

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 因幡 正代

本研究は、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、さらに DBA/2Ha マウスの免疫学的異常について解析した。また、NH3 抗体が認識する分子の検索を研究目的とし、NH3 抗体が、細胞の 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について解析し、以下の結果を得ている。

1) 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, IgG1 産生細胞への分化が誘導される。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ところ、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ことが明らかになった。

2) 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 [3 H]-チミジンの取り込みを完全に阻害し、NH3 抗体は Y16 細胞の [3 H]-チミジンの取り込みを有意に阻害した。このことから、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示された。また、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ためか調べるため、 125 I で標識した IL-5 (125 I -IL-5) を用い、NH3 抗体による 125 I -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 125 I -IL-5 の IL-5R への結合は約 80% 阻害された。NH3 抗体

では、 ^{125}I -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示された。

3) NH3 抗体によって認識される抗原の発現分布を、各種細胞株およびマウス各組織の免疫担当細胞を用いて、フローサイトメトリーで解析した。NH3 抗原はプロ B 細胞株、成熟 B 細胞株、肥満細胞株、および骨髄、脾臓、腹腔内の B220 陽性 B 細胞に発現していた。しかし T 細胞系細胞株、赤芽球系細胞株、CD3 陽性胸腺細胞では発現していなかった。株化細胞、生体内免疫細胞ともに 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が認められなかったことから、NH3 抗体が認識する分子は B 細胞に重要な機能を持つ分子であることが示唆された。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、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 鎖を発現している事から、NH3 抗原は一部の B-1 細胞に発現している事が示唆された。

4) 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 細胞をそれぞれ分取し、IL-5 存在下に培養し、培養上清中に含まれる IgM 量と IgM 分泌細胞の出現頻度を測定した。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示された。

5) NH3 抗原を生化学的に解析するため、NH3 の発現が最も高い BCL1-B20 細胞を用いて免疫沈降を行い、NH3 抗体により約 60kDa の免疫沈降物を検出した。また、抗 IL-5R α 鎖抗体でも 60 kDa の沈降物が得られた。これらの事実から、NH3 抗体が認識する細胞表面分子の分子量は約 60 kDa であり、IL-5R α 鎖のそれと類似していることが明らかになった。NH3 抗原の発現分布や分子量などが IL-5R α 鎖のそれと類似していることから、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ので、IL-5 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にて調べたところ、IL-5 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示された。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) 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 FACS Vantage で NH3 陽性細胞を分取し、NH3 抗原の cDNA 単離を試みた結果、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。以上の事から、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。

以上、本論文により、未だ明らかにされていない NH3 抗原が、主に B 細胞に発現する細胞表面分子であり、NH3 抗原を発現している B 細胞が高頻度に IL-5 応答性を示したことなどから、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ことが示唆された。

今後、NH3 抗原の cDNA 配列が明らかになり、IL-5R と NH3 抗原の再構築実験により NH3 抗原の IL-5R シグナル系への関与が明らかになれば、本研究は 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に違いないと思われる。また、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 細胞の解明に重要な貢献をもたらすと思われ、学位の授与に値するものと考えられる。