

Title	細胞外基質および間質細胞への活性化B細胞の接着機構
Author(s)	磯田, 竜太郎
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38058
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	磯田 竜太郎
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 10690 号
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	細胞外基質および間質細胞への活性化 B 細胞の接着機構
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 宏 (副査) 教授 作田 正義 助教授 滝川 正春 助教授 小川 知彦

論文内容の要旨

慢性の炎症性疾患では、その炎症部位にリンパ球を主体とする炎症細胞浸潤が認められる。しかしその炎症局所への定着機構についてはいまだ不明な点が多い。一方近年、細胞接着分子 (CAM) についての研究が進み、種々の免疫反応に CAM が関与していることが明らかにされてきている。さらにある種の CAM は、生体内に広く分布する細胞外基質 (ECM) をそのリガンドとして利用していることも報告されている。そこで今回、B 細胞がどのような分子機構により ECM 及び間質細胞に対する接着能を獲得し得るのかを明らかにすることにより、B 細胞の炎症局所における集積、定着機構を解明することを目的とし、以下の実験を行った。

実験は最終分化段階に近い B 細胞のモデルとして、mouse B cell lymphoma である CH 12 と mouse B cell leukemia line である BCL₁ を用いた。これらの B 細胞の活性化には Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、E.coli 由来の lipopolysaccharide (LPS) を用いた。さらにこれら B 細胞の間質細胞に対する接着について検討するためマウス由来の fibroblast line である BALB/3T3 およびマウス骨髄由来の stromal cell line である BMS 2 を用いた。ECM としてはフィブロネクチン (FN) とヒアルロン酸 (HA) に着目して実験に供した。B 細胞の ECM 及び間質細胞に対する接着能の検討は、これらの細胞を⁵¹Cr にて標識し、上述の ECM をコーティングした 24 穴浮遊細胞用プレートまたは間質細胞をコンフルエントに近い状態まで培養した 24 穴細胞培養用プレート上に投入し、37°C にて 30 分間培養した後これらのプレートに接着した細胞の放射活性を測定することにより評価した。またこれらの接着がいかなる分子を介している現象であるかを明らかにするために、この系に種々の CAM に対する特異的モノクローナル抗体 (mAb) を加えてこの接着を阻害する実験を行った。また CAM の細胞表面上での発現は Flow cytometry により解析した。

PMA によって活性化された CH 12 の FN および HA に対する接着能の経時的变化を調べたところ、FN に対する接着能は PMA 刺激後急速に上昇し、15 分刺激時には早くもピークに近いレベルに達し、その後 4 時間刺激時まで徐々に上昇した後次第に失われていった。一方、HA に対する接着能はこれとは対照的に PMA 15 分刺激時には急激に失われ、その後 4 時間刺激時迄は同様なレベルを維持するが、その後徐々にその接着能は上昇した。そして FN に対する接着能が活性化以前のレベルを下回った 12 時間刺激時には HA に対する接着能はほぼピークに達し、その後しばらく一定のレベルを示した。さらに BCL₁ においてもほぼ同様な ECM に対する接着パターンを示すことが解った。

CAM に対する mAb による阻害実験から、FN に対する接着は抗 VLA-4 mAb である PS/2 によって、また HA

に対する接着は抗 CD44 mAb である KM201 によって特異的に阻害され、活性化 B 細胞は VLA-4 分子を介して FN に接着し、CD 44 分子を介して HA に接着することが確認された。

次にこれらの接着分子の細胞表面の発現量について検討したところ、VLA-4 分子の発現量は PMA 刺激によってもほとんど変化せず、他方 CD 44 分子の発現量は PMA 16 時間刺激時には大きく上昇しており、FN への接着能の増強には細胞表面の VLA-4 分子の発現量の増加は伴わず、HA に対する接着能の上昇には CD 44 分子の発現レベルの上昇が寄与している可能性が示唆された。

さらにこのような B 細胞の ECM への接着が、生理的刺激及び細菌感染により影響されるか否かを検討するために、IL-4, IL-5, あるいは LPS 処理が BCL₁ の FN および HA に対する接着に影響するかどうかを検討した。その結果、IL-5, 及び LPS は PMA 刺激と同様なパターンの接着能の変動を誘導した。特に HA との接着は刺激後 3~4 日目まで上昇を続け、PMA の場合に比較し、より強固な HA との接着を誘導し得た。IL-4 については FN に対しても HA に対しても著明な B 細胞の接着能の上昇は誘導できなかった。

以上の知見をふまえて、B 細胞と間質細胞 (BMS 2 および BALB/3T3) との接着機構を検討するため、間質細胞に対する CH 12 及び BCL₁ それぞれの接着の種々の CAM に対する mAb で阻害する実験を試みた。その結果 PMA 4 時間刺激時の B 細胞と BMS 2 の接着は PS/2 によって効果的に阻害されるが、16 時間刺激時では PS/2 による阻害効果は弱まり、むしろ KM 201 によって効果的に阻害されるようになった。このことは B 細胞の PMA による活性化の初期には VLA-4 分子を介して、後期には CD 44 分子を介して、B 細胞は間質細胞と接着していることを強く示唆している。

しかし間質細胞を BALB/3T3 に変えると KM 201 の効果は検出されず、間質細胞の種類により関与する接着経路が一様でないことが示唆された。

以上の結果より、活性化 B 細胞の ECM との接着機構において B 細胞の活性化の初期と後期の段階でその時間的経過に伴い、異なる CAM の接着能を個々に変化させていることが明らかになった。これら CAM の同様な使い分けが B 細胞と間質細胞との接着においても観察された。今回の研究により B 細胞はサイトカインや細菌由来の LPS などの刺激をうけて活性化されることにより、VLA-4 や CD 44 を介した接着能が亢進し、このような変化が B 細胞が炎症巣へ定着する際に主要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は B 細胞の細胞外基質および間質細胞に対する接着機構について解析し、B 細胞の刺激時間の経過とともに、その初期には VLA-4 分子がそして後期には CD 44 分子が機能的に活性化され、細胞外基質や間質細胞に対する接着を担うことを明らかにした。これは B 細胞が刺激された際に、B 細胞上の異なる細胞接着分子の各々のリガンドに対する接着能の獲得および喪失が相補的に制御され得ることを初めて明らかにしたものである。これらの知見は炎症部位への B 細胞の集積、定着の分子機構を知るための手がかりを与えるものであり、本研究は博士 (歯学) の学位請求に充分値するものと認める。