

3.3 結果

3.3.1 抗原レセプターと補体レセプターの共架橋による RAG の発現調節

先にも述べたように、他のグループの研究者らによってすでに B 細胞表面の IgM クラスの抗原レセプターの軽鎖を架橋することにより、RAG の再発現が抑制されるということが知られている。そこで、まず、このような現象が再現できるかどうかについて検討した。その結果、抗 IgM 抗体による架橋のみでは強い抑制は認められず、部分的に RAG の発現が低下するのみであった (図3.1)。

3.3.2 リンパ節胚中心における補体レセプターの発現

胚中心においては濾胞樹状細胞上や B 細胞上に補体レセプターが発現されていると報告されていることから、本実験で用いている抗補体レセプター抗体が十分高い特異性を有するかどうか組織染色により検討した。

その結果、PNA 陽性細胞の集団として観察される胚中心内において、ネットワーク状の陽性染色が認められた。この結果から、やはり従来報告どおり胚中心においては濾胞樹状細胞および B 細胞表面に補体レセプターが発現していることが確認された。また、本研究で使用している抗補体レセプター抗体の特異性が十分高いことも示された (図3.2)。

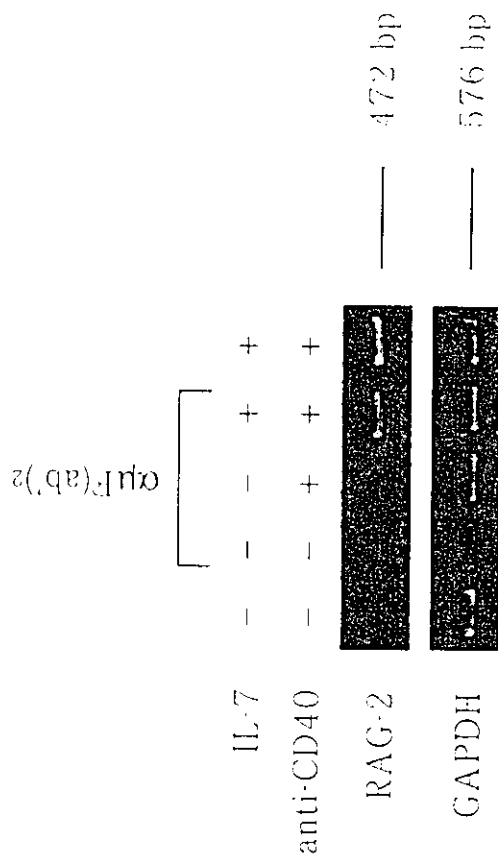


図 3.1 抗原レセプターの架橋による RAG の発現抑制
 抗 IgM 抗体の F(ab)₂ 断片を培地中に 10ug/ml の濃度で添加し、培養 3 日目に RAG の発現を RT-PCR 法で調べた

図 3.2 リンパ節内における補体レセプターの発現
A; 抗原感受したマウスの膝下リンパ節切片を FITC-PNA (緑) と抗補体レセプター (赤) で染色した。B; FITC-PNA とコントロール抗体による染色

3.3.3 抗原レセプターと補体レセプターの共架橋の RAG 再発現への影響

抗 CD40 抗体と IL7 によって RAG の再発現が誘導される条件に、ビオチン化抗 IgM 抗体、ビオチン化抗補体レセプター抗体およびアビジンをそれぞれ組み合わせて添加したところ、図 3.3 に示すように、抗 IgM 抗体で抗原レセプターのみを架橋した場合には、RAG の再発現は若干の抑制を受けたのみであった。一方、抗原レセプターと補体レセプターを共架橋した場合には、1/10 以下に RAG の再発現が抑制されていた。この結果は、RAG の再発現は抗原レセプターのみからのシグナルというよりは、抗原レセプターと補体レセプターの両者からのシグナルによって制御されていることを示している。

3.3.4 抗原レセプターと補体レセプターの共架橋の IL7 レセプターの発現への影響

抗原レセプターと補体レセプターを共架橋することにより RAG の再発現は強く抑制されたが、このことはこれらの抗体による RAG の発現に対する直接的な効果とも考えられるが、IL7 レセプターの発現を抑制することにより B 細胞の IL7 に対する応答性を下げている可能性も否定できない。

そこで、同様の培養条件における IL7 レセプターの発現についても検討を加えた。その結果、抗原レセプターと補体レセプターの共架橋は IL7 レセプターの発現には大きな影響を与えていなかった (図3.4)。このことは、このような刺激が非特異的に細胞の様々な機能を低下させてはいないことを示している。

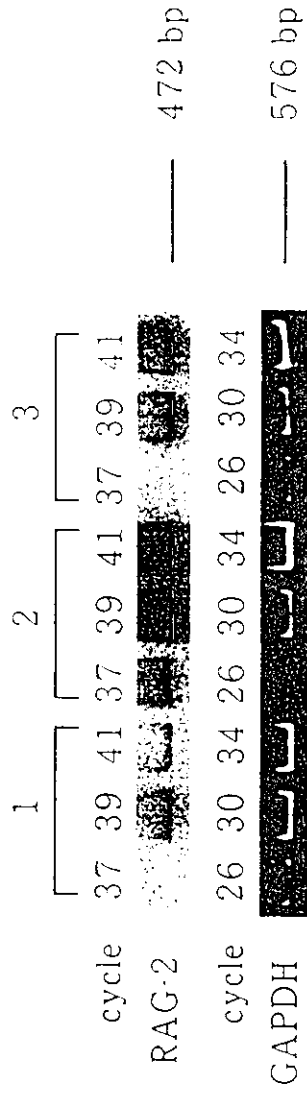


図 3.3 抗原レセプターと補体レセプターの共架橋による RAG の発現抑制
 抗 IgM 抗体の F(ab')₂ 断片と抗補体レセプター抗体を培地中に添加し、抗 CD40 抗体と
 IL7 によって誘導される RAG の発現に対する影響を RT-PCR-Southern blot 法で調べた。

- 1; 5ug/ml ビオチン化抗 IgM F(ab')₂ 断片 + 5ug/ml 抗補体レセプター抗体 + アビジン
- 2; アビジン
- 3; 5ug/ml 抗補体レセプター抗体 + アビジン

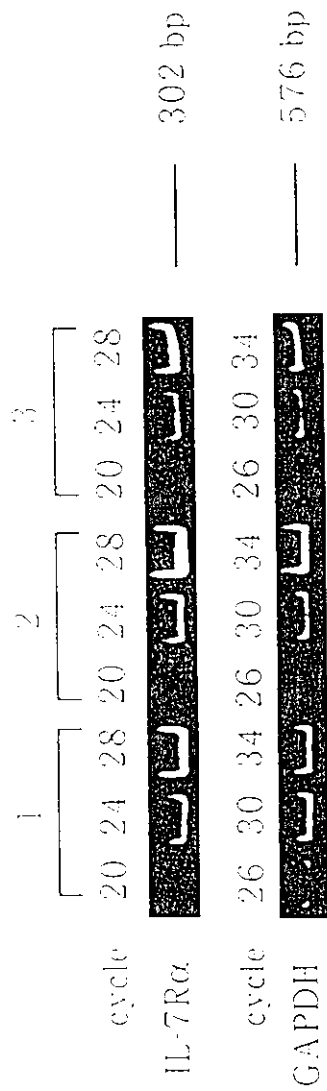


図 3.4 抗原レセプターと補体レセプターの共架橋が IL7 レセプターの発現に与える影響
 抗 IgM 抗体の F(ab)₂ 断片と抗補体レセプター抗体を培地中に添加し、抗 CD40 抗体と
 IL7 によって誘導される IL7 レセプターの発現に対する影響を RT-PCR 法で調べた
 1: 5ug/ml ビオチン化抗 IgM F(ab)₂ 断片 + 5ug/ml 抗補体レセプター抗体 + アピジン
 2: アピジン
 3: 5ug/ml 抗補体レセプター抗体 + アピジン

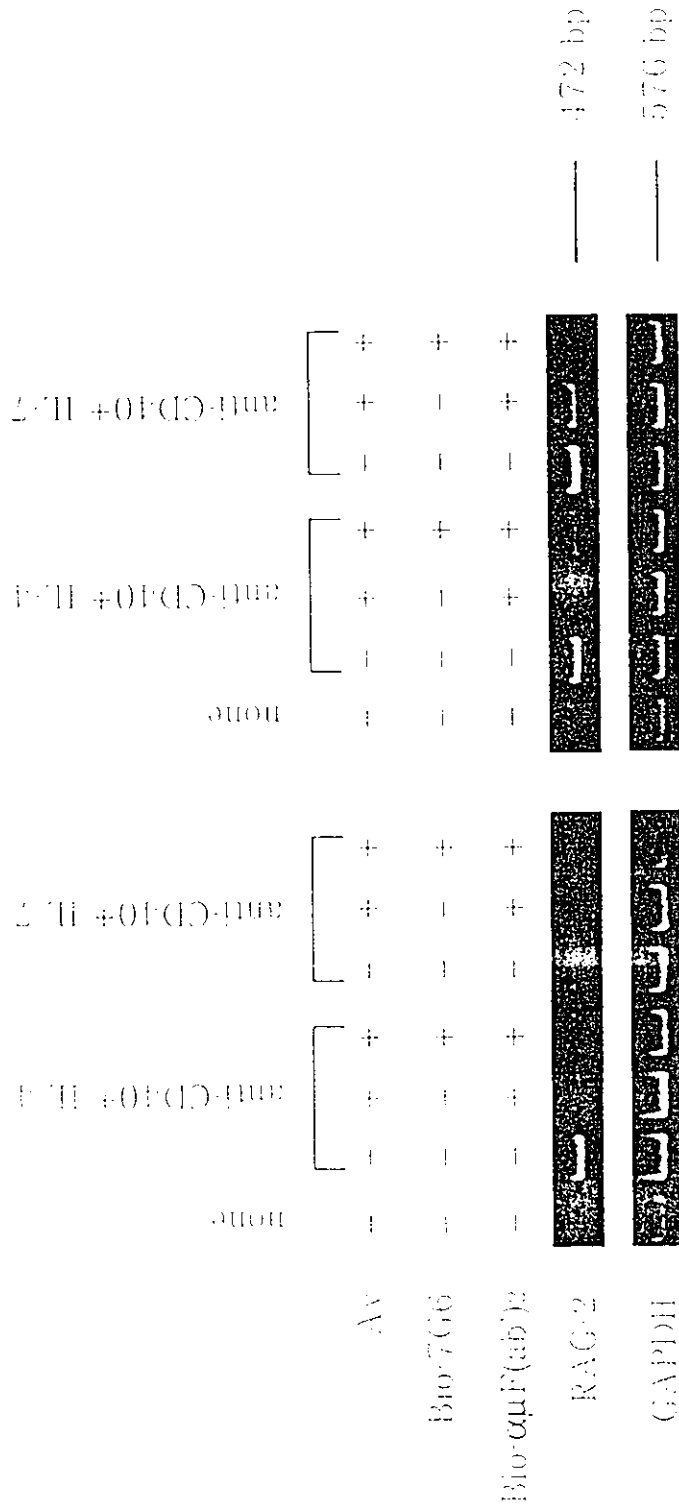
3.3.5 RAG の再発現を誘導するサイトカインの種類と共架橋の抑制作用

In vitro における従来の研究では、抗 CD40 抗体で活性化された B 細胞においては、IL7 のみではなく IL4 によっても RAG の再発現が誘導されることが示されている。そこで、抗原レセプターと補体レセプターの共架橋が IL4 によって誘導された RAG の再発現をも抑制するのか否かについても検討を加えた (図3.5)。

その結果、IL4 で RAG の再発現を誘導した場合には、抗原レセプターの架橋のみで RAG の再発現が強く抑制されることが、培養 2 日目、3 日目ともに観察されたが、IL7 で誘導した場合には、もっとも RAG の再発現が強く誘導される 3 日目には、IL4 の場合ほど強い抑制は認められず、両者で異なる抑制パターンが得られた。一方、抗原レセプターに対する抗体と共に補体レセプターに対する抗体も添加した場合には、いずれのサイトカインで活性化した場合にも RAG の再発現は、ほぼ完全に抑制されていた。

day2

day3



42

図3.5 異なるサイトカインで再発現したRAGに対する抗原レセプター、補体レセプターの共架橋の影響
抗CD40抗体とIL4またはIL7でB細胞刺激してRAGの再発現を誘導した。また、図中
に示してある場合は、5ug/ml ビオチン化抗IgM F(ab)₂ 断片、5ug/ml 抗補体レセプター
抗体、1ug/ml アビジンを追加している

3.4 考察

リンパ節胚中心における RAG の再発現調節機構について *in vitro* のモデル系を用いて検討したところ以下のような結論が得られた。1) 抗 CD40 抗体と IL7 で RAG の再発現を誘導した場合、抗原レセプターの架橋のみでは強い RAG の抑制は認められず、補体レセプターとの共架橋が必要であった。2) この抑制作用は、IL7 レセプターの発現を抑制する間接的な作用ではない。3) IL4 と抗 CD40 抗体で RAG の再発現を誘導した場合には、IL7 で誘導した場合と異なり、抗原レセプターの架橋のみで十分な抑制作用が認められた。

(3) の結果は、RAG の再発現を誘導するサイトカインが IL4 であるか IL7 であるかの違いによって、制御機構が異なる部分があるということを示唆している。我々の研究により IL4 を欠損したマウスの胚中心においても野生型と同程度の RAG の再発現が認められることが明らかとなっていることから(4)、生体内においては IL7 がより重要な役割を果たしていると考えられる。また、未熟な分化段階では正常な V(D)J 組み換えを完了するためには IL7 のシグナルが必須であることが抗 IL7 抗体を投与する実験や IL7 レセプターノックアウトマウスを用いた実験により明らかにされている(8,9)。これらのことを考慮すると、実際の RAG の制御様式は抗 CD40 抗体と IL7 で活性化した場合に近いと考えられる。

Nemazee らのグループは高濃度の抗原レセプターに対する抗体を培養系に添加することによって、抗原レセプターからの刺激が RAG の再発現の抑制に十分なシグナルであると結論づけている(4)。しかし、他の報告によれば、胚中心

中に存在する抗原は、そのほとんどが免疫複合体を形成して濾胞樹状細胞上に結合しているとされていることから(10)、高濃度の抗体に相当する十分な架橋を行うだけの遊離の抗原は存在していないものと考えられる。したがって、抗原レセプターの架橋のみで RAG の抑制が行われているのではなく、抗原レセプターと補体レセプターの両者からのシグナルが協調して RAG の抑制に重要な役割を果たしていると考えられるべきであろう。

今後は、本研究における実験で得られた結果に代表される RAG の再発現を抑制している因子の実体は何であるのかを明らかにすることによって、生体内における RAG 再発現の調節機構を分子レベルで明らかにすることができると考えられる。

3.5 文献

- 1) Hikida M., et al., Science 1996; 274: 2092-2094.
- 2) Papavasiliou et al., Science 1997; 278: 298-301.
- 3) Hikida et al., J.Exp.Med. 1998; 187: 795-799.
- 4) Hertz M. et al., Nature 1998; 394: 292-295.
- 5) MacLennan I.C.M. et al., Annu.Rev.Immunol. 1994; 12: 117-139.
- 6) Carter R.H. et al., J.Immunol. 1998; 141, 457-463.
- 7) Kozono et al., Eur.J.Immunol. 1995; 25, 1013-1017.
- 8) Grabstein K.H. et al., J.Exp.Med. 1993; 178: 157-264.
- 9) Pechon J.J. et al., J.Exp.Med. 1994; 180: 1955-1960.
- 10) MacLennan I.C.M. et al., Annu.Rev.Immunol. 1994; 12: 117-139.

4. ポリクローナル IgE 抗体産生機構と RAG 再発現

4.1 イントロダクション

近年、アトピー等のアレルギー疾患が社会問題化している。これらの疾患の原因の一つにアレルギーに対する抗原特異的 IgE 抗体の過剰産生が挙げられる。しかし、どのような機構で抗原特異的な IgE 抗体が過剰産生されるのか、その機構については不明な点が多く残されている。

B細胞が IgM 抗体産生細胞から IgE 抗体産生細胞へとクラススイッチする機構については人為的にクラススイッチを誘導する系がなかったため困難を究めたが、LPS や抗 CD40 抗体で活性化した B 細胞に IL4 刺激を加えることにより *in vitro* で IgE へのクラススイッチが誘導されることが見出されたため(1,2)、飛躍的に研究が進歩した。しかし、*in vivo* における抗原特異的な抗体産生応答は、生体内においては B 細胞のみの働きで惹起されるのではなく、ヘルパー T 細胞から分泌されるサイトカインや細胞表面の補助刺激分子からの活性化シグナルが必要であることが明らかとなっている(3-5)。

さらに、Mossman らによればマウスの T 細胞株を用いた解析により、これらのヘルパー T 細胞は主に IL2 や IFN- γ を産生する 1 型と IL4 や IL5 を産生する 2 型に分類されることが示されていることから(6)、生体内においては IL4 を産生する 2 型ヘルパー T 細胞の過剰な働きにより IgE 依存性アレルギーが発症すると考えられるようになった。事実、種々のアレルギー疾患を発症している患者の末梢血中のヘルパー T 細胞の亜集団が IL4 を産生する 2 型ヘルパー T 細胞に偏っていることが多く、B 細胞において IL4 依存性の IgM から IgE へのクラススイッチが強く誘導されている場合が多いと考えられている。

これらのことから、アレルギー疾患における IgE へのクラススイッチ機構に関する研究においては、ヘルパー T 細胞の分化の偏りを生じる原因を明らかにすることに力点が置かれている。しかし、これらのアレルギー患者においてもすべての抗原に対してアレルギー疾患を発症するほど高値の IgE 抗体が産生されるわけではなく、特定の抗原に特異的な B 細胞のみが IgE 産生細胞へとクラススイッチする。このことは、抗原特異的 IgE 抗体の過剰産生の機構を明らかにするためには、T 細胞の偏りだけでなく抗原刺激を受けた B 細胞の選択機構についても詳細な検討を行う必要があることを示している。

異物に対する抗原特異的な B 細胞の増殖や分化は主にリンパ節内の胚中心で行われている。したがって、アレルギー疾患における抗原特異的 IgE 抗体の過剰産生機構を明らかにするためには、胚中心における B 細胞の分化・選択機構を明らかにする必要があると考えられる。

一方、本研究の第 2 章、第 3 章でも明らかにしたように、胚中心内の活性化 B 細胞は、CD40 からの刺激と IL4 による活性化を受けて RAG を再発現する。さらに、このような細胞は抗原レセプターの可変領域において再度 V(D)J 組み換えを行い抗原特異性を変化させ得るということも明らかとなっている。このことは、IgE へクラススイッチする B 細胞が優先的に RAG を再発現し、抗原特異性を変化させる可能性を示唆している。そこで、この章においては、マウスにおける IgE へのクラススイッチのモデル系である寄生虫感染の系を用いて、IgE へのクラススイッチと RAG の再発現による抗原特異性の変化に関係があるのか否か検討を行う。

4.2 方法

4.2.1 寄生虫

ポリクローナル IgE 抗体産生を誘導する寄生虫としては、*Nippostrongylus brasiliensis* を使用した。

4.2.2 動物

感染対象のマウスには、第 1 章で用いた QM マウスと C57BL/6 の F1 マウス (QM/B6F1 マウス) を使用した。

4.3.3 抗 NP 抗体の吸収

抗 NP 抗体の吸収は、第 1 章と同様の方法で行った。

4.3.4 IgE 産生細胞の抗体可変部遺伝子の配列決定

IgE 抗体の可変部遺伝子の構造解析は以下のような手順で行った。寄生虫感染後 2 から 3 週間後に脾臓細胞を調製し、第 1 章と同様の方法で RNA を抽出した。その後、oligo dT をプライマーとして逆転写を行い、フレームワーク 1 中の比較的保存されている領域と IgE 抗体の定常領域 (CH1) に位置する領域

中にそれぞれプライマー配列を設計して可変部遺伝子断片を増幅した。3'側のプライマーはIgE重鎖定常部中に位置することから、IgE抗体の可変部遺伝子のみが選択的に増幅できると考えられる。

4.3 結果

4.3.1 寄生虫感染によるポリクローナル IgE 抗体の産生

N.brasiliensis への感染が成立している場合、マウスの血中に高濃度のポリクローナル IgE 抗体が産生されることが知られている。そこで、QM/B6F1 マウスにおいても野生型マウス同様ポリクローナル IgE 抗体が産生されるか否かを検討した (図4.1)。その結果、QM/B6F1 マウスにおいても寄生虫感染後約3週間で非常に高い濃度のポリクローナル IgE 抗体が血清中に認められた。したがって、このマウスにおいても寄生虫の感染およびそれに引き続く IgE への高頻度なクラススイッチの誘導は野生型と同様に起きていおり、モデル実験に適しているということが明らかになった。

4.3.2 寄生虫感染後の QM/B6F1 マウスにおける IgE 抗体の抗原特異性

寄生虫感染前後のQM/B6F1 マウスの血清中の抗 NP 抗体の割合を調べたところ、寄生虫感染後に、IgE 抗体において NP 特異的抗体が血清中の全抗体に占める割合が IgM クラスと比べて有為に低い値を示していた (図 4.2)。クラススイッチによって抗体重鎖遺伝子の定常領域のみが μ 鎖から ϵ 鎖に置き換えられているのであれば、IgM と IgE の抗原特異性に大きな差は認められないと考えられる。したがって、この結果は、IgM から IgE へのクラススイッチが行われたときに、同時に抗原特異性も変化していることを強く示唆している。

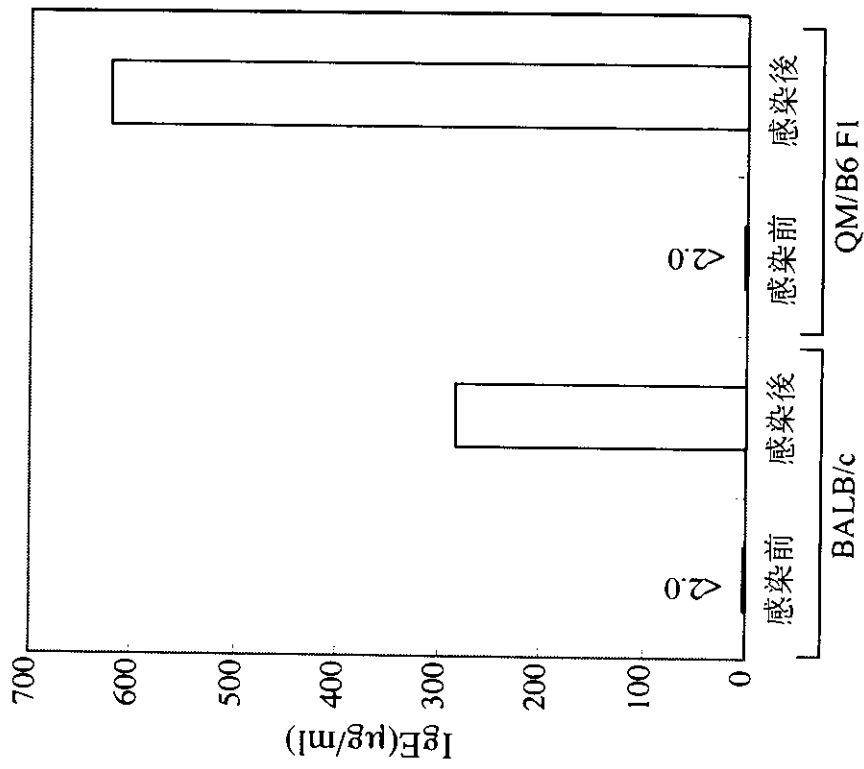


図 4.1 QM/B6 F1 マウスへの寄生虫感染によるポリクローナル IgE 抗体の産生誘導
 QM/B6 F1 マウスに寄生虫を感染後 16 日目に血清を採取し、サンドイッチ ELISA 法を用
 いて血清中の IgE 抗体価を測定した。

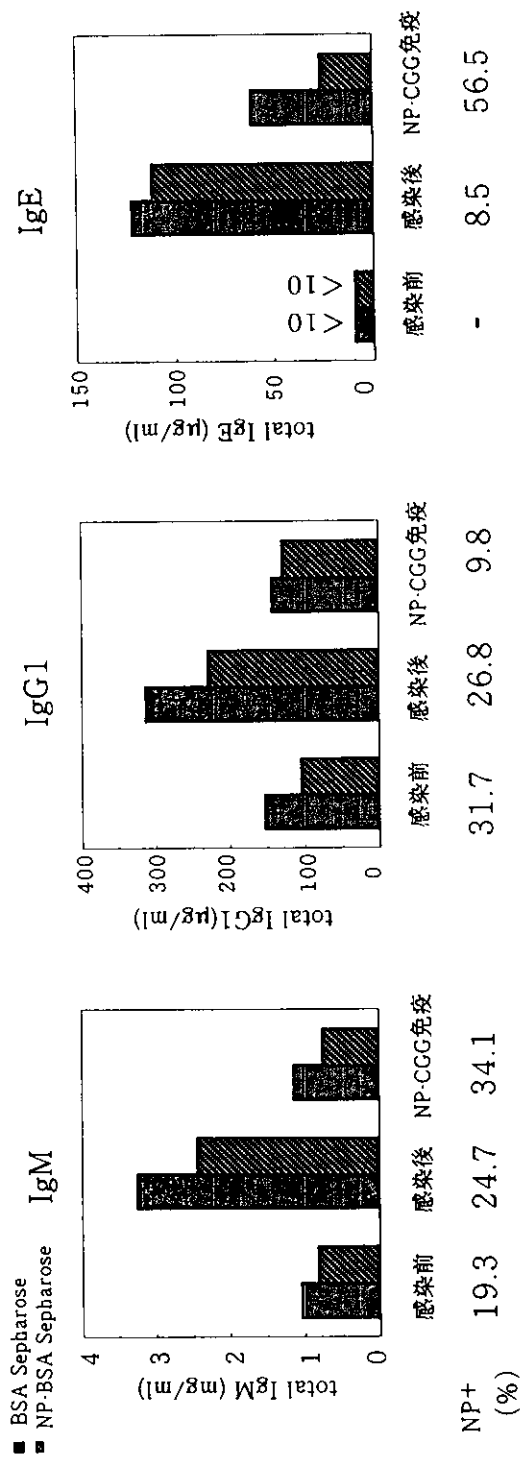


図 4.2 寄生虫感染した QM/B6F1 マウスの血清中抗体の抗原特異性
 QM/B6F1 マウスに寄生虫を感染後 16 日目に血清を採取し、NP-BSA-セファロースを用
 いて NP 特異的抗体を吸収し、抗体の抗原特異性を検討した。

4.3.3 寄生虫感染後の QM/B6F1 マウスにおける IgE 抗体の可変部遺伝子構造

さらに、重鎖可変部の遺伝子が 17.2.25 から変化した抗体については、どのような配列へと変化しているのかを明らかにするために、その一部の塩基配列を決定した。

その結果、図 4.3 に示すような配列が得られ、特徴的な共通配列は認められなかった。すなわち、このようなポリクローナルな IgE へのクラススイッチが誘導される条件においては、特定の可変部遺伝子へとエディティングが行われるわけではないということを示している。