

学位論文題名

Effects of AhR ligands on the production of immunoglobulins in purified mouse B cells

(精製マウスB細胞における抗体産生へのAhRリガンドの影響)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) は環境汚染物質である 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) に代表されるダイオキシン等の多環性芳香族炭化水素化合物によって活性化される核内受容体である。その主な作用としては薬物代謝酵素 (CYP1A1, 1A2 等) の発現誘導の転写因子として働くことが知られている。また、TCDD による種々の毒性 (催奇形性、免疫抑制、発ガンの促進等) は AhR により仲介されることが報告されている。

近年、AhR リガンドが T 細胞の Th17/Treg 分化や Th1/2 分化に影響を与えることが報告されるなど、AhR の T 細胞分化への関与を示す報告が相次いでおり、AhR の免疫系での機能が注目されている。一方、AhR の B 細胞における機能については、現在までのところ良くわかっていない。これまでに、TCDD 投与マウスにおける抗体産生抑制、TCDD によるマウス B 細胞株からの IgM 産生抑制等の報告がなされており、B 細胞においても AhR が抗体産生に何らかの機能を有していることが推察されていた。しかしながら、TCDD は毒性が強く、且つ、AhR 以外への作用も示唆されていることから、B 細胞での AhR の機能を解析するツールとしては TCDD 以外の AhR アゴニストによる検証が望ましいと考えられる。現在までのところ、幾つかの内在性 AhR アゴニストの存在が報告されているが、これまでに内在性 AhR アゴニストによる B 細胞の抗体産生への影響については報告がされていなかった。

本研究は B 細胞における AhR の機能を解析する目的で、トリプトファン代謝産物で内在性 AhR アゴニストの一つである 2-(1^H-indole-3[′]-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE) と、対照化合物として合成 AhR アンタゴニストである CH223191 の 2 種類の化合物を用い、精製マウス B 細胞からの抗体産生への影響を評価し、その作用機序を解析することを目的として実験を行った。

【材料と方法】 マウス脾臓よりナイーブ B 細胞を磁気ビーズにより精製し、ITE 又は CH223191 添加後に T 細胞依存的な刺激である anti-CD40 抗体と IL-4 で共刺激を行った。培養 3 日目及び 6 日目に、培養細胞より total RNA を精製し、Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 法により各種遺伝子の発現量を測定した。また、培養 6 日目の培養上清について、IgM、IgG1 及び IgE 量を ELISA 法により測定した。また、培養 6 日目の培養細胞を用い、ELISPOT 法にて一定細胞数あたりの IgG1 産生細胞数を測定した。

【結果】 精製したマウス B 細胞を各 AhR リガンド存在下で anti-CD40 抗体/IL-4 で共刺激を行い、培養 6 日目の AhR 及び AhR 活性化マーカー遺伝子である Cyp1a1 遺伝子発現への影響を qRT-PCR 法にて評価した。その結果、各リガンドによる AhR 発現への影響は認められなかった。一方、Cyp1a1 発現は AhR アゴニストである ITE 処理により顕著に誘導され、AhR アンタゴニストである CH223191 処理では影響は認められなかった。以上の結果より、ITE は培養 6 日目まで AhR 活性化能を保持していることを確認した。次に、上記条件下での精製マウス B 細胞からの IgM、IgG1 及び IgE 産生への影響を ELISA 法にて評価した。その結果、ITE 処理により精製マウス B 細胞からの IgM、IgG1 及び IgE 産生量は 50% 程度まで抑制された。一方、CH223191 処理では IgG1 産生量が若干ながら促進

する傾向を示した。

AhR リガンドによる抗体産生制御の作用機序を解明する目的で、培養 3 日目の各 AhR リガンドによるクラススイッチへの影響を評価した。その結果、ITE 及び CH223191 処理は B 細胞のクラススイッチに重要な $\gamma 1$ 及び ϵ germinal transcripts の発現や組み換え関連酵素である AID や UNG の発現には影響を与えなかった。次に、AhR リガンドによる B 細胞のプラズマ細胞分化への影響を評価する目的で、培養 6 日目の細胞を用いて各抗体の膜結合型及び分泌型 mRNA の発現を qRT-PCR 法で評価した。その結果、ITE 処理は IgG1 及び IgE の膜結合型 mRNA の発現にほとんど影響を与えないが、分泌型 mRNA の発現を抑制していた。また、ELISPOT 解析により、AhR リガンドによる IgG1 抗体分泌細胞形成への影響を評価した。その結果、ITE 処理は IgG1 分泌細胞形成を抑制し、CH223191 処理は促進することを確認した。

さらに、ITE によるプラズマ細胞分化抑制のメカニズムを解析する目的で、培養 6 日目のプラズマ細胞分化促進転写因子 (Blimp-1, XBP-1)、プラズマ細胞マーカー (Syndecan-1)、プラズマ細胞分化抑制転写因子 (Pax-5) の発現への影響を qRT-PCR 法にて評価した。その結果、ITE 処理により XBP-1 及び Syndecan-1 の発現は抑制される傾向を示した。一方、Blimp-1、Pax-5 の発現にはほとんど影響を示さなかった。

以上の結果は、内在性アゴニストである ITE がマウス B 細胞に直接作用して、プラズマ細胞への分化を抑制することにより、抗体産生を抑制していることを示している。

【考察】 本研究において、TCDD 同様、内在性 AhR アゴニストである ITE も、B 細胞に直接作用し、抗体産生を抑制することが明らかとなった。この結果は、内在性 AhR リガンドが生体内において B 細胞の分化・機能を制御している可能性を示唆している。一方、合成 AhR アンタゴニストである CH223191 は弱いながらも IgG1 産生を促進する活性を示した。この結果も、B 細胞において内在性 AhR リガンドが抗体産生に影響を与えていることを示唆するものかもしれない。

本研究の結果、ITE による B 細胞の抗体産生抑制機序は、B 細胞のプラズマ細胞への分化の抑制であることが明らかとなった。B 細胞のプラズマ細胞への分化は、いくつかの転写因子から成るネットワークにより制御されていることが報告されている。この内、Blimp-1 と XBP-1 はプラズマ細胞分化促進転写因子として報告されており、一方、Pax-5 はプラズマ細胞分化抑制転写因子として報告されている。これまでに LPS 刺激したマウス B 細胞株の研究で、TCDD は Pax-5 の発現を誘導することにより、Pax-5 が Blimp-1、XBP-1 の発現を抑制し、プラズマ細胞分化を抑制するメカニズムが提唱されている。一方、本研究の結果では、ITE は Pax-5、Blimp-1 発現にはほとんど影響を与えておらず、XBP-1 発現を抑制していた。XBP-1 はプラズマ細胞分化に必須な転写因子であり、主に分泌関連の遺伝子発現制御に働いていると報告されている。ITE は主に XBP-1 の発現を抑制することにより、プラズマ細胞への分化を抑制しているのかも知れない。

【結論】 本研究によって、内在性 AhR アゴニストである ITE がマウス B 細胞に直接作用して、その抗体産生を抑制することが明らかとなった。今後、AhR アゴニストによる抗体産生抑制作用の詳細な分子メカニズムを解明することにより、B 細胞をターゲットとした抗自己免疫疾患薬、抗炎症薬等の開発が期待できるかもしれない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 清 野 研 一 郎
副 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 高 岡 晃 教

学位論文題名

Effects of AhR ligands on the production of immunoglobulins in purified mouse B cells

(精製マウスB細胞における抗体産生へのAhRリガンドの影響)

本研究において、AhRの内在性アゴニストであるITEと合成AhRアンタゴニストであるCH223191を用い、精製マウスB細胞からの抗体産生への影響、及び、その作用機序について検討した。申請者は、本実験系において、ITE処理によりB細胞からのIgM、IgG1及びIgEの産生が抑制されることを確認した。また、CH223191処理により抗体産生量がわずかに増加傾向になることを観察した。ITEによる抗体産生抑制の作用メカニズム解析では、ITE処理はクラススイッチや各抗体の膜結合型mRNAの発現には影響を与えないが、分泌型mRNAの発現を抑制することを確認した。さらにITE処理によりIgG1抗体産生細胞数が減少し、プラズマ細胞のマーカ遺伝子であるSyndecan-1の発現も抑制されることを確認した。また、プラズマ細胞分化に関与する3つの転写因子(Blimp-1、XBP-1、Pax-5)について、ITE処理による発現への影響を評価した結果、プラズマ細胞の誘導因子であるXBP-1の発現が抑制されていることを確認した。以上の結果は、AhRアゴニストがB細胞に直接作用し、XBP-1の発現を抑制することによりプラズマ細胞への分化を抑制している可能性を示唆するものであった。

学位論文発表後、副査である清野研一郎教授からAhRアゴニストはin vivoでも抗体産生に作用するのか質問があり、未発表データであるが、AhRアゴニストによるマウスIgE産生モデルでのIgE産生抑制効果を確認しているとの返答があった。また、副査である高岡晃教教授からITEとCH223191はどのような化合物かとの質問があり、ITEは豚の肺よりAhRアゴニスト活性のある内在性アゴニストとして精製された化合物であり、CH223191はAhRのレポーター遺伝子アッセイでTCDDに対しアンタゴニスト活性を有する化合物としてスクリーニングされてきた化合物であるとの返答があった。さらに、AhRリガンドの抗体産生抑制作用の種差の影響について質問があり、未発表データであるが、AhRアゴニストによるヒトB細胞からの抗体産生抑制効果を確認しているとの返答があった。また、ITEによる抗体の分泌型mRNAの発現抑制はXBP-1の発現抑制により説明が可能かとの質問があり、分泌型mRNAの合成にはCstF-64の発現が関与していると報告されているが、これまでにXBP-1がCstF-64の発現を制御しているとの報告はなく、また、ITEがCstF-64の発現に影響を与えているかは今回検討していないとの返答があった。また、副査の西村孝司教授より、免疫系が関与する各種疾患に対し、AhRのアゴニストやアンタゴニストを薬剤とし

て使用する場合、どのようなことを考慮すべきかとの質問があり、AhR は今回示した B 細胞の他にも、T 細胞への作用が報告されていることから、対象とする疾患において B 細胞や T 細胞がどの様に関与しているかを明らかにして、さらにこれらの細胞に対する各 AhR リガンドの作用を把握することにより、総合的に判断する必要があるとの返答があった。また、主査の上出利光教授より ITE の B 細胞と T 細胞への作用用量に違いはあるかとの質問があり、ITE の T 細胞への影響は未検討であるが、今後、是非検討する予定であること、また、マウス B 細胞への作用用量はマウス AhR に対する Kd 値とほぼ同じ用量から作用しているとの返答があった。さらに、進化の段階で AhR はどの段階から存在しているのか、及び、AhR は外来異物に対する制御分子として働いているが、進化の過程での AhR の存在意義は何かとの質問があり、下等なものでは *C. elegans* や *Drosophila* の段階で既に AhR 遺伝子の存在が報告されていること、及び、これら無脊椎動物では AhR に ligand binding domain が無い事から、AhR は本来生体形成に必要な分子としてもともと存在していたと考えるが、脊椎動物へ進化する過程で外来異物に対する制御分子としての機能を獲得したと考えているとの返答があった。

この論文は、AhR アゴニストが直接 B 細胞に作用して IgM、IgG1 及び IgE 産生を抑制すること、及び、AhR アゴニストの抗体産生抑制における XBP-1 の重要性を示したのみでなく、内在性の AHR アゴニストが実際に B 細胞で作用することを示した点で高く評価され、今後、炎症や自己免疫疾患の改善を目指した新規治療法の開発に寄与す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、これまでの研究活動における研鑽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。