

## 審査の結果の要旨

氏名 竹 中 圭

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事が知られている。近年、PLC- $\delta$ と構造上高い相同性を持ちながら加水分解活性を持たない新規 PLC 様蛋白質、PLC-L2 が同定された。PLC-L2 は当初、骨格筋に多い蛋白として報告されたが、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。しかしながら、現在まで PLC-L2 の生理的な役割や細胞内での機能について全く明らかにされていなかった。本論文の研究では、PLC-L2 が活性を持たない事と免疫器官に高い発現が見られることに着目し、PLC-L2 欠損マウスを作製し個体及び、細胞レベルの解析を行うことで、PLC-L2 が B 細胞の刺激応答性を負に制御する分子であることを明らかにしている。

まず、PLC-L2 欠損マウスの各免疫器官を FACS 解析することにより、B 細胞に表現型の変化を見出している。すなわち骨髄、脾臓での B2 細胞の発達は PLC-L2 欠損マウスでは正常に進むが、骨髄内の脾臓から再循環してくる成熟 B 細胞数の減少と、脾臓の成熟 B 細胞上の CD23、CD24 の発現強度の減弱を観察している。これらの結果から PLC-L2 が B2 細胞の発達ではなく、脾臓の成熟 B 細胞の機能に関与していることが示唆される。また、PLC-L2 欠損マウスでは腹膜腔内の B-1a 細胞が著明に減少しており、このことから PLC-L2 は B2 細胞とは異なり、B2 細胞とは由来を異にする B1 細胞の発達、もしくはその維持に重要であると指摘している。

以上の知見に基づいて B 細胞の *in vitro* の刺激応答性について検討を行い、PLC-L2 欠損成熟 B 細胞が野性型細胞に比べて抗 IgM 抗体に対して顕著に増殖反応を示している。さらに、抗 IgM 抗体での刺激によりリンパ球の活性化マーカーである CD69 の発現誘導が PLC-L2 欠損 B 細胞では、野性型に比べ速やかに起こることを示し、これらの結果から、PLC-L2 欠損 B 細胞は抗 IgM 抗体刺激、つまり B 細胞レセプター(BCR)の刺激による活性化を受けやすいと考えられる。また、PLC-L2 欠損 B 細胞では野性型に比べ、LPS 刺激による IgG3 の産生量も増加していることを明らかにし、以上の結果から、PLC-L2 が B 細胞の活性化を負に制御する分子であると指摘している。

次に、PLC-L2 の細胞内での分子レベルでの機能を明らかにする目的で、PLC との関連から BCR 刺激によるカルシウム動員に対する PLC-L2 の影響を、PLC-L2 欠損成熟 B 細胞と野性型細胞におけるカルシウム動員を比較することで検討している。その結果、PLC-L2 欠損成熟 B 細胞では野性型に比べ、細胞外からのカルシウム流入が亢進

していることを見出し、PLC-L2 が細胞外からのカルシウムの流入を負に制御する分子であると考察している。

最後に、以上で見られた B 細胞の細胞レベルの変化がマウス個体レベルでどの程度、生理的な変化をもたらすのかを検討している。若い世代では、血清中の IgM は変化しないが、加齢により PLC-L2 欠損マウスでは IgM が野性型に比べ、増加していることを見出し、その原因を B1 細胞ではなく、脾臓 B 細胞が活性化を受けやすいためと考察している。さらに、T 細胞非依存性抗原で免疫したときの IgM, IgG1, IgG3 の産生量が、野性型に比べて有意に増加していることも示している。以上の結果から、PLC-L2 は個体レベルにおいても B 細胞の活性化を負に制御する分子であると指摘している。

本論文の研究では、生化学的、細胞生物学的、及び生理的に全く機能が不明であった新規 PLC 様蛋白、PLC-L2 の機能が B 細胞の増殖や抗体産生を負に制御することであることを、細胞レベル、個体レベルの解析を通じて初めて明らかにしている。さらに、PLC-L2 が細胞外からのカルシウム流入を抑制することで、既知の抑制経路とは異なったメカニズムで B 細胞の活性化の閾値を上げ、B 細胞の恒常性の維持に重要であるとの知見を得ている。よって、本論文の成果は、免疫寛容や免疫恒常性といった免疫学一般のみならず、B 細胞のシグナル伝達に対しても寄与が大きいと考えられることから、博士(薬学)の学位の授与に値すると判定した。