

論文内容の要旨

論文題目 CD38 刺激によるマウス B 細胞の活性化機構

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 12 年 4 月進学

医学博士過程

病因・病理学専攻

氏名 加来寛明

【序論】

B リンパ球は、外来性および内在性の抗原に対して、特異的な抗体を産生することを運命づけられている。抗体は抗原の中和や貪食を促進することにより、外来感染病原体やがん細胞の排除に著しく寄与する。成熟 B リンパ球では、抗体の生理的機能を変化させるために、重鎖の定常部遺伝子のクラス変換が行われる。はじめに μ 鎖が発現しており IgM 抗体が産生されるが、抗原やサイトカインなどの刺激を受けて、他のクラスに組み変わり、それぞれが有利な生理活性を持って、生体防御や病理に関わる。B リンパ球が、どの B リンパ球活性化因子やサイトカインによって刺激されるかによって、変換する抗体のクラスは異なる。変換する抗体のクラスの種類の種類は、胚性型 RNA 転写で規定される。胚性型 RNA は、クラス変換に必須の RNA であり、胚性型 RNA が標的のクラス変換領域のゲノムに結合し、その領域のゲノム構造を開くことで、クラス変換が起こる。

従来 B リンパ球の研究は、主に BCR、CD40、LPS 刺激などの系を用いて、B リンパ球活性化の機序が説明されてきた。私はマウス脾臓 B リンパ球上に強く発現する CD38 に着目した。マウス脾臓 B リンパ球上の CD38 を抗 CD38 抗体で架橋刺激すると、増殖反応、IL-5 レセプター α 鎖の発現上昇、胚性型 γ 1RNA 転写の誘導が起

こり、さらに IL-5 で共刺激することにより、より強力な増殖反応の亢進、IgM 抗体産生の増強または IgG1 へのクラス変換が起こることが明らかになっている。

CD38 は、リンパ系の細胞だけではなく、肝臓、膵臓、腎臓、脳、筋、骨といった広範な細胞にも発現している 45 kDa の 2 型膜タンパク質であり、細胞外領域には、NAD を基質として、cADPR や ADPR を合成する独特の酵素活性を持っている。CD38 は種々の組織で種々の機能を持っていることが少しずつ分かって来たが、B リンパ球においては、未だに種々の有用なマーカーになり得るといふことしか位置付けられておらず、機能やシグナル伝達機構は未知である。

本論文の目的は、CD38 刺激による B リンパ球の増殖反応、胚性型 γ 1RNA 転写の誘導が、どのような分子機構により、達成されているのかを明らかにすることである。それによって、B リンパ球の増殖反応、クラス変換の分子機構がさらに詳細に理解されることが期待される。

【方法と結果】

(1) CD38 と NF- κ B 活性化

胚性型 γ 1RNA 転写の誘導には、少なくとも NF- κ B 活性化が必須であることが知られているので、まず CD38 刺激においても NF- κ B の活性化が起こるか否かを検討した。脾臓 B リンパ球を精製し、CD38 刺激後の核抽出液と、NF- κ B に結合できるプローブを用いたゲルシフト法を行い、NF- κ B の核内移行を指標として、NF- κ B の活性化の検出を行った。CD38 刺激において、CD40、BCR、LPS 刺激の場合と同様に、NF- κ B の活性化が起こり、それはタンパク質合成非依存性であることが分かった。CD38 刺激により NF- κ B のどの構成因子が活性化するのかを、抗体を用いたゲルシフト法で調べると、CD38 刺激により活性化する NF- κ B の構成因子は p50、p65、c-Rel であった。

(2) CD38 刺激により活性化した NF- κ B の役割

p50、c-Rel の遺伝子欠損 B リンパ球を用いて、CD38 刺激により活性化した NF- κ B の役割について検討した。CD38 刺激による増殖反応を (3 H)チミジンの取り込みで解析すると、両遺伝子欠損 B リンパ球とも、CD38 刺激による増殖反応は減弱していた。また、RT-PCR により、両遺伝子欠損 B リンパ球とも CD38 刺激による胚性型 γ 1 転写の誘導は減弱していた。さらに、7 日間培養後の上清中に含まれる IgM と IgG1 抗体濃度を ELISA にて測定すると、CD38、IL-5 共刺激による IgM 及び IgG1 抗体産生は野生型と比べて、両遺伝子欠損 B リンパ球とも減少していた。

(3) CD38 刺激による NF- κ B 活性化の分子機構

CD38 刺激による NF- κ B の活性化の分子機構を調べるために、Btk や PI3-K 欠損 B

リンパ球を用いた。両遺伝子欠損 B リンパ球とも CD38 刺激による NF- κ B の活性化が見られなかった。また、CD38 刺激による NF- κ B の活性化は、PKC の阻害剤処理、または培地の EGTA 処理により、顕著に阻害されていた。このように、CD38 シグナルは、BCR シグナルと同様に、Btk、PI3-K、PKC、Ca²⁺流入を介して、NF- κ B の活性化を誘導していることが示唆された。

(4) 酵素活性非依存性の CD38 シグナル

CD38 の酵素活性により生成される cADPR や ADPR は Ca²⁺流入に関与することが明らかになっているが、予め B リンパ球に cADPR の機能的アンタゴニストである 8-Br-cADPR 処理しても、CD38 刺激による NF- κ B の活性化と胚性型 γ 1 転写の誘導の阻害は観察されなかった。また、NAD、cADPR、ADPR 存在下の培養で、NF- κ B の活性化の程度は変わらなかった。このことから、CD38 及び BCR 刺激による NF- κ B の活性化を導く Ca²⁺流入には、cADPR や ADPR の生成は関与しないことが示唆された。BCR 刺激による Ca²⁺流入には、PLC- γ 2 が関与し NF- κ B の活性化を導いているので、CD38 刺激による NF- κ B の活性化に PLC- γ 2 が関与するか否かを、PLC- γ 2 欠損 B リンパ球を使用して解析を行った。CD38 刺激による NF- κ B の活性化は PLC- γ 2 欠損 B リンパ球において見られなかった。このことから、B リンパ球において、CD38 シグナルにおける Ca²⁺流入は、CD38 の酵素活性による生成される cADPR や ADPR ではなく、BCR シグナルと同様に PLC- γ 2 が関わっていることが示唆された。

(5) CD38 シグナルと BCR シグナルの違い

CD38 刺激において、PLC- γ 2、BASH、Vav のチロシンリン酸化が起きるか否かを、CD38 刺激後にそれらの分子を免疫沈降して、抗チロシンリン酸化抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。BCR 刺激では 2 分以内に強力な PLC- γ 2、BASH、Vav のチロシンリン酸化が起こったが、CD38 刺激においてはどの刺激時間においても、全くチロシンリン酸化の上昇は観察されなかった。

(6) CD38 と β -AR の関係

さらに、CD38 シグナルの上流ではどのような分子が関与しているかを検討した。CD38 が G protein のシグナルに関与することを示唆する報告があったので、G protein の関与を調べた。CD38 刺激による NF- κ B の活性化、増殖反応、胚性型 γ 1 転写の誘導は、G α 型の G protein シグナルを阻害する CTX 処理により、顕著に阻害されていた。また、G α 共役型 β -AR のアゴニスト及びアゴニスト処理により、CD38 刺激による NF- κ B の活性化が顕著に阻害されていた。よって、CD38 シグナルに β -AR、G α が関与することが示唆された。

【考察】

これまで CD38 における研究はその酵素活性を中心に展開しており、反応生成物 cADPR や ADPR が、種々の細胞の Ca^{2+} 流入に関わっていることが明らかとなってきたが、CD38 シグナル上でどのような転写因子の活性化を引き起こすかは全く分かっていなかった。本研究により、CD38 シグナル上で転写因子の活性化が起きることを、B リンパ球を用いた NF- κ B の活性化の系で、初めて発見することができた。

B リンパ球における CD38 刺激は、NF- κ B の活性化依存性に増殖反応、胚性型 γ 1RNA 転写の誘導を行う機構が明らかになった。NF- κ B の活性化へ至る詳細な分子機構については、Btk、PI3-K、PKC、PLC- γ 2、 Ca^{2+} 流入を介して、起こっていることも明らかにすることができた。これらの分子の関与は、BCR 刺激と同様であるので、CD38 シグナルは BCR シグナルとリンクしていることが考えられる。

CD38 シグナルは、CTX 処理、または $\text{G}_{\text{s}\alpha}$ 共役型 β -AR のアゴニスト及びアゴニスト処理により、顕著に阻害されることから、CD38 と β -AR とのシグナルリンクも示唆された。また驚くべきことに、B リンパ球以外の細胞系ではあるが、 β -AR シグナルも、Btk、PI3-K、PKC、PLC- γ 2、 Ca^{2+} 流入を介した経路も明らかになっており、そのシグナルに CD38 が関与する可能性も考えられる。

最近、CD38 はスフィンゴ糖脂質と相互作用することができるということが分かって来た。スフィンゴ糖脂質は raft に濃縮して存在し、raft はシグナルをより効率的に伝達するために重要な膜構造である。BCR、GPCR、G protein も raft に高濃度に存在することが知られているので、CD38 刺激により、raft 領域に BCR や β -AR が寄って来て、近接した領域に集まることに起因して、シグナルを伝達している可能性も考えられる。

本研究により、CD38 シグナルを伝達する機構として、以下の三つの可能性が考えられる。第一に BCR シグナルとリンクしている可能性、第二に β -AR シグナルとリンクしている可能性、第三に、raft 形成を起こすことによってその二つのシグナルとリンクするという可能性であり、今後これらの分子機構を明らかにしていきたい。