



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 前田 密
 博士の専攻分野の名称 博士(医学)
 学位記番号 第16052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/C3HF1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-6R (100ng/ml) 及び抗CD40モノクローナル抗体 (1 μg/ml) を用いた。STAT 3・SHP-2・MAPキナーゼERKの活性化は、イムノプ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 $gp130^{F759/F759}$ 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 STAT 3 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 STAT 3 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 STAT 3 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-6R 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-6R 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-6R 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-6R 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-6R 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 STAT 3 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 STAT 3 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 STAT 3 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-6R 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-6R 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-6R 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くことから、F759 高密度 B 細胞においては、STAT 3 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 STAT 3 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 2 b クラスの抗体産生細胞への分化の促進に、STAT 3 活性化の遷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 STAT 3 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、IL 6 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 STAT 3 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、STAT 3 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性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。