

## 論文の内容の要旨

論文題目 新規ホスホリパーゼ C(PLC)様蛋白 PLC-L2 の B 細胞における役割

氏名 竹中 圭

### <序>

ホスホリパーゼ C(PLC)は細胞外からの刺激に応答して、膜リン脂質であるホスファチジルイノシトールニリン酸(PIP<sub>2</sub>)を加水分解し、イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)とジアシルグリセロール(DAG)を産生する酵素で、各々カルシウム動員とプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を引き起こす。現在、PLC は構造や活性化のメカニズムにより、 $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  の5つのファミリーに分類される。本研究室で単離された PLC-L2 は PLC- $\delta$ と構造上、高い相同性を持ちながら、加水分解活性に必須なアミノ酸が置換されているため活性を持たないユニークな蛋白であるが、その生理的な役割等は全く明らかにされていない。PLC-L2 は当初、骨格筋に多い蛋白として同定されたが、B 細胞、T 細胞を含む血球系の細胞にも高い発現が見られる。血球系細胞、特に B 細胞や T 細胞では、 $\gamma$ タイプの PLC が T 細胞レセプター、B 細胞レセプター (BCR) の下流で重要なシグナル伝達分子として機能している。これらのレセプターからのシグナルの強度は厳密に制御され、近年の遺伝子欠損マウスを用いた研究から、シグナルの乱れがしばしば免疫不全や自己免疫疾患を引き起こすことが明らかになってきている。PLC-L2 が PLC 活性を持たないこと、及びリンパ球に高い発現が見られるという事実から、PLC-L2 もまた、リンパ球においてレセプターからのシグナルを何らかの形で制御している可能性が示唆された。本研究において、私は PLC-L2 欠損マウスを作製し、PLC-L2 の免疫系における生理的な機能、及び細胞内における機能の解析を行った。

## <結果>

### 1 PLC-L2 欠損 B 細胞の表現型

相同組み換え法で作製した PLC-L2 欠損マウスの免疫器官の解析を行った。胸腺、脾臓、骨髄、腹腔から細胞を単離し、各種表面抗原で染色したのち FACS 解析した。脾臓における B 細胞の発達を IgD と IgM の染色で調べたが、大差は認められなかった（データ本文中）。しかし、 $B220^+/CD21^{int}$  で分類される成熟 B 細胞上の CD23（図 1 a）及び CD24（データ本文中）の発現の減少が観察された。CD23 や CD24 の発現は、B 細胞の活性化状態で変化するという報告があることから、PLC-L2 欠損マウスの成熟 B 細胞が野性型とは異なった刺激感受性をもっている可能性が示唆された。また、骨髄内の脾臓から再循環している成熟 B 細胞 ( $B220^{hi}/IgM^+$ ) に軽度の減少が観察された（図 1 b）。一方、骨髄における B 細胞の初期の発達（プロ-B 細胞 からプレ-B 細胞、プレ-B 細胞から未熟 B 細胞）には著変は認められず、PLC-L2 は骨髄、脾臓を含めて B 細胞の発達そのものには深く関与していないことが分かった。次に腹腔内に存在する胎児肝由来の B1 細胞について調べた所、 $CD5^+/IgM^+$  の B-1a 細胞が顕著に減少していた（図 1 c）。B-1 細胞は CD5 の発現の有無で、B-1a と B-1b に二分されるが、PLC-L2 欠損マウスでは B-1b 細胞はほぼ、正常に存在していた（データ本文中）。

以上のことから、PLC-L2 欠損より通常の B 細胞（B 2 細胞）の発達は正常に進むが、脾臓成熟 B 細胞の性質の変化が示唆された。また、PLC-L2 が B-1a 細胞の発達、あるいは維持に重要であることが明らかになった。

B 細胞とは対照的に、PLC-L2 欠損マウスにおける T 細胞の発達や、末梢での T 細胞の活性化状態は細胞表面抗原で調べた限り、正常であった（データ本文中）。以上の結果から、私は B 細胞の細胞レベルでの機能を解析することにした。

### 2 PLC-L2 欠損 B 細胞は刺激応答性が亢進する

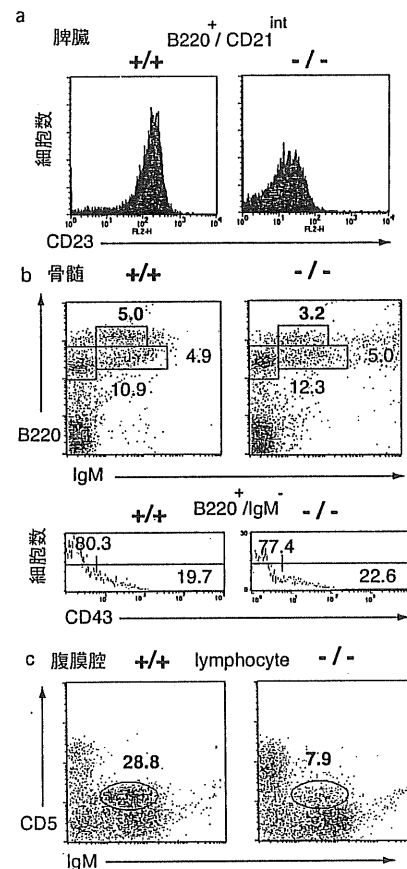


図1 免疫器官のFACS解析  
脾臓細胞(a)、骨髄細胞(b)、腹腔腔細胞(c)を図に示してある各種抗体で染色し、FACS解析を行った

PLC-L2 欠損 B 細胞の性質を調べるため、増殖性を検討した。同一の細胞集団で比較するため、選択的に回収した脾臓成熟 B 細胞を図にある各種刺激の存在下 48 時間培養し、培養時間最後の 12 時間でのチミジンの取り込みを調べた。PLC-L2 欠損成熟 B 細胞では、特に抗-IgM 抗体刺激に対して顕著に増殖応答の亢進が見られた (図 2 a)。また、抗-IgM 抗体で、脾臓 B 細胞を刺激した際、リンパ球の活性化により発現が誘導されることが知られている CD69 の発現を調べた所、PLC-L2 欠損 B 細胞では、発現誘導が野生型 B 細胞に比べて速やかに起こった(図 2 b)。以上の結果は PLC-L2 欠損 B 細胞が BCR 刺激によって活性化を受けやすいことを示している。B 細胞の重要な機能に、抗体を産生し、分泌することがある。PLC-L2 欠損 B 細胞の抗体分泌能を調べるため、B 細胞を LPS で刺激し、分泌される IgG3 量を ELISA 法で測定した所、PLC-L2 欠損 B 細胞では、野生型に比べて分泌 IgG3 量の増加が見られた (図 2 c)。また、B 細胞表面に現れる IgG3 の量も PLC-L2 欠損マウスで増加が認められた (データ本文中)。

これらの結果から、PLC-L2 欠損 B 細胞は活性化を受けやすく、PLC-L2 が細胞レベルにおいて、B 細胞の応答を負に制御していることが明らかになった。

B 細胞では BCR の下流で、PLC- $\gamma$ 2 がカルシウム動員を起こすことが知られている。そこで、細胞内での機能を調べる目的で、PLC-L2 が BCR 刺激後のカルシウム動員に与える影響を検討した。

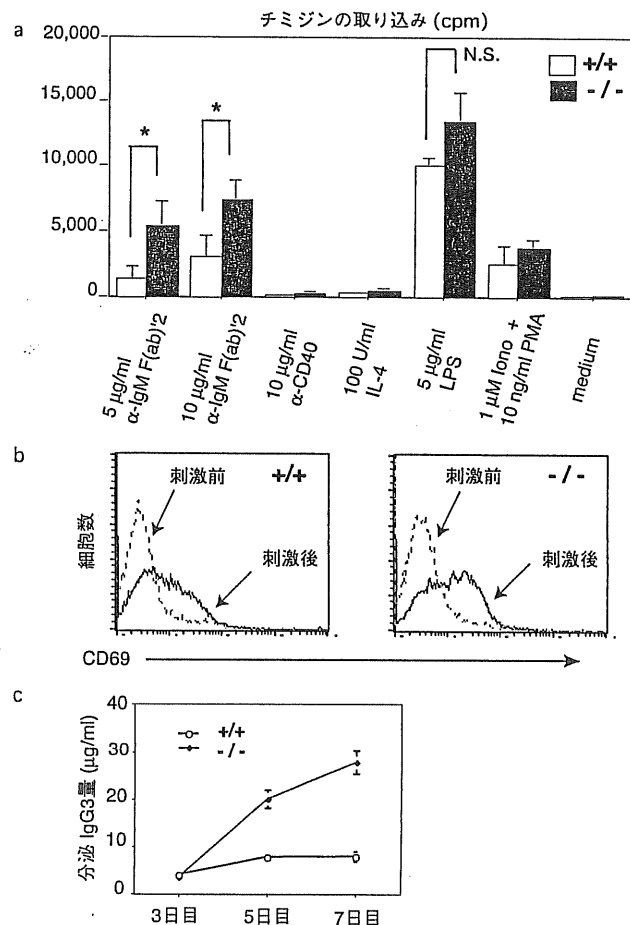


図2 PLC-L2欠損B細胞では刺激応答性が亢進する  
a 48時間、B細胞を刺激し最後の12時間のチミジンの取り込みを調べた  
b B細胞を抗IgM抗体で6時間刺激し、CD69の発現を比較した  
c B細胞をLPSで刺激し、分泌されるIgG3量をELISAで比較した

### 3 PLC-L2 欠損 B 細胞におけるカルシウムシグナルの亢進

成熟 B 細胞を抗-IgM 抗体で刺激した時のカルシウム動員について検討した所、PLC-L2 欠損 B 細胞ではカルシウム動員の亢進が認められた (図 3 a)。カルシウム動員は、最初に IP<sub>3</sub> が細胞内の小胞体からカルシウム放出を起こし、続いて小胞体内のカルシウムが枯渇すると容量依存性のカルシウムチャンネル (SOCs) を介して、細胞外からカルシウムが流入することによって起こることが知られている。そこで、この亢進が細胞内か細胞外カルシウムの

どちらの寄与によるのかを調べるため、B 細胞を細胞外カルシウム非存在下で抗-IgM 抗体刺激し、細胞内からのカルシウム動員を起こさせた後、細胞外にカルシウムを添加して細胞外からの流入を調べた。その結果、図 3 b に示すように、PLC-L2 欠損 B 細胞では、細胞外からの流入の亢進が観察された。同様の現象は小胞体のカルシウムを枯渇させる試薬で刺激し、カルシウム流入を調べた時でも観察された（データ本文中）。

以上のことは、PLC-L2 が細胞外からのカルシウム流入を負に制御する機能をもつことを強く示唆している。次に PLC-L2 欠損 B 細胞では、カルシウムの下流が亢進しているかを調べるため、カルシウム

依存的に活性化し核移行することが報告されている NFATc 1 の核内の量を調べた。その結果、PLC-L2 欠損 B 細胞では、野性型に比べ BCR 刺激により、核内の NFATc1 の増加がみられカルシウムシグナルが亢進していることが明らかになった（データ本文中）。

#### 4 PLC-L2 欠損マウスの免疫応答

こうした B 細胞の変化が個体レベルで、どういった変化をもたらすのかを次に検討した。定常状態での血中イムノグロブリン濃度を ELISA 法で測定し比較した結果、9-14 週齢の PLC-L2 欠損マウスでは IgM、IgA は正常の範囲内だったが、IgG3 には減少が見られた（図 4 a）。この IgG3 の減少は腹膜腔内の B-1a 細胞の減少を反映していると考えられる。しかしながら、加齢した PLC-L2 欠損マウス（6-7 ヶ月）では、IgM の軽度の増加が認められ（図 4 b）、同時に抗核抗原 IgM も野性型に比べ多く検出された（データ本文中）。さらに、マウスを T 細胞非依存性 2 型抗原である TNP-Ficoll で免疫し、それに対する応答を調べた所、PLC-L2 欠損マウスでは野性型に比べ免疫応答の亢進が認められた（図 4 c）。

以上のことから、PLC-L2 欠損マウスでは、個体レベルにおいても、B 細胞が活性化を受けやすいことが明らかになった。

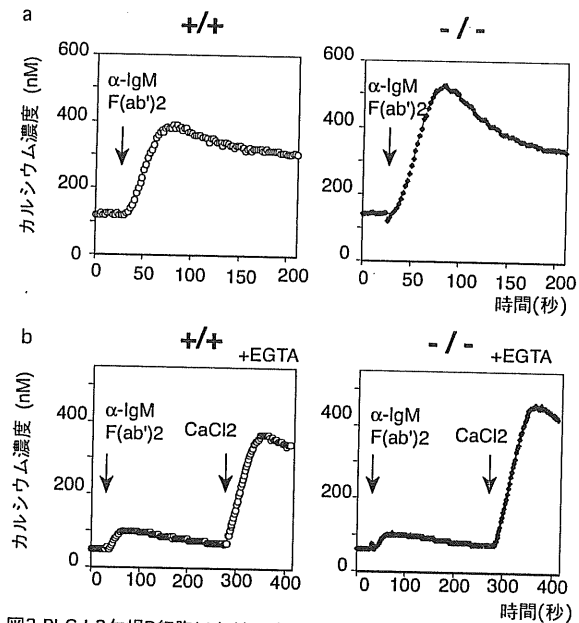


図3 PLC-L2欠損B細胞におけるカルシウムシグナルの亢進  
a B細胞を抗IgM抗体で刺激し、細胞内カルシウム動員を比較した  
b B細胞でのカルシウム流入を比較した

#### <考察とまとめ>

本研究において、私は、PLC-L2 が B 細胞の刺激応答性を負に制御していることを明らかにした。PLC-L2 が欠損すると、脾臓の BCR 刺激による成熟 B 細胞の増殖能が亢進し、カルシウム流入も亢進する。PLC-L2 欠損マウスでは T 細胞非依存性の免疫応答が亢進し、加齢による IgM の増加が観察された。以上の結果は、PLC-L2 が主に BCR の下流で B 細胞の活性化を負に制御していることを示すと共に、PLC-L2 が刺激応答の閾値を上げ、B 細胞の過剰の活性化を防ぐことで B 細胞の恒常性の維持に効いている可能性を示唆している。また、通常の B 細胞と異なり腹膜腔内 B-1a 細胞は、予想外に減少していた。この結果は、PLC-L2 が B-1a 細胞の維持、あるいは発達にも関与していることを示している。

B 細胞の応答性を負に制御する機構として抑制性の細胞膜上レセプターが、蛋白質ホスファターゼである SHP、あるいはリン脂質ホスファターゼである SHIP を活性化して、負のシグナルを伝

えることがよく知られている。これらの経路に関与する分子の欠損マウスの表現型と、PLC-L2 欠損マウスの表現型の間には相違点も見られることから、PLC-L2 が既知の抑制メカニズムとは異なった別の経路に位置している可能性がある。実際、細胞内の機能として、PLC-L2 は細胞外からのカルシウム流入を抑制することが考えられ、PLC-L2 が B 細胞における新規な抑制分子として機能していると考えられる。

今後、B 細胞での PLC-L2 の結合蛋白の探索等により、PLC-L2 の細胞内でのより詳しい機能が明らかになると思われる。また、PLC-L2 のホモログである PLC-L1 と PLC-L2 との二重欠損マウスを解析することにより、PLC-L2 の恒常性の維持や免疫寛容におけるより詳細な役割についての知見が得られると考えられる。

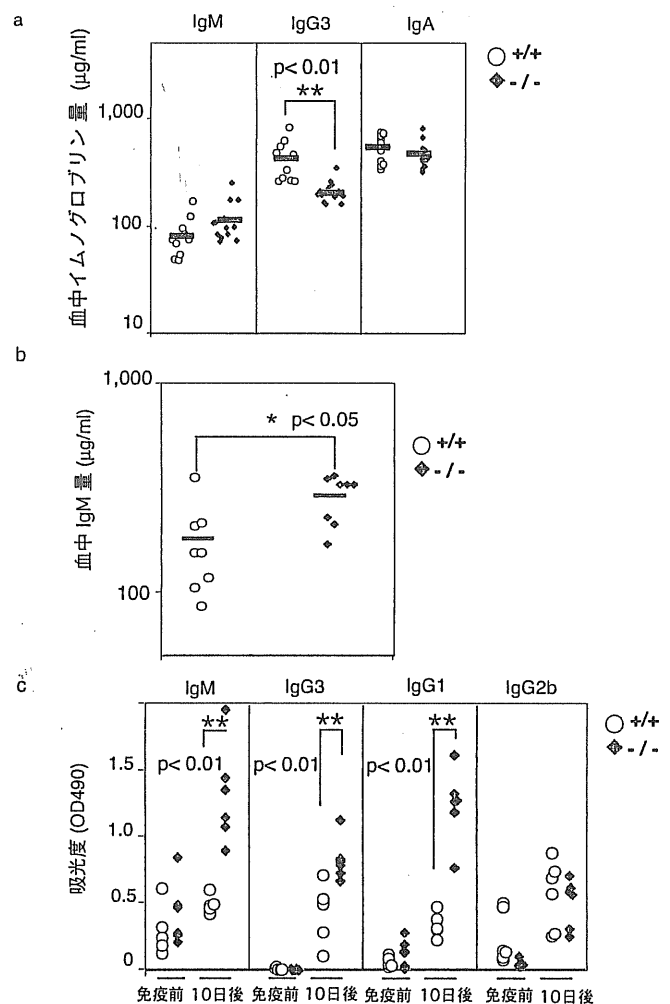


図4 PLC-L2欠損マウスの免疫応答  
a 9-14週令のマウスの定常状態の血中イムノグロブリン量を調べた  
b 加齢した(6-7ヶ月)マウスの血中IgM量を調べた  
c T細胞非依存性抗原で免疫した時の免疫応答を比較した