

## B細胞の活性化応答における Bach2 の役割

武藤 哲彦

### 1. はじめに

液性免疫応答においてBリンパ球（B細胞）は抗原刺激により抗体の産生および分泌を担う形質細胞へ分化し、分泌された抗原特異的な抗体が抗原を排除する。このB細胞の活性化応答で、転写因子Bach2（BTB and CNC homology 2）は細胞運命を決定する役割を担う。Bach2は転写因子MafKとヘテロ二量体を形成して、MARE（Maf recognition element）というDNA配列に特異的に結合する転写因子として、Bach1とともに同定された。当初からB細胞においてBach2が高発現することが見いだされており、Bach2の生理的な役割およびBach2の活性制御は、主にB細胞を用いた研究によって解明されてきた。近年、B細胞の他にT細胞およびマクロファージによる細胞性免疫応答でのBach2の役割が解明され、液性と細胞性の両方の免疫応答における重要性が示されている。さらに、骨髄では造血幹細胞からB細胞へ系列分化する初期分化の過程での細胞運命決定を調節することから、当初の予想よりもはるかに広範囲で活躍する転写因子であった。本稿では、Bach2研究を牽引してきたB細胞の活性化応答におけるBach2の役割とBach2の活性を制御する機構について紹介したい。

### 2. B細胞分化とBach2の発現パターン

B細胞は骨髄で造血幹細胞から系列分化する。幼若なB細胞分化段階では、抗体遺伝子の再構成を成功させたB細胞が生存権を得る。B細胞は脾臓へ移動して成熟し、その後、脾臓およびリンパ節などの二次リンパ組織において免疫応答に備える。抗原刺激を受けたB細胞は、抗体分泌に特化した形質細胞もしくは二次免疫応答を担う記憶B細胞へ分化する。Bach2の発現は造血幹細胞より検出され、B細胞系列に分化したのちpre-B細胞で急上昇し、成熟B細胞

胞まで維持され、形質細胞への分化過程で低下する<sup>1)</sup>。また、記憶B細胞でBach2は低く発現する<sup>2)</sup>。

### 3. B細胞でのBach2による分化制御

二次リンパ組織内の成熟B細胞は、組織内局在や抗原応答性などの違いから、辺縁帯B細胞（marginal zone B cell：MZB）と濾胞B細胞（follicular zone B cell：FOB）に分類される。FOBは抗原で活性化されると盛んに細胞増殖し、T細胞や樹状細胞などとともに胚中心（germinal center：GC）という微小環境を形成する。Bach2の発現はGC B細胞への分化過程で上昇する<sup>3)</sup>。GCでの免疫応答（GC応答）でB細胞は、抗体のアイソタイプをIgMからIgGなどへ変換するクラススイッチDNA組換え（class switch recombination：CSR）と抗体遺伝子の可変部をコードする領域に変異を導入して抗体の高親和性化を目指す反応である体細胞超変異（somatic hypermutation：SHM）を実行する。両者とも特異的酵素AIDが抗体遺伝子へ変異を導入することがきっかけとなる。したがって、B細胞は、形質細胞分化、記憶B細胞分化、またはCSRとSHMの実施という三つの選択肢から細胞運命を選ぶ（図1）。運命決定に関わる主要な外的要因は、抗体の抗原との親和性である。具体的には、高親和性の抗体を持つB細胞は形質細胞へ分化し、低親和性抗体のB細胞は記憶B細胞へ分化し、中庸なものはSHMを再度実行する<sup>4)</sup>。一方、内的要因の一つとして転写因子Bach2がCSR実施の運命決定に寄与する機構を我々は解明してきた。そこでわかったことは、転写抑制因子であるBach2は細胞系列特異的の遺伝子を活性化して運命を選択するのではなく、他の細胞運命を抑制して特定の細胞運命を逆説的に規定するというメカニズムである。

抗原刺激前のB細胞（ナイーブB細胞）の性質は転写因子Pax5によって維持される。形質細胞分化過程では、マスター制御転写因子のBlimp-1の遺伝子発現がIRF4などによって誘導され、Blimp-1はPax5遺伝子発現を抑制して分化の逆行を防ぐ。CSRを実施する細胞では、AID遺伝子（*Aicda*）の発現がPax5とGC応答をつかさどる転写因子群により抗原刺激に応答して誘導される。ところが、同じく抗原刺激で誘導されるBlimp-1は*Aicda*を直接転写抑制する。これを回避するため、CSRを実施する細胞に発現したBach2は*Blimp-1*遺伝子（*Prdm1*）の発現を直接抑制し、形

東北大学大学院医学系研究科生物化学分野（〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町2-1）

#### The roles of Bach2 in activated B cell responses

Akihiko Muto (Department of Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890925

© 2017 公益社団法人日本生化学会

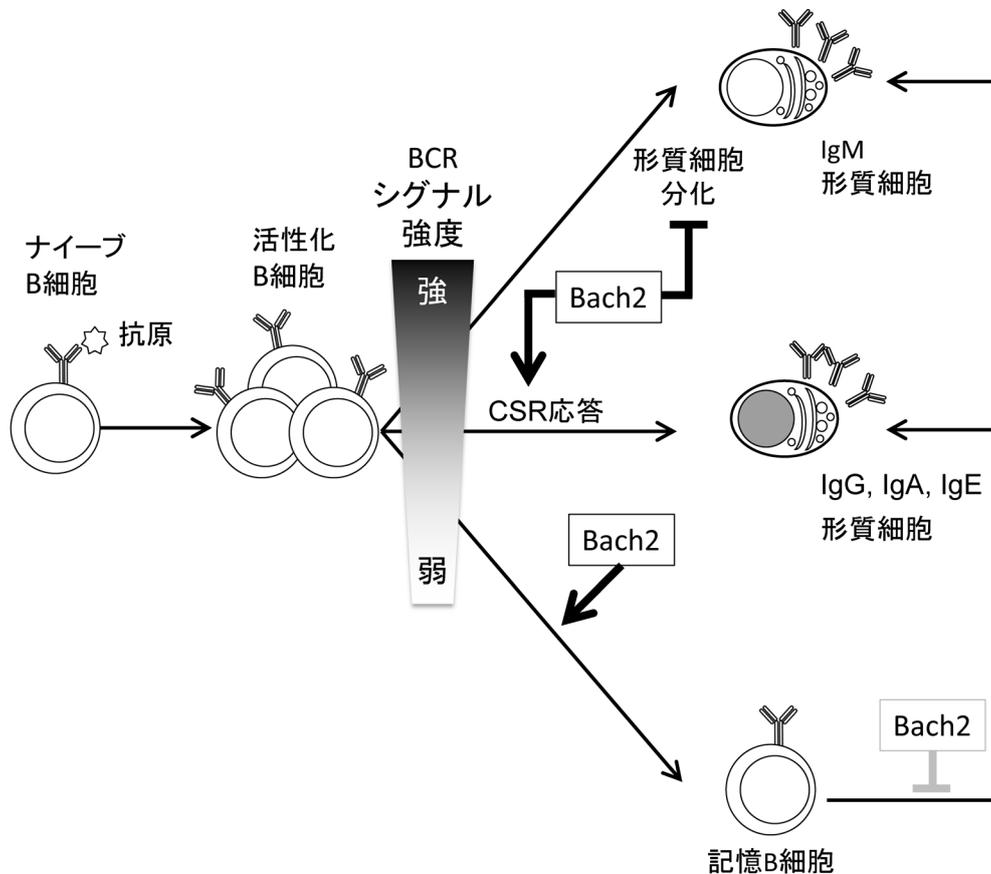


図1 活性化B細胞におけるBach2の役割

ナイーブB細胞は抗原で活性化されると細胞増殖し、IgM抗体を分泌する形質細胞に分化する。一部のB細胞はCSR応答を経てIgG、IgAもしくはIgEを分泌する形質細胞へ分化する。細胞運命決定はB細胞受容体（BCR）シグナルの強さに影響される。BCRシグナルの比較的弱い細胞は記憶B細胞へ分化する。Bach2は形質細胞分化を抑制してCSR細胞分化を促す。また、記憶B細胞への分化にBach2は必要である。二次免疫応答でナイーブB細胞よりも記憶B細胞から形質細胞へ分化しやすい理由は、記憶B細胞の方がナイーブB細胞よりもBach2の抑制作用が弱いからである。

質細胞分化を一時的に抑制することが、CSRの実施に必須の遺伝子制御である。このことを我々は以下のようなマウス遺伝学を用いて明らかにしてきた。Bach2ノックアウト(KO)マウスでは、AIDの発現が誘導されずCSRとSHMは実施されない<sup>5)</sup>。一方で、刺激依存的な形質細胞分化は亢進する。Bach2とBlimp-1を両方ノックアウトしたダブルKOマウスを作成したところAIDの発現誘導が回復し、CSR障害が起こらなかった<sup>6)</sup>。また、Bach2は記憶B細胞への分化にも必須であり、Bach2KOマウスでは記憶B細胞分化が障害される。ただし、このときBach2による*Prdm1*の抑制を必要としない<sup>4)</sup>。さらに、記憶B細胞は抗原刺激で形質細胞へ分化する頻度がナイーブB細胞に比べて圧倒的に高い。これはナイーブB細胞に比べて記憶B細胞でのBach2の発現が低く、形質細胞分化への抑制作用が弱いと考えられる<sup>2)</sup>。これらの結果から、Bach2はB細胞の活性化応答で、個々のB細胞が細胞運命を決定するのに必須の因子であるといえる。

#### 4. T細胞におけるBach2の役割

形質細胞分化とCSR応答との間でみられる、他の応答を抑制することで特定の細胞状態を規定するというBach2の運命決定機構は、T細胞にも見いだされるので一部を紹介したい。T細胞はCD8陽性T細胞とCD4陽性T細胞に大別される。いずれもナイーブT細胞は抗原で活性化されるとエフェクター細胞へ分化し、その一部が記憶T細胞へ分化する。エフェクターCD4陽性T細胞には産生するサイトカインの違いからTh1, Th2, Th17というヘルパーT細胞のサブセットがある一方、炎症反応の沈静化など免疫反応の抑制に寄与する制御性T細胞(Treg細胞)がある。Bach2KOマウスでは、Th2細胞作用が亢進するという複数の報告がある一方で、制御性T細胞分化の障害が見いだされる<sup>7-10)</sup>。Bach2がCD4陽性ナイーブT細胞状態を維持しエフェクターT細胞もしくはエフェクター記憶T細胞への分化を抑制することで、過度の炎症反応が致命的になる

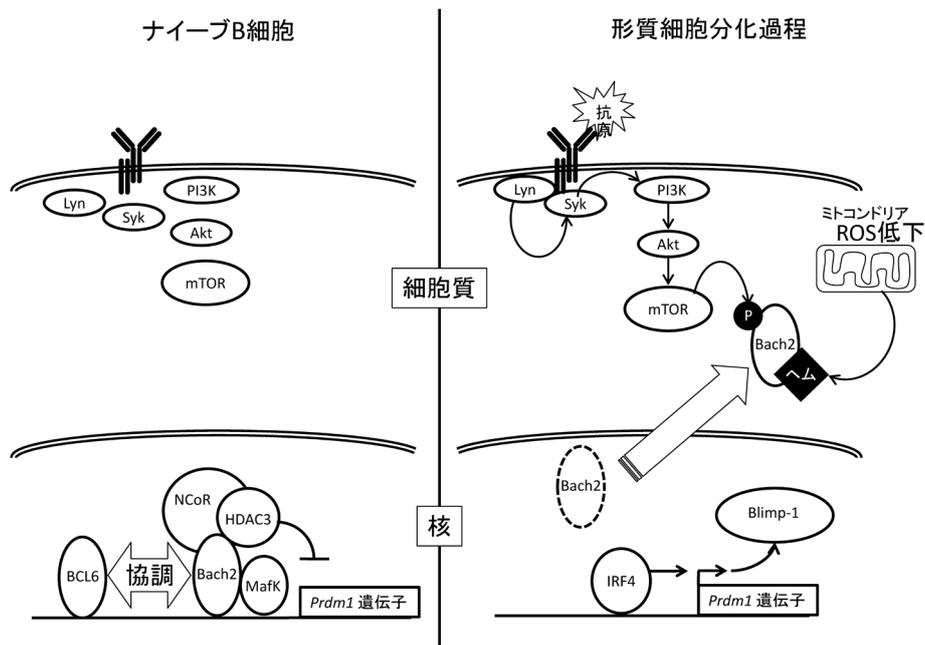


図2 Bach2による転写調節とBach2の活性制御

ナイーブB細胞ではBach2はNCoR複合体を形成し、*Blimp-1* 遺伝子 (*Prdm1*) にHDAC3をリクルートすることで、エピジェネティック制御により転写抑制する。転写抑制因子BCL6と協調関係にある。一方、形質細胞分化過程では強いBCRシグナルでBach2タンパク質はBCRシグナルの下流でリン酸化されて核外に排出される。ヘムはBach2に直接結合しDNA結合能を阻害する。その結果、*Blimp-1*の発現が活性化し形質細胞へ分化する。

ことを防ぐ恒常性維持の役割が提唱されている。Bach2が制御性T細胞分化を促進するときに、Th2分化を抑制することが必要な可能性がある。一方、CD8陽性T細胞ではBach2がエフェクター細胞への分化を抑制することが<sup>8</sup>、記憶T細胞への分化に必要である<sup>11</sup>。

## 5. Bach2による転写制御に関与する因子

Bach2による*Prdm1*の転写抑制は、CSR応答だけでなくGC B細胞への分化やT細胞の分化調節においても重要である。Bach2はエピジェネティック制御因子および、他の転写因子と協力して*Prdm1*の転写を抑制する(図2)。マウスB細胞株からBach2複合体構成タンパク質を精製後に質量分析した結果、転写抑制共役因子(コリプレッサー)NCoR1とNCoR2および、その複合体因子のヒストン脱アセチル化酵素HDAC3が同定された<sup>12</sup>。Bach2KO B細胞では*Prdm1*のBach2結合領域周囲のヒストンH3の9番目のリシン残基のアセチル化(H3K9Ac)が上昇する。B細胞株に比べBach2を発現しない形質細胞株では、H3K9Acが高く、逆にH3K9のメチル化修飾は低い。したがって、Bach2はHDAC3を*Prdm1*にリクルートし、結合領域周辺で転写活性化に寄与するヒストンアセチル化修飾を除去して*Prdm1*の発現を抑制する。それに加えて、他の転写因子との協調的な転写制御が解明されてきた。Bach2と転写抑

制因子BCL6は、GC形成に必須の転写因子であり、*Prdm1*の転写を抑制する。このとき、Bach2とBCL6は直接相互作用して遺伝子座へのリクルートを相互に強め、協調的に転写を抑制する<sup>3</sup>。また、BCL6にはBach2遺伝子の発現を誘導する作用およびBach2タンパク質を安定化する作用もある。ChIP-seq法でBach2とBCL6の直接標的遺伝子が網羅的に解析された結果、Bach2の標的遺伝子のうち約6割がBCL6と共通であり、Bach2の結合ピークの約3割はBCL6の結合ピークと一致した。したがって、Bach2とBCL6はその役割を完全に補完はできないものの、GC形成や形質細胞分化抑制では協調すると考えられる。

## 6. Bach2の活性制御機構

Bach2の活性制御では、リン酸化およびヘムの結合による機構が解明されてきた。膜結合型の抗体を中心としたB細胞受容体(B cell receptor: BCR)の下流でPI3キナーゼ(PI3K)シグナルが強い細胞は形質細胞へ分化し、相対的に弱い細胞はCSRを実施する。一方、PI3K-Akt-mTORシグナル経路の下流でBach2がリン酸化されることは、マウスB細胞においてシグナル分子の阻害剤を用いた解析で示されてきた(図2)<sup>2,13</sup>。Bach2は細胞質と核の間を移動するが、マウスBach2でリン酸化される72か所のアミノ酸のうち535番目のセリンをアラニンに置換した変異Bach2は

主に核内へ集積した<sup>13)</sup>。このことから、BCRシグナルの強い細胞では、リン酸化されたBach2が核外へ排出されて転写因子として不活性化されるため、*Prdm1*転写抑制が解除され、形質細胞へ分化を開始すると考えられる。特筆すべきは、*Bach2*遺伝子の発現自体もPI3Kシグナルの下流のFoxo1の不活化で抑制されるため<sup>2,13)</sup>、Bach2は二系統で制御されている。

ヘムは、酸素運搬（ヘモグロビン）や電子伝達（呼吸鎖）など生体に必須の因子である。マウス脾臓B細胞の初代培養系にヘムを添加するとBlimp-1発現形質細胞の出現頻度が上昇し、逆にCSRを実行する細胞の出現頻度が低下する<sup>14)</sup>。Bach2KO B細胞では、このヘムの効果がみられない。Bach2はヘムが直接結合するCP（システイン-プロリン）モチーフを5か所持つ。ヘムがBach2タンパク質に直接結合することがBach2組換えタンパク質によるヘム滴定実験で示された。ヘムはBach2に結合することで、Bach2のDNA結合活性を阻害し、タンパク質の分解を促進する。すなわち、ヘムはBach2を不活性化して形質細胞分化を促進すると考えられる。生理的に活性化B細胞でのヘム合成系は、ミトコンドリアの発生する活性酸素種（reactive oxygen species：ROS）の影響を受ける。ミトコンドリアROSはヘム合成系の最終段階を阻害し、細胞内のヘム量を低下させる。活性化B細胞はミトコンドリア量と膜電位に基づいて分画すると、両者の増加したB細胞（ミトコンドリアHi B細胞）ではCSRを実行するB細胞の出現頻度が高く、両者が減少したB細胞（ミトコンドリアLo B細胞）では形質細胞の出現頻度が高い<sup>15)</sup>。つまり、ミトコンドリアHi B細胞ではヘム合成が阻害されBach2の活性が維持される。一方、ミトコンドリアLo B細胞ではヘムが合成され、その結果、Bach2が不活性化されて形質細胞へ分化しやすいと考えられる（図2）。リン酸化修飾とヘム結合は両方ともBach2の活性を抑制するが、これらの制御の連携は興味深い課題である。

## 7. おわりに

最近、ヒトBACH2変異が要因の免疫不全の症例が初めて報告された<sup>16)</sup>。このBACH2変異はアミノ酸置換を伴い、ハプロ不全で症状が現れる。これは、細胞内Bach2タンパク質量は適切に保たれる必要があるというマウスでの知見と矛盾しない<sup>6)</sup>。そして、患者のB細胞ではヒトBLIMP1の発現が亢進しており、CSRに障害があるためIgG産生形質細胞が著減する。また、記憶B細胞分化が障害される。アミノ酸置換変異したBACH2タンパク質の性質を組換えタンパク質で調べると安定性が低下し凝集しやすいことから、変異アレルから発現するタンパク質は正常に機能しないと考えられる。さらに、T細胞の異常とし

て、制御性T細胞数が減少して腸炎を発症する。これらの症状は基礎研究によって得られてきた結果に一致する部分が多いことから、基礎研究が治療戦略の開発に貢献できることを願う。

## 文 献

- 1) Itoh-Nakadai, A., Matsumoto, M., Kato, H., Sasaki, J., Uehara, Y., Sato, Y., Ebina-Shibuya, R., Morooka, M., Funayama, R., Nakayama, K., Ochiai, K., Muto, A., & Igarashi, K. (2017) *Cell Reports*, **18**, 2401-2414.
- 2) Kometani, K., Nakagawa, R., Shinnakasu, R., Kaji, T., Rybouchkin, A., Moriyama, S., Furukawa, K., Koseki, H., Takemori, T., & Kurosaki, T. (2013) *Immunity*, **39**, 136-147.
- 3) Huang, C., Geng, H., Boss, I., Wang, L., & Melnick, A. (2014) *Blood*, **123**, 1012-1020.
- 4) Shinnakasu, R., Inoue, T., Kometani, K., Moriyama, S., Adachi, Y., Nakayama, M., Takahashi, Y., Fukuyama, H., Okada, T., & Kurosaki, T. (2016) *Nat. Immunol.*, **17**, 861-869.
- 5) Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., Yamamoto, M., & Igarashi, K. (2004) *Nature*, **429**, 566-571.
- 6) Muto, A., Ochiai, K., Kimura, Y., Itoh-Nakadai, A., Calame, K.L., Ikebe, D., Tashiro, S., & Igarashi, K. (2010) *EMBO J.*, **29**, 4048-4061.
- 7) Tsukumo, S., Unno, M., Muto, A., Takeuchi, A., Kometani, K., Kurosaki, T., Igarashi, K., & Saito, T. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 10735-10740.
- 8) Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C.A., Bonelli, M., Sciumè, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., Yu, Z., Liu, H., Takahashi, H., Rao, M., Muranski, P., Crompton, J.G., Punksosy, G., Bedognetti, D., Wang, E., Hoffmann, V., Rivera, J., Marincola, F.M., Nakamura, A., Sartorelli, V., Kanno, Y., Gattinoni, L., Muto, A., Igarashi, K., O'Shea, J.J., & Restifo, N.P. (2013) *Nature*, **498**, 506-510.
- 9) Kim, E.H., Gasper, D.J., Lee, S.H., Plisch, E.H., Svaren, J., & Suresh, M. (2014) *J. Immunol.*, **192**, 985-995.
- 10) Kuwahara, M., Ise, W., Ochi, M., Suzuki, J., Kometani, K., Maruyama, S., Izumoto, M., Matsumoto, A., Takemori, N., Takemori, A., Shinoda, K., Nakayama, T., Ohara, O., Yasukawa, M., Sawasaki, T., Kurosaki, T., & Yamashita, M. (2016) *Nat. Commun.*, **7**, 12596.
- 11) Roychoudhuri, R., Clever, D., Li, P., Wakabayashi, Y., Quinn, K.M., Klebanoff, C.A., Ji, Y., Sukumar, M., Eil, R.L., Yu, Z., Spolski, R., Palmer, D.C., Pan, J.H., Patel, S.J., Macallan, D.C., Fabozzi, G., Shih, H.Y., Kanno, Y., Muto, A., Zhu, J., Gattinoni, L., O'Shea, J.J., Okkenhaug, K., Igarashi, K., Leonard, W.J., & Restifo, N.P. (2016) *Nat. Immunol.*, **17**, 851-860.
- 12) Tanaka, H., Muto, A., Shima, H., Katoh, Y., Sax, N., Tajima, S., Brydun, A., Ikura, T., Yoshizawa, N., Masai, H., Hoshikawa, Y., Noda, T., Nio, M., Ochiai, K., & Igarashi, K. (2016) *J. Biol. Chem.*, **291**, 6316-6330.
- 13) Ando, R., Shima, H., Tamahara, T., Sato, Y., Watanabe-Matsui, M., Kato, H., Sax, N., Motohashi, H., Taguchi, K., Yamamoto, M., Nio, M., Maeda, T., Ochiai, K., Muto, A., & Igarashi, K. (2016) *J. Biol. Chem.*, **291**, 1826-1840.
- 14) Watanabe-Matsui, M., Muto, A., Matsui, T., Itoh-Nakadai, A.,

- Nakajima, O., Murayama, K., Yamamoto, M., Ikeda-Saito, M., & Igarashi, K. (2011) *Blood*, **117**, 5438–5448.
- 15) Jang, K.J., Mano, H., Aoki, K., Hayashi, T., Muto, A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, S.L., Igarashi, K., Shimizu, A., & Sugai, M. (2015) *Nat. Commun.*, **6**, 6750.
- 16) Afzali, B., Grönholm, J., Vandrovicova, J., O'Brien, C., Sun, H.W., Vanderleyden, I., Davis, F.P., Khoder, A., Zhang, Y., Hegazy, A.N., Villarino, A.V., Palmer, I.W., Kaufman, J., Watts, N.R., Kazemian, M., Kamenyeva, O., Keith, J., Sayed, A., Kasperaviciute, D., Mueller, M., Hughes, J.D., Fuss, I.J., Sadiyah, M.F., Montgomery-Recht, K., McElwee, J., Restifo, N.P., Strober, W., Linterman, M.A., Wingfield, P.T., Uhlig, H.H., Roychoudhuri, R., Aitman, T.J., Kelleher, P., Lenardo, M.J., O'Shea, J.J., Cooper, N., & Laurence, A.D.J. (2017) *Nat. Immunol.*, **18**, 813–823.

## 著者寸描

### ●武藤 哲彦 (むとう あきひこ)

東北大学大学院医学系研究科生物化学分野准教授。博士（医学）。

■略歴 1996年筑波大学第二学群生物学類卒業。筑波大学医学研究科医科学専攻修士取得。筑波大学人間総合科学研究科分子情報・生体制御医学専攻博士取得。広島大学大学医歯薬学総合研究科を経て、2009年より現職。

■研究テーマと抱負 臓器を形成しない獲得免疫系が全体としては絶妙に調節されることに魅了されます。転写因子Bach2の研究ではB細胞での機能が先行して解明されてきましたが、T細胞やマクロファージにも必要な因子であり、興味はつきません。

■趣味 映画鑑賞。愛犬と過ごすこと。