

論文内容の要旨

論文題目: TRAF6-dependent signal pathway is essential for the formation of B-cell follicles in secondary lymphoid organs

(TRAF6 依存性シグナル伝達経路は二次リンパ器官の B 細胞濾泡形成に必須である)

氏名: 秦 俊文

リンパ器官はリンパ細胞の産生、分化、生存維持、獲得免疫応答などを行う器官である。その中で脾臓、リンパ節、パイエル板などの二次リンパ器官は獲得免疫応答の場を提供する。二次リンパ器官が効率的に機能するためにはその微細構造形成が必須である。二次リンパ器官の微細構造において特徴的なのは、B、T リンパ細胞がそれぞれ B 細胞濾泡と T 細胞領域に分かれて存在することである。B 細胞濾泡は B 細胞と濾泡樹状細胞などの濾泡ス

トローマ細胞により構成され、効率的な獲得免疫応答に重要な領域である。

二次リンパ器官の微細構造形成には、NF- κ B を活性化するリンホトキシン β レセプターシグナル伝達経路 (LT $\alpha_1\beta_2$ →LT β R→NIK→IKK α →NF- κ B2→RelB) や TNFR1 シグナル伝達経路 (TNF→TNFR1)が必要であることが報告されてきた (図 1)。特に、B 細胞濾泡の形成および維持には、ストローマ細胞 (濾泡樹状細胞) のケモカイン CXCL13 と B 細胞に発現する

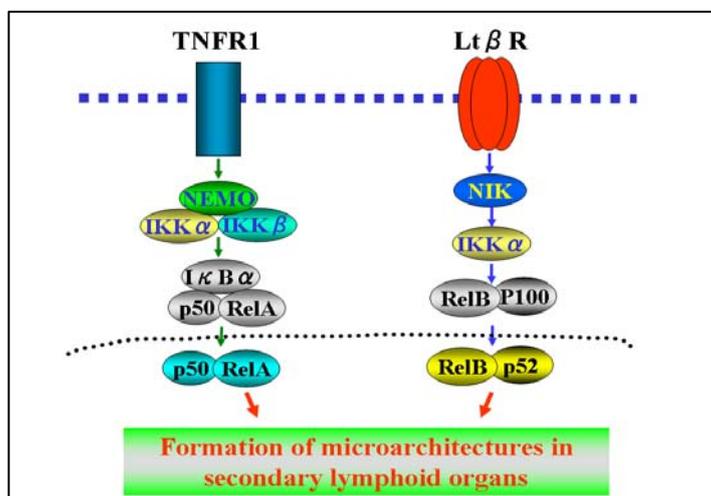


図 1 TNFR1 シグナル伝達経路とリンホトキシン β レセプターシグナル伝達経路は二次リンパ器官の微細構造形成に必須である。

そのレセプター CXCR5、および B 細胞上のリンホトキシンとストローマ細胞 (濾泡樹状細胞) に発現するリンホトキシン β レセプターからなる正のフィードバック制御機構が重要

な役割を担っていることが示唆されてきた（図 2）。しかしながら、現在まで二次リンパ器官の微細構造形成、特に B 細胞濾胞の形成、維持に関する分子メカニズムの全貌はまだ解明されていない。

TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)は、様々な細胞表面レセプターからのシグナルを細胞内で伝達して、転写因子 NF- κ B や AP-1 の活性化を誘導し、細胞の増殖や分化を制御するアダプタータンパク質であること

ことが知られている。TRAF6 は一次リンパ器官である骨髄腔の形成や胸腺髄質の微小環境形成に不可欠であり、TRAF6 により制御される胸腺内の微小環境は自己免疫寛容に必須であることが当研究室においてすでに明らかとなっている。また、二次リンパ器官であるリンパ節の形成に TRAF6 は必須な因子であることも当研究室より解明されている。これらの事実から、TRAF6 依存性シグナル伝達経路は様々なリンパ器官の発生や微小環境の構築において機能することが予想された。しかしながら、二次リンパ器官の微細構造形成における TRAF6 の役割はまだ明らかにされていない。そこで、本研究では、TRAF6 欠損マウスを用いて、TRAF6 の二次リンパ器官の微細構造形成(特に、B 細胞濾胞の形成や維持)に関する解析を行った。

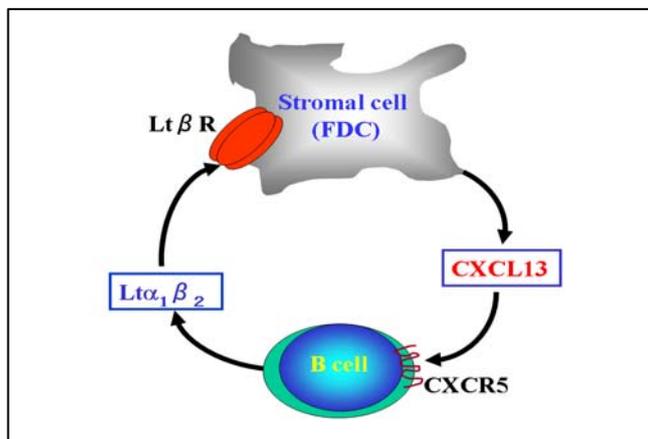


図 2 B 細胞帰巢性の正のフィードバック制御機構

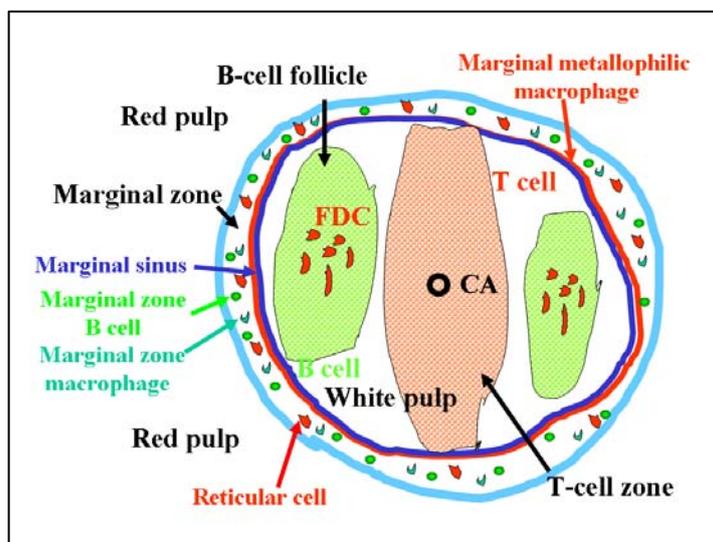


図 3 脾臓微細構造図

脾臓は赤脾髄、白脾髄、辺縁部三つの部分より構成される。それぞれ、白脾髄は B 細胞濾胞、T 細胞領域より、辺縁部は辺縁部 B 細胞、辺縁部マクロファージなどより構成される（図 3）。TRAF6 の脾臓微細構造に及ぼす影響を明らかにするために、生後 2 週齢の TRAF6 欠損マウスを用いて、組織学的および免疫組織化学的な解析を行った。その結果、赤脾髄では異常が観察されなかった。一方、白脾髄では T 細胞領域が認められるもの

の、獲得免疫応答に重要である B 細胞濾胞や濾胞樹状細胞の存在を確認することができなかった。さらに、B 細胞数の減少も明らかになった。また、辺縁部の欠損も判明した。以上の結果から、TRAF6 は脾臓の微細構造の構築に必須な因子であることが明らかになった。

TRAF6欠損マウス表現型解析の結果はすでに報告されている TNFR1 シグナル伝達経路に関わる因子 (TNF α 、TNFR1) やリンホトキシン β レセプターシグナル伝達経路に関わる因子 (リンホトキシン α 、リンホトキシン β レセプター、NIK や RelB など) の欠損、変異マウスの表現型と類似している。

次に、B 細胞濾泡形成の時間的推移を詳細に検討した。野生型マウスでは、生後3日目から B 細胞は血管の周囲に集め、B 細胞の集団と濾泡樹状細胞が見られ、8日目から B 細胞濾泡の形成が始まる。TRAF6欠損マウスにおける濾泡樹状細胞と B 細胞の集団形成は、野生型と比較して生後8日目まで相違が認め

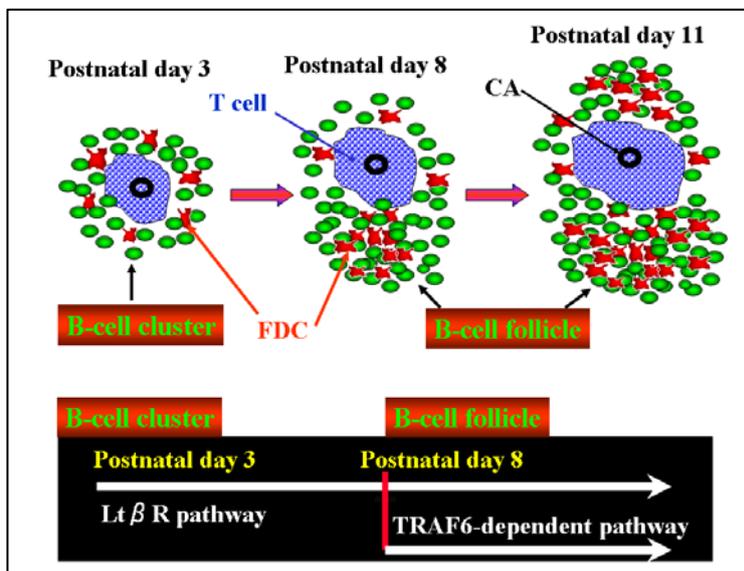


図 4 B 細胞濾泡形成時間的推移

られなかった。しかしながら、生後8日目の TRAF6欠損マウス

では濾泡状の構造と濾泡樹状細胞が認められたが、生後11日目には B 細胞濾泡の維持ができず、生後14日目には B 細胞濾泡、濾泡樹状細胞ともに完全に消失した。一方、リンホトキシン β レセプターシグナル伝達経路に関わる因子の欠損、変異マウスであるリンホトキシン α 欠損マウス、NIK 点変異マウスである *aly/aly* マウス、RelB 欠損マウスでは、TRAF6欠損マウスの表現型と類似しているものの、生後8日目までに起きる B 細胞の集団化とそれに伴う濾泡樹状細胞の分化が起こらず、それ以降の B 細胞濾泡形成も認められなかった。したがって、TRAF6 は B 細胞濾泡形成過程における初期からの B 細胞集団化 (3日目から)

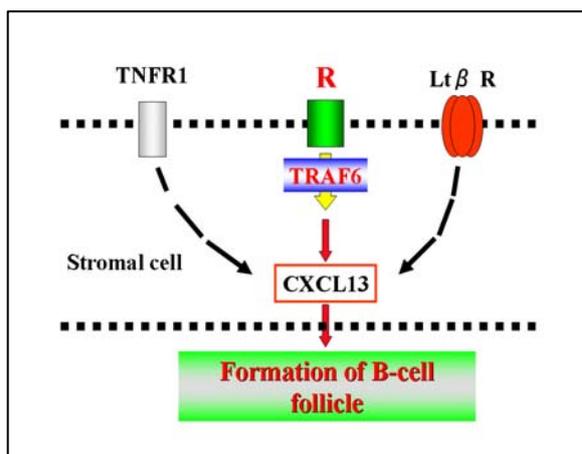


図 5 B 細胞濾泡形成シグナル伝達経路

に必要ではなく、その後 (8日目から) の B 細胞濾泡形成と維持に必須であることを明らかとなった。これに対して、リンホトキシン β レセプターシグナル伝達経路は生後初期からの B 細胞集団化にも必須 (図 4) であることから、TRAF6 はリンホトキシン β レセプターシグナル伝達経路に関与しない可能性が示唆される。実際、TRAF6 欠損 MEF 細胞を用いて解析したところ、TRAF6 はリンホトキシン β レセプターシグナル伝達経路で機能しないことが明らかとなった。

TNFR1 シグナル伝達経路も B 細胞濾泡形成に必須であることが報告されてきた。しかしながら、TRAF6 欠損マウスでは、TNF α 、

TNFR1、リンホトキシン α 、リンホトキシン β 及びリンホトキシン β レセプターの発現に野生型と相違が認められなかった。TRAF6 は TNFR1 からのシグナル伝達経路にも関与しないことがすでに明らかになっていることから、B 細胞濾胞形成、維持を制御する機構には、少なくとも 3 種類のシグナル伝達経路があることを示している。すなわち、TNFR1 シグナル伝達経路、リンホトキシン β レセプターシグナル伝達経路、TRAF6 依存性シグナル伝達経路が B 細胞濾胞形成、維持を制御することが明らかとなった (図 5)。

B 細胞濾胞は B 細胞と濾胞樹状細胞等の濾胞ストローマ細胞より構成される。これまでにどちらかの異常により B 細胞濾胞の形成や維持ができなくなることが知られている。TRAF6 欠損マウス B 細胞濾胞の異常が、B 細胞などリンパ球に原因があるのか、ストローマ細胞に原因があるか、または両方に関わるかについて検討を行った。TRAF6 欠損マウスの脾臓では B 細胞が減少する。そこで TRAF6 欠損マウス B 細胞濾胞形成各段階の B 細胞、濾胞樹状細胞を分離して解析したところ、B 細胞上の CXCR5、TNF α 、リンホトキシン α 、リンホトキシン β 、濾胞樹状細胞上の TNFR1、リンホトキシン β レセプターの発現異常が認められなかった。また、胎生 14 日目の TRAF6 欠損マウス肝臓由来の造血幹細胞を、あらかじめ致死量放射線照射した T、B 細胞を持たない RAG2 欠損マウスに移植したところ、B 細胞濾胞の再構築については野生型と相違が認められなかった。一方で TRAF6 欠損 B 細胞を RAG2 欠損マウスに移植すると、B 細胞濾胞の形成が確認されたが、大量の野生型 B 細胞を TRAF6 欠損マウスに移植しても、B 細胞濾胞の回復が認められなかった。以上の結果から、TRAF6 欠損マウス B 細胞濾胞の異常が B 細胞に起因せず、X 線照射に抵抗性がある濾胞ストローマ細胞に起因することを示している。

B 細胞濾胞の形成、維持には B 細胞と濾胞樹状細胞のコミュニケーションが必須である。濾胞樹状細胞はケモカイン CXCL13 を発現することで、B 細胞を誘引し、B 細胞濾胞を形成、維持する。そこで、B 細胞濾胞形成各段階において、TRAF6 欠損マウス脾臓中の濾胞樹状細胞で発現する CXCL13 の発現変化を検討した。その結果、生後 5 日目で CXCL13 発現は TRAF6 欠損マウスと野生型マウスでほとんど差がないが、生後 8 日目以降で CXCL13 発現が有意に減少した。これらの結果は CXCL13 の発現誘導は生後 8 日目以前には TRAF6 依存性シグナル伝達経路に依存することではなく、生後 8 日目以降では CXCL13 の発現は TRAF6 依存性シグナル伝達経路に依存することを示唆している。

この制御機構が、他の二次リンパ器官でも機能するのかを調べるため、TRAF6 欠損マウスのパイエル板の微細構造形成について検討を行なった。パイエル板は腸管壁上に存在する二次リンパ器官であり、腸管免疫特に粘膜免疫に重要な役割を担っている。TRAF6 欠損マウスにおけるパイエル板の B 細胞濾胞形成の時間的推移やケモカイン CXCL13 の発現について解析を行った。その結果、脾臓と類似する表現型が判明した。

本研究で、TRAF6 依存性シグナル伝達経路は二次リンパ器官のストローマ細胞において、濾胞ストローマ細胞 (濾胞樹状細胞) の CXCL13 の発現を誘導し、B 細胞濾胞の形成に機能すること (図 5)、さらに TRAF6 依存性シグナル伝達経路は、二次リンパ器官の発生段階でリンホトキシンシグナル伝達経路と異なる時期で作動し、B 細胞濾胞の形成や維持を制御することを明らかにした (図 4)。