

平成13年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

## Bリンパ球の自然免疫応答におけるCD19の制御メカニズム

所 属 国立国際医療センター研究所 細胞組織再生医学研究部

研究者 藤 本 学

### 要旨

本研究では B リンパ球の自然免疫に関わるメカニズムを明らかにするために、B 細胞のリポ多糖 (LPS) シグナルの伝達経路を分子レベルで解明することを目的とする。CD19 は RP105 受容体に依存し Toll-like receptor 4 受容体には非依存性のシグナルによりチロシンリン酸化され JNK の活性化経路を特異的に制御することにより、LPS による B 細胞活性化を調節していることが示された。

### 1. 研究目的

感染症の制御は、社会の高齢化にともなって、今後さらに重要性が増すものと考えられる。今日の感染症治療は、抗生物質を中心とするものであり、優れた有用性の反面、その濫用が耐性菌の増加や菌交代現象など種々の弊害をひきおこしている。このため、宿主側の免疫担当細胞をターゲットにした新たな治療法の開発が急務であり、高等生物の免疫細胞の感染防御機構を分子レベルで明らかにする必要がある。高等生物の免疫機構は自然免疫と獲得免疫に大別され、獲得免疫は感染の後期や再感染時の生体防御に関わるのに対し、自然免疫は感染初期に侵入した病原体を最初に認識して排除するとともに、獲得免疫系を活性化する。自然免疫系においてリポ多糖(LPS)などを認識する Toll-like receptor からのシグナル伝達が中心的な役割を果たすことが明らかになってきた。B リンパ球は獲得免疫において主要な役割を果たすとともに、自然免疫でも LPS 等に強く反応して活性化され、重要な役割を担っている。しかしながら、そのシグナル伝達の分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究は、B リンパ球における LPS 受容体からのシグナル伝達の機序の解明を目的とし、B 細胞の活性化の閾値を制御する分子である CD19 を中心に解析する。これまでに詳細に研究されてきた抗原受容体シグナル伝達系では、CD19 は様々な分子の機能を調節することがわかっており、LPS 受容体の系でも中心的な役割を果たしていることが推測される。その傍証として、CD19 欠損マウス B 細胞では LPS 刺激による増殖能が著明に低下している。このような分子メカニズムを詳細に検討することは、B 細胞における LPS シグナル伝達経路の包括的な理解につながり、自然免疫における感染防御能に新たな治療ターゲットを見出せる可能性がある。

### 2. 研究方法

動物は CD19 ノックアウトマウスおよび同胞野性型マウスを使用した。マウスは当研究所の動物施設において specific pathogen free の環境で飼育し、8 週齢のマウスを実験に用いた。本研究所の動物実験管理委員会により承認されたプロトコールに基づいて実験をおこなった。B 成熟リンパ球の形質をもつリンパ芽球細胞の cell line である A20 細胞は、10%FCS、抗生物質、グルタミン、2 メルカプトエタノール加 RPMI1640 培地にて培養した。また研究者が過去に樹立した CD19 陰性 B cell line (A20) を用いた。

B 細胞は脾臓から抗 Thy1.2 抗体がコートされた磁気ビーズを用いて T 細胞を除去することにより精製した。B 細胞は RPMI1640 培地中で 37℃に加温した後、LPS または抗 RP105 抗体で一定時間刺激した後、細胞を溶解した。溶解液は SDS-PAGE あるいは免疫沈降に用いた。免疫沈降は、細胞溶解液をマウスないしウサギ IgG およびプロテイン G 結合アガロースビーズで非特異反応を吸収した後、適当な抗体とプロテイン G ビーズを混合し、4～6 時間程度反応させた。ビーズは溶解バッファーにて洗浄し、SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解した。

細胞溶解液あるいは沈降させた蛋白は SDS-PAGE により分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜はペルオキシダーゼ標識抗リン酸化チロシン抗体または適当な抗体とペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス/ウサギ IgG 抗体で反応させた。これらのプロットは enhanced chemiluminescence により発色させた。各レーンの蛋白量が等しいことを確認するため、あるいは結合している別の蛋白を検出するために、プロット後抗体をはがし、適当な抗体で再度プロットを行った。

細胞内カルシウム濃度の測定は脾臓より分離した B 細胞に Indo-1 を取り込ませた後、フローサイトメーターにて 405/495nm の吸光度にて測定した。

細胞増殖試験は、LPS または抗 RP105 抗体の存在下で細胞を 48 時間培養した後、18 時間 BrdU 取込みをおこない、抗 BrdU 抗体を用いた ELISA 法を用いた。

### 3. 研究成果

まず CD19 による LPS 応答が Toll-like receptor 4 (TLR4) と RP105 のどちらの受容体に依存しているかについて検討を加えた。野性型 B 細胞を LPS および抗 RP105 抗体を至適濃度にて刺激するとどちらの刺激によっても CD19 のチロシンリン酸化が誘導されたが、LPS 刺激によるリン酸化は、LPS の RP105 への結合を競合的に阻害する抗 MD1 抗体によって抑制された。したがって、CD19 のリン酸化は RP105 受容体に依存するが TLR4 受容体には依存しないことが示された。CD19 のチロシンリン酸化は刺激後約 20 分で最大に達し、その後も長時間にわたりリン酸化が残存した。この結果は CD19 ノックアウトマウス脾臓 B 細胞の抗 RP105 抗体による細胞増殖は野性型マウスの脾臓 B 細胞に比べて著明に低いことから確認された。

CD19 ノックアウトマウス脾臓 B 細胞および CD19 陰性 A20 細胞ではそれぞれ野性型細胞に比べて MAP キナーゼのファミリーである Extracellular-signal regulated kinase (ERK) の活性化は正常に誘導されたが、一方 c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が著明に障害されており、CD19 は LPS 刺激において RP105 受容体を介しておこる JNK の活性化経路を制御していることが示された (図 1)。

さらに抗 RP105 抗体刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を解析した。抗 RP105 刺激により B 細胞の細胞内カルシウム濃度は徐々に増加し、約 5 分で最高に達し、その濃度が維持される。この反応パターンは LPS あるいは抗 RP105 抗体刺激で Syk の活性化が誘導されないことを反映していると考えられる。CD19 ノックアウトマウス由来の B 細胞では抗 RP105 抗体架橋による細胞内カルシウム濃度の上昇が野性型にくらべて緩徐であり、最高濃度に達するまでに約 8 分を要した、最終的には野性型と同じレベルにまで達した。一方、この細胞内カルシウム濃度上昇は野性型、CD19 欠損 B 細胞ともに PI3 キナーゼの阻害剤である Wortmannin および LY294002 により完全に抑制された (図 2)。しかしながらこれらの阻害剤は JNK の活性化には全く影響を与えなかった。

### 4. 考察

B 細胞に発現する LPS 受容体として、TLR4 と MD2 の複合体および Toll-like receptor family に属する RP105 と MD1 の複合体が知られている。TLR4 ノックアウトマウス由来の B 細胞では LPS に対する応答が全く欠落し、RP105 ノックアウトマウス由来の B 細胞でも著明に障害される。TLR4 からのシグナルを伝達する経路として、アダプター蛋白の MyD88 および IRAK を介する経路、別のアダプター蛋白である TIRAP を介する経路が知られているが、本研究により膜局在アダプター蛋白として働く B 細胞特異的分子の CD19 は LPS による B 細胞活性化を RP105 からのシグナル伝達に関与することにより制御していることが明らかになった。B 細胞シグナル分子の欠損マウス、例えば PI3 キナーゼ、Btk, BLNK, PLC $\gamma$ 2 などの欠損マウス B 細胞は種々の程度で LPS に対する応答性が低下していることがこれまでに示されているが、これらの分子も CD19 と同様に RP105 からのシグナル伝達に関与している可能性が強く示唆される。しかしながら、その経路について CD19 は JNK 活性化を、PI3 キナーゼは細胞内カルシウム動員というように異なる経路を独立して制御していることが明らかになった。もちろん CD19 欠損細胞ではカルシウム濃度の上昇が遅延していたことは CD19 も独自のメカニズムでカルシウム調節に関与していることを示唆している。

B 細胞抗原受容体シグナル伝達においても、PI3 キナーゼ、Btk, BLNK, PLC $\gamma$ 2 はいわゆる "signalosome"

としてカルシウムの調節に必須の役割をもつ一連の分子群であり、一方 CD19 は Lyn や Vav, CD22 などの活性化を制御することにより B 細胞活性化閾値を設定する働きがあるが、LPS シグナルにおいてもこれらの分子は類似した役割分担をしている可能性が考えられる。

## 5. まとめ

B 細胞は抗原受容体を介した抗原認識による獲得免疫において主要な役割を果たすとともに、自然免疫においても Toll-like receptor を介した菌体成分認識機構により迅速な IgM 産生が可能となり、自然免疫においても重要な役割を担っている。B 細胞には LPS を認識する受容体として TLR4 の他に B 細胞特異的な RP105 を発現しており、その両者が協調して作用すると推定される。本研究により特にその RP105 受容体のシグナル伝達が CD19 により担われていることがはじめて明らかにされた。今後さらに詳細な解析をおこなう予定である。

## 6. 研究発表

特になし

## 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 特になし
- 2) 実用新案登録 特になし
- 3) その他 特になし

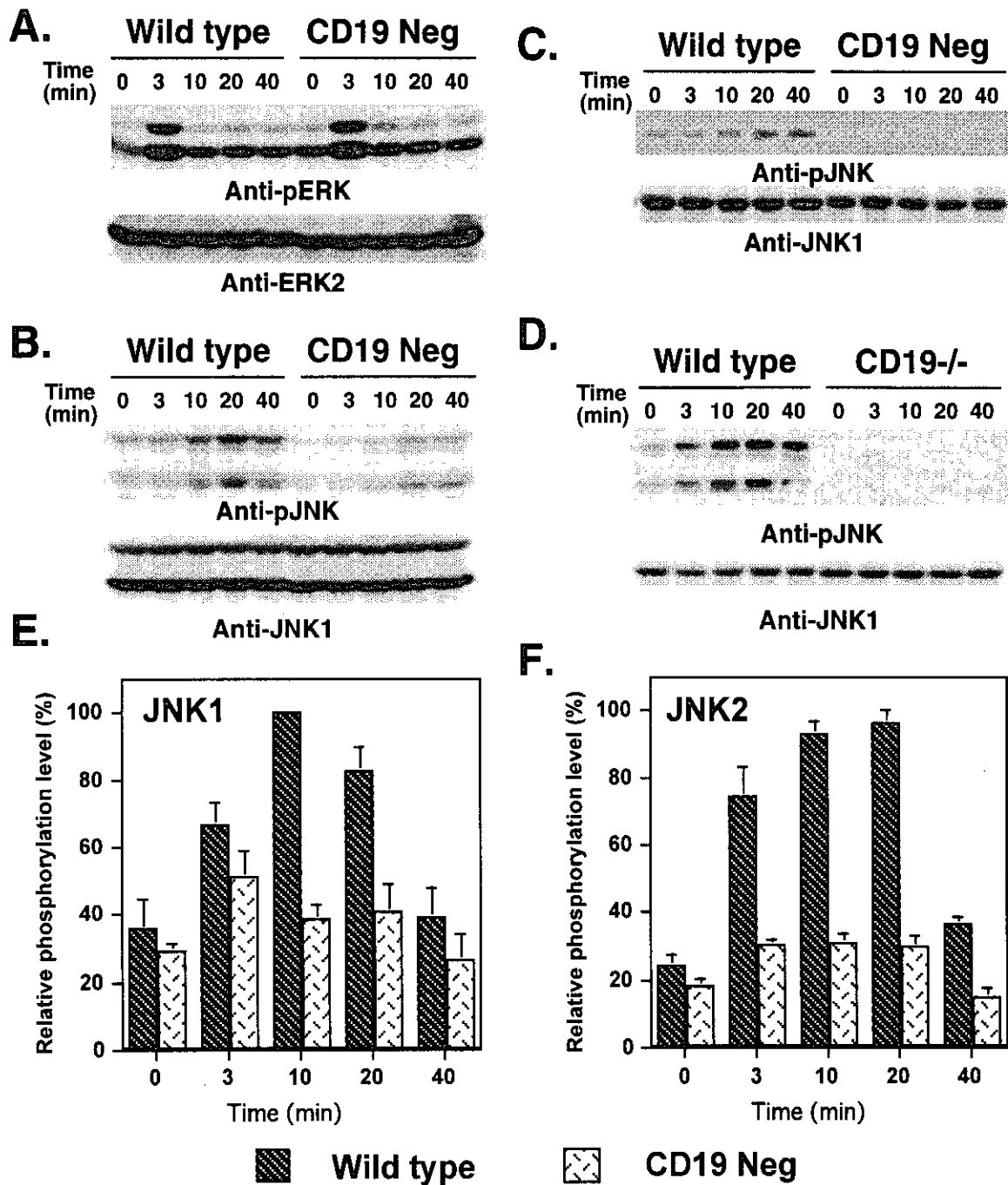


図1 抗RP105抗体刺激 (A, B, D, E, F)およびLPS刺激 (C)によるERKおよびJNKの活性化 (リン酸化)。A, B, C, E, FはA20細胞、Dはマウス脾臓細胞を用いた結果を示す。A20細胞におけるJNKの活性化はBに代表的なプロットを、EおよびFは定量による結果を示している。EおよびFでは野生型の最大リン酸化レベルを100%と定義し、その相対的なリン酸化レベルを求めた。

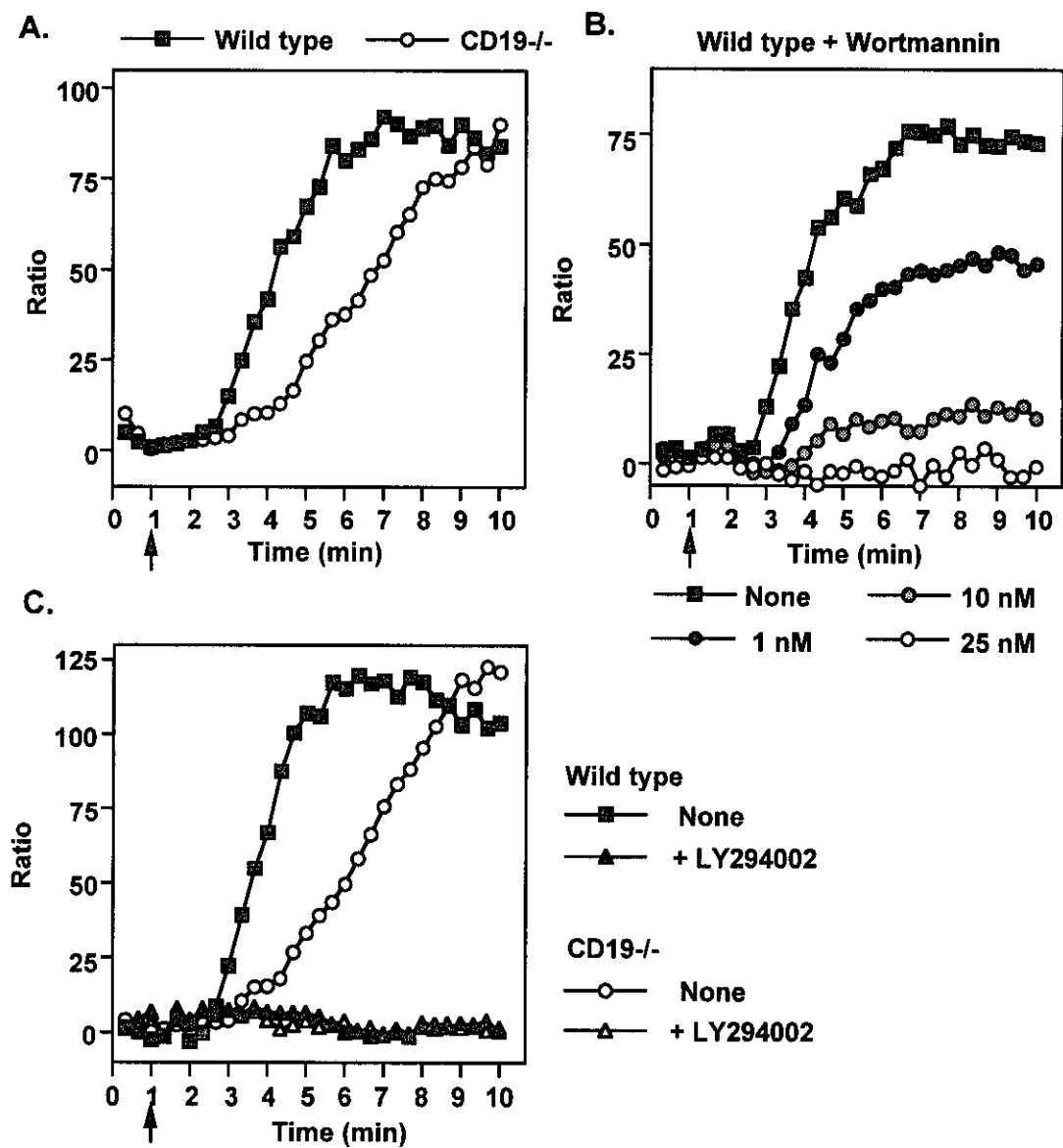


図2 抗RP105抗体刺激による細胞内カルシウム濃度。細胞にIndo-1を取り込ませ、405/495nmの比であらわしている。矢印の時点で刺激を加え、20秒単位のカルシウム濃度をプロットした。



---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社