

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	高田 俊太郎
論文審査担当者	主査：石野 史敏 副査：仁科 博史 副査：中西 啓
論 文 題 目	Role of Endosome in B cell Antigen Receptor Signaling and Activation by Polysaccharide Antigens.

(論文内容の要旨)

<要旨>

B 細胞抗原受容体(BCR)のエンドサイトーシスは近年活性化シグナル伝達への関与が認められつつある。当研究室ではエンドソームにおける長期の活性酸素産生とその B 細胞活性化への寄与を見出し、エンドソームを長期シグナルの場と想定した。今回共焦点顕微鏡解析より、BCR が一般的なエンドサイトーシスとは異なり長時間エンドソームで保持されることが判明した。そしてその間継続的にシグナル伝達がエンドソームで起きていることが示唆された。

糖鎖抗原 NP-dextran は細胞内で強い分解耐性を示すと同時に長時間エンドソームに存在し、極めて短い時間に認識した抗原量のみで B 細胞の増殖を誘導した。糖鎖抗原による増殖は活性酸素非依存的であったが、これらの結果はエンドソームに抗原が保持され続けることが T 細胞非依存的な活性化に重要であることを示している。

<諸言>

B 細胞は主に抗体産生による生体防御を担っており、細胞表面にある B 細胞抗原受容体を介して抗原を認識する。抗原によって架橋された BCR はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、これは MHC 分子を介した抗原提示に重要であることが知られている。BCR エンドサイトーシスとシグナル伝達の関係については、従来細胞表面上の BCR を減らすことによる抑制的な役割と考えられてきたが、最近エンドサイトーシスの阻害により PI3K 経路等が抑制されることなどが報告され、エンドソームが活性化シグナル伝達に寄与することが示唆された。しかし、この報告を含めたこれまでの研究はエンドソームにおけるシグナル伝達が分解過程に起こる現象としての理解を超えず、従ってその生理的意義も明らかではない。当研究室では、長期的な活性酸素産生が B 細胞の活性化に重要であり、その産生場所がエンドソームであることを見出した。そのためエンドソームにおける長期的なシグナル伝達が細胞膜での伝達とは別に B 細胞の活性化に重要であるという仮説を立て、その検証を目指した。

一般的に、B 細胞の活性化には BCR による抗原の認識に加えて、T 細胞からの補助シグナルが必要である。しかしながら、糖鎖抗原などの T 細胞非依存性抗原と呼ばれる抗原に対する応答においては T 細胞による補助を必要とせず、B 細胞は単独で活性化することが知られている。この反応に T 細胞が関与しないのは T 細胞抗原受容体がタンパク抗原以外を認識することができないからであるが、B 細胞が T 細胞の補助なしに活性化する仕組みは不明である。T 細胞非依存性抗原は分子量が大きく、エピトープの反復配

列を持つため BCR を広範囲で架橋することで活性化を誘導するという理解がされてきた。しかしタンパク抗原を多エピトープ化しても単独で B 細胞を活性化することはできないため、T 細胞非依存的な活性化機構を説明するには不十分である。本研究では、最近明らかになりつつあるエンドソームシグナルの観点から T 細胞非依存性抗原に対する応答を理解することを試みた。

<方法>

B 細胞株 BAL17 の BCR を抗 IgM 抗体で架橋し、培養後細胞表面に残っている抗体を染色してその残存量を測定した。細胞内に取り込まれた BCR の詳細な輸送経路を調べるため、GFP タグを付加した Rab5, Rab7, Rab11 の各遺伝子を BAL17 細胞に遺伝子導入し、抗 IgM 抗体刺激後の BCR との局在比較を共焦点顕微鏡により行った。エンドソームにおけるシグナル伝達の有無を検証するため、BCR シグナルのアダプター分子 BLNK を遺伝子導入して BCR エンドサイトーシス後の局在の解析を行った。また、細胞内染色により刺激後の BCR とリン酸化チロシンの局在解析を行った。さらにこれらの局在解析に関して、活性酸素を N-Acetyl-L-Cysteine (NAC)により阻害した条件についても検証した。

B 細胞内での糖鎖抗原の輸送経路を解析するため、4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP)ハプテンに特異的な BCR を発現する B 細胞株 BAL17-9T13 に GFP 付加した Rab5, Rab7, Rab11 をそれぞれ遺伝子導入した。これらの細胞を糖鎖抗原 NP-dextran で刺激し、共焦点顕微鏡を用いて NP-dextran と各 Rab タンパク質の局在を解析した。細胞内における抗原の安定性を定量的に調べるために NP-dextran と抗 IgM 抗体の刺激後 24 時間後までの細胞内残存量をフローサイトメーターで測定し、刺激 15 分後の蛍光強度を 100 とした時の相対値をそれぞれ算出した。糖鎖抗原が T 細胞の補助なしに B 細胞を活性化する機構をさらに調べるため NP 特異的な BCR を発現する B 細胞を持つマウス B1-8hi を導入し、このマウス脾臓から精製した B 細胞を CFSE でラベルした。そして NP-dextran、抗 IgM 抗体、LPS で刺激した 72 時間後の増殖細胞を通常培養、NAC による活性酸素阻害、刺激開始 30 分後に抗原・抗体を除去の各条件についてフローサイトメーターにより測定した。

<結果>

抗 IgM 抗体によるエンドサイトーシスの動態を調べたところ、架橋後 5 分で 6 割、30 分で 8 割の BCR が取り込まれた。共焦点顕微鏡で観察すると細胞内で LAMP1 陽性の部位に集積している様子が 6 時間に渡って見られた。Rab 導入細胞を用いた解析により、細胞内に取り込まれた BCR はまず Rab5+の初期エンドソームに入り、その後 Rab7+の後期エンドソームに継続的に局在した。一方 Rab11+のリサイクリングエンドソームには有意な局在は認められなかった。BLNK の局在は無刺激の段階では細胞質全体に分布していたが、刺激後 15 分の時点で BCR が局在する区画に集積し、強いシグナルとして観察された。この局在は刺激後 6 時間に至るまで継続的に認められた。NAC により活性酸素を阻害してもこの BLNK の集積は変化が見られなかった。リン酸化チロシンの染色実験においては、エンドサイトーシスされた BCR とリン酸化チロシンの共局在が見られ、一部細胞膜にも認められた。NAC 処理をした場合にも共局在スコアに有意な変化はなかった。

Rab 遺伝子を導入した NP 反応性 B 細胞株を用いた局在解析により、NP-dextran は抗 IgM 抗体と同様、細胞内に取り込まれた後初期エンドソームを経て後期エンドソームに入り、そこで維持された。またリサイクリング経路に入らないことも同様であった。細胞内での安定性を定量的に解析したところ、抗 IgM 抗体は 6 時間後におよそ 50%、12 時間後には 10%以下にまで減少した。一方 NP-dextran は 24 時間後でも 60%程度が残存していた。NP 特異的な BCR を持つマウスの B 細胞を用いた CFSE 増殖アッセイを行った結果、72 時間後において抗 IgM 抗体刺激は 50%以上の細胞が増殖させたが、NAC による活性酸素の

阻害によって増殖がほぼ完全に抑制された。一方 NP-dextran 刺激によって 8 割程度の細胞が増殖したが、活性酸素を阻害しても同程度の割合の細胞が増殖していた。さらに、NP-dextran は刺激開始 30 分後に抗原を除き、培地のみでその後培養しても 50%程度の細胞に増殖を誘導した。この短時間の抗原の存在のみによる増殖誘導は LPS や抗 IgM 抗体刺激をした場合には全く見られなかった。

<考察>

従来受容体エンドサイトーシスおよびその後の分解プロセスは数十分～1 時間で起こることとして理解されてきた。今回エンドソームに架橋した BCR が 6 時間の局在していることが認められたことから、B 細胞において取り込まれた BCR-抗原の分解が制限されていることが示唆された。さらに、シグナルアダプター分子 BLNK やリン酸化チロシンが継続的にエンドソームへ局在していたことはエンドソームが細胞表面とは別個のシグナル伝達の間としての役割があると考えられる。これらの結果は、エンドソームにおいて産生される長期的な活性酸素が B 細胞の活性化に重要であるという考えを支持するものである。すなわち、エンドソームに架橋された BCR が長く維持されることで持続的な活性酸素の産生を誘導し、活性酸素がエンドソーム近傍で活性化シグナルを増強することで増殖などの現象が成立すると考えられる。BLNK のエンドソームへのリクルートやリン酸化チロシンのエンドソームへの局在は活性酸素による影響を受けなかったが、これは活性酸素がシグナル伝達分子の局在ではなくリン酸化修飾の調節に役割を持っているからであると考えられる。

抗 IgM 抗体はエンドソームに長時間局在が見られたが、糖鎖抗原は同様の性質を示すことに加えて細胞内において極めて安定であった。刺激開始後まもなく抗原を除いても増殖が維持されたことは初期に取り込まれた糖鎖抗原が B 細胞の活性化に十分であることを意味している。糖鎖抗原による増殖が活性酸素阻害の影響を受けなかった結果に関しては、活性酸素によるシグナル増強がなくともエンドソームに安定的に維持された抗原が十分なシグナルを誘導するためであると考えられる。本研究により糖鎖抗原の物性的特徴が B 細胞活性化の調節に関与していることが初めて示唆された。

<結論>

BCR はエンドソームで持続的なシグナル伝達を引き起こしている。糖鎖抗原のエンドソームにおける安定性は T 細胞非依存的な B 細胞活性化を可能にしている。

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	高田 俊太朗
論文審査担当者	主査：石野 史敏 副査：仁科 博史 副査：中西 啓
論文題目	Role of Endosome in B cell Antigen Receptor Signaling and Activation by Polysaccharide Antigens.
(論文審査の要旨) B 細胞抗原受容体 (BCR) のエンドサイトーシスは、B 細胞活性化にかかわるシグナル伝達を集結させる役割を話していると考えられてきたが、申請者のグループはエンドソーム内にとりこまれた BCR が長期の活性化酸素産生を介してシグナル伝達に重要な役割を果たしたという考えを提出している。本研究は、BCR がエンドソーム内に取り込まれた後も消化を受けず比較的安定に存在し、リサイクリング経路にも入らないこと、これにより引き起こされた活性化酸素産生が B 細胞活性化に重要なことを明らかにした。また、ニトロフェノール修飾をしたデキストランを糖鎖抗原として用いた場合には、細胞内で強い分解耐性を示すことで長期間エンドソームに存在すること、30 分の処理で B 細胞の増殖を誘導でき、この場合の増殖は活性化酸素産生に非依存的に起きることなどを明らかにした。 この T 細胞非依存的な糖鎖抗原による B 細胞活性化は、細菌感染に対応する機構と考えられ、免疫学の重要な課題の解明に貢献するものである。	