

学位論文題名

CXCR4 expression on activated B cells is
down-regulated by CD63 and IL-21

(CD63と IL-21は活性化 B 細胞上の CXCR4発現を抑制する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

胚中心は脾臓やリンパ節内に形成され、ここで成熟 B 細胞が高親和性記憶 B 細胞や長期生存形質細胞に分化する。組織学的にはセントロブラスト (Centroblast; CB) が構成する暗帯とセントロサイト (Centrocyte; CC) が構成する明帯の二つに区分され、機能的に大きく異なる。暗帯の CB は盛んに増殖しながら免疫グロブリン可変部の体細胞高頻度突然変異を起こすのに対し、明帯の CC はほとんど増殖せずに、IL-4 や IL-21 を産生する胚中心濾胞ヘルパー T 細胞の協力の下で濾胞樹状細胞上の特異的な抗原との結合能を試され、高親和性の CC のみクラススイッチして、高親和性記憶 B 細胞や長期生存形質細胞に分化する。明帯と暗帯の極在化には胚中心 B 細胞上の CXCR4 の発現調整が重要で、CB では CXCR4 が高発現であるのに対し、CC では低発現となる。しかしこの発現制御機構は未だ解明されていない。

T 細胞や腫瘍細胞上の CXCR4 の制御機構に関しては、遺伝子・蛋白合成レベルの制御に加え、クラスリン依存性のエンドサイトーシスと CD63 分子によるエクソサイトーシスの調整が知られている。一方、胚中心における B 細胞分化を模した培養系として脾臓ナイーブ B 細胞を抗 CD40 抗体と抗 IgM 抗体、IL-4 で刺激した後、培養 2 日目に IL-21 で追加刺激すると、IL-21 で活性化 B 細胞上の CXCR4 の発現が低下することが知られている。

以上より、本研究は胚中心 B 細胞及び活性化 B 細胞上の CXCR4 の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

活性化 B 細胞上における CXCR4 発現の制御機構を明らかにするために、まず前述の培養系の IL-21 による CXCR4 の抑制機構に着目した。IL-21 又は IL-4 による追加刺激後の CXCR4 mRNA 及び、細胞内蛋白量に有意差は認められなかった。一方、IL-21 と dynamin 阻害薬を同時に添加してエンドサイトーシスを阻害すると、培養 4 日目の CXCR4 の発現は IL-4 刺激時と同レベルにまで増加した。また IL-21 追加刺激により CXCR4 のエンドサイトーシスに関与する *GRK6* の mRNA の発現量が有意に上昇し、IL-21 による CXCR4 発現低下は *GRK6* の発現亢進に伴う CXCR4 エンドサイトーシスの亢進によることが考えられた。

次に、胚中心 B 細胞における CXCR4 低下における IL-21 の作用を検討する目的でアラム溶解 NP-CG で免疫した胚中心 B 細胞を FACS で純化 ($B220^{+}GL7^{+}FAS^{+}$) し、IL-21 を添加して 48 時間培養したところ、胚中心 B 細胞上の CXCR4 の発現は低下した。しかし IL-21 受容体欠損マウスと野生型マウスを同様に免疫し、胚中心 B 細胞上の CXCR4 の発現量を比較したところ、両者に有意差を認めなかった。以上の結果から、IL-21 は胚中心 B 細胞上の CXCR4 発現を低下させる作用を持つが、その発現調整を IL-21 の作用のみで説明できないことが明らかとなった。

そこで胚中心 B 細胞上の CXCR4 発現調節機構を明らかにする目的で、CB ($B220^{+}GL7^{+}FAS^{+}CXCR4^{+}$) と CC ($B220^{+}GL7^{+}FAS^{+}CXCR4^{-}$) を純化し、後述の分子の mRNA 発現量を検討した。単離した CC 及び CB 内の *Bcl6* と *IRF-4* の mRNA 量は有意に逆相関の関係にあったが、CXCR4 の発現量は両者に有意差を認めなかった。さらに胚中心 B 細胞内の CXCR4 蛋白

量は均一であったため、CC 上の CXCR4 の発現低下は、転写レベルではなくエンドサイトーシスやエクソサイトーシスによって調節される可能性が考えられた。そこで GRK6 と CD63 の mRNA 発現量を検討したところ、GRK6 は両者で有意差を認めなかったが、CD63 は CB と比べ CC で有意に発現が増加していた。CD63 は、CD4 陽性 T 細胞において CXCR4 分子と直接結合し、CXCR4 をエンドソームに輸送することで、細胞表面上の CXCR4 発現を低下させることが知られており、胚中心 B 細胞においても CXCR4 の発現調節に関与する可能性が示唆された。

Bcl6 分子は胚中心 B 細胞で強発現する抑制性転写制御因子で、胚中心形成に必須である。CB と CC の mRNA の検討で Bcl6 と CD63 の発現量が逆相関していたことから、CD63 の発現を Bcl6 が抑制している可能性を考え、両者の関連性を検討した。そこで Bcl6 欠損 B 細胞と野生型 B 細胞を前述の培養系で 4 日間培養し、CD63 の mRNA 量と蛋白量を測定した。培養前及び全ての培養条件下で CD63 の mRNA 及び蛋白の発現量が野生型 B 細胞と比較して著明に上昇していた。データベース (<http://www.gene-regulation.com>) を用いた解析で、CD63 遺伝子に Bcl6 の結合可能な配列を同定したことから、同部位の Bcl6 結合量とアセチル化ヒストン (Ac-H3) の量をクロマチン免疫沈降法で解析したところ、野生型ナイーブ B 細胞で同部位に Bcl6 結合を認め、Bcl6 欠損 B 細胞では同領域のヒストンアセチル化の亢進を認めた。以上から、CD63 遺伝子が Bcl6 の標的遺伝子であると考えられた。

さらに、活性化 Bcl6 欠損 B 細胞上における CXCR4 の発現を、前述の培養法で検討したところ、CXCR4 の発現は IL-21 添加のみならず、IL-4 添加でも低下した。CXCR4 の mRNA 発現量や細胞内 CXCR4 の発現量は、野生型の活性化 B 細胞と有意差がなく、Dynamin 阻害薬を用いたエンドサイトーシスの阻害実験でも Bcl6 欠損 B 細胞上の CXCR4 の発現は変わらなかった。以上の結果から、活性化 Bcl6 欠損 B 細胞における CXCR4 の低下には CD63 の高発現が関与していることが示唆された。

また、Bcl6 欠損 B 細胞を前述の培養系で 2 日間培養した後、電気穿孔法で CD63 の siRNA を導入し CD63 の mRNA を阻害したところ、CXCR4 の細胞上発現は対照群と比較し CD63 を阻害した細胞で上昇した。さらに、Bcl6 阻害薬の存在下で野生型 B 細胞を前述の培養系で刺激したところ、阻害薬を添加した細胞上の CXCR 発現は低下し、CD63 の mRNA 発現量は阻害薬の濃度依存性に増加した。以上の結果から、活性化 B 細胞上の Bcl6-CD63 を介した CXCR4 の発現制御機構が明らかとなった。

【考察】

本研究で、私は活性化 B 細胞上の CXCR4 の発現低下に関し、2 つの異なる機構を解明した。IL-21 は胚中心濾胞ヘルパー T 細胞が分泌する主要なサイトカインであること。また、CD63 は CXCR4 のみならず MHC class II や BCR に代表される胚中心 B 細胞の生存や細胞死を選択するために重要な分子の発現を調整すること。以上から、これらの機構を更に解明することは、高親和性の記憶 B 細胞や長期生存型形質細胞の分化機構を解明する一助となると考えられた。

【結論】

マウス活性化 B 細胞上の CXCR4 の発現に対して、IL-21 は GRK6 発現亢進を介した CXCR4 のエンドサイトーシスにより抑制的に制御し、Bcl6 は CD63 の発現抑制により促進性に制御する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 瀬 谷 司
副 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学位論文題名

CXCR4 expression on activated B cells is down-regulated by CD63 and IL-21

(CD63と IL-21は活性化 B 細胞上の CXCR4発現を抑制する)

CXCR4の発現は胚中心暗帯のセントロブラスト(Centroblast; CB)の極在に必須であり, CXCR4の発現が低下することでセントロサイト(Centrocyte; CC)は暗帯を離れ明帯へと形成する. しかしこのCXCR4の発現制御機構は明らかではない. 本研究ではCB内のCXCR4の細胞内蛋白量はCC内と変わらなかったことから, 胚中心B細胞上のCXCR4の発現制御には転写以外の機構が存在する可能性が考えられた.

研究は, マウス脾臓からMACS を用いてCD43陰性の細胞を回収することで純化したナイーブB細胞に対し, 培養初日にT細胞依存性の抗原刺激を模してIL-4, 抗CD40モノクローナル抗体, 抗マウスIgM抗体 F(ab)'₂で刺激して, 2日間培養した活性化B細胞を用いた. 野生型の活性化B細胞に濾胞性ヘルパーT細胞から分泌される主要なサイトカインであることが知られているIL-21を添加して再刺激すると, エンドサイトーシスに参与するGRK6の発現亢進を介してCXCR4のエンドサイトーシスが亢進した. しかしながら, 免疫後のIL-21受容体欠損マウス脾臓における胚中心B細胞上のCXCR4発現を検討すると, CXCR4の発現が低下したCCも分化していたため, CCでは更に別のCXCR4発現低下機構が関与している可能性が考えられた.

ここでCD4陽性T細胞においてCXCR4をエンドソームに輸送することが知られているCD63分子に注目して, CBとCCにおける同分子のmRNAの発現量を比較したところ, CCで発現が上昇していた. さらに, Bcl6は胚中心形成に必須な転写抑制因子として知られているが, Bcl6のmRNAの発現量はCD63と対照的にCCと比べてCBで上昇していた. このことから, Bcl6の発現量の低下に伴うCD63の発現亢進がCCにおけるCXCR4の発現低下に参与する可能性を考えた. そこで先程と同様の培養系を用いてBcl6欠損マウス脾臓B細胞を活性化させたところ, 全ての刺激で細胞表面のCXCR4の発現は低下し, CD63の発現が著明に亢進していた. 野生型のナイーブB細胞において, CD63遺伝子のクロマチンにBcl6が結合していたことから, CD63はBcl6の標的遺伝子であることが示唆された. また, Bcl6欠損B細胞のCD63をsmall interfering RNAを用いて阻害すると, CXCR4の発現が上昇し, 活性化B細胞にBcl6阻害薬を添加するとCD63のmRNA量が容量依存性に増加し, 細胞表面CXCR4発現

量が低下した。

以上の結果から、本研究では、活性化B細胞上のCXCR4発現低下はIL-21を介したエンドサイトーシスの亢進及びCD63を介したエンドソームへの輸送亢進によって制御されることを証明し、これらの機構がCCIにおけるCXCR4の発現低下に関与していることが示唆された。

質疑応答では、副査の笠原正典教授から、本研究で証明した二つの活性化B細胞におけるCXCR4低下機構の関連に関する質問があった。また活性化B細胞におけるCXCR4の発現制御が転写調整機構ではなくエンドサイトーシスやエクソサイトーシスの調整によって行われる生理的意義についての質問があった。次いで副査の小池隆夫教授から骨髄におけるCXCR4の発現調節に関する質問があり、CXCR4の発現制御機構が複数存在することの意義について質問があった。さらに、主査の瀬谷司教授から、本研究で証明したCXCR4の発現調節機構が胚中心以外のCXCR4発現調整に関与する可能性について質問を受けた。いずれの質問に対しても、申請者は過去の論文報告の引用や未発表の実験結果を用いて概ね適切に回答した。

この論文は、胚中心B細胞に代表される活性化B細胞におけるCXCR4の発現制御機構を明らかにしたことが高く評価され、今後、高親和性の記憶B細胞や長期生存型形質細胞の分化機構を解明するための一助となることが、期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。