

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 Lipid rafts 内で RP105 受容体依存性で Toll-like receptor 4 受容体非依存性にチロシンリン酸化され、さらに Lyn と Vav の活性化を増幅することによって JNK 活性化を特異的に制御し、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 C57BL/6 マウス、CD19 ノックアウトマウス (C57BL/6 系統)、C3H/HeJ, C3H/HeN 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 細胞株は、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

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

B 細胞には LPS 受容体として Toll-like receptor 4 (TLR4) と RP105 (CD180) の二つが発現していることがこれまでに知られている。TLR4 シグナルを制御する分子 MyD88 を欠損した B 細胞は LPS 刺激に対しては増殖反応が消失していたのに対し、RP105 刺激に対しては正常な反応を示した (図 1)。一方、CD19 欠損 B 細胞は LPS 刺激と RP105 刺激の両者に対して同程度に減弱した反応を呈した (図 1)。そこで CD19 は RP105 を介して LPS シグナルを制御しているという仮説のもとにそのシグナル伝達機構を解析した。CD19 は野性型 B 細胞において LPS、抗 RP105 抗体のどちらの刺激によってもチロシンリン酸化が誘導された (図 2)。このリン酸化は、LPS の RP105 への結合を競合的に阻害する抗 MD1 抗体によって完全に抑制されたが (図 2)、一方 TLR4 受容体に変異があり TLR 4 を介した活性化が完全に障害されている C3H/HeJ マウス由来の B 細胞では正常に認められた。したがって、CD19 のリン酸化は TLR4 非依存性で RP105 依存性であることが明らかになった。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。また、スクロースによる密度勾配遠心法により CD19 と RP105 はともに刺激後に Triton X 不溶性画分に検出され、刺激に伴って Lipid rafts に移行することが示された。

さらに、CD19 のチロシンリン酸化の意義について解析した。CD19 陰性 A20 細胞では抗 RP105 抗体刺激によって誘導される細胞内チロシンリン酸化が全体として減弱しており、特に Src-family チロシンキナーゼの Lyn の活性化および Vav のチロシンリン酸化が野生型に比べ著明に減弱していた (図 3)。さらに、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 4)。

次に抗 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 5)。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。他方、CD19 欠損細胞では Akt の活性化はほぼ正常であり、CD19 と PI3 キナーゼは独立した経路を制御していることが示唆された。

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/MD2 複合体はマクロファージをはじめとした種々の細胞に共通し

て発現するが、RP105/MD1 複合体は B 細胞に特異的に発現している。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 を介する経路や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 γ 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異なると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 γ 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。このように B 細胞特異的 LPS 受容体である RP105 は、MyD88 などを用いる universal な TLR4 シグナル経路と異なり、B 細胞特異的分子を利用していることは非常に興味深い点であり、今後の創薬等のターゲットになりうると考えられる。

B 細胞においては RP105 は強く発現しているが、TLR4 の発現は非常に弱い。にもかかわらず、TLR4 欠損 B 細胞では LPS による細胞増殖が消失していることから、この二つの LPS 受容体は重複した機能をもっているのではなく、むしろ双方の存在がどちらも必要であり、一方が欠けた状態では正常にシグナルが伝達されないと考えられる。今後、この分子メカニズムについてさらに明らかにする必要がある。

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。CD19 は補体受容体である CD21 と複合体を形成し、補体シグナルをも制御していることから、*in vivo* では抗原、LPS などのいわゆる pathogen-associated molecular pattern、補体などが互いに作用しながら B 細胞の活性化を規定すると考えられる。今後 B 細胞における TLR 受容体を介するシグナル伝達機構についてさらに詳細な解析をおこないたい。

6. 研究発表

Manabu Fujimoto, Jonathan C. Poe, Anne B. Satterthwaite, Matthew I. Wahl, Owen N. Witte, Thomas F. Tedder. Complementary roles for CD19 and Btk in B lymphocyte signal transduction. Cold Spring Harbor Conference, 2002 年 4 月, Cold Spring Harbor

Manabu Fujimoto, Thomas F. Tedder. CD19 amplification of B lymphocyte antigen receptor-induced Ca²⁺ responses: a role for Lyn sequestration in extinguishing negative regulation. Experimental Biology 2002 (FASEB), 2002 年 4 月 New Orleans

藤本 学, 矢澤徳仁, 佐藤伸一, 三宅健介, 審良静男, Thomas F. Tedder, 玉置邦彦 CD19 による LPS 受容体 RP105 シグナル伝達機構 第 32 回日本免疫学会 2002 年 12 月 東京

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

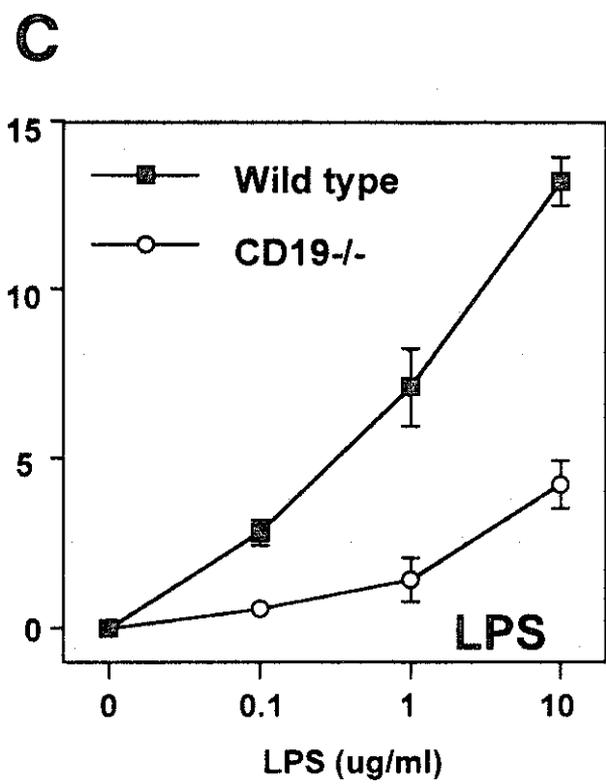
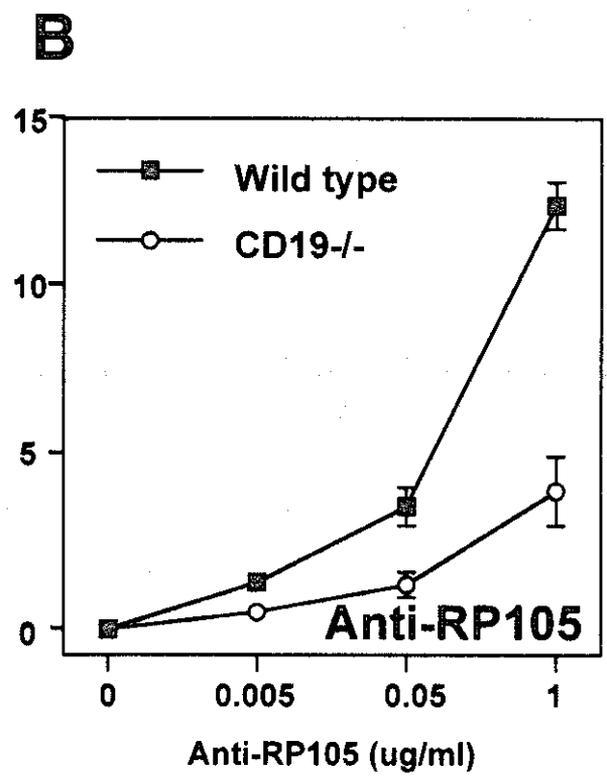
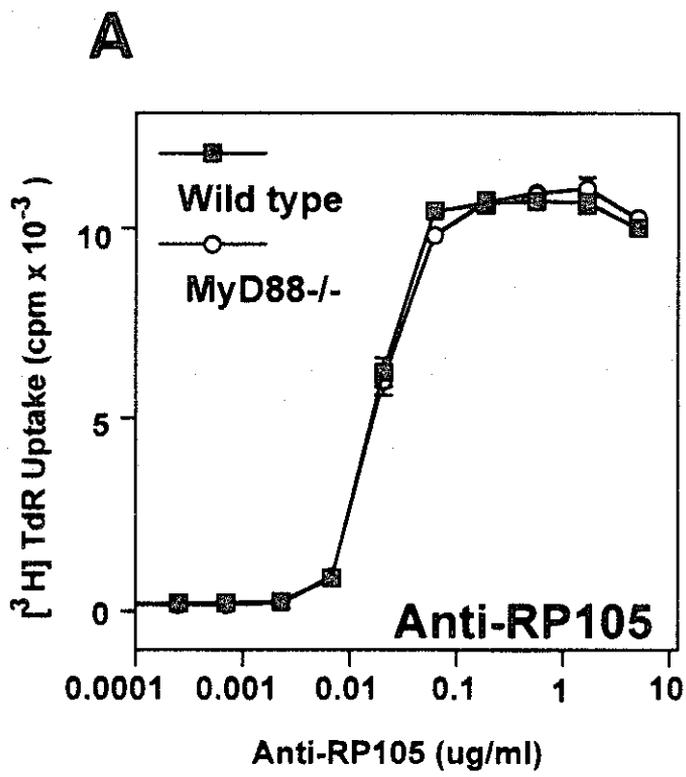
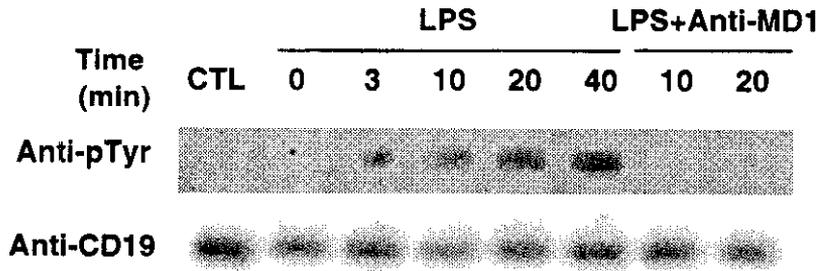


図1 MyD88ノックアウトマウス, CD19ノックアウトマウスB細胞の抗RP105抗体, LPS刺激に対する増殖反応

A. CD19 Immunoprecipitation



B. CD19 Immunoprecipitation

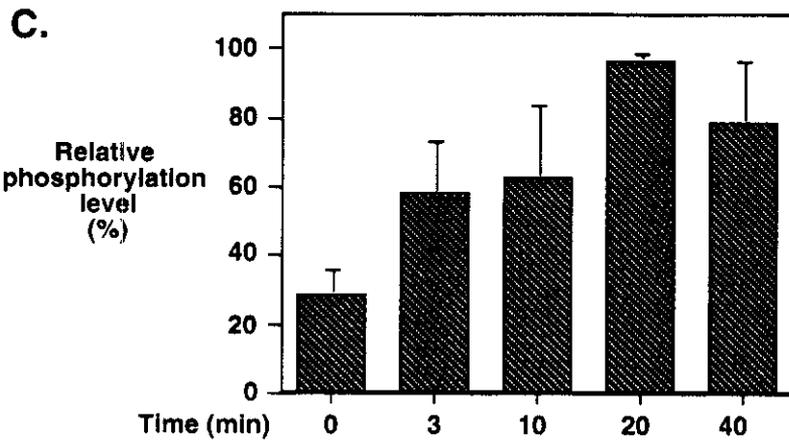
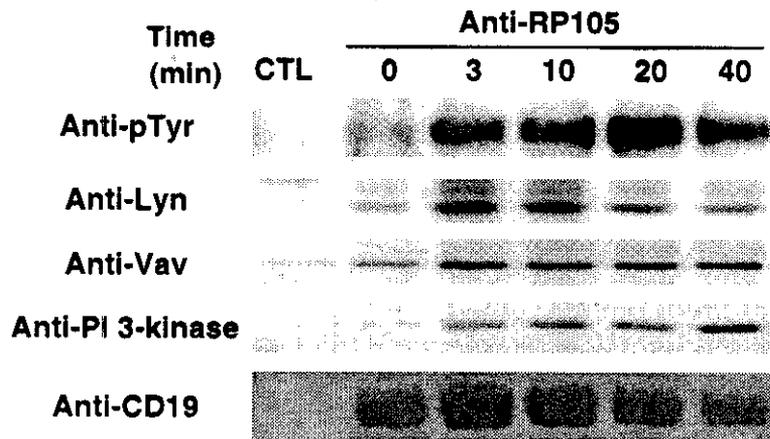
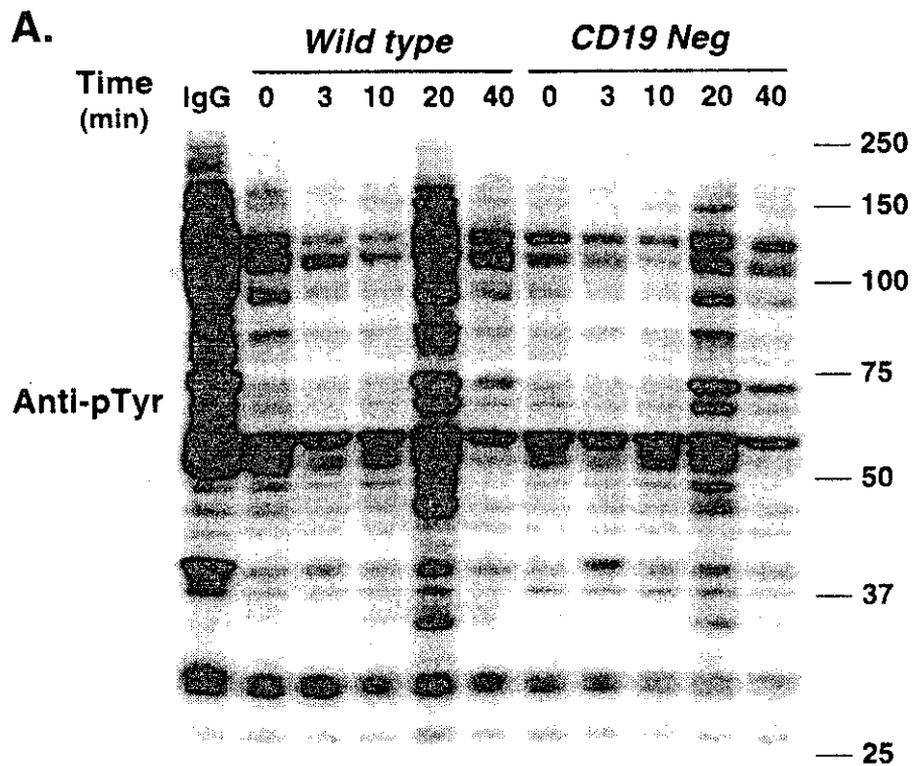
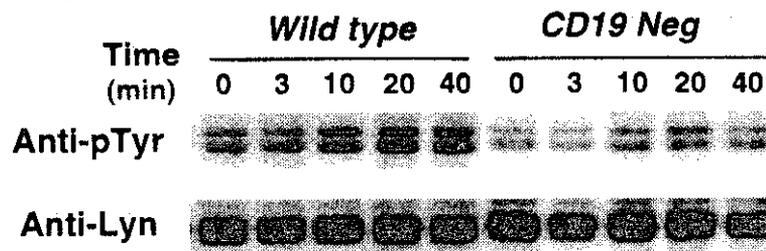


図2 A20細胞におけるLPS(A)あるいは抗RP105抗体(B)刺激によるCD19のチロシンリン酸化。BではLyn, Vav, PI3キナーゼの各抗体による会合をも示した。Bに代表的なプロットを, Cに3回の実験の定量の平均を示した。



B. Lyn Immunoprecipitation



C. Vav Immunoprecipitation

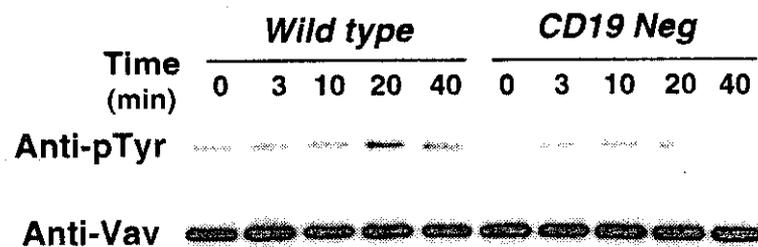


図3 野生型およびCD19陰性A20細胞において、抗RP105抗体刺激に誘導される細胞内チロシンリン酸化 (A) , Lyn (B) およびVav (C) のチロシンリン酸化。

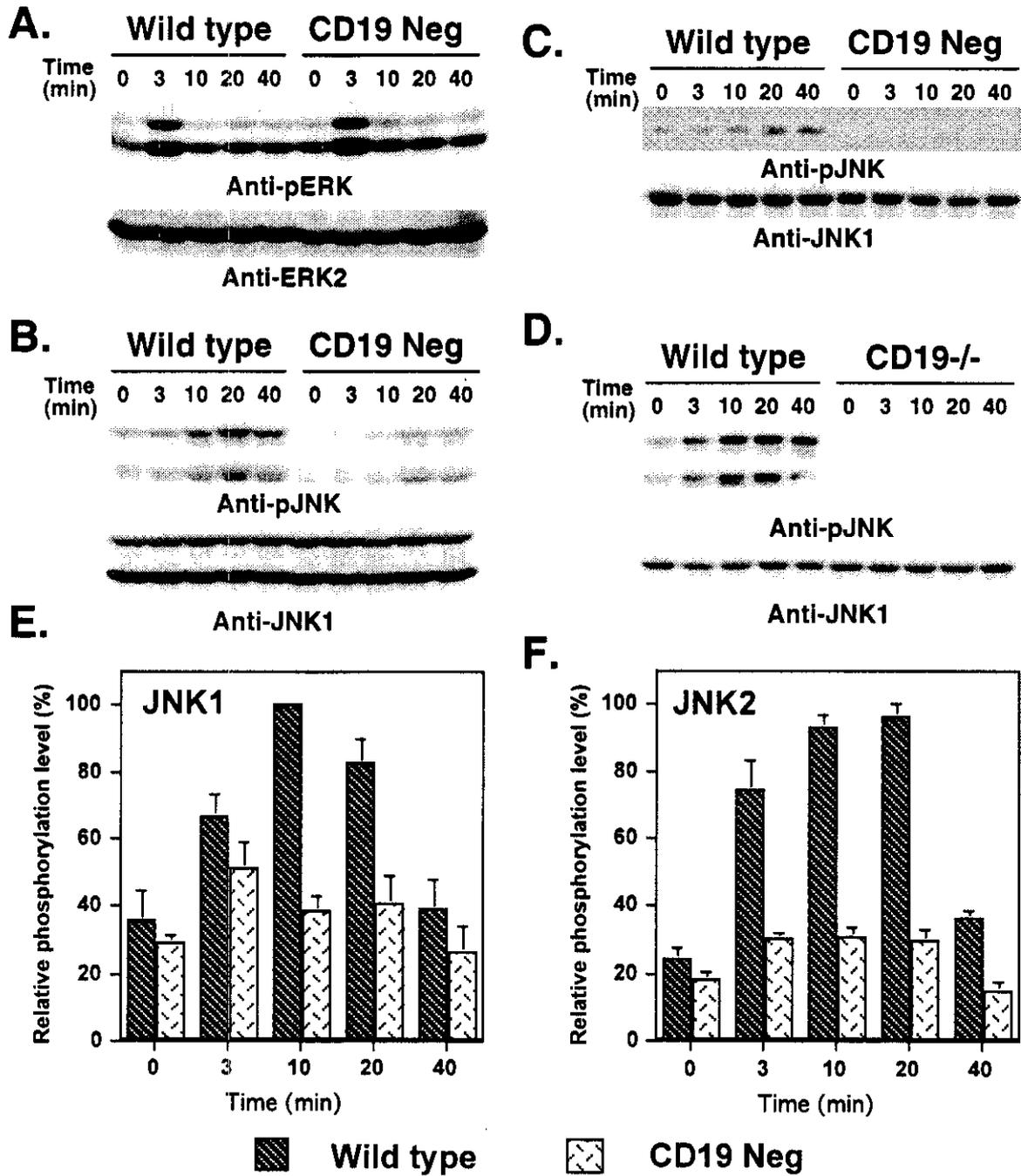


図4 抗RP105抗体刺激 (A, B, D, E, F)およびLPS刺激 (C)によるERKおよびJNKの活性化 (リン酸化)。A, B, C, E, FはA20細胞、Dはマウス脾臓細胞を用いた結果を示す。A20細胞におけるJNKの活性化はBに代表的なプロットを、EおよびFは定量による結果を示している。EおよびFでは野生型の最大リン酸化レベルを100%と定義し、その相対的なリン酸化レベルを求めた。

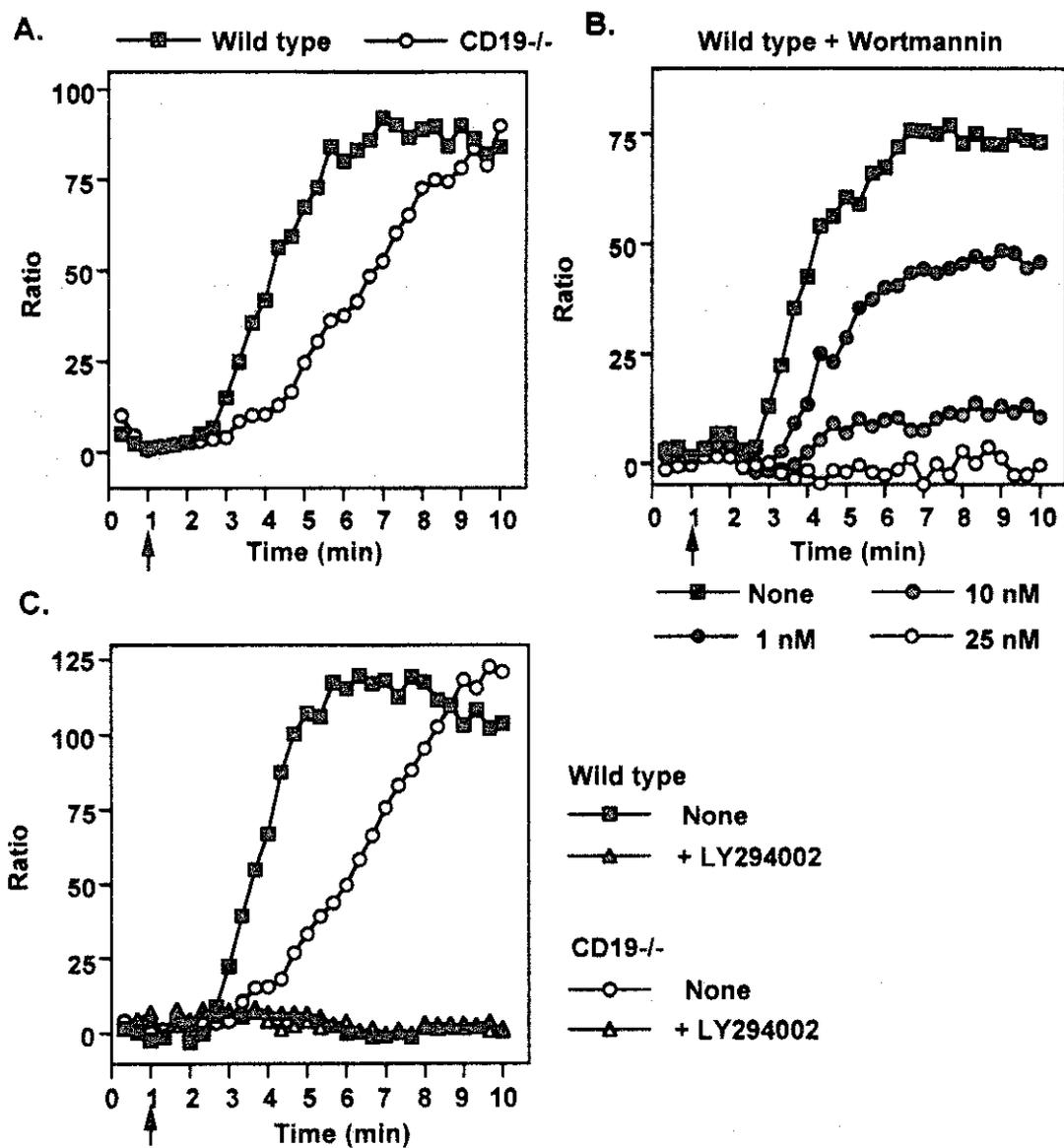


図5 抗RP105抗体刺激による細胞内カルシウム濃度。細胞にIndo-1を取り込ませ、405/495nmの比であらわしている。矢印の時点で刺激を加え、20秒単位のカルシウム濃度をプロットした。