

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33953">https://hdl.handle.net/11094/33953</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	三 木 善 次
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 転写形式 B 細胞株を見出し、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酸分画 (80% 飽和) 後、ゲル濾過 (sephadex G-100) を行い、分子量 15K~20K の分画を用い、 $1 \times 10^6$  の細胞より得られたものを 1u とした。その結果、BCDF (10u/ml) で 48 時間刺激することで、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 BCDF 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 diisopropyl fluorophosphate (DFP) 又は phenylmethylsulfonyl fluoride (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-nitrophenylethylpentylphosphonate ( $10^{-4}$  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CESS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  $\mu$ M) 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<sub>2</sub>、M期にある細胞はBCDFに反応せず、G<sub>1</sub>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<sub>1</sub>期以前にBCDFとDFPを共存させても、洗い去ればG<sub>1</sub>期におけるBCDFに対する反応は阻害されないが、G<sub>1</sub>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<sub>1</sub>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<sub>1</sub>期にBCDF応答性を示し、G<sub>1</sub>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。

このような研究は、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。