

論文題目 自己免疫疾患モデルマウスにおける
軽鎖非依存性 μ 重鎖の検討

指導教官 五十嵐 隆教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 13 年 4 月入学

医学博士課程
生殖・発達・加齢医学専攻
氏名 安戸 裕貴

研究目的)

軽鎖非存在下で細胞膜表面に発現する軽鎖非依存性 μ 重鎖が preB ALL、自己免疫疾患および免疫不全疾患発症に関与する可能性を示唆する報告がされている。今回の研究では、軽鎖非依存性 μ 重鎖と自己免疫疾患との関係に着目し、自己免疫疾患モデルマウスである MRL/+マウスおよび MRL/*lpr* マウスの骨髄、脾臓内における軽鎖非依存性 μ 重鎖の分布を免疫沈降法、ウェスタンブロット法、および ELISA 法を用いて検討し、疾患との関連性を解明することを目的とした。

方法)

軽鎖非依存性 μ 重鎖の存在の有無については、免疫沈降法、ウェスタンブロット法により評価した。検討対象として、免疫不全モデルマウスの $\lambda 5(-)$ マウスを使用した。また、正常モデルマウスおよび自己免疫疾患モデルマウスにおける軽鎖非依存性 μ 重鎖の存在の有無については、正常モデルマウスとして C3H マ

ウスを自己免疫疾患モデルマウスとして MRL/+マウスを使用した。これらの IgM(-)骨髄細胞を採取し、mRNA の抽出および、cDNA への逆転写合成を行った。cDNA から RT-PCR により、重鎖遺伝子可変領域をクローニングし、分泌型 μ 重鎖定常領域を含む発現ベクターに挿入し、多様な可変領域を含む分泌型 μ 重鎖発現ベクターを作成した。これらの μ 重鎖発現ベクターを COS7 細胞にて一過性発現させ、細胞内ならびに培養上清中の μ 蛋白の存在の有無を評価した。

次に、軽鎖非依存性 μ 重鎖の分布の評価にあたっては、ELISA 法により評価した。検討対象は、自己免疫モデルマウスとして、MRL/+マウスおよび、Fas に変異を有する MRL/*Ipr* マウス、また、正常モデルマウスとして C3H マウスを用いた。また、骨髄細胞は B220(+)*IgM*(-)*CD43*(+)*CD25*(-)であるプロ B 細胞と、B220(+)*IgM*(-)*CD43*(-)*CD25*(+)であるプレ B 細胞とに分け、脾臓細胞も検討対象とした。これらの細胞を用いて、先程と同様な方法で、分泌型 μ 重鎖発現ベクターを作成し、COS7 細胞にて一過性発現させ、cell lysate 中および上清中の μ 蛋白の濃度を測定した。また、定量化のため、 μ 分泌率を上清中の μ 蛋白量を cell lysate 中の μ 蛋白量で割り、百分率化したものとして定義した。軽鎖非依存性の基準として、正常マウス C3H マウスの脾臓細胞由来の μ 重鎖のうち、最も分泌率が高かったクローンの μ 分泌率を採用した。この基準値を越える分泌率を示す μ 重鎖を軽鎖非依存性 μ 重鎖、基準値以下の分泌率を示すクローンを軽鎖依存性 μ 重鎖と定義した。

検討をした分泌型 μ 重鎖の VH7183 family の全領域と CDR3 領域の塩基配列は、ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems, Tokyo, Japan)、ABI model 310 automated sequencer を用いて解読した。

実験結果)

今回の研究で自己免疫疾患モデルマウスにおける軽鎖非依存性 μ 重鎖の分布を免疫沈降法、ウェスタンブロット法およびELISA法により評価した結果、以下の事柄が判明した。

- 1) マウス軽鎖非依存性 μ 重鎖を $\lambda 5(-)$ マウスの骨髄より同定した。
- 2) ELISA法による軽鎖非依存性 μ 重鎖の検討の結果、以下のことがわかった。
 - a) 正常モデルマウスの骨髄プロB細胞において軽鎖非依存性 μ 重鎖が存在した。
 - b) 自己免疫疾患マウスの骨髄細胞や脾臓細胞において、正常マウスと比較して、軽鎖非依存性 μ 重鎖が高頻度に存在した。
- 3) マウス軽鎖非依存性 μ 重鎖のシークエンスの特徴から以下のことが判明した。
 - a) VH7183.3j1、RF3が頻用される傾向にある。
 - b) CDR3領域内の陽性荷電の数が増加し、陰性荷電の数が減少していた。
 - c) CDR3領域内において、アルギニンが、95番目、100番目のアミノ酸の位置で使用されている特徴が認められた。

考察)

CDR3 領域の短いマウスにおいても、ヒトと同様に $\lambda 5(-)$ マウスや正常マウスの骨髄で、軽鎖非依存性 μ 重鎖が存在することが判明した。

自己免疫疾患モデルマウスである MRL/+マウスおよび MRL/*lpr* マウスの骨髄細胞と脾臓細胞において、軽鎖非依存性 μ 重鎖が高頻度に存在することが認められたことから、自己免疫疾患モデルマウスでは、軽鎖非依存性 μ 重鎖が早期の *negative selection* を受けず、末梢へと流出していることが考えられた。このことから、自己免疫疾患モデルマウスにおける軽鎖非依存性 μ 重鎖の *regulation* の異常が自己免疫疾患の発症と関わっている可能性が考えられた。

また、マウス軽鎖非依存性 μ 重鎖の特徴として、CDR3 領域内の陰性荷電アミノ酸の数が減少していたことから、CDR3 領域内で陽性荷電アミノ酸の使用に制約があるマウスでは、CDR3 領域内の陰性荷電の数を減らして、相対的に陽性に帯電することで、軽鎖非依存性の性質が維持されていることが推定された。また、CDR3 領域内の特定のアミノ酸の位置でアルギニンが使用されやすいことから、マウスの軽鎖非依存性の性質獲得には、CDR3 領域内の特定の位置で

アルギニンが存在することが重要であることが推定された。

結語)

軽鎖非依存性 μ 重鎖が、プロB細胞からプレB細胞での早期B細胞分化の段階でのnegative selectionを受けない場合に、腫瘍疾患、自己免疫疾患および免疫不全症などの様々な疾患をもたらす可能性が想定される。今回の研究で、自己免疫疾患モデルマウスにおける軽鎖非依存性 μ 重鎖のregulationの異常が自己免疫疾患の発症と関わっている可能性を示唆した。自己免疫モデルマウスにおける軽鎖非依存性 μ 重鎖の分布を評価し、軽鎖非依存性 μ 重鎖の機能解析をおこなうことは、自己免疫疾患の解明に寄与するのみならず、腫瘍疾患、免疫不全症などにおける未知の疾患の病態解明にも貢献すると思われる。