

学位論文題名

Negative regulation of apoptotic death in immature B cells by CD45

(CD 45による未熟B細胞アポトーシスの制御)

学位論文内容の要旨

目 的

B細胞抗原レセプター刺激により、1分以内にいくつかの蛋白質のチロシンリン酸化が誘導される。この生化学的な変化に始まるシグナルのカスケードにより、成熟B細胞においては活性化・増殖が誘導され、未熟B細胞においては増殖抑制・アポトーシス（プログラムされた細胞死）が誘導される。このリンパ球の活性化と不活化は、外来抗原に対する免疫応答と自己成分に対する免疫寛容の基礎にある機構であるが、未だ不明な点が多い。

本研究では、チロシンの脱リン酸化を触媒する酵素（チロシンホスファターゼ）の中で造血系細胞に局限して発現しているCD 45を取り上げ、未熟B細胞がアポトーシスに至る過程をこの分子がどのように制御しているのかを検討した。

方 法

1. 細胞

未熟B細胞の表現型（膜型IgM⁺⁺、膜型IgD[±]）を示すリンパ腫細胞WEHI-231を用いた。

2. CD 45陰性クローンの樹立

WEHI-231を変異剤処理後、抗CD 45抗体と補体によるCD 45陽性細胞傷害、さらに限界希釈法によるクローニングを行った。出現したクローンの中から、CD 45抗体とFITCを標識したプロテインAを用いたフローサイトメトリーによりCD 45陰性クローンを選び出した。

3. ノーザンブロット解析

それぞれの細胞からpoly(A)⁺ RNAを抽出し、ホルムアルデヒド：ホルムアミド変性ゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、CD 45の膜貫通領域を含む2.3kbのBam HIフラグメントをプローブとしてCD 45 mRNAの発現を検討した。

4. ホスファターゼ活性の測定

CD 45モノクローナル抗体を結合させたプロテインG-セファロースと cell lysate を反応させ、抗体と結合した分画について酵素活性の測定を行った。基質としてp-nitrophenyl phosphate を用い、生成されたp-nitrophenol の量をスペクトロフォトメーターで測定した。

5. 細胞内カルシウムイオン濃度の測定

カルシウムイオンと結合して蛍光を発するFluo-3AMを取り込ませた細胞に、抗IgM抗体10 µg/mlを添加した後5分間の蛍光強度の変化について、フローサイトメーターで解析した。

6. ウェスタンブロット解析

それぞれの細胞を抗IgM抗体40 µg/mlで1分間刺激後、1% Triton-X-100で可溶化した分画についてSDS-PAGEで展開し、ニトロセルロース膜に転写した。チロシンリン酸化蛋白質の検出は、マウス抗ホスホチロシン抗体とアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス抗体で行った。

7. 細胞増殖の測定

それぞれの細胞を抗IgM抗体(0.1 µg/ml ~ 10 µg/ml)で48時間から72時間刺激した後、細胞数、及び $[^3\text{H}]$ Thymidineの取り込みを測定し、抗体非添加群を対照とした%増殖抑制を算出した。

8. DNA断片化

抗IgM抗体(0.1 µg/ml ~ 10 µg/ml)で刺激後20時間のサンプルから断片化されたDNAを抽出し、アガロース電気泳動による解析を行った。

結 果

1. 未熟B細胞株WEHI-231からのCD45陰性クローンの樹立

限界希釈法により得られたクローンについて、細胞表面のCD45の発現を調べた結果、10-5、31-2、39-2という3種類のCD45陰性クローンを得た。また、クローン39-2を継代培養中にCD45の発現を回復したリバータント(39-2 rvt)を得た。これらのクローンについて膜型IgM、膜型IgDの発現を調べたところ、親株との差は認められなかった。また、他の細胞表面分子H-2、Ia抗原についても親株と得られたクローンとの間での発現の差は認められなかった。

2. CD45陰性クローンにおけるCD45 mRNA及びホスファターゼ活性の発現

ノーザンブロット解析により、WEHI-231親株とCD45陰性クローン、リバータントにおけるCD45 mRNAの発現を調べた。その結果、親株では強い発現が認められるのに対し、いずれの陰性クローンでも発現は消失しており、mRNAレベルでの発現も抑えられていることが明らかとなった。リバータントでの発現は親株とほぼ同程度に回復していた。また、CD45陰性クローンにおけるCD45ホスファターゼ活性はほとんどなくなっているのに対し、リバータントでは親株と同様の活性を示した。

3. CD45陰性クローンと親株における機能的相違

a. 蛋白質チロシンリン酸化は、親株では刺激後初めて強く誘導されるのに対し、CD45陰性クローンではいずれも刺激前から構造的にチロシンリン酸化が亢進しており、抗IgM抗体刺激によるチロシンリン酸化の増強は認められなかった。

b. 抗IgM抗体刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の動態は、親株とリバータントでは一過的に強いカルシウムイオン濃度の上昇が認められた。それに対し、いずれの陰性クローンでも上昇のピークは親株より30秒ほど遅れ、イオン濃度の低下の速度も遅くなっていた。

c. 抗IgM抗体刺激による細胞増殖抑制は、親株では30～60%であったのに対し、陰性クローンでは70～90%とより強い抑制が認められた。リバータントでは親株とほぼ同様の抑制が認められた。

d. 抗IgM抗体刺激によるDNA断片化は、親株と比べて陰性クローンで増強していた。

考 察

未熟B細胞におけるCD45の機能を解明する目的で、WEHI-231からCD45陰性クローンを樹立し、その性状を親株と比較検討した。その結果、CD45陰性クローンでは構成的なチロシンリン酸化が認められ、CD45がチロシンリン酸化のホメオスターシスに関与していることが推測される。また、抗原レセプター刺激による細胞内カルシウムイオンの動員、細胞増殖抑制、アポトーシスは、親株に比してCD45陰性クローンで増強していた。これらの結果は、CD45が抗原レセプターを介して誘導されるアポトーシスに至るシグナル伝達機構をネガティブに制御していることを示唆している。T細胞、及び膜型IgMをトランスフェクトした形質細胞腫では、CD45の発現がなければ抗原レセプターを介するシグナルが伝達されないという報告を考慮に入れると、CD45の機能が細胞型や細胞の分化段階の違いにより異なっている可能性が想定される。この点を明らかにするためには、成熟B細胞でのCD45の機能を解析することが不可欠であると考えられる。

結 語

本研究により、チロシンホスファターゼであるCD45は、未熟B細胞におけるチロシンリン酸化や細胞内カルシウムイオンの動員などの初期のシグナルのみならず、増殖抑制、アポトーシスに至るシグナルをも制御していること、さらにその制御はネガティブであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Negative regulation of apoptotic death in immature B cells by CD45

(CD 45による未熟B細胞アポトーシスの制御)

目的: B細胞抗原レセプター刺激により、1分以内にいくつかの蛋白質のチロシンリン酸化が誘導される。この生化学的な変化に始まるシグナルのカスケードにより、成熟B細胞においては活性化・増殖が誘導され、未熟B細胞においては増殖抑制・アポトーシス（プログラムされた細胞死）が誘導される。このリンパ球の活性化と不活化は、外来抗原に対する免疫応答と自己成分に対する免疫寛容の基礎にある機構であるが、未だ不明な点が多い。

本研究では、チロシンの脱リン酸化を触媒する酵素（チロシンホスファターゼ）の中で造血系細胞に限局して発現しているCD45を取り上げ、未熟B細胞がアポトーシスに至る過程をこの分子がどのように制御しているのかを検討した。

方法: 細胞としては、未熟B細胞の表現型（膜型IgM⁺⁺、膜型IgD[±]）を示すリンパ腫細胞WEHI-231を用いた。このWEHI-231を変異剤処理後、抗CD45抗体と補体によるCD45陽性細胞傷害、さらに限界希釈法によるクローニングを行い、フローサイトメトリーにより、CD45陰性クローンを選び出した。得られたクローンからpoly(A)⁺ RNAを抽出し、ホルムアルデヒド：ホルムアミド変性ゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、CD45の膜貫通領域を含む2.3kbのBamHIフラグメントをプローブとしてCD45 mRNAの発現を検討した。また、CD45モノクローナル抗体を結合させたプロテインG-セファロースとcell lysateを反応させ、抗体と結合した分画について酵素活性の測定を行った。基質としてp-nitrophenyl phosphateを用い、生成されたp-nitrophenolの量をスペクトロフォトメーターで測定した。蛋白質のチロシンリン酸化は、それぞれの細胞を抗IgM抗体40 µg/mlで1分間刺激後、1% Triton-X-100で可溶化した分画についてSDS-PAGEで展開し、ニトロセルロース膜に転写した。チロシンリン酸化蛋白質の検出は、マウス抗ホスホチロシン抗体とアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス抗体で行った。細胞内カルシウムイオン濃度の測定は、カルシウムイオンと結合して蛍光を発するFluo-3 AMを取り込ませた細胞に、抗IgM抗体10 µg/mlを添加した後5分間の蛍光強度の変化について、フローサイトメーターで解析した。細胞増殖の測定は、それぞれの細胞を抗IgM抗体(0.1 µg/ml ~ 10 µg/ml)で48時間から72時間刺激した後、細胞数、及び [³H]Thymidineの取り込みを測定し、抗体非添加群を対照とした%増殖抑制を算出した。

DNA断片化については 抗IgM抗体 (0.1 μ g/ml ~10 μ g/ml) で刺激後20時間のサンプルから断片化されたDNAを抽出し、アガロース電気泳動による解析を行った。

結果及び考察：未熟B細胞におけるCD45の機能を解明する目的で、WEHI-231からCD45陰性クローンを樹立し、その性状を親株と比較検討した。その結果、CD45陰性クローンでは構成的なチロシンリン酸化が認められ、CD45がチロシンリン酸化のホメオスターシスに関与していることが推測された。また、抗原レセプター刺激による細胞内カルシウムイオンの動員、細胞増殖抑制、アポトーシスは、親株に比してCD45陰性クローンで増強していた。これらの結果は、CD45が抗原レセプターを介して誘導されるアポトーシスに至るシグナル伝達機構をネガティブに制御していることを示唆している。T細胞、及び膜型IgMをトランスフェクトした形質細胞腫では、CD45の発現がなければ抗原レセプターを介するシグナルが伝達されないという報告を考慮に入れると、CD45の機能が細胞型や細胞の分化段階の違いにより異なっている可能性が想定される。この点を明らかにするためには、成熟B細胞でのCD45の機能を解析することが不可欠であると考えられる。

結語：本研究により、チロシンホスファターゼであるCD45は、未熟B細胞におけるチロシンリン酸化や細胞内カルシウムイオンの動員などの初期のシグナルのみならず、増殖抑制、アポトーシスに至るシグナルをも制御していること、さらにその制御はネガティブであることが示唆された。

口頭発表にあたり、葛巻教授より、B細胞のCD45の基質について、石橋教授より、未熟Bリンパ腫使用による実験結果の信頼性、カルシウム放出の系について、上出教授より、CD45陰性クローンにおけるCD45以外の膜型ホスファターゼの発現・機能、及びCD45エクソン6ノックアウトマウスでの結果との矛盾について、小林教授より、親株とCD45陰性クローンにおける増殖及びカルシウム放出パターンの相違、CD40の関与について、細川教授よりB細胞のアポトーシスの機序について、小野江教授より、CD45によるチロシンキナーゼの脱リン酸化機構について、柿沼教授より、アポトーシスにおけるDNaseの関与について質問がなされた。申請者は概ね適切な解答をした。また、副査の葛巻、上出両教授には個別の審査を受け合格と判断された。

以上、本研究は、マウス未熟B細胞腫から初めてCD45陰性クローンを樹立し、未熟B細胞アポトーシスにおけるCD45の役割を明かにしたものであり、免疫系の重要な機能である免疫応答と免疫寛容の機構の解明に大きく寄与するものである。よって、本論文は医学博士の学位授与に値するものと判断される。