. 2002; 298(5598): 1630–4.
- 25) Ozaki K, Spolski R, et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol*. 2004; 173(9): 5361–71.
- 26) Kuchen S, Robbins R, et al. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J Immunol*. 2007; 179(9): 5886–96.
- 27) Horiguchi S, Tanaka Y, et al. Seasonal changes in antigen-specific T-helper clone sizes in patients with Japanese cedar pollinosis: a 2-year study. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38(3): 405–12.
- 28) Luger EO, Wegmann M, et al. Allergy for a lifetime? *Allergol Int*. 2010; 59(1): 1–8.
- 29) Bachert C, Gevaert P, et al. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107(4): 607–14.
- 30) Van Zele T, Gevaert P, et al. Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens. *Clin Exp Allergy*. 2007; 37(12): 1840–7.
- 31) Erazo A, Kutchukhidze N, et al. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity*. 2007; 26(2): 191–203.
- 32) Saito T, Kitayama D, et al. Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation. *Immunobiology*. 2008; 213(7): 545–55.
- 33) Harada M, Magara-Koyanagi K, et al. IL-21-induced Bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J Exp Med*. 2006; 203(13): 2929–37.
- 34) Hiromura Y, Kishida T, et al. IL-21 administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis. *J Immunol*. 2007; 179(10): 7157–65.

The maintenance of the IgE antibody secreting cells

Ayako Inamine¹, Yoshitaka Okamoto¹, Masashi Arima², Takeshi Tokuhisa²

¹Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery (J2), Graduate School of Medicine, Chiba University

²Department of Developmental Genetics (H2), Graduate School of Medicine, Chiba University

ABSTRACT

In seasonal allergy (such as Japanese cedar pollinosis), pollen specific IgE Ab production has been persistent even in the absent season of allergens. Since long-lived plasma cells (LL-PCs) in bone marrow (BM) are important for the maintenance of serum Ab titers, the persistent production of IgE Abs in Allergic patients may be due to IgE-LL-PCs in BM. However, IgE-LL-PCs in murine BMs have never been detected. Moreover, high concentration of IgE Abs was detected in serum of nasal polyposis patients and IgE-PCs were accumulated in the nasal polyposis tissue.

In this study, we investigated the mechanism of IgE-LL-PCs generation using IL-21R-KO mice which have high concentration of serum IgE titers. When the number of IgE-PCs was examined in IL-21R-KO mice by ELISPOT assay, no IgE-PCs were detected in BM, despite of the high serum IgE concentration. Then, we have established the culture system to generate LL-PCs from naive B cells using IL-21, and those IgE-PCs were transferred into mice to examine the generation of IgE-LL-PCs in BMs.

Since LL-PCs are derived from germinal center (GC) B cells was impaired in IL-21R-KO mice, we will discuss the role of IL-21 in the generation of LL-PCs including IgE-LL-PCs.

These results suggested that IgE-LL-PCs would provide a new target for immunotherapy in Allergic diseases.

Key words: allergy, polynosis, IgE, immunological memory, Long-lived plasma cells