

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目

マウス IgG3 産生における Innate Immune Receptor の役割

指導教員 三宅健介 教授

東京大学大学院医学系研究科 平成 15 年 4 月入学

医学博士課程 病因・病理学専攻

氏 名 小林俊彦

細菌のリポ多糖(LPS)は B 細胞に増殖応答を引き起こし、抗体産生を促すことは現象として知られていた。しかしながら、LPS 認識に関与する分子が不明であったことにより非特異的であると考えられていた。しかし、近年の Toll-like receptor (TLR)ファミリーの発見により、LPS は TLR4/MD-2 複合体により認識されることが明らかとなった。B 細胞は TLR4/MD-2 の発現によって直接 LPS 認識を行うが、抗体産生には Radioprotective105 (RP105)とその共受容体の MD-1 も必要である。RP105/MD-1 は主として B 細胞に発現する TLR の 1 つで TLR4 と相同性が高いことから、これまで LPS 応答への機能的な関与が解析されてきた。本論文では、RP105/MD-1 による B 細胞活性化の分子メカニズムと生理的な意義についての解析を中心に、LPS などの T 細胞非依存性抗原(TI 抗原)により誘導される IgG3 抗体産生に果たす TLR の役割について検討した。

まず、TLR が抗体産生にどの程度貢献しているかを検討するため、TLR および下流のシグナル伝達に関連する遺伝子の KO マウスを用いて、それらの血清 IgG3 を測定した。その結果、ほとんどの TLR シグナルに関与する MyD88 の KO マウスでは顕著な IgG3 の低下を示した。一方、TLR3 と TLR4 のシグナル伝達において Interferon (IFN)- β の誘導に関わる TRIF の KO マウスでは WT と差は認められなかった。また、TLR2xTLR4 double KO マウスにおいても MyD88 KO マウス同様に IgG3 の減少が認められたことから、TLR2 あるいは TLR4 のリガンドである LPS やリポペプチドといった細菌表層成分

の認識が IgG3 サブクラスの抗体産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

並行して、RP105 KO B 細胞が TLR4 リガンドの LPS 刺激に加えて TLR2 リガンド刺激に対しても低応答性であることを発見した。一方、TLR9 リガンドである非メチル化 DNA (CpG-ODN) に対する応答性に差は認められなかった。さらに、*ex vivo* において TLR2 および TLR4 リガンド刺激によって誘導される IgG3 抗体産生が、RP105 KO 及び MD-1 KO B 細胞においては WT に比べ減弱していた。このとき、抗体のクラススイッチに重要な因子である Activation-induced cytidine deaminase (AID) の TLR2 及び TLR4 刺激による誘導が減弱していることを発見した。また、RP105 KO マウスは *in vivo* への TLR2 あるいは TLR4 リガンド投与により誘導される IgG3 クラスの抗体産生についても低下を示した。この原因として、抗体を産生する CD138⁺ 形質細胞が正常に誘導されていないことが判明した。さらに、非免疫状態における血清 IgG3 の抗体価は MyD88 KO マウスと同程度であったことから、RP105 KO および MD-1 KO マウスにおける血清 IgG3 の減少は B 細胞の TLR2 および TLR4 リガンドに対する応答性の低下に起因することが示唆された。しかし、RP105 KO マウスにおける TLR2 および TLR4/MD-2 の発現は WT と顕著な差が認められなかったため、リガンド認識後の RP105/MD-1 を介した活性化が IgG3 抗体産生に必要であると考えられた。

そこで RP105 の欠失による B 細胞の遺伝子発現パターンの変化をマイクロアレイにより WT との比較解析を行った。その結果、RP105 KO B 細胞において IgG3 産生に必須な定常領域の mRNA ($\gamma 3$ germline transcript; GLT) の発現が低下していた。実際、定量的 RT-PCR を行った結果、RP105KO B 細胞において $\gamma 3$ GLT の発現の低下を認めた。同様に、TLR2xTLR4 double KO、MyD88 KO B 細胞においても $\gamma 3$ GLT の低下を認めたことから、TLR2 あるいは TLR4 から MyD88、RP105 を介したシグナルにより、 $\gamma 3$ GLT が発現されていると推察された。

ここで、RP105 シグナルによる $\gamma 3$ GLT 発現のメカニズムを検討した。 $\gamma 3$ GLT 発現調節因子には NF- κ B1 と c-Rel の 2 つが知られているが、TLR2xTLR4 double KO、MyD88 KO、RP105 KO および MD-1 KO B 細胞においてそれらの発現には WT との差が認められなかったため、これら KO B 細胞においては NF- κ B1 あるいは c-Rel の活性化が障害されていることが予測された。RP105 KO および MD-1KO B 細胞における NF- κ B1 の活性化について検討した結果、これら遺伝子 KO B 細胞では LPS 刺激時の NF- κ B1 のリン酸化が減弱していた。また、RP105 を抗体で架橋刺激すると NF- κ B1 のリン酸化が認められたことと、NF- κ B1 の遺伝子 KO は IgG3 の低下を示すという報告があることから、RP105 が NF- κ B1 を活性化して $\gamma 3$ GLT の転写に関与している可能性が示唆された。細胞内シグナル伝達の解析を行った結果、RP105 KO B 細胞では NF- κ B1 活性化の減弱と同時に

Akt のリン酸化の減弱も認められた。しかし、これらのシグナル伝達の障害が不完全であったことから、TLR2 あるいは TLR4/MD-2 からのシグナル伝達と RP105/MD-1 からのシグナル伝達とが別々に NF- κ B1 の活性化を誘導している可能性が示唆された。また、B 細胞を PI3 kinase 阻害剤の wortmannin で処理すると γ 3 GLT 転写量が低下する結果が得られ、PI3 kinase が γ 3 GLT 発現に寄与していることを支持した。

さらに、共焦点レーザー顕微鏡と免疫沈降法により、RP105/MD-1 が刺激の有無に拘らず TLR2 あるいは TLR4/MD-2 と恒常的に会合していることを明らかとした。

以上より、B 細胞の RP105/MD-1 は TLR2 あるいは TLR4/MD-2 と複合体を形成することで効率良く PI3 kinase の活性化を促し、増殖及びその後の IgG3 産生細胞への分化を誘導していることが示唆された。

本研究では、血清 IgG3 の産生機構を目的として、微生物表層に存在する糖や脂質といった T 細胞非依存性の抗原に対する B 細胞活性化の分子機構について検討した。その結果、TLR2 および TLR4/MD-2 が微生物表層成分を認識し、活性化シグナルを伝達するとともに RP105/MD-1 と会合することで同時に RP105/MD-1 からのシグナルも活性化することであることを示した。よって、B 細胞の増殖および IgG3 産生細胞への分化には TLR と RP105/MD-1 双方による活性化が必要であることを示した。