

論文の内容の要旨

論文題目 Toll 様受容体 7 リガンドによる B 細胞活性化機構の解析

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 17 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

・本裕美子

【背景】

B 細胞は抗体を産生し外来抗原を認識・排除する機構を持つ。CSR は、抗体の抗原に対する特異性を変化させずにその機能を変化させ生体から外来抗原を効率的に排除する過程である。ヒトにおいて CSR が欠失した場合には高 IgM 症候群と呼ばれる病態を呈し、易感染性となる。その機構は段階的に進行することが知られているが、未だに解明されていない部分も残されている。

A. 抗 CD38 抗体刺激系とは

CD38 は B 細胞、T 細胞表面に発現している II 型の膜貫通蛋白質である。そのリガンドは濾胞樹状細胞に発現しているとされる。抗 CD38 抗体（クローン：CS/2）により B 細胞表面上に発現している CD38 を架橋すると、細胞増殖などを誘導する。その際活性化されるシグナルは BCR 刺激時のシグナルと類似している。

B. グアノシンの置換体とは

8-メルカプトグアノシン (8-SGuo) などのグアノシン置換体は B 細胞の増殖、分化を誘導することは以前より報告がなされており、当初は T 細胞様の刺激を B 細胞に与える分子であるとされていた。しかし、8-SGuo が CSR を直接的に誘導するか否か、またその B 細胞活性化機構は不明である。

C. TLR7 とは

Toll 様受容体 (TLR) は自然免疫系において主に解析が為されている受容体である。BCR とは異なり、病原体が固有に持つパターンを認識することで外来の病原体を排除し、生体防御に寄与する。TLR7 の場合には一重鎖 RNA やグアノシンの置換体などをリガンドとして認識するとされている。TLR7 は MyD88 をアダプター分子としてシグナルを伝達する。

TLR7 刺激によりマクロファージや樹状細胞は炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生を誘導する。また近年 B 細胞における TLR7 の活性化についても研究が行われ、BXSB/Yaa マウスにおいては TLR7 の遺伝子重複のために自己抗体の産生が誘導され自己免疫疾患を発症することが明らかとなっており、B 細胞における研究の重要性が増している。

試験管内で CSR を誘導する場合には B 細胞増殖を促すマイトーゲン、およびサイトカインを加える。クラススイッチを惹起するサイトカインには IL-4 や IL-5 が存在する。試験管内の実験では抗 CD40 抗体と IL-4 による共刺激系などを使用する 경우가多く、IL-4 はクラススイッチファクターとも称される。IL-5 もまた抗 CD40 抗体との共刺激系において IgG1 への CSR を惹起することができる。

IL-5 により IgG1 産生細胞への分化を誘導する系としてユニークなものが抗 CD38 抗体との共刺激系である。抗 CD38 抗体をマイトーゲンとして用いた場合は IL-5 との共刺激によって IgG1 特異的に CSR を誘導することができる。しかし興味深いことに、抗 CD38 抗体と IL-4 との共刺激では CSR を誘導できない。IL-5 によってクラススイッチが惹起されながら IL-4 によって惹起されない例は他には見つかっておらず、極めてユニークな刺激系である。したがって、抗 CD38 抗体を用いた実験系を利用することにより抗 CD40 抗体では見出せなかった CSR に関与する因子を見出せる可能性がある。私はこの点に着目し、抗 CD38 抗体及び IL-4 の刺激系に別種の刺激を加えることで CSR が惹起可能であるか検討を行い、CSR に必要な因子の探索を目指した。別種の刺激として 8-SGuo を候補に選んだ。

【方法と結果】

1. 8-SGuo は IgG1 産生細胞への分化誘導能を持つ

抗 CD38 抗体および IL-4 の共刺激系に候補物質である 8-SGuo を添加することでマウスの脾臓 B 細胞からの IgG1 産生が確認された。

2. 8-SGuo は TLR7 を介してシグナルを伝達する

グアノシンの 7、8 位置換体であるロキシソリビン (Lox) は TLR7 のリガンドとして知られている。そこで、8-SGuo の機能にも TLR7 が関与しているのではないかと考え、TLR7 ノックアウトマウス、MyD88 ノックアウトマウスを用いて解析を行った。その結果、野生型マウスにおいて見られた IgG1 産生細胞への分化がノックアウトマウスの脾臓 B 細胞では確認されず、8-SGuo が TLR7-MyD88 依存的に IgG1 産生細胞への分化を誘導していることが明らかになった。

3. CSR 機構についての解析：8-SGuo は AID の発現を誘導し、IL-4 は DNA の修復を誘導する

抗 CD38 抗体、IL-4、8-SGuo の 3 つの共刺激により CSR を誘導することができるが、抗 CD38 抗体及び IL-4 のみ、もしくは抗 CD38 抗体及び 8-SGuo のみの刺激では CSR を誘導しなかった。したがって、IL-4、8-SGuo はクラススイッチのゲノム DNA 組み替えに必要な因子を互いに相補的に誘導しているのではないかと考えられた。そこで、段階的に進行する CSR の各ステップについて検討を行ったところ、抗 CD38 抗体および IL-4 刺激を与えた場合は AID の発現誘導が見られず、AID を過剰発現させたところ IgG1 への CSR が確認された。一方、抗 CD38 抗体および 8-SGuo 刺激を与えた場合には AID の発現誘導

が見られ、CSR のターゲットとなる領域での DNA 切断までは進行していた。したがって、抗 CD38 抗体、IL-4、8-SGuo の刺激系においては 8-SGuo が AID 発現を誘導し、IL-4 は DNA 切断後の修復を担っているのではないかと考えられる。

4. TLR7 リガンド間の機能比較——8-SGuo と Lox の相違点

今回の研究では 8-SGuo が TLR7 を介して B 細胞にシグナルを伝達していることを明らかにした。したがって、TLR7 リガンドとされる Lox と同様の機能を持つことが推測されるが、解析を行った結果興味深い事実が明らかとなった。

脾臓 B 細胞において抗 CD38 抗体刺激系において 8-SGuo と Lox の機能を比較したところ、いずれも IgG1 産生細胞への分化を誘導した。しかし、8-SGuo、Lox の単独刺激下においては Lox が細胞分裂を誘導したのに対し 8-SGuo はほとんど誘導しなかった。

次にマクロファージ、樹状細胞において 8-SGuo、Lox による刺激を比較した。その結果、Lox によるサイトカイン産生、シグナル伝達経路の活性化は見られたのに対し 8-SGuo によるそれらの反応は見られなかった。

さらにプラズマサイトイド樹状細胞について Lox、8-SGuo 単独刺激の比較を行ったところ、Lox、8-SGuo 共にサイトカインの産生が確認された。

【考察】

1. 8-SGuo は TLR7 を介して IgG1 産生細胞への分化を誘導する

今回の研究から 8-SGuo が TLR7 を介して IgG1 産生細胞への分化を誘導することが明らかになった。抗 CD38 抗体および 8-SGuo による刺激系は生体内においては RNA 複合体を抗原として認識する BCR を発現する B 細胞が、BCR に結合した抗原を細胞内に取り込み、TLR7 により認識され活性化した状態に類似しているのではないかと考えられる。

2. 8-SGuo は抗 CD38 抗体刺激下において AID 発現を誘導し、IL-4 は DNA 修復を誘導する

今回の研究から、8-SGuo は抗 CD38 抗体刺激下において AID 発現を誘導することが明らかになった。また、抗 CD38 および IL-4 の共刺激では AID の発現が見られず、強制発現によって IgG1 への CSR が誘導された。したがって、抗 CD38 抗体、IL-4、8-SGuo による刺激系で 8-SGuo は AID 発現を誘導することで CSR に寄与しているといえる。

また、抗 CD38 抗体および 8-SGuo の共刺激系では CSR は完了しないが、DNA 修復までは進行していた。IL-4 を加えると CSR が完了することから、IL-4 は DNA 修復を誘導することで CSR に寄与していることが示唆される。

DNA 修復が完了しないため CSR が欠損するという現象は高 IgM 症候群 IV 型においても見られる現象であるが、試験管内でこの現象を誘導したのは初めてである。CSR 特異的な DNA 修復にかかわる分子は、その存在が示唆されているものの同定には至っていない。抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo を用いた研究を進めることでこの分子が同定できるのではないかと考えられる。

3. 8-SGuo と Lox の機能の相違点：TLR7 リガンド間の機能比較

今回の研究では、8-SGuo と Lox に細胞により活性化能の相違があることを見出した。樹状細胞やマクロファージにおいて 8-SGuo にはサイトカイン産生能がみられなかったのに対し B 細胞やプラズマサイトイド樹状細胞においては Prdm1 の発現やサイトカイン産生を誘導したことは興味深い。

今回の研究において示された 8-SGuo と Lox の相違点の理由はまだ明らかになっていない。一つの可能性として、TLR7 のリガンド認識に必要な共輔因子が 8-SGuo と Lox では相異なるということが考えられる。このような特性は今後、種々の免疫細胞における TLR7 の機能解析を進めて行くに当たって有用なツールとなると考えられる。