Osaka University Knowledge Archive

Title	ヒトB細胞株のB細胞分化因子依存性IgG産生におけるセリンエステラーゼ活性化の関与
Author(s)	三木, 善次
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33953
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【35】

氏名・（本籍）	三木善次（みきよしつぐ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6415 号
学位授与の日付	昭和59年3月24日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ヒトB細胞株のB細胞分化因子依存性IgG産生におけるセリンエステラーゼ活性化の関与**
論文審査委員	（主査） 教授 岸本 進 （副査） 教授 岸本 忠三 教授 濱岡 利之

論文内容の要旨

（目　的）

免疫系は細胞の増殖・分化という基本的なしくみを解く良い材料を与えてくれ，又その理解は免疫系制御の実現をもたらしてくれる。その視点より，成熟B細胞が抗体産生細胞に至る分化過程に着眼した。しかし正常B細胞は，サブセットや分化段階が不均一であるため，その分子論的な解析が困難である。そこで，もし単クローンの細胞集団であるB腫瘍細胞やB細胞株が外からのシグナルに反応して別の分化段階に活性化されうるならば，B細胞分化機構を物質レベルで論じる良いモデルとなる。我々はB細胞分化因子（BCDF）に反応して抗体産生細胞に至るヒトEBトランスフォームB細胞株を見い出し，その活性化のsubcellularな解析を試みた。そして，その手がかりとして刺激依存性のセリンエステラーゼの関与を調べた。

（方法ならびに成績）

ヒトB細胞株，CESSは細胞表面にIgGを持ち，約1％の細胞がIgGを分泌している。この細胞をBCDFとともに培養し，reverse plaque法でIgG産生細胞を算定した。BCDFは扁桃腺からの単核細胞を0.1％PHAで48時間刺激した上清を硫安分画（80％飽和）後，ゲル沪過（sephadexG−100）を行い，分子量15K〜20Kの分画を用い，1×10^{6}の細胞より得られたものを1uとした。その結果，B−CDF（10u／mℓ）で48的間刺激することで，約5〜10％の分泌細胞の増加をみた。

その際，10^{-4} Mのhydroxyureaによって細胞分裂を止めても分泌細胞の増加に変化がなかったことは，BCDFによる抗体産生細胞への分化過程に細胞分裂は必要でないことを示している。CESSがBC−DFに対するレセプターを有することは，先の15K〜20K分画中のBCDF活性がCESS細胞で特異

的に吸収されることから明らかにされた。よって，このＣＥＳＳを用いて，ＢＣＤＦレセプターを介するシグナル伝達機構の解析を試みた。

まず，ＣＥＳＳをＢＣＤＦで刺激すると同時に，セリンエステラーゼの特異的活性阻害剤であるdiisopropylfluorophosphate（ＤＦＰ）又はphenylmethylsulfonylfluoride（ＰＭＳＦ）を10^{-3}Ｍの濃度で加えると，その IgG 産生誘導は完全に抑制されることが示された。しかもその阻害効果は10^{-3}Ｍ～10^{-5}Ｍの範囲で濃度依存的で，ＤＦＰやＰＭＳＦの存在はＣＥＳＳの生存率に影響を与えなかった。このことは，ＢＣＤＦによるＣＥＳＳの活性化にセリンエステラーゼが関与することを示すものである。さらに，ＤＦＰと同じくセリンエステラーゼの活性中心をリン酸化するp－nitrophenylethylpentyl－phosphonate(10^{-4}Ｍ～10^{-6}Ｍ）によっても IgG 産生誘導は阻害されるが，リン酸化能のないＤＦＰの類似体 diisopropyl methylphosphate（10^{-3}Ｍ～10^{-5}Ｍ）では阻害されないことで確かめられた。一方，ＤＦＰによる IgG 産生の抑制は，ＤＦＰをＢＣＤＦと共に加えた時のみ起り，ＤＦＰで前処理したC－ＥＳＳをＢＣＤＦで刺激しても IgG 産生は抑制されなかった。これはセリンエステラーゼの活性化がＢＣＤＦ刺激に依存していることを示している。このことを thymidine block 法で同期したＣＥＳＳを用いて確かめた。ＣＥＳＳを thymidine（750 μＭ）とともに16時間培養し同期させ，thymidineを洗い去った後，^{3}Ｈ－thymidineの取り込み及び mitotic indexを調べ細胞分裂周期のＳ期及びＭ期を同定した。その結果，細胞分裂周期は約13時間で，同期した細胞は thymidine block 解放後７時間で metaphase に入ることが示された。その各細胞分裂周期毎にＢＣＤＦで２時間刺激し，ＢＣＤＦを洗い去った後48時間培養を行ない IgG 分泌細胞を算定した。そして thymidine block 解放後，Ｓ，G_2，Ｍ期にある細胞はＢＣＤＦに応答せず，G_1期（解放後８～12時間）に入ったものがＢＣＤＦに反応することがわかった。

そこでG_1期以前にＢＣＤＦとＤＦＰを共存させても，洗い去ればG_1期におけるＢＣＤＦに対する反応は阻害されないが，G_1期にＢＣＤＦとＤＦＰを共存させるとＣＥＳＳは活性化されず，その状態では洗い去ってもＢＣＤＦ応答性は回復しないことが示された。このことはG_1期にＢＣＤＦで活性化されたセリンエステラーゼをＤＦＰが非可逆的に阻害したため，その細胞はもはやＢＣＤＦレセプターからのシグナルを伝えることができなくなったものと考えられる。さらに，ＢＣＤＦで活性化されるセリンエステラーゼの基質特異性を調べるために，いくつかのアミノ酸誘導体の影響を調べた結果，N－acetyl－Ｌ－alanyl－Ｌ－alanyl－Ｌ－alanine methyl ester（ＡＡＭＥ）がＢＣＤＦによる IgG 産生誘導を有意に抑制した。

（総　括）

ＢＣＤＦに反応し抗体産生細胞に至るヒトＢ細胞株，ＣＥＳＳを見い出し，その細胞を用いてBCDFレセプターを介するシグナル伝達機構を解析した。その過程にセリンエステラーゼの活性化が関与することが，その特異的阻害剤であるＤＦＰを用いて明らかにされた。さらにＣＥＳＳは細胞分裂周期中G_1期にＢＣＤＦ応答性を示し，G_1期にＢＣＤＦがレセプターに結合した時にセリンエステラーゼが活性化されることが示された。

論文の審査結果の要旨

本研究は，均一なモノクローナルヒトB細胞を用いてT細胞由来分化因子がレセプターを介してIgG産生へと最終分化を誘導する過程にセリンエステラーゼの活性化が必要であることを明らかにしたものであり，B細胞の分化について新しい知見を加えたものである。
この様な研究は，細胞の増殖，分化を通じてその機能を営む免疫系の制御を考える上で有用な情報を提供する。