



| | |
|--------------|---|
| Title | B細胞分化におけるgp130からの情報伝達経路の役割 |
| Author(s) | 前田, 密 |
| Citation | 大阪大学, 2001, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42652 |
| 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。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | まえ だ ひそか 前 田 密 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 6 0 5 2 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 13 年 3 月 23 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科病理系専攻 |
| 学 位 論 文 名 | B 細胞分化における gp130 からの情報伝達経路の役割 (Roles for gp130-mediated signal transduction pathways in B cell differentiation) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 菊谷 仁 教 授 宮坂 昌之 |

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

IL-6 ファミリーサイトカインは、共通の受容体 gp130 を介して細胞内に情報を伝達する。リガンドの結合は gp130 分子の二量体形成、JAK キナーゼの活性化を誘導し、その結果 gp130 の細胞質部分のチロシンがリン酸化される。ヒト gp130 の N 末端より 759 番目のチロシン残基はチロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 のリン酸化に必須であり、YXXQ モチーフを持つ 4 つのチロシン残基 (767、814、905、915 番目のチロシン残基) のうち少なくとも 1 つは、転写因子 STAT3 のリン酸化に必須である。SHP-2 は、Grb2 / Sos あるいは Gab1 / Gab2 を介して MAP キナーゼ ERK を活性化する。一方、リン酸化された STAT3 は二量体を形成して核内に移行し、遺伝子発現を制御する。SHP-2 と STAT3 を介するシグナルは種々の細胞で生存・増殖・分化の制御に関与している。

In vitro および変異マウスの解析により IL-6 は後期 B 細胞に作用して、抗体産生細胞への分化を誘導し、形質細胞の増殖を誘導することが明らかにされている。腫瘍病理学教室では gp130 の情報伝達経路の生体反応における役割を解明するために gp130 から STAT3 を介した経路と SHP-2 を介した経路がそれぞれ選択的に遮断された gp130 変異ノックインマウス (それぞれ *gp130^{FXXQ/FXXQ}* および *gp130^{F759/F759}*) を作成し解析してきた。抗体産生反応の解析では、*gp130^{F759/F759}* マウスにおいて胸腺依存性抗原特異的な IgG2a と IgG2b の産生が亢進していた。一方、*gp130^{FXXQ/FXXQ}* マウスの胎仔肝細胞で再構成したマウスにおいては、血中 IgG2a・IgG2b 濃度の減少と、胸腺依存性抗原特異的な IgG2a と IgG2b の産生低下が認められた。これらの結果は、生体内の抗体産生反応における STAT3 の中心的役割と、SHP-2 による抑制性制御機構の存在を示唆する。そこで本研究においては gp130 から STAT3 および SHP-2 を介する情報伝達経路の *in vitro* B 細胞分化における役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

細胞質部分の YXXQ モチーフを持つすべてのチロシン残基または 759 番目のチロシン残基がそれぞれフェニルアラニンに置換されるような変異を導入することによって、STAT3 または SHP-2 を介する情報伝達経路が選択的に遮断されたヒト gp130 遺伝子ノックインマウス (それぞれ *gp130^{FXXQ/FXXQ}* および *gp130^{F759/F759}*) とその対照マウス (ヘテロ接合体あるいは野生型ホモ接合体) を用いた。*gp130^{FXXQ/FXXQ}* マウスは生後 1 日で死亡するため、胎生 14.5 日の肝臓細胞を致死量 X 線照射した B6 / C3 HF1 マウスに移入し、8 週以降経過した再構成マウスを利用した。マウス脾臓細胞にマイクロビーズ標識抗 CD45R 抗体を反応させ、マグネチックカラムを用いて B 細胞 (純度: 95% 以上

IgM 陽性) を調整した。静止期の細胞として、Percoll の不連続密度勾配遠心法 (Percoll 濃度70%と60%の間) により分離した高密度の細胞を用いた。gp130及び CD40を介した細胞刺激には、IL-6 と IL-6 受容体 α 鎖の融合タンパク IL-6 /sIL-6 R (100ng/ml) 及び抗 CD40モノクローナル抗体 (1 μ g /ml) を用いた。STAT3・SHP-2・MAP キナーゼ ERK の活性化は、イムノブロットにより検出した。抗体産生量、抗体産生細胞数をそれぞれアイソタイプ特異的 ELISA・ELISPOT 法で算定した。

【成績】

1. B細胞における gp130からの情報伝達。

まず gp130^{FXXQ/FXXQ} 胎仔肝再構成マウスおよび gp130^{F759/F759} マウスの脾臓B細胞 (以下それぞれ FXXQB 細胞、F759B 細胞と略) における gp130刺激依存性のチロシンリン酸化を調べたところ、FXXQB 細胞では STAT3 の、そして F759B 細胞では SHP-2 のチロシンリン酸化が選択的に阻害されていた。また F759B 細胞では STAT3 のリン酸化が著明に遷延していた。しかしプロB細胞株や線維芽細胞と異なり MAP キナーゼ ERK の活性化は対照脾臓B細胞においても認められなかった。一方、抗 CD40抗体による刺激では、FXXQ、F759、対照いずれのB細胞においても ERK の活性化は同等に誘導されたことから、マウス脾臓B細胞においては gp130刺激を介して SHP-2 から ERK にいたる情報伝達経路は作動していないことが明らかとなった。

2. gp130からの刺激により FXXQB 細胞では抗体産生が誘導されないのに対し、F759B 細胞では IgG 2a と IgG 2b の抗体産生量が増強する。

gp130から STAT3 を介した情報伝達経路の抗体産生における役割を明らかにするために、FXXQ 高密度B細胞を IL-6 /sIL-6 R 存在下に培養し、上清中の抗体量を測定した。対照高密度B細胞では IL-6 /sIL-6 R の単独刺激により IgM・IgG 1・IgG 2a・IgG 2b・IgG 3すべてのアイソタイプの抗体産生が誘導されたのに対して、FXXQ 高密度B細胞では、全てのアイソタイプの抗体産生が認められなかった。対照高密度B細胞の抗 CD40抗体単独刺激で誘導される IgM 産生および IL-6 /sIL-6 R と抗 CD40抗体の共刺激による IgM 産生増強効果も、FXXQ 高密度B細胞ではほとんど認められなかった。

次にgp130刺激による F759高密度B細胞の抗体産生を解析したところ、IL-6 /sIL-6 R の単独刺激による IgM の産生量は対照高密度B細胞と差がなかった。しかし IgG 2a と IgG 2b クラスの抗体産生量は、対照の2倍以上に亢進していた。一方、抗 CD40抗体単独刺激および IL-6 /sIL-6 R と抗 CD40抗体の共刺激でも IgG 2a・IgG 2b クラスにおいて F759B 細胞の抗体産生量の増強傾向が認められた。これらの結果により gp130から STAT3 を介した情報伝達経路の抗体産生反応における重要性が明らかとなり、F759B 細胞における STAT3 の活性化の遷延が、IgG 2a・IgG 2b クラスの抗体産生反応の増強に関与する可能性が示唆された。

3. F759B 細胞における gp130依存的抗体産生の亢進は、クラススイッチしたB細胞の抗体産生細胞への分化促進による。

種々の細胞株を用いた解析により STAT3 には、抗アポトーシス作用、細胞周期 G1-S 期移行促進作用、B細胞分化誘導作用、形質細胞増殖促進作用のあることが明らかとなっている。そこでまず高密度B細胞の gp130依存性増殖反応をトリチウムチミジンの取り込みによって調べたところ、F759高密度B細胞は対照と同様、IL-6 /sIL-6 R 刺激によって増殖反応は誘導されなかった。また、F759と対照いずれの高密度B細胞においても IL-6 /sIL-6 R 刺激による抗アポトーシス作用は認められなかった。B細胞から抗体産生細胞への分化については、F759および対照高密度B細胞を IL-6 /sIL-6 R 存在下に5日間培養し、誘導された抗体産生細胞の数を ELISPOT 法にて調べた。その結果、IgG 2a および IgG 2b 抗体産生細胞の数が、それぞれ対照の1.6倍、5.4倍と有意に増加していたことから、F759高密度B細胞においては、STAT3 の抗アポトーシス作用、増殖促進作用ではなく、分化誘導作用が亢進している可能性が示唆された。

次に、この抗体産生細胞数の増加が、調整した脾臓高密度B細胞分画に存在している形質細胞あるいはクラススイッチした細胞の数、B細胞に誘導されるクラススイッチあるいは分化、いずれの差によるものかを検討する実験を行った。まず脾臓高密度B細胞分画より Syndecan-1 陽性の形質細胞をマグネチックカラムで除去しても F759高密度B細胞の gp130の刺激依存性に誘導される IgG 2a および IgG 2b クラスの抗体産生量はほとんど減少せず、対照より高値であったことから、F759脾臓高密度B細胞分画に形質細胞がより多く存在しているという可能性は否定され

た。しかし、脾臓高密度B細胞分画より Syndecan-1 陽性細胞と細胞表面 IgG 陽性細胞を除去すると F759 と対照の高密度B細胞から誘導される IgG 2a・IgG 2b クラスの抗体産生量に差がなくなり、また、産生量も著明に低下した。これらの結果により、F759 高密度B細胞における gp130 刺激依存性抗体産生反応の増強は、すでにクラススイッチしたB細胞の分化促進によってもたらされることが明らかとなった。

【総括】

gp130 を刺激することによって誘導される脾臓高密度B細胞の抗体産生反応は、主にクラススイッチしたB細胞における STAT3 の分化誘導作用によって担われていることが明らかとなり、*gp130^{F759/F759}* 変異B細胞における IgG 2a と IgG 2b クラスの抗体産生細胞への分化の促進に、STAT3 活性化の遅延が関与する可能性が示唆された。gp130 依存性のB細胞分化において STAT3 を介する経路が中心的役割を担い、SHP-2 を介する経路がその抑制性制御に関与していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、IL6 ファミリーサイトカイン受容体の共通コンポーネントである gp130 から STAT3 及び SHP-2 を介した情報伝達経路のB細胞分化における役割を検討したものである。活性化されたB細胞が IL-6 に反応して抗体産生細胞に分化する機序に関する報告は数多くあるが、gp130 からの情報伝達経路の役割は明らかではない。今回 gp130 からの情報伝達経路を選択的に遮断したノックインマウス由来の脾臓B細胞を用いることで、STAT3 経路が細胞の増殖誘導なしに抗体産生細胞への分化に重要な役割を果たしていることと、SHP-2 経路がその機能を抑制的に制御していることを明らかにした。またマウスからのB細胞調整において、形質細胞を除去した高密度B細胞でも gp130 依存的な刺激にて抗体産生は誘導されたが、表面 IgG 陽性細胞と形質細胞を除去した高密度B細胞では抗体産生をほとんど誘導できないことが示された。しかし gp130 からの刺激が IgG 2a、IgG 2b、IgG 3 の sterile transcription を誘導することを見い出した。これらの結果より gp130 からの刺激では IgM から IgG クラスへのスイッチは誘導できないが、記憶B細胞に作用して抗体産生を惹起する可能性が示唆された。また活性化B細胞のみならず静止期のB細胞も、gp130 の刺激により抗体産生細胞に分化し得ることを示唆した点でも意義深い。それらを示すため本論文は、緻密に計画され、正確な免疫細胞生物学的手法に裏付けられた実験に基づいており、また総じて実験医学研究としての独創性に富んでいるため、博士（医学）の学位授与に値すると判断した。