

論文の内容の要旨

論文題目 新しい B 細胞機能分子の探索

指導教官 高津 聖志 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月 入(進)学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 因幡 正代

<序論>

Th2 細胞や肥満細胞により分泌されるインターロイキン 5 (IL-5) は、好酸球の増殖、生存、分化を促進するとともに B 細胞の増殖や IgM、IgA などの抗体産生を促進する。また、IL-5 は好塩基球に作用し、炎症性メディエーターの放出を促進する。IL-5 の研究は抗原刺激された B 細胞を抗体産生細胞に分化させる T 細胞由来のリンホカイン、T 細胞代替因子 (T cell-replacing factor; TRF) の研究としてスタートした。共同研究者の Takatsu らは、マウス系統差間における TRF に対する B 細胞の応答性について検索するため、種々の系統マウス由来 B 細胞をハプテン化 KLH 抗原 (dinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin: DNP-KLH) で感作し、TRF 存在下の抗 DNP IgG 産生を調べた結果、他系統マウス由来 B 細胞は TRF に応答性を示すが、DBA/2Ha 由来 B 細胞は応答性を示さない事を報告した。TRF 低応答性 DBA/2Ha マウスを TRF 高応答性 BALB/c マウス感作 B 細胞で免疫して得られた抗血清は B 細胞の TRF 依存性 IgG-PFC 応答を選択的に阻害した。この阻害効果は、TRF 高応答性を示すマウスの B 細胞で吸収された。さらにフローサイトメーターを用いた検索によると、得られた抗血清は、BALB/c マウス由来 B 細胞に反応性を有したが T 細胞には全く反応しなかった。これらのことから、この抗血清には仮想上の TRF アクセプターに対する抗体が含まれていると考えられた。

TRF アクセプターについて更に知見を得るため、Takatsu らは DNP-KLH 抗原感作された BALB/c マウス由来 B 細胞で頻回免疫した DBA/2Ha 雄マウスの B 細胞を、ミエローマ細胞と融合させ、TRF の作用を阻害する単クローン抗体を産生するハイブリドーマ NH3 を作製した。NH3 抗体がどのような分子を認識し、どのような特性を持っているのか未だ明らかにされていない。

本論文は、TRF 低応答性である DBA/2Ha マウスの B 細胞が IL-5 に低応答性を示すか、それに関する B 細胞異常について解析し考察したものである。また、DBA/2Ha マウスの性質を利用して得られた NH3 抗体を用いて、NH3 抗体が認識する分子の検索を目的とし、NH3 抗原発現細胞の分布、NH3 抗体が IL-5 応答性に与える影響、NH3 陽性脾臓 B 細胞の IL-5

応答性、NH3 抗体が認識する分子の特性などについて解析し、結果と考察を記述した。

＜方法と結果＞

(1) 抗 CD38 抗体および IL-5 共刺激による DBA/2Ha マウス由来 B 細胞の抗体産生と増殖応答

Takatsu, Kikuchi らはマウス脾臓 B 細胞上に発現している CD38 を抗 CD38 抗体 (CS/2) で架橋すると B 細胞は著明に増殖し IL-5R α 鎖の発現を増強し、IL-5 をさらに添加すると IgM および IgG1 産生細胞への分化が誘導されることを報告している。このシステムを利用し、DBA/2Ha マウス由来 B 細胞の IL-5 応答性を抗体産生能を指標に調べた。DBA/2Ha および DBA/2 マウスの脾臓より B 細胞を分離し、抗 CD38 抗体と IL-5 で共刺激し 7 日間培養し、培養上清中に含まれる IgM および IgG1 を ELISA にて測定した。DBA/2 マウス由来 B 細胞を抗 CD38 抗体と IL-5 で刺激すると、IgM、IgG1 の産生がみられた。一方、DBA/2Ha マウス由来 B 細胞を刺激した場合、IgM および IgG1 産生はみられたが、その程度は DBA/2 に比べ約 2 分の 1 程度に減少していた。抗 CD38 抗体と IL-5 共刺激により誘導される増殖応答については両マウスの B 細胞に差はなかった。これらのことから、DBA/2Ha マウス由来脾臓 B 細胞は、抗 CD38 抗体と IL-5 共刺激により DBA/2 マウスと同程度の増殖応答を示すが、IL-5 により誘導される IgM、IgG1 産生が著明に低下していることが明らかになり、DBA/2Ha マウスの B 細胞は IL-5 依存性の分化に関し、低応答性を示すと考えた。

(2) IL-5 応答性に及ぼす NH3 抗体の効果

DBA/2Ha マウスが TRF に対して低応答性である性質を利用して得られた NH3 抗体を用い、IL-5 に依存した増殖反応が NH3 抗体存在下でどのように変化するか調べた。NH3 抗体を IL-5 依存性早期 B 細胞株 Y16 細胞の培養開始時に添加し、Y16 細胞の³H-チミジンの取り込みを測定したところ、抗 IL-5R α 鎖抗体は、IL-5 により誘導される Y16 細胞の³H-チミジンの取り込みを完全に阻害し、NH3 抗体は Y16 細胞の³H-チミジンの取り込みを、有意に阻害した。これらの事から、抗 IL-5R α 鎖抗体が Y16 細胞の IL-5 依存性増殖反応を完全に阻害し、NH3 抗体は IL-5 によって誘導される Y16 の増殖を有意に阻害することがわかった。

NH3 抗体が Y16 細胞の IL-5 依存性増殖反応の阻害が、NH3 抗体による IL-5 の IL-5R への結合阻害によるか調べるため、¹²⁵I で標識した IL-5 (¹²⁵I-IL-5) を用い、NH3 抗体による¹²⁵I-IL-5 の結合阻害実験を行った。抗 IL-5R α 鎖抗体 H7 抗体では¹²⁵I-IL-5 の IL-5R への結合は約 80%阻害された。NH3 抗体では、¹²⁵I-IL-5 の IL-5R への結合は阻害されず、細胞に結合した放射性活性はコントロール抗体添加の場合と同程度を示した。これらのことから抗 IL-5R α 鎖抗体は IL-5 の IL-5R への結合を阻害するが、NH3 抗体は阻害しない事が明らかになった。

(3) NH3 抗原の発現

NH3 抗体によって認識される抗原の発現分布を調べるため、各種細胞株をビオチン化 NH3 抗体および抗 IL-5R α 鎖抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。その結果、NH3 抗原は、Y16 細胞、WEHI231 細胞、BCL1-B20 細胞など B 細胞系細胞株、肥満細胞株 MC9 細胞および骨髄由来肥満細胞 (BMBC) で発現が認められた。MTH 細胞、LSTRA 細胞などの T 細胞系細胞株や赤芽球系細胞株 MELy3 細胞では NH3 抗原は検出されなかった。発現量を比較すると、IL-5R α 鎖の発現が NH3 抗原より高い Y16、WEHI231、MC9 細胞、またその逆で NH3 抗原の発現が IL-5R α 鎖より高い BCL1-B20、BMBC といった 2 つのグループに分類できることがわかった。これらのことから、NH3 抗原は IL-5R α 鎖と異なる分子である可能性が示唆された。抗 CD38 抗体で C57BL/6 マウス脾臓 B 細胞を 3 日間刺激すると、IL-5R α 鎖陽性細胞の割合が 6%から 62%に上昇するが、NH3 抗原発現細胞の割合は 6%から

13%にしか上昇しなかった。これらの結果からも NH3 抗原の発現誘導パターンは IL-5R α 鎖のパターンと異なることがわかり、両分子が性状を異にする可能性が示唆された。マウス各組織の免疫担当細胞における NH3 抗原の発現をフローサイトメトリーで解析したところ、NH3 抗原は、骨髄、脾臓、腹腔内の B220 陽性 B 細胞にそれぞれ 0.9%、2.8%、14.3%発現していたが、胸腺内の CD3 陽性細胞は発現していなかった。

NH3 抗原と IL-5R α 鎖の発現細胞分布についてさらに明らかにするため、腹腔内細胞を NH3 抗体、IL-5R α 鎖抗体および抗 B220 抗体で 3 重染色し解析した。腹腔内 B 細胞における、NH3 抗原と IL-5R α 鎖の発現を調べたところ、NH3 陽性細胞は、腹腔内 IL-5R α 鎖陽性 B 細胞のうち 7.4 %を占めることがわかった。自然免疫で重要とされている腹腔内 B-1 細胞は、恒常的に IL-5R α 鎖を発現していることから、NH3 抗原は一部の B-1 細胞に発現していると考えられる。

以上のことから、株化細胞および生体内免疫細胞において、NH3 抗原は主として B 細胞に発現しており、T 細胞系では全く発現していないことがわかった。

(4) NH3 陽性 B 細胞の IL-5 応答性

NH3 陽性 B 細胞の IL-5 応答性を明らかにするため、C57BL/6 マウスの脾臓細胞から B220⁺/NH3⁺ B 細胞ならびに B220⁺/NH3⁻ B 細胞をそれぞれ FACStar で分取し、IL-5 存在下に培養後、培養上清中に含まれる IgM 量および IgM 分泌細胞の出現頻度を、それぞれ ELISA および ELISPOT により測定した。未分画および B220⁺/NH3⁻ B 細胞は IL-5 存在下でも IgM 産生量は検出限界以下であったが、B220⁺/NH3⁺ B 細胞は、IL-5 に応答して IgM を産生した。また、B220⁺/NH3⁺ B 細胞の IgM 産生細胞の出現頻度が、B220⁺/NH3⁻ B 細胞を培養した場合にくらべ、IL-5 存在下で著しく高かった。これらのことから脾臓の B220⁺/NH3⁺ B 細胞は、IL-5 に応答して IgM 分泌細胞へと分化しやすいことが明らかになった。

(5) IL-5R α 鎖ノックアウトマウス由来 B 細胞における NH3 抗原の発現

IL-5 により誘導される Y16 細胞の増殖反応が、NH3 抗体によって有意に抑制されたこと、NH3 抗原の発現分布が IL-5R α 鎖のそれと類似していたことなどから、NH3 抗体が認識しているのは、IL-5R α 鎖そのものである可能性が考えられた。そこで IL-5R α 鎖ノックアウトマウスにおける NH3 抗原の発現をフローサイトメトリーで調べたところ、IL-5R α 鎖ノックアウトマウスの B 細胞も NH3 抗原を発現していることが分かった。また、IL-5R α 鎖を一過性に発現させた COS7 細胞と NH3 抗体が反応しなかったことから、NH3 抗体が認識するのは IL-5R α 鎖とは異なる分子であると結論した。

(6) NH3 抗体による免疫沈降

NH3 抗原を生化学的に解析するため、NH3 抗原の発現が最も高い BCL1-B20 細胞を用いて免疫沈降を行った。BCL1-B20 細胞の細胞表面をビオチン化し、1% Brij で可溶化後に NH3 抗体を用いて免疫沈降をしたところ、NH3 抗体により約 60 kDa の免疫沈降物を検出した。この NH3 抗体による免疫沈降物と抗 IL-5R α 鎖抗体による免疫沈降物のタンパク量を比較すると、使用した抗体量が等しいにも関わらず、NH3 抗体で検出された免疫沈降物のタンパク量が IL-5R α 鎖のタンパク量に比べ少なかった。この結果は、BCL1-B20 細胞における NH3 抗原の発現が IL-5R α 鎖の発現より多いという FACS 解析のデータと整合しない。可能性としては、NH3 抗体が免疫沈降に適しておらず、免疫沈降の条件では抗原に対する親和性が低いこと、または NH3 抗原はビオチン化されにくいタンパクである事が考えられる。さらに、NH3 抗体による約 60 kDa の免疫沈降物が NH3 抗原そのものである可能性と、NH3 抗原と IL-5R α 鎖は会合して存在しており、NH3 抗体による約 60 kDa の免疫沈降物は IL-5R α 鎖であり、会合している NH3 抗原は非常に高分子のタンパクであるか、あるいは糖鎖である為にバンドとして検出されなかったという可能性が考えられる。以上の可能性について明らかにする為、

2次元電気泳動法などを用い、NH3 抗体による約 60 kDa の免疫沈降物が IL-5R α 鎖であるかどうか更に確認する必要があると考える。

(7) NH3 抗原の cDNA 単離

NH3 抗原の cDNA を単離することを目的とし、CDM8 ベクターに組み込まれた BCL1-B20 細胞の cDNA ライブラリーを COS7 細胞に発現させ、NH3 抗体で染色後に FACS Vantage で NH3 陽性細胞を分取した。細胞を溶解後、プラスミドの回収を行った。回収されたプラスミドは、大腸菌 MC1061/P3 にトランスフォームし増幅させた。プラスミド濃縮のため、増幅させたプラスミドを再び COS7 細胞にトランスフェクトし、NH3 陽性細胞を分取した。これを 4 回繰り返した。4 回目のスクリーニング後、700 個のシングルコロニーをそれぞれ COS7 細胞にトランスフェクトし、1 個の NH3 陽性クローン (12D-6) を得た。12D-6 の塩基配列を決定したところ、Fc γ RIIB の塩基配列と高い相同性を示した。そこで、NH3 抗原が Fc γ RIIB そのものであるか検索するため、Fc γ RIIB ノックアウトマウスを用いて、NH3 抗原の発現をフローサイトメトリー法により解析した。腹腔内 B 細胞群の NH3 抗原陽性率は、野生型マウスおよび Fc γ RIIB ノックアウトマウスでそれぞれ 9.1%、5.6%であり Fc γ RIIB ノックアウトマウスも NH3 抗原陽性 B 細胞集団が検出された。また、抗 CD38 抗体で刺激した脾臓 B 細胞の NH3 抗原の発現率は野生型マウスおよび Fc γ RIIB ノックアウトマウスでそれぞれ 5.8%、4.7%であり両者に大きな差は認められなかった。これらのことから Fc γ RIIB ノックアウトマウスの B 細胞も NH3 抗原を発現していると結論した。以上より、スクリーニングの過程で得られた NH3 陽性クローン 12D-6 は Fc γ RIIB 遺伝子とは結論できなかった。

<まとめと今後の展望>

DBA/2Ha マウスの脾臓 B 細胞は IL-5 依存性の IgG1 産生が DBA/2 マウスに比べ著明に低く、IL-5 低応答性が確認された。DBA/2Ha マウスの B 細胞が IL-5 低応答性であることを利用して得られた NH3 抗体を使った解析により以下の興味ある結果が得られた。1) NH3 抗体は Y16 細胞の IL-5 依存性 DNA 合成を阻害する。2) NH3 抗体で認識される NH3 抗原は細胞表面分子で、主に B 細胞に発現している。3) NH3 抗原を発現している B 細胞が高頻度に IL-5 応答性を示す。これらの結果から NH3 抗原は B 細胞に重要な機能を持ち、また IL-5 応答性の制御に関与していると考えられる。

今後は、生化学的解析で得られた 60 kDa の免疫沈降物が、IL-5R α 鎖であるか、または NH3 抗原そのものであるか明らかにする為、2次元電気泳動法を用いて解析する必要があると考えている。また、共焦点レーザー顕微鏡を用い、NH3 抗原と IL-5R α 鎖の細胞上における局在を調べることにより、NH3 抗原と IL-5R α 鎖の関連性がより明確になると考えている。そして最終的には、NH3 抗原の cDNA 単離に焦点をあて研究を進めることが重要であろう。NH3 抗原の cDNA 配列が明らかになれば、LTK⁻細胞 (マウス繊維芽細胞) における IL-5R α 鎖、IL-5R β 鎖と NH3 抗原の再構築が可能になり、NH3 抗体を添加した場合と無添加の場合における IL-5 シグナルにより誘導されるシグナル伝達物質の活性化や発現等について検索することにより、NH3 抗原の IL-5 シグナルへの関与が明らかになることが期待される。そうすれば、この研究が IL-5 シグナルの新たな制御機能解明への突破口となり、IL-5 が関与する B 細胞の分化制御に新しい情報を提供することに違いない。また、NH3 抗原を解析することは、マウス B 細胞の分化制御、特に現在自然免疫との関連で注目されている B-1 細胞の解明などに新しい情報を提供することになり、その有用性が期待される。