

Toll 様受容体 7 リガンドによる B 細胞活性化機構の解析

塚本 裕美子

目次

略語表	3
概要	6
序論	7
結果	13
考察	22
まとめ・今後の展望	28
材料と方法	30
参考文献	37
表	
図	
謝辞	

略語表

53BP1	transformation related protein 53 Binding Protein 1
6-SGuo	6-mercaptoguanosine、6-メルカプトグアノシン
8-BrA	8-bromoadenosine、8-ブロモアデノシン
8-BrGuo	8-bromoguanosine、8-ブロモグアノシン
8-SA	8-mercaptoadenosine、8-メルカプトアデノシン
8-SGuo	8-mercaptoguanosine、8-メルカプトグアノシン
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
ADP	Adenosine 5' -diphosphate、アデノシン 5' -二リン酸
ADPR	ADP Ribose、ADP リボース
APC	Allophycocyanin
APOBEC-1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
Bach2	BTB and CNC homology 2
BCL1	B-cell leukemia/lymphoma 1
Bcl-6	B-cell CLL/lymphoma 6
BCR	B Cell Receptor、B 細胞受容体
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
Btk	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
C α	immunoglobulin α Constant region、免疫グロブリン α 定常領域
C δ	immunoglobulin δ Constant region、免疫グロブリン δ 定常領域
C ϵ	immunoglobulin ϵ Constant region、免疫グロブリン ϵ 定常領域
C γ 1	immunoglobulin γ 1 Constant region、免疫グロブリン γ 1 定常領域
C γ 2a	immunoglobulin γ 2a Constant region、免疫グロブリン γ 2a 定常領域
C γ 3	immunoglobulin γ 3Constant region、免疫グロブリン γ 3 定常領域
C μ	immunoglobulin μ Constant region、免疫グロブリン μ 定常領域
cADP	cyclic ADP、サイクリック ADP
cADPR	cyclic ADPR、サイクリック ADP リボース
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA、相補的 DNA
CFSE	CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester
CH γ 1	immunoglobulin γ 1 Heavy chain Constant reagon、免疫グロブリン g1 重鎖 定常領域
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation、クロマチン免疫沈降
CSR	Class Switch Recombination、クラススイッチ組み換え

DC	Dendritic Cell、樹状細胞
DNA	Deoxyribonucleic acid、デオキシリボ核酸
DNA-PKcs	DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
DOC	Deoxycholate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmic Reticulum、小胞体
ERK	Extracellular Regulated MAP Kinase
Exo1	Exonuclease 1
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum、ウシ胎仔血清
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g1	gamma1
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
H2AX	H2A histone family, member X
HRP	Horseradish peroxidase、西洋ワサビペルオキシダーゼ
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
Ig	Immunoglobulin、免疫グロブリン
IL	Interleukin、インターロイキン
IL-4R α	IL-4 Receptor α 、IL-4 受容体 α 鎖
I μ	IgM I exon、IgM I エクソン領域
KO	Knock Out、ノックアウト
Lig4	Ligase IV, DNA, ATP-dependent
LM-PCR	Ligation-Mediated PCR
Lox	Loxoribine、ロキシリビン (7-アリル-8-オキソグアノシン)
LPS	Lipopolysaccharide、リポ多糖
LRR	Leucine Rich Repeat、ロイシンリッチリピート
MACS	Magnetic cell sorting
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor、マクロファージコロニー刺激因子
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NF- κ B	Nuclear Factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells
NK	Natural Killer、ナチュラルキラー
OPD	o-Phenylenediamine Dihydrochloride
PAX5	Paired box gene 5

PBS	Phosphate Buffered Saline、リン酸緩衝化生理食塩水
PCR	Polymerase Chain Reaction、ポリメラーゼ連鎖反応
pDC	plasmacytoid Dendritic Cell、プラズマサイトイド樹状細胞
PE	Phycoerythrin
PEC	Peritoneal cavity、腹腔
RANTES	Regulated upon Activation, Normally T-Expressed, and presumably Secreted
RNA	Ribonucleic acid、リボ核酸
RP105	radioprotective, 105kDa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR、逆転写 PCR
S μ	μ Switch region、 μ スイッチ領域
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SLE	Systemic Lupus Erythematosus、全身性エリテマトーデス
TIR	Toll/IL-1 Receptor ドメイン
TCR	T Cell Receptor、T 細胞受容体
TGF	Transforming Growth Factor、トランスフォーミング増殖因子
TLR	Toll-like Receptor、トル様受容体
TNF	Tumor Necrosis Factor、腫瘍壊死因子
TNP	2,4,6-trinitrophenol
UNG	Uracil DNA Glycosylase
XPB-1	X-box Binding Protein 1
XRCC4	X-ray Repair Complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
Yaa	Y chromosome-linked-autoimmune accelerator

概要

B 細胞の産生する抗体は外来抗原の認識・排除に関わり獲得免疫系において主要な機能を担う。クラススイッチ組み換えは抗体の抗原に対する特異性を変化させずに抗体の機能を変化させ、効率的な外来抗原の排除を促進する機構である。

抗 CD38 抗体及び IL-5 により脾臓 B-2 細胞に共刺激を与えると IgG1 産生細胞への分化を誘導する。しかし、抗 CD40 抗体や LPS との共刺激系においてクラススイッチ組み換えを誘導する IL-4 は、抗 CD38 抗体との共刺激ではクラススイッチ組み換えを誘導しない。私はこの系に着目し、抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激系に更に別種の刺激を加えることでクラススイッチ組み換えを惹起できるのではないかと考え種々の化合物を検討したところ 8-メルカプトグアノシン (8-SGuo) を加えることによって IgG1 産生細胞への分化を誘導することができた。8-SGuo は TLR7 のリガンドであった。

抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo の共刺激系による IgG1 産生細胞への分化の際には 8-SGuo は AID の発現を誘導することによってクラススイッチ組み換えに寄与していた。一方、IL-4 はクラススイッチ組み換えに伴う非相同 DNA 末端結合に関与する因子を誘導していることが示唆された。クラススイッチ組み換え特異的に非相同 DNA 末端結合を誘導する因子はその存在が示唆されているものの分子としては同定されていない。抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo による刺激系を詳細に解析することでその因子を初めとするクラススイッチに必要な因子を同定する可能性が示唆される。

8-SGuo の機能を既知の TLR7 リガンドであるロキソリビンと比較したところ、骨髄由来マクロファージや樹状細胞においては全くシグナルを伝達しないが脾臓 B 細胞、プラズマサイトイド樹状細胞においては 8-SGuo 刺激により特定の遺伝子発現やサイトカインの産生が見られた。

今回私が同定した新規の TLR7 リガンドである 8-SGuo は既知の TLR7 リガンドであるロキソリビンと比較して特徴的な性質を持ち、またクラススイッチ組み換えの分子機構を解明するための有用なツールになり得ることが示唆された。

序論

B 細胞は抗体を産生し病原体からの生体防御に寄与する。抗体が機能的に病原体を排除できるよう変化するクラススイッチ組み換え機構に関しては研究が進んでいるがまだ解明できていない点も多い。私は抗 CD38 抗体により B 細胞を刺激する系を用いてクラススイッチ組み換えに関与する新たな分子の同定を目指した。

獲得免疫と抗体

免疫系は生体を病原体から防御するため高度に発達したシステムであり、免疫記憶を伴う獲得免疫系と、免疫記憶を伴わない自然免疫系から成る(1)。

獲得免疫系は進化過程においては比較的遅く発達しており、軟骨魚類などからその存在が確認されている。哺乳類において獲得免疫系の機能を主に担当するのは、B 細胞及び T 細胞である。B 細胞、T 細胞はともに B 細胞受容体 (BCR)、T 細胞受容体 (TCR) と呼ばれる外来抗原を認識する受容体を発現する。これらの受容体はゲノム DNA 上における遺伝子組み換え (VDJ 組み換え) を経て極めて多数のレパトリーが産出される。この遺伝子組み換え機構が BCR や TCR による無数の外来抗原の認識を可能にする。

B 細胞は B-1 細胞と B-2 細胞に分類される。古典的な B 細胞は B-2 細胞である。B-2 細胞は骨髄内に存在する造血幹細胞から分化し、BCR の遺伝子座のゲノム DNA 組み換え完了後、一細胞につき一種類の BCR を細胞表面上に発現するようになる。この状態の B 細胞を未成熟 B 細胞と呼ぶ。未成熟 B 細胞は骨髄から脾臓などの二次リンパ器官へと移行し成熟 B 細胞へと分化する。成熟 B 細胞は外来抗原を認識すると胚中心においてクラススイッチ組み換えや体細胞高頻度突然変異を経て抗体産生細胞へと最終分化を果たす (図 1A)。最終分化時のマスター遺伝子は Blimp-1(遺伝子名 *Prdm1*)である(2, 3)。マウス Blimp-1 は、細胞株 BCL1 に IL-2 と IL-5 により刺激を与えると抗体産生細胞へと分化を遂げる際に発現が増大する分子として同定された(2)。この Blimp-1 は種々の分子の転写抑制因子として機能し、生体内においても抗体産生細胞へと分化する際に必要である。胚中心 B 細胞においては Bcl-6、Bach2 などが発現し Blimp-1 の発現を抑制しているが、クラススイッチ組み換えや体細胞高頻度突然変異が完了するとサイトカインや TLR のシグナルにより Blimp-1 が発現し Bcl-6、Pax5、AID などの胚中心において発現する遺伝子群の転写を抑制する。その結果、B 細胞は XBP-1 などの抗体産生を促進する因子を発現し抗体産生細胞へと分化を遂げる (図 1B) (3-5)。

一方、B-1 細胞は胎児期の肝臓において産生され、成体においては自己増殖によりその数を維持しているとされる。B-1 細胞は主に腹腔や腸管に存在し、その BCR のレパトリーも限られている。

BCR は成熟 B 細胞においては細胞膜表面上に発現している。一つの B 細胞が発現する BCR のレパトリーは一種類に限定されている。外来抗原を認識し、活性化した B 細胞はクローン増殖により増殖し、抗体産生細胞へと分化する。抗体産生細胞は BCR を抗体として細胞外に分泌する。

分泌された抗体は外来抗原に結合し、外来抗原の排除において機能的な役割を果たす。

B細胞のクラススイッチ組み換えについて

活性化 B 細胞により分泌される抗体は細胞外病原体やその毒素を認識し生体から排除する。抗体分子は抗原を認識する可変部（抗原結合部位）、および抗体のクラスを規定する定常部からなる（図 1C）。抗体のクラスはマウスでは IgM、IgD、IgG、IgA、IgE の 5 種類に分類され、IgG は更にサブクラスである IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 に分類される。B 細胞分化の初期段階では全ての B 細胞が IgM、IgD クラスの抗体を発現している。しかし、外来抗原を認識した成熟 B 細胞は脾臓の胚中心において惹起されるクラススイッチ組み換えは、抗体の抗原に対する特異性を変化させずに抗体の生理活性を変化させる（図 1B）。ゲノム上でこれらの定常部をコードしている領域をそれぞれ C μ 、C δ 、C γ （C γ 1、C γ 2a、C γ 2b、C γ 3）、C α 、C ϵ と呼ぶ。B 細胞が外来抗原を認識すると、ゲノム DNA 上での不可逆的な組み換え（クラススイッチ組み換え）によりクラススイッチ組み換えが誘導される。

ヒトにおいてクラススイッチ組み換えが欠失すると高 IgM 症候群と呼ばれる病態を呈する。高 IgM 症候群にはいくつかの原因遺伝子が同定されているが、原因遺伝子がいまだ不明のタイプも存在する(6)。

クラススイッチ組み換えの機構について

クラススイッチ組み換えに必要なステップについて先行研究を纏めると図 2 のようになる。

クラススイッチ組み換えを誘導するためには第一に B 細胞が増殖し、5～6 回程度の細胞分裂をすることが必要である(7, 8)。細胞の増殖後、さらにゲノム DNA 上で組み換えが惹起される。

クラススイッチ組み換えの分子機構についてはまだ良く分かっていないことが多い。しかし近年、クラススイッチ組み換えに必須な遺伝子である activation-induced cytidine deaminase (*Aicda*、蛋白質名は AID) が同定された(7, 8)。AID は RNA のシトシンをウラシルへと変換する酵素である APOBEC-1 と相同性を持ち、脾臓の胚中心 B 細胞特異的に発現している(9)。*Aicda* をノックアウトしたマウスでは抗体のクラススイッチ組み換え、体細胞突然変異が消失する(8)。体細胞高頻度突然変異はクラススイッチ組み換え同様、成熟 B 細胞において BCR をコードするゲノム DNA 上に不可逆的に突然変異が導入される現象である。しかしクラススイッチ組み換えとは異なり、抗体の可変部位に突然変異を導入することで抗体の抗原に対する特異性を上昇させる。

ヒトの高 IgM 症候群 II 型においては AID 欠損がその原因であることが知られている(9)。また線維芽細胞において AID をウイルスベクターにより強制発現させ、さらに人工基質を導入すると、人工基質のクラススイッチ組み換えを誘導できることが示され、AID がクラススイッチ組み換えにおける必須の遺伝子であることが試験管内で明らかになった(10, 11)。しかし、細胞内における AID の詳細な機能についてはまだ明らかになっていない。

AID 存在下におけるクラススイッチ組み換えの過程は、IgG1 への組み換えの場合を例にとると、

- (1) S μ 領域と S γ 1 領域のアクセシビリティ上昇
- (2) S μ 領域と S γ 1 領域の DNA 切断
- (3) 非相同的 DNA 末端結合

という順序で進行する (図 2) (10, 11)。

(1) に示した S 領域のアクセシビリティ上昇においては、胚細胞型 IgH 鎖 (IgG1 へのクラススイッチ組み換えの場合、胚細胞型 γ 1 と呼ぶ) の転写が必須である(12)。

また胚細胞型 IgH 鎖の転写に伴い、S 領域のヒストン H3 のアセチル化が誘導されているという知見も得られている(15, 16)。

(2) に示した S μ 領域と S γ 1 領域の DNA 切断については、uracil DNA glycosylase (UNG) のノックアウトマウスにおいてクラススイッチ組み換えが見られないことから、UNG が DNA 切断に関与しているのではないかとされている(13)が、UNG の優勢ネガティブ変異体を発現させても DNA 切断には影響しないという報告もあり(18, 19)、UNG と DNA 切断との関連については確定していない。

(3) に示した非相同的 DNA 末端結合には DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) の構成分子である DNA 結合性の Ku70/80 が関与していることがノックアウトマウスの実験から示唆されていた(20-22)が、近年それを否定する報告もあり、確定していない(23)。また、ノックアウトマウスなどを用いた研究から γ H2AX、53BP1、Exo1、XRCC4、Lig4、ATM などの分子がクラススイッチ組み換えにおける DNA 切断部位を認識・修復に関わっているのではないとも言われている(14-21)。いずれもクラススイッチ組み換え特異的に機能する分子ではなく、DNA の非相同的末端結合に一般的に関与する分子である。

試験管内におけるクラススイッチ組み換えの誘導について

試験管内においては、特定のミトゲン、及び T 細胞や他の免疫細胞から産生されるサイトカインを用いて B 細胞にクラススイッチ組み換えを誘導することができる。クラススイッチを惹起するサイトカインには IL-4 や IL-5、TGF- β などが存在する。サイトカインの種類によりクラススイッチ後のクラスはある程度限定され、細菌細胞壁の構成成分である LPS と IL-4、もしくは抗 CD40 抗体と IL-4 により刺激されたマウス脾臓 B 細胞は IgG1 や IgE へのクラススイッチ組み換えを誘導する(32-34)。この刺激系は試験管内の実験においてよく使用され、IL-4 はクラススイッチファクターとも称される。TGF- β は LPS との共刺激系において IgG2b、IgA へのクラススイッチ組み換えを誘導する。IL-5 は、抗 CD40 抗体との共刺激系において IgG1 へのクラススイッチ組み換えを惹起することができ(22)、また IgA へのクラススイッチ組み換えを完了した細胞においてその抗体産生量を増大させる(23)。さらに抗 CD40 抗体および IL-4 による共刺激系に IL-5 を添加すると協奏的な作用により抗体産生量が増大することが知られている。このように IL-5 はクラススイッチ組み換えを誘導する機能と同時に抗体産生量を増加させる機能を有している。

IL-5 により IgG1 産生細胞への分化を誘導する系としてユニークなものが抗 CD38 抗体との共

刺激系である。すでに報告されている通り、抗 CD38 抗体をマイトーゲンとして用いた場合は IL-5 との共刺激によって IgG1 特異的にクラススイッチ組み換えを誘導することができる(22, 24)。しかし興味深いのは、抗 CD38 抗体と IL-4 との共刺激ではクラススイッチ組み換えを誘導できないことである(35-37)。IL-5 によってクラススイッチが惹起されながら IL-4 によって惹起されない例は他には見つかっていない。極めてユニークな刺激系である。したがって、抗 CD38 抗体を用いた実験系を利用することにより抗 CD40 抗体では見出せなかったクラススイッチ組み換えに関与する因子を見出せるのではないかと期待できる。私はこの点に着目し、抗 CD38 抗体及び IL-4 の刺激系に別種の刺激を加えることでクラススイッチ組み換えが惹起可能であるか検討を行い、クラススイッチ組み換えに必要な因子の探索を目指した。

CD38、および抗 CD38 抗体により刺激された B 細胞について

CD38 は B 細胞表面上に発現している糖タンパク質である(図 3A)。細胞外領域、膜貫通領域、細胞内領域の 3 つの部分からなり、細胞外領域に ADP リボシルシクラーゼ 活性、cADP リボシルヒドラーゼ活性を持つ。

血球系細胞、非血球系細胞に広く発現しているが、マウスの胚中心 B 細胞では発現が見られない(38-41)。CD38 のリガンド分子は未だ同定されていないが、樹状細胞に発現している分子であるとの報告もある(25)。

マウスの IgMIgD 陽性 B 細胞表面上に発現している CD38 を α CD38 抗体 (クローン: CS/2) により刺激すると、B 細胞の増殖、Btk のリン酸化、NF- κ B の活性化、IL-5 受容体 α 鎖の発現を誘導する(26, 27)。抗 CD38 抗体刺激のシグナル伝達経路は BCR 刺激と共有している(38, 43)。 α CD38 抗体および IL-5 により共刺激すると Blimp-1 の発現を誘導し、前述の通り IgG1 へのクラススイッチ組み換えを誘導することができる(22, 24, 27)。

グアノシン置換体

8-メルカプトグアノシン (8-SGuo、図 4B) などのグアノシン置換体は B 細胞の増殖、分化を誘導することは以前より報告がなされており、当時は T 細胞様の刺激を B 細胞に与える分子であるとされていた(28-33)。また、TNP-LPS、IL-4 により刺激された B 細胞が IgE を産生しないのに対し、TNP-LPS、IL-4、8-SGuo により共刺激された B 細胞が IgE を産生することはすでに報告されている(50)。しかし、8-SGuo がクラススイッチ組み換えを直接的に誘導するか否か、またその B 細胞活性化機構は不明である。私はグアノシン置換体をターゲットとし、抗 CD38 抗体及び IL-4 刺激された B 細胞に添加することで IgG1 へのクラススイッチ組み換えを誘導可能か検討した。

自然免疫系と TLR

自然免疫系は進化の初期から存在する免疫系であり、ショウジョウバエなどにおいても確認さ

れている。広範な病原体を認識することで生体防御に寄与する機能を持つ。獲得免疫系が特定の外来抗原を特異的に認識する T 細胞や B 細胞の活性化、増殖を必要としその機能を発揮するまでやや時間が掛かるのに対し、自然免疫系は迅速に機能する。そのため、自然免疫系は感染の初期応答において特に重要である。我々の体内においては自然免疫系と獲得免疫系が車の両輪のごとくに機能し生体を防御していると言える。

TLR に代表されるパターン認識受容体は自然免疫系における主役となる分子である。これらの分子は BCR のように多数のレパートリーを創出することで無数の外来抗原を認識するという戦略ではなく、病原体に特徴的な脂質や蛋白質、核酸のパターンを認識するという戦略で生体防御に寄与している。

TLR ファミリーは I 型の膜貫通蛋白質であり、リガンド認識部位に LRR (ロイシンリッチリピート) ドメイン、シグナル伝達部位に TIR (Toll/IL-1 Receptor) ドメインを持つという共通点がある。マウスでは 13 種類の TLR が既に同定されている。TLR7 の場合には、アダプター分子である MyD88 が TIR ドメインに結合しシグナルを伝達する。TLR7 は一重鎖 RNA や抗ウィルス薬をリガンドとして認識するとされる(34, 35)。B 細胞は獲得免疫系において機能する細胞であるが、TLR4、7、9 などを発現しており TLR 刺激は抗体産生細胞への分化誘導等において重要な因子である。

TLR と自己免疫疾患の関係

TLR はその発現部位によって大きく 2 グループに分類される。細胞表面上に発現しているものと細胞内に発現しているものである。細胞内に発現するタイプの TLR は無刺激時には ER 中に存在し、細胞がリガンドを取り込むとエンドソームへと移行しリガンドと結合する。細胞内に発現する TLR は TLR3、TLR7、TLR9 である (図 3B)。これらはいずれも核酸を認識する TLR であり、TLR3 は二重鎖 RNA、TLR7 は一重鎖 RNA、TLR9 は DNA をそれぞれリガンドとして認識する(36, 37)。いずれもウィルス由来の核酸を認識するため進化したとされる。

これらの TLR が細胞内に発現している理由は、自己免疫疾患発症の危険性を低下させるためではないかとされている。核酸は外来の病原性微生物のみならず宿主も保持しているため、核酸を認識し免疫細胞を活性化させる受容体は常に自己免疫疾患を誘導する危険性を孕む。そのため、宿主の核酸を認識することのないよう細胞表面ではなく ER 中に発現しているとされている(38)。しかし、尚これらの TLR は自己免疫疾患と関係のあることが指摘されている(39)。TLR7 については、TLR7 を含む Y 染色体の遺伝子座が重複したマウスでは、バックグラウンドによっては自己免疫疾患を発症することがこれまでの研究から見出されている(37, 40, 41)。また、核酸を含む自己抗原を認識する自己抗体を産生することが知られている SLE モデルマウスにおいて TLR7 が欠損すると RNA を含む自己抗原に対する自己抗体が産生されなくなることが報告されている(42)。

TLR に関する研究は自然免疫系を担うマクロファージ、樹状細胞といったミエロイド系の細胞を用いた事例が先行していた。しかしながら、B 細胞においても TLR の機能は無視できない。以前より B 細胞の増殖・抗体産生を惹起すると知られていた LPS は TLR4 のリガンドであり、前

述したように Blimp-1 の発現を誘導することが知られている(3)。TLR ファミリーと同様に LRR ドメインを持ち、B 細胞に発現し LPS を認識する RP105 のノックアウトマウスは血清中の IgG3 量が野生型と比較し少ないことが報告されており(43)、獲得免疫応答である B 細胞の抗体産生においても TLR の機能は重要である。上述したように TLR7 は自己免疫疾患との関与が示されているが、その場合には B 細胞が TLR7 の刺激により自己抗体を産生するという現象が存在している。従って、B 細胞における各 TLR の機能解析を詳細に行うことも今後重要になる。

TLR リガンドの多様性

TLR9 のリガンドは DNA とされているが、実験においてしばしば使用される TLR9 リガンドは CpG-DNA である。CpG-DNA は非メチル化された C と G から成る DNA モチーフであるが、その配列によって CpG-A、CpG-B というタイプ分けがなされている。CpG-A、CpG-B は共に TLR9 のリガンドとして機能するが、CpG-A は NK 細胞やプラズマサイトイド樹状細胞の反応を強く誘導するのに対し、CpG-B は B 細胞の反応を強く誘導するという相違点を持つ。このように、同じ TLR9 リガンドであっても細胞によってその反応性は異なるという現象が存在する(44)。TLR7 リガンドにおいても同様の現象が存在し、Lox と 8-SGuo や 8-BrGuo では細胞によってその反応性が異なる可能性がある。よって、Lox と 8-SGuo について B 細胞や樹状細胞、マクロファージを用いてその性質を比較した。

結果

1. 8-SGuo は IgG1 産生細胞への分化を誘導する

8-メルカプトグアノシン (8-SGuo) は B 細胞の IgG1 産生を惹起する

マウス脾臓 B 細胞を精製し、抗 CD38 抗体及び IL-5 により共刺激を与えると IgG1 の産生を惹起する。しかし、IL-4 を共刺激として加えた時には IgG1 産生が惹起されないことは以前より報告がなされている。その事実を確認するため、マウス脾臓 B 細胞を精製し抗 CD38、IL-4、IL-5 の各種刺激を加え培養後、細胞培養上清中の抗体量を ELISA 法により測定した。その結果、これまでの報告と同様に抗 CD38 抗体及び IL-5 の共刺激では IgG1 産生が確認されたが、IL-4 との共刺激系では IgG1 産生が確認されなかった (図 4A)。

次に私は、B 細胞活性化刺激としてグアノシンの置換体である 8-SGuo を共刺激として加えた。その結果、抗 CD38 抗体、IL-4、および 8-SGuo の刺激によって IgG1 産生細胞への分化が誘導された (図 4A)。興味深いことに、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系においては IgM 産生細胞への分化誘導が見られたが IgG1 産生細胞への分化は誘導されないことが明らかとなった。

グアノシンの 8 位置換が B 細胞分化誘導機能に必要である

そこで、私は 8-SGuo に見られる IgG1 産生細胞への分化誘導機能が 8-SGuo 特異的であるのか調べるため、8-SGuo に類似したヌクレオシド置換体である 8-ブロモグアノシン (8-BrGuo)、6-メルカプトグアノシン (6-SGuo)、8-メルカプトアデノシン (8-SA) における抗 CD38 抗体、IL-4 との共刺激による IgG1 産生細胞への分化機能の有無に関して検討を行った。8-SGuo と同様の IgG1 産生細胞への分化誘導機能が見られたのは 8-BrGuo のみであった。この実験結果から、グアノシンの 8 位置換が分化誘導機能に必要であることが示唆された (図 4B、C)。

8-SGuo は TLR7 を介してシグナルを伝達する

グアノシンの置換体である 7-アリル-8-オキソグアノシン、通称ロキソリビン (Lox、図 5A) は一重鎖 RNA や抗ウイルス薬剤とともに TLR7 のリガンドとして機能することが知られている (34, 35)。そこで、8-SGuo や 8-BrGuo が TLR7 リガンドとして機能しているかどうか TLR7 ノックアウトマウス、及び TLR7 シグナルの下流に存在するアダプター分子である MyD88 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を用いて解析を行った。その結果、TLR7 ノックアウトマウス及び MyD88 ノックアウトマウスにおいては抗 CD38 抗体、IL-4 との共刺激による 8-SGuo、8-BrGuo による IgG1 産生細胞への分化誘導機能は見られず、抗 CD38 抗体との共刺激による IgM 産生細胞への分化誘導機構も見られなかった (図 5B、C)。

TLR7 ノックアウトマウス、MyD88 ノックアウトマウス脾臓 B 細胞における抗 CD38 抗体や IL-4 刺激の B 細胞活性化能について検討するため、まず B 細胞表面上の CD38、IL-4 受容体の発現量を解析したところ野生型マウスと同程度に発現していることが確認された (図 6A)。さらに、B 細胞表面の抗 CD38 抗体、IL-4 刺激による CD86 発現増強について解析を行った。CD86 は活

性化した B 細胞において発現が増大することが知られている。その結果、TLR7、MyD88 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞においても野生型マウスと同等の CD86 の発現増強が見られた (図 6B)。したがって、TLR7、MyD88 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞はいずれも抗 CD38 抗体、IL-4 により野生型マウス B 細胞と同等に活性化されていることが示唆された。

以上の結果から、グアノシンの 8 位置換体である 8-SGuo、8-BrGuo はともに TLR7、MyD88 依存的な経路によりそのシグナルを伝達していることが明らかになった。

生体内における TLR7 とクラススイッチ組み換えの関係

試験管内の実験から、8-SGuo は TLR7 を介して抗 CD38 抗体、および IL-4 により刺激された B 細胞の IgG1 産生細胞への分化を誘導していることが見出された。

TLR7 は主に自己免疫疾患マウスを用いた研究から自己抗体産生との関連が示唆されるなど、生体内においても抗体産生やクラススイッチ組み換えを惹起していると考えられる(54-57)。高い週齢のマウス脾臓細胞を用いて脾臓中に存在する IgG をウェスタンブロッティングにより検出したところ、野生型マウスでは IgG が検出されたが TLR7 ノックアウトマウス、MyD88 ノックアウトマウスでは検出されなかった (図 7A)。この結果は C57BL/6 マウスの生体内においても TLR7 がクラススイッチ組み換えに寄与していることを示唆している。

抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の刺激を与えることで生体内においてもクラススイッチ組み換えを誘導するか調べるため、野生型マウスに抗 CD38 抗体及び 8-SGuo、同じく TLR7 リガンドである Lox を腹腔内投与し脾臓 B 細胞における IgG1 の発現、また抗体産生細胞への分化を示すマーカーである CD138 の発現を解析した。その結果、図 7B、C のようになり生体内においても抗 CD38 抗体及び TLR7 の刺激を与えることで抗体産生細胞への分化、IgG1 産生細胞への分化を惹起することが明らかになった。

8-SGuo による抗体産生細胞への分化は *Prdm1* 発現を伴う

序論において述べたように、Blimp-1 (遺伝子名 *Prdm1*) は脾臓 B 細胞が抗体産生細胞へ分化する際のマスター遺伝子として機能することが知られている(45-47)。しかしながら、抗 CD40 抗体及び IL-4 により刺激し抗体産生細胞へと分化させる刺激系では例外的に *Prdm1* の発現が見られないまま抗体産生細胞へと分化する(48)。そこで、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系において *Prdm1* 発現の誘導を RT-PCR により確認した結果、8-SGuo は抗 CD38 抗体との共刺激系において *Prdm1* の発現を誘導することが明らかとなった (図 8)。したがって、抗 CD38 抗体および 8-SGuo の共刺激系において抗体産生細胞への分化が惹起される際には *Prdm1* がマスター遺伝子として機能していることが示唆された。

B-1 細胞におけるクラススイッチ組み換えへの関与 : IL-5 刺激との相違点

B 細胞は B-1 細胞と B-2 細胞に分類される。これまでの実験において用いてきた B 細胞は脾臓に存在する B-2 細胞であった。

B-1 細胞は主に存在する臓器、BCR のレパートリーの多様性などの面で B-2 細胞とは性質を異にするが、クラススイッチ組み換えは B-1 細胞においても誘導される。そこで、抗 CD38 抗体、IL-4、8-SGuo の共刺激系において B-1 細胞のクラススイッチ組み換えが惹起されるかどうか ELISA 法により検討を行った。

マウスの腹腔細胞から精製した B-1 細胞、B-2 細胞を抗 CD38 抗体、IL-4、8-SGuo、及びそれらの組み合わせにより刺激し細胞培養上清中の抗体価を ELISA 法により測定した。その結果、抗 CD38 抗体、IL-4、8-SGuo の共刺激、あるいは抗 CD38 抗体、IL-4、及び Lox による共刺激系においても B-1 細胞に対する IgG1 産生細胞への分化は誘導されなかった (図 9A)。

脾臓 B 細胞、腹腔 B-1 細胞、腹腔 B-2 細胞において TLR7 の発現を RT-PCR により確認したが、顕著な差は見られなかった (図 9B)。CD38、IL-4 受容体の発現も FACS により確認したが顕著な差は見られなかった (図 9C)。Lox による CD86 の発現増強も B-1 細胞、B-2 細胞間で顕著な差は見られない (図 9D)。しかし、抗 CD38 抗体による CD86 発現増強には差が見られる (図 9D)。抗 CD38 抗体、IL-4、及び TLR7 リガンドの共刺激系で B-1 細胞が IgG1 産生細胞へと分化しない原因は抗 CD38 抗体によるシグナルが B-2 細胞と比較して弱いことにあると示唆される。

2. クラススイッチ組み換えにおける 8-SGuo の機能解析

8-SGuo により $S\mu$ - $S\gamma 1$ 間ゲノム DNA 組み換えが誘導される

これまでの実験結果から、抗 CD38 抗体及び IL-4 による共刺激系に 8-SGuo を加えることにより IgG1 産生細胞への分化を誘導できることが明らかになった (図 4A)。IgG1 産生細胞への分化誘導機構に関しては、

- (1) 8-SGuo が $S\mu$ - $S\gamma 1$ 間ゲノム DNA 組み換えに関与している
- (2) 8-SGuo はゲノム DNA 組み換え後の抗体産生に関与している

の 2 つの可能性が考えられる。そこで脾臓 B 細胞を刺激後、ゲノム DNA を精製し DNA 組み換えの副産物であるスイッチサークルの検出を行った。

その結果、図 9A に示すとおり抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激系に 8-SGuo を添加することによりゲノム DNA の組み換えが誘導されることが見出された。この実験においてはポジティブコントロールとして抗 CD40 抗体および IL-4 による共刺激系を用いている。抗 CD38 および IL-5 による共刺激系における報告(48)と同様に、抗 CD38 抗体 IL-4、および 8-SGuo との共刺激系は抗 CD40 抗体および IL-4 による共刺激系と比較し検出されるスイッチサークル量が多い。これは、抗 CD40 抗体および IL-4 による共刺激のほうがクラススイッチ組み換えを誘導する頻度が高い事を示す。また、TLR7 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞との比較により、8-SGuo による $S\mu$ - $S\gamma 1$ 間ゲノム DNA 組み換えの惹起は TLR7 を介してシグナルが伝達されることが明らかになった (図 10B)。

興味深いことに、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo のみによる刺激では $S\mu$ - $S\gamma 1$ 間ゲノム DNA 組み換えが惹起されない (図 10A)。また、抗 CD38 抗体および IL-4 のみによる刺激においても同様に

S μ -S γ 1 間ゲノム DNA 組み換えは惹起されない (図 10A)。抗 CD38 抗体刺激下におけるクラススイッチ組み換えにおいては、ゲノム DNA 組み換えに関して IL-4、8-SGuo 両者の刺激が必要であることが分かる (図 10A)。

以上の結果から、抗 CD38 抗体刺激下におけるクラススイッチ組み換えでは IL-4、8-SGuo がともにクラススイッチ組み換えに必須となる分子の活性化を誘導し、それらが相補的に機能することで抗 CD38 抗体、IL-4、8-SGuo の 3 種により共刺激を加えた場合には IgG1 へのクラススイッチ組み換えが惹起されるものと考えられる。以下では、IL-4、8-SGuo により誘導されるクラススイッチに必須となる分子について検討を行った。

細胞分裂回数

クラススイッチ組み換えが惹起されるためには、それに先立ち 3-4 回程度の細胞分裂が必要となることが知られている(5, 6)。そこで、CFSE 染色を用い抗 CD38 抗体及び IL-4、8-SGuo により刺激した場合の細胞分裂回数に関して時間を追って検討を行った。その結果、図 11A に示すとおり抗 CD38 抗体刺激下においては IL-4 刺激のみ、8-SGuo 刺激のみでもクラススイッチ組み換えに必要とされるだけの細胞分裂を誘導していた。

胚細胞型 γ 1 の発現

クラススイッチ組み換えにおいて、ゲノム DNA の組み換えに先立ち胚細胞型の RNA が転写されることが知られている(12)。そこで、準定量的 RT-PCR 法により各刺激群における胚細胞型 γ 1 の発現を解析した。抗 CD38 抗体のみの刺激においても胚細胞型 γ 1 が発現することは以前より知られている(26)。抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激系、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系においても同様に胚細胞型 γ 1 の発現が確認された (図 11B)。

スイッチ領域のヒストン H3 アセチル化

IgG1 へのクラススイッチ組み換えにおいては組み換えのターゲットとなる S γ 1 領域のヒストン H3 がアセチル化されることにより S γ 1 領域のアクセシビリティが上昇することが必要である。そこで抗 CD38 抗体、IL-5、IL-4、及び 8-SGuo の各種刺激により二日間培養したマウス脾臓 B 細胞を回収しクロマチン免疫沈降法により S γ 1 領域のヒストン H3 アセチル化の有無について解析を行った。その結果、抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激を与えた B 細胞においてもヒストン H3 はアセチル化されていることが確認された (図 11C)。

AID の発現

AID はクラススイッチ組み換えにおけるマスター遺伝子として機能している。そこで、抗 CD38 抗体刺激下における AID の発現を準定量的 PCR により解析した。図 12A に示すとおり、抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激では AID の発現は誘導されない。しかしながら、抗 CD38 抗体と 8-SGuo の共刺激系では AID 発現が誘導される。MyD88 ノックアウトマウス、TLR7 ノックアウトマウ

スの脾臓 B 細胞を用いて同様の実験を行った結果から、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激による AID 発現は TLR7、MyD88 を介したシグナル伝達により誘導されていることが明らかとなった (図 12B)。

抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo の共刺激系においてはクラススイッチ組み換えが誘導される (図 12A)。この系において AID の発現を誘導しているのは 8-SGuo であることが上の結果から示唆される。また、抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激系において IgG1 へのクラススイッチ組み換えが誘導されない理由として AID 発現が惹起されないことが推測される。そこで、レトロウイルスベクターを用いてマウスの脾臓 B 細胞に AID を強制発現させた。その細胞を抗 CD38 抗体及び IL-4 により刺激したところ、細胞表面上の IgG1 発現が確認できた (図 12C)。

このことから、抗 CD38 抗体、IL-4 及び 8-SGuo の共刺激系において 8-SGuo は AID 発現を誘導することでクラススイッチ組み換えの惹起に寄与していることが明らかになった。

また、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系は IL-4 を加えた共刺激系と比べ AID の発現量が低い (図 12A)。発現量の差によりクラススイッチ組み換えが惹起されていない可能性を考え、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系においても AID を強制発現させ、クラススイッチ組み換えの有無を検討した。その結果、図 12C のようになり抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激を加えた B 細胞に AID を過剰発現させてもクラススイッチ組み換えが惹起されるわけではないことが分かった。したがって、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の刺激においてクラススイッチ組み換えが惹起されない理由は AID の発現量の不足によるものではないことが示唆された。

DNA 切断

抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系においては細胞分裂、胚細胞型 $\gamma 1$ の転写、AID の発現はこれまでの結果から確認されたが、スイッチサークルが検出されないことからゲノム DNA の組み換えは見られないことが明らかとなっている (図 10A)。

クラススイッチ組み換えにおけるゲノム DNA 組み換えはターゲット領域である S_{μ} 領域、 $S_{\gamma 1}$ 領域が互いに持ち寄られ、ゲノム DNA がループ状の構造を形成し、DNA 切断酵素により切断され、 S_{μ} 、 $S_{\gamma 1}$ に形成された DNA 切断後の末端が互い違いに結合することにより完了する。切断された S_{μ} ~ $S_{\gamma 1}$ の間にある部分がスイッチサークルとしてゲノム DNA から切り出される。

そこで私は抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo の共刺激系においてゲノム DNA の組み換え過程がどのように進行しているのか解析を行った。

ゲノム DNA 組み換えにおける重要なステップに DNA 切断がある。このステップに関しては LM-PCR 法により解析を行うことができる。LM-PCR 法は図 12A に示すとおり、DNA 切断部位にリンカーを付加し、切断部位付近の配列特異的なプライマーとリンカー特異的なプライマーにより PCR をかける。その結果、切断部位のある DNA のみ増幅された PCR 産物が検出される (図 13A)。

マウス脾臓 B 細胞を抗 CD38 抗体、IL-5、IL-4、8-SGuo、及びそれらの組み合わせにより刺激し、2 日後に細胞を回収した。2 日間の培養により一部の細胞は死細胞となっている。死細胞中の

ゲノム DNA は断片化されているため、死細胞を解析から除く必要がある。そこで、フィコールウログラフィンによる密度勾配を用いて回収した細胞から生細胞を精製した。トリパンブルー染色により生細胞の割合を確認したところ、90%以上が生細胞となっているという結果が得られた。この生細胞を用いてゲノム DNA を精製、S γ 1 領域付近でのゲノム DNA 切断を検出した。その結果、図 13B に示すとおり抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo の刺激では DNA 切断が検出され、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の刺激においてもその頻度は少ないが DNA の切断が検出された。

以上の結果より、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激下においてクラススイッチ組み換えはゲノム DNA の切断までは進行しているがスイッチサークルの形成には至っておらず、結果としてクラススイッチ組み換えが完了しないことが示唆された。したがって、抗 CD38 抗体、8-SGuo による共刺激系に IL-4 を添加すると、ゲノム DNA 切断後の DNA 修復過程に必要な因子を IL-4 が誘導するため IgG1 へのクラススイッチ組み換えが完了するのではないかと考えられる。

3. 8-SGuo、Lox の機能比較

抗 CD38 抗体、及び IL-4 との共刺激下における IgG1 産生細胞への分化誘導

前のセクションで述べたとおり、8-SGuo は抗 CD38 抗体、IL-4 との共刺激系において B 細胞に IgG1 産生細胞への分化を誘導する因子として同定された。また、抗 CD38 抗体同時に TLR7 リガンドとして同定された 8-BrGuo も抗 CD38 抗体、IL-4 との共刺激系において同様に IgG1 産生細胞への分化を誘導した。そこで、Lox についても同様の機能が認められるか検討を行った。

その結果、図 14A のように Lox においても 8-SGuo と同様に抗 CD38 抗体、IL-4 との共刺激系において IgG1 産生細胞への分化誘導が認められた。また、抗 CD38 抗体との共刺激系において IgM 産生細胞への分化誘導が認められた。

更に、8-SGuo と同様に、抗 CD38 抗体の代わりに抗 IgM 抗体を使用した場合にも IgG1 産生細胞への分化を誘導した（図 14B）。したがって、Lox と 8-SGuo は共に抗 CD38 抗体、抗 IgM 抗体刺激下における IgG1 産生細胞、IgM 産生細胞への分化誘導能を持つことが明らかになった。

B 細胞増殖の誘導

上の実験で 7 日間 B 細胞を培養している際に、8-SGuo 刺激よりも Lox 刺激のほうが速い細胞増殖を誘導する印象を受けた。そこで、8-SGuo、Lox の細胞増殖誘導能について解析を行った。

野生型マウスから脾臓 B 細胞を精製し、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo、Lox を種々の濃度で加え刺激しトリチウムラベルしたチミジンの取り込みを測定し細胞増殖を測定した。その結果、Lox、8-SGuo とともに濃度依存的に細胞増殖能が増大した（図 15A）。しかし、Lox は 8-SGuo と同一の濃度においてよりも強く細胞増殖を誘導できることが明らかになった（図 15A）。抗 CD38 抗体の代わりに抗 IgM 抗体を用いて同様の実験をしたところ、同様に Lox は 8-SGuo と同一の濃度でより活発な B 細胞の増殖を誘導した（図 15B）。

ここまでの結果は抗 CD38 抗体や抗 IgM 抗体との共刺激系において Lox、8-SGuo の細胞増殖の誘導能を測定してきたが、次に Lox、8-SGuo 単独での B 細胞増殖の誘導能を測定した。マウ

ス野生型脾臓 B 細胞を精製し、Lox、8-SGuo を種々の濃度で加え刺激し 3 日間培養後、FACS 解析により生細胞での細胞分裂回数を測定した (図 15C)。Lox は 0.1 mM においても無刺激の場合と比較して有意に細胞分裂を誘導し、3-4 回程度の細胞分裂を完了した細胞群が見られる。また、濃度 1 mM の条件下では 3 日間の培養で 3-4 回程度の細胞分裂を終えた細胞の割合が増大する。

一方 8-SGuo の場合には濃度 0.1 mM の条件下では無刺激の場合と比較して有意の細胞分裂が誘導されていない。濃度 1 mM の条件下では、3-4 回程度に分裂した細胞の割合がやや増大する。しかし、濃度 1 mM においても 3-4 回程度に分裂した細胞の割合は Lox を 0.1 mM 加えた場合と比較して少ない。

以上の結果から、8-SGuo、Lox はともに抗 CD38 抗体や抗 IgM 抗体との共刺激においても、単独刺激においても脾臓 B 細胞の増殖を誘導することが分かった。しかし、その効果は 8-SGuo と Lox の間で差があり、Lox 刺激は 8-SGuo 刺激よりも強く細胞分裂を誘導することが明らかとなった。

B 細胞活性化の誘導：CD86 発現上昇

次に私は 8-SGuo、Lox による B 細胞活性化能を解析するため、8-SGuo、Lox 刺激後の CD86 の発現を FACS により検出した。野生型マウスの脾臓 B 細胞を精製後、8-SGuo、Lox を 0.1 mM ずつ、抗 CD38 抗体もしくは抗 IgM 抗体を種々の濃度で加え培養後、回収した細胞を FACS により解析した (図 16)。

Lox を単独で加えた場合には 60 %程度の細胞が CD86 を発現する。抗 CD38 抗体を単独で加えた場合にも 57 %程度の CD86 発現が見られた。更に、抗 CD38 抗体と Lox の共刺激系においては協奏的作用が見られ、90 %程度の CD86 発現が見られるようになった。抗 IgM 抗体刺激は抗 CD86 抗体刺激と異なり単独での CD86 発現能は低い。しかし、興味深いことに Lox との共刺激系においては協奏的作用により抗 CD38 抗体と同様の CD86 発現を誘導した。

一方、8-SGuo 刺激を加えた場合、単独刺激では無刺激の場合と比較して有意な CD86 の発現上昇は見られなかった。更に、抗 CD38 抗体、抗 IgM 抗体との共刺激系においても協奏作用による CD86 の発現上昇は見られず、抗 CD38 抗体のみ、抗 IgM 抗体のみにより刺激した場合と比較して有意な発現上昇は確認されなかった。

以上の結果から、Lox は単独刺激においても CD86 の発現上昇を誘導することができるが 8-SGuo にはその作用はないことが明らかとなった。また、抗 CD38 抗体や抗 IgM 抗体との共刺激系において Lox はそれらの刺激との協奏的作用により CD86 の発現を更に上昇させるが、8-SGuo においては協奏的作用も見られなかった。Lox と 8-SGuo は CD86 の発現上昇の誘導において大きく性質を異にすることが明らかとなった。

B 細胞における種々の遺伝子発現

前のセクションでは抗 CD38 抗体や IL-4 と 8-SGuo を共刺激として B 細胞に加えた場合の *Aicda* や *Prdm1* の発現量について解析を行った。そこで更に、8-SGuo や Lox による単独刺激で

の発現について解析を行った。

野生型マウス脾臓 B 細胞を精製し、8-SGuo、Lox の単独刺激を加えて所定の時間培養後 B 細胞を回収し精製した全量 RNA から cDNA を合成し、リアルタイム PCR により解析を行った。その結果、図 17A のように、Lox の単独刺激においては 48 時間培養後から *Aicda* の発現が見られたが 8-SGuo では *Aicda* 発現が見られなかった。一方、*Prdm1* についても解析を行ったところ、8-SGuo でも Lox より発現量は少ないものの *Prdm1* の発現を誘導していた。*Aicda* の発現は B 細胞の細胞分裂回数と相関していることが過去の報告から明らかになっている(49)。8-SGuo の単独刺激では細胞分裂の誘導が Lox と比べて弱いため(図 15C)、*Aicda* の発現も誘導できないと考えられる。

更に TLR4 や TLR9 のリガンドである lipid A や CpG-B 刺激との比較を行った。Lipid A、CpG-B とも *Aicda*、*Prdm1* の発現を誘導した(図 17B、C)。また、TLR7 ノックアウトマウス、MyD88 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を精製し同様の解析を行ったところ、Lox、8-SGuo による *Prdm1*、*Aicda* の発現誘導は TLR7、MyD88 依存的に行われていることが明らかになった(図 17B、C)。Lipid A、CpG-B のシグナルは TLR7 には非依存的に、MyD88 には依存的に伝達されていた。

B 細胞のシグナル伝達には Btk が関与している場合が多い。抗 CD38 抗体刺激や抗 IgM 抗体刺激も Btk のリン酸化を誘導することが知られており(64, 65)、Lipid A などによる TLR4 刺激も Btk リン酸化を誘導することが知られている(66)。そこで Btk ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を用いて Lox、8-SGuo による遺伝子発現の誘導に関して解析を行った。その結果、Lox、8-SGuo ともに Btk 依存的なシグナル伝達を行っていることが明らかになった(図 17D)。

8-SGuo 刺激はマクロファージ、樹状細胞において機能しない

ここまでは B 細胞における 8-SGuo、Lox の作用について解析を行ってきた。TLR7 を含む TLR に関してはマクロファージ、樹状細胞などのミエロイドにおいて研究が先行している。そこで、マクロファージや樹状細胞における 8-SGuo の機能を Lox と比較検討した。

野生型マウスの骨髄細胞を M-CSF、GM-CSF 刺激下において 7 日間培養し、回収した細胞をそれぞれマクロファージ、樹状細胞として使用した。回収した細胞から cDNA を合成し TLR7 の発現を RT-PCR により確認したところマクロファージ、樹状細胞においても脾臓 B 細胞と同程度の TLR7 の発現が見られた(図 18A)。

骨髄細胞から樹立したマクロファージに Lox、8-SGuo、lipid A 刺激を加え 24 時間後に培養上清を回収後、上清中に分泌された TNF- α 、IL-6 の量を ELISA 法により測定すると図 18B のようになった。この結果から、Lox は濃度 100 μ M においてマクロファージの TNF- α 、IL-6 産生を誘導するが、8-SGuo は濃度 1 mM においても TNF- α や IL-6 の産生を誘導しないことが明らかになった。

次に、骨髄細胞から樹立した樹状細胞においてマクロファージと同様に 8-SGuo、Lox、lipid A による刺激を加え、24 時間後に細胞培養上清中の TNF- α 、IL-12/IL-23 p40 の量を ELISA 法により測定した(図 18C)。その結果、Lox は濃度 1 mM において TNF- α 、IL-12/IL-23 p40 の産生

を誘導したが、8-SGuo 刺激は濃度 1 mM においても産生の誘導は見られなかった。

8-SGuo によるサイトカイン産生が見られなかったことから、次に CD86 の発現増強について解析を行った。骨髓から樹立した樹状細胞を 8-SGuo、Lox、lipid A により 48 時間刺激し、細胞を回収後 CD86 の発現を FACS により解析した (図 18D)。その結果、Lox、lipid A に刺激においては無刺激の場合と比較して有意に CD86 の発現が増大していたが、8-SGuo 刺激においては無刺激の場合と同等の CD86 発現が見られ、発現増強は確認できなかった。

そこで、マクロファージ、樹状細胞におけるシグナル伝達分子の活性化について解析を行った (図 18E、F)。マクロファージを lipid A、Lox、8-SGuo により刺激し、図中に示した刺激時間後に回収し、ウェスタンブロッティングにより I κ B- α の分解について解析を行ったところ、図 18E に示すとおり lipid A、Lox による刺激では I κ B- α の分解が検出されたが 8-SGuo 刺激では検出されなかった。また、樹状細胞を lipid A、Lox、8-SGuo により同様に刺激し、図中に示した刺激時間後に回収し、ウェスタンブロッティングにより I κ B- α の分解、ERK のリン酸化について解析を行ったところ、8-SGuo による I κ B- α の分解、ERK のリン酸化は Lox、lipid A と比較してほとんど検出されなかった (図 18F)。

以上の結果から、8-SGuo はマクロファージ、樹状細胞のサイトカイン産生は誘導せず、CD86 の発現増強、シグナル伝達分子の活性化もほぼ誘導しないことが明らかとなった。

8-SGuo 刺激はプラズマサイトイド樹状細胞において機能する

TLR7 リガンドによる刺激はウィルス感染時にプラズマサイトイド樹状細胞を刺激しインターフェロンの産生を誘導することで生体防御に寄与することが知られている (Gibson SJ, cell immunol 218 74)。そこで、プラズマサイトイド樹状細胞における 8-SGuo 刺激の作用を検討した。

骨髓細胞を Flt-3L 刺激下で培養し回収後、8-SGuo、lipid A、Lox により種々の濃度で刺激し 24 時間後の培養上清中に分泌された IL-12/IL-23 p40、RANTES の濃度を ELISA 法により測定した。その結果興味深いことに、8-SGuo 刺激においてもプラズマサイトイド樹状細胞による IL-12/IL-23 p40、RANTES の産生が見られた (図 19A)。しかし、Lox では濃度 100 μ M において産生が見られるのに対し 8-SGuo では濃度 1 mM の条件下で初めて IL-12/IL-23 p40、RANTES の産生を確認することができた (図 19A)。

次に野生型マウスの脾臓細胞を抗 PDCA1 抗体、抗 B220 抗体、抗 CD11c 抗体により染色し、FACSaria を用いて脾臓に存在するプラズマサイトイド樹状細胞を精製した (図 19B)。精製したプラズマサイトイド樹状細胞を Lox、8-SGuo により刺激し培養上清中の IL-12/IL-23 p40、RANTES 量を測定したところ骨髓から樹立したプラズマサイトイド樹状細胞と同様に 8-SGuo 刺激においても IL-12/IL-23 p40、RANTES の産生が見られた (図 19C)。

以上の結果から、プラズマサイトイド樹状細胞においては樹状細胞やマクロファージと異なり、8-SGuo 刺激によりサイトカインの産生が誘導されることが明らかとなった。ただし、サイトカイン産生に必要な 8-SGuo の濃度は Lox の 10 倍程度であった。

考察

グアノシンの 8 位置換体は TLR7 を介してシグナルを伝達し、適切な刺激下において B 細胞の分化を誘導する

今回の実験で私は 8-メルカプトグアノシン (8-SGuo) が抗 CD38 抗体、IL-4 により刺激された B 細胞において IgG1 産生細胞への分化を誘導する事を見出した (図 4A)。また、抗 CD38 抗体刺激 B 細胞に 8-SGuo のみを加えると IgM 産生細胞への分化を誘導する事を見出した (図 4A)。これは以前の研究(33)によって見出されていた、8-SGuo の B 細胞活性化機能を改めて確認したものと言える。8-SGuo 同様にグアノシンやアデノシンの置換体である 8-ブロモグアノシン (8-BrGuo)、6-メチルグアノシン、8-ブロモアデノシンなどを用いて解析を行った結果、8-BrGuo のみにおいて 8-SGuo と同様の B 細胞の分化誘導する機能が確認された (図 4C)。したがって、B 細胞の分化誘導機能にはグアノシンの 8 位が置換されていることが重要であると明らかになった。

同じくグアノシンの 8 位が置換されている 7-アリル-8-オキソグアノシン (ロキソリビン、Lox) が TLR7 のリガンドとして知られていることから 8-SGuo や 8-BrGuo も TLR7 のリガンドとして機能しているのではないかと考えられる。そこで、TLR7 ノックアウトマウス、MyD88 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を用いて解析を行った結果、8-SGuo、8-BrGuo とともに TLR7 のリガンドとして機能し MyD88 を経由したシグナリングを行っていることが明らかとなった (図 5B、C)。共刺激として使用している抗 CD38 抗体や IL-4 に対する反応性は野生型マウスの脾臓 B 細胞と TLR7 ノックアウトマウス、MyD88 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞の間で差が測定されなかった (図 6)、8-SGuo と 8-BrGuo は TLR7 を介してシグナルを伝達していると考えられる。

TLR に関する先行研究においては、TLR2 などではリガンドと TLR との直接的な結合が生化学的に解析されている(50)。TLR7、TLR9 の場合にはそれぞれ一重鎖 RNA、DNA をリガンドとする (35, 51)。しかしこれまでのところ TLR7、TLR9 と RNA、DNA との直接的な結合を証明した例はない。ノックアウトマウス由来の細胞を用いた解析により一重鎖 RNA や DNA による免疫細胞の活性化に TLR7 や TLR9 が必要であることが示されたため、これらが TLR7、TLR9 のリガンドであると考えられている。今回解析を行った 8-SGuo や 8-BrGuo も、これらと同様の意味で TLR7 のリガンドであると言える。

以前の報告(34)では、8-BrGuo は TLR7 を介したシグナル伝達を誘導しないとされていた。これは、当該論文においては骨髓由来の樹状細胞などを使用して実験を行っていたため 8-BrGuo の反応が見られなかったものと考えられる。

先行研究から TLR7 は自己免疫疾患との関連性が指摘されている(39, 40, 42)。X 染色体上の TLR7 の遺伝子座を含む部位が重複した BXSb/Yaa マウスは自己免疫疾患を発症することが知られており、その原因遺伝子は TLR7 である(54-56)。TLR7 のリガンドは RNA であると考えられているため、TLR7 遺伝子の重複していないマウスであっても RNA を含む自己抗原に対する抗体産生

に TLR7 が関与している可能性は高い。抗 CD38 抗体の刺激により活性化されるシグナル伝達経路は、BCR 刺激により活性化されるシグナル伝達経路と類似している(26)。今回主に解析した、抗 CD38 抗体、IL-4、TLR7 リガンドによる刺激系は BCR、IL-4、TLR7 リガンドによる刺激系を模倣しているものではないかと考えられる。たとえば、生体において RNA を含む抗原を認識する BCR を発現した B 細胞が抗体産生細胞へと分化する状態を模倣しているのではないかと考えている。

今回同定した、抗 CD38 抗体及び TLR7 リガンドの共刺激により抗体産生細胞への分化を誘導する機構が生体内においても機能しているのかどうか調べたところ、図 7 のように生体内においても脾臓 B 細胞の CD138 発現増強、IgG1 発現増強を誘導することが明らかとなった。従って、抗 CD38 抗体及び TLR7 リガンドによる B 細胞の分化誘導は試験管内においてのみ確認されるものではなく、生体内においても起こり得る現象であることが分かる。CD38 ノックアウトマウスにおける先行研究においても(67)、血清中に存在する IgG1 量が野生型マウスと比べて低いことが確認されている。これらは CD38 刺激が生体内の B 細胞のクラススイッチ組み換え、抗体産生細胞への分化にも関与している事を示唆している。CD38、TLR7 のダブルノックアウトマウスや CD38、IL-5 のダブルノックアウトマウスの作製により CD38 と IL-5、CD38、IL-4、及び TLR7 リガンド刺激により惹起されるクラススイッチ組み換え、抗体産生細胞への分化誘導の生体内における寄与がより明らかになるものと考えられる。

また、抗 CD38 抗体刺激下の脾臓 B 細胞において 8-SGuo 刺激により抗体産生が誘導される場合には *Prdm1* の発現が誘導されることも明らかとなった(図 8)。Blimp-1 (遺伝子名 *Prdm1*) は B 細胞が抗体産生細胞へ分化する際のマスター遺伝子として機能することが知られている(45-47)が、抗 CD40 抗体及び IL-4 の刺激において抗体産生が誘導される場合には Blimp-1 発現が見られない(48)。一方、抗 CD38 抗体及び IL-5 の共刺激においては Blimp-1 の発現が確認されている(37, 43)。抗 CD38 抗体刺激下において 8-SGuo により誘導される抗体産生細胞への分化は、抗 CD38 抗体及び IL-5 により誘導される抗体産生細胞への分化とこの点においては類似していることが示唆される。

一方、B-1 細胞においては抗 CD38 抗体、IL-4、及び TLR7 リガンドによるクラススイッチ組み換えは見られなかった(図 9A)。抗 CD38 抗体による CD86 の発現増強は B-1 細胞の方が B-2 細胞と比較して有意に低い(図 9D)。また、抗 CD38 抗体が B-1 細胞に対しては増殖を誘導しないことが以前に報告されている(52)。抗 CD38 抗体は BCR 刺激とそのシグナル経路を共有する(26, 53)が、BCR 刺激は B-1 細胞において機能しないことも以前に報告されている(54, 55)。抗 CD38 抗体による活性化能が低いために抗 CD38 抗体、IL-4、及び TLR7 リガンドの刺激では B-1 細胞において IgG1 産生細胞への分化が誘導されないと考えられる。

抗 CD38 抗体と IL-5 の共刺激系では B-1 細胞も IgG1 産生細胞へと分化する(図 9A)。この場合には IL-4 と TLR7 リガンドとの共刺激とはことなり、B-1 細胞に対する抗 CD38 抗体の活性化能の低さを IL-5 が補完していると考えられる。

抗 CD38 抗体刺激下における脾臓 B-2 細胞に対する抗体産生細胞への分化誘導という面では

IL-4 及び TLR7 リガンドの共刺激は IL-5 とその機能が類似している。しかし、B-1 細胞においては IL-5 との機能に差が見られる。IL-4 と TLR7 リガンドの共刺激は IL-5 刺激と完全に一致するものではなく、相違点が存在すると考えられる。

抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo の共刺激によるクラススイッチ組み換えの分子機構

図 4A に示したとおり、抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo の共刺激においては IgG1 産生細胞への分化が誘導されるが抗 CD38 抗体と IL-4 の共刺激、あるいは抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激においては IgG1 産生細胞への分化が誘導されない。IgG1 産生が見られないだけでなく、ゲノム DNA における S μ -S γ 1 領域間での組み換えが惹起されていないことも解析から明らかになった (図 10A)。従って、8-SGuo と IL-4 はそれぞれ相異なる因子を誘導しており、抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo による共刺激系では IL-4、8-SGuo により誘導される因子が揃うことによりクラススイッチ組み換えが初めて惹起されると考えられる。そこで、抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激、あるいは抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激を与えたマウス脾臓 B 細胞においてクラススイッチ組み換えがどこまで進行しているのか解析することでクラススイッチ組み換えにおける必須因子を同定することができるのではないかと考え検討を行った。

クラススイッチ組み換えに必要な過程としては、

- (1) 刺激後数回程度の細胞分裂
- (2) 胚細胞型 γ 1 の転写、S 領域におけるヒストン H3 のアセチル化
- (3) AID の発現
- (4) DNA 切断・修復を伴うゲノム DNA 組み換え

が挙げられる (図 2)。そこで今回の研究では抗 CD38 抗体刺激 B 細胞においてこれらの過程がどこまで進行しているのか検討した。結果を表 1 にまとめている。

その結果、細胞分裂、胚細胞型 γ 1 の転写、ヒストン H3 のアセチル化に関しては抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激系においても、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系においても完了していた (図 11)。

抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激系においては AID の発現が確認されなかった。ウィルスベクターにより AID を強制発現させたところ IgG1+ の細胞の割合が増加したことから (図 12C)、AID 発現が欠損しているために抗 CD38 抗体及び IL-4 の共刺激系ではクラススイッチ組み換えが完了しないことが分かる。従って、抗 CD38、IL-4、及び 8-SGuo の共刺激系において 8-SGuo は AID 発現を誘導することでクラススイッチ組み換えに寄与していると考えられる (図 20A、表 1)。一方、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系において AID を強制発現させても IgG1 を表面に発現する細胞の割合は増加しなかったことから、抗 CD38 抗体及び 8-メルカプトグアノシン刺激でクラススイッチ組み換えが完了しない理由は AID の発現量ではないと考えられる。

AID はクラススイッチ組み換えや体細胞高頻度突然変異のマスター遺伝子であり、ゲノム DNA の組み換え及び変異を誘導するためその発現は厳密に制御されている。生体内の脾臓 B 細胞が AID を発現する場合は胚中心に限られ、AID を常に発現するトランスジェニックマウスは癌を発症

することが知られている(56)。しかしながら、AID の発現を制御する分子機構に関しては未だに不明な点が多い。後述するように 8-SGuo 刺激は単独では AID 発現を誘導しないが、抗 CD38 抗体との共刺激により AID 発現を誘導するようになる (図 17A、図 12B)。しかし 8-SGuo 同様、TLR7 リガンドである Lox は単独刺激でも AID 発現を誘導する (図 17A)。Lox が単独刺激においても細胞増殖を誘導するのに対し 8-SGuo は単独刺激ではほとんど細胞増殖を誘導しない (図 15C)。AID 発現には数回程度の細胞分裂が必要であることが知られている(49)。抗 CD38 抗体および 8-SGuo の共刺激により AID が発現する際には抗 CD38 抗体による細胞増殖のシグナルが伝えられ、8-SGuo により AID の発現に必須となる因子が誘導されていると考えられる。

従って、8-SGuo は Lox 刺激などと比較して細胞増殖よりも AID 発現のみに必要な因子を誘導している可能性が高く、AID 発現の分子機構を解明するに当たり興味深いリガンドであることが示唆される。

抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系においてクラススイッチ組み換えが完了しない理由は AID の発現量ではなかったため、ゲノム DNA の S γ 1 領域付近での切断を検出したところ抗 CD38 抗体及び 8-SGuo による共刺激を与えた脾臓 B 細胞においても S γ 1 領域付近での DNA 切断が見出された (図 13B)。しかしながら、スイッチサークルは検出されない (図 10A)。この 2 つの結果から、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo による共刺激系では DNA 切断までは誘導される。しかし、その後の DNA 修復過程が進行しないために結果としてクラススイッチ組み換えが完了しないものであると考えられる (表 1)。

クラススイッチ組み換えの DNA 修復仮定において機能する分子群は、通常の DNA 損傷を修復する際にも非相同 DNA 末端結合を促進する分子群であると考えられている。したがって、クラススイッチ組み換えにおいて DNA 修復のみが機能しないということは一見考えにくい。しかしながら、ヒトの高 IgM 症候群 IV 型においてはクラススイッチ組み換えの DNA 修復が欠損するためにクラススイッチ組み換えが完了しないことが知られている(6, 57)。高 IgM 症候群の患者においても、非相同 DNA 末端結合により DNA 修復が行われる TCR、BCR の VDJ 組み換えは正常に行われることから、クラススイッチ組み換え特異的に非相同 DNA 末端結合を動作させる機構が存在し、高 IgM 症候群の患者においてはその機構に何らかの障害が存在するためクラススイッチ組み換えが完了しないものと考えられる。

AID の変異体の解析から AID の C 末端側にクラススイッチ組み換えに必要な共転因子が結合するのではないかと類推されている(58, 59)。前述したように AID はクラススイッチ組み換えと共に体細胞高頻度突然変異のマスター遺伝子でもあるが、AID の変異体を強制発現させた AID ノックアウトマウス由来の B 細胞においてクラススイッチ組み換えは欠失するが体細胞高頻度突然変異は野生型 AID と同様に惹起される。クラススイッチ組み換えと体細胞高頻度突然変異は DNA 修復過程において大きく異なるため、ここで存在が示唆される共転因子は、クラススイッチ組み換えにおける非相同的 DNA 末端結合に関与するのではないかとされている。

抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激による脾臓 B 細胞のクラススイッチ組み換えが完了しない原因は抗 IgM 症候群 IV 型と同様のものであり、同時に AID の共転因子と関連して要ると推測される。

8-SGuoの共刺激を与えたB細胞と更にIL-4 刺激を加えたB細胞との遺伝子発現プロファイルを比較し差の見られる分子を同定することによりクラススイッチ組み換えにおける分子機構がより明確になると考えられる。さらに高IgM症候群IV型の原因となる遺伝子を同定することにも繋がるため、今後の研究が重要になる。

Lox と 8-SGuo の機能比較：B 細胞において

8-SGuo と Lox は共に TLR7 のリガンドである。また、抗 CD38 抗体や IL-4 との共刺激系においてはいずれも IgM 産生細胞への分化、IgG1 産生細胞への分化を誘導した (図 14)。抗 CD38 および IL-4 との共刺激系において IgG1 産生細胞への分化を誘導する機能は 8-SGuo、Lox に共通であることが分かる。

また、抗 CD38 抗体や抗 IgM 抗体との共刺激系において細胞増殖も誘導したが 8-SGuo 刺激により Lox 刺激と同等の細胞増殖を誘導するためには 10 倍程度の刺激量が必要であった (図 15A、B)。さらに B 細胞に対して 8-SGuo のみ、Lox のみの単独刺激を加えた場合にはその性質が大きく異なることが実験により明らかになった (図 15C)。

細胞分裂に関しては Lox の単独刺激では誘導されるが、8-SGuo の単独刺激ではわずかにしか誘導されない (図 15C)。また、CD86 の発現増強を指標に脾臓 B 細胞の活性化を測定すると、8-SGuo 刺激は単独刺激においても抗 CD38 抗体や抗 IgM 抗体との共刺激系においても CD86 の発現を増強することはなかった。Lox 刺激は単独刺激においても CD86 発現を増強し共刺激系においても協奏的作用を示している。従って、二つの TLR7 リガンドの特性は CD86 の発現増強に見る B 細胞の活性化において大きく異なるといえる (図 16)。

8-SGuo は単独刺激において細胞増殖をほとんど誘導しないため、*Aicda* の発現も誘導することはない (図 17A)。しかし興味深いのは、単独刺激において *Prdm1* の発現を誘導する点である (図 17A)。8-SGuo は細胞増殖や CD86 の発現増強に見られる細胞の活性化を誘導することはほとんどないが、ピンポイントで *Prdm1* の発現を誘導することができる。*Prdm1* は B 細胞が抗体産生細胞へと分化するためのマスター遺伝子であり、TLR 刺激によりその発現が誘導されることは既に報告されている。しかし、8-SGuo 刺激は細胞増殖、細胞の活性化などのシグナルを伝えないため、極めてシンプルに *Prdm1* の発現を誘導するシグナルのみを伝達していると考えられる。従って、*Prdm1* の発現機構を解明するに当たって 8-SGuo 刺激は有用なツールとなりえるのではないかと示唆される。また、この実験から Lox 刺激、8-SGuo 刺激とも脾臓 B 細胞においては *Btk* を介してシグナルを伝達していることが明らかとなった (図 17C)。TLR4 のシグナルに関しては *Btk* の関与が以前より指摘されていたが、TLR7 のシグナルに関して *Btk* の関与を示した報告はなく、初めて発見された事象である。

Lox と 8-SGuo の機能比較：ミエロイド系の細胞において

TLR などの自然免疫系で機能する分子に関してはマクロファージ、樹状細胞といったミエロイド系の細胞での研究の方が先行している。そこで、ミエロイド系の細胞に対する 8-SGuo の機能

を解析した (図 18)。マクロファージ、骨髄由来樹状細胞において 8-SGuo によるサイトカインの産生、CD86 の発現増強は観察されなかった。8-SGuo 刺激により IkB α の分解、ERK2 のリン酸化などの TLR7 リガンドによるシグナル経路の活性化が観察されなかったのは極めて興味深い。シグナルが伝達されていないとすれば、B 細胞において *Prdm1* の発現を誘導したような、特定の遺伝子の発現を誘導している可能性も低いと考えられる。樹状細胞を用いた先行研究では 8-BrGuo は TLR7 リガンドではないとされていたが(34)、8-SGuo 同様 8-BrGuo 刺激も樹状細胞においてはシグナルを伝えず、その結果 TLR7 リガンドではないと判断されたのであろう。

興味深いのは、8-SGuo 刺激はプラズマサイトイド樹状細胞においてサイトカイン産生を誘導する機能を持つことである (図 19)。脾臓 B 細胞において抗 CD38 抗体や抗 IgM 抗体との共刺激により細胞増殖を誘導した場合同様、Lox と比較して 10 倍量程度の刺激を必要とするがマクロファージや樹状細胞の場合とは大きく異なる。8-SGuo は細胞の種類によってその活性化能が異なるといえる。

8-SGuo と Lox に見られるこれらの性質の違いは何に由来するのだろうか。単純に刺激の強弱の問題であるとも考えられるが、TLR9 における CpG-A と CpG-B のような、リガンドとしての性質の違いではないかとも考えられる。両者は共に TLR7 に認識されることで細胞を活性化していることはノックアウトマウスの実験から明らかになっている。Lox、8-SGuo とともに TLR7 を介してシグナルを伝えながらその性質が相違することを説明する一つの仮説として、共転因子の存在を考えることができる。TLR ファミリーの 1 つ TLR4 はそのリガンドである LPS を認識するための共転因子として MD-2 を必要とすることが知られている(60)。TLR7 にもそのような共転因子が複数種類存在し、8-SGuo を認識する場合と Lox を認識する場合では必要とする共転因子が異なるとも考えられる。細胞間によって主に発現している共転因子が異なるとすれば、B 細胞、樹状細胞、マクロファージやプラズマサイトイド樹状細胞といった細胞間で Lox と 8-SGuo の反応性が相違する理由が説明できる。

TLR7 のリガンドは一重鎖 RNA である。試験管内では Lox やイミキモド、R-848、PolyU などが良く使用される。生体内においてウィルス等に感染した場合に細胞に与えられる TLR7 刺激は Lox のみ、あるいは Poly U のみといった単一の性質を持つものではなく、種々のタイプの一重鎖 RNA 刺激が加えられるのではないかと考えられる。Lox のような機能を持つ TLR7 リガンドも 8-SGuo のような機能を持つ TLR7 リガンドも存在するとすれば、TLR7 リガンド間での機能の相違点を比較することも今後生体内における TLR7 リガンドの機能を解析する上で有用である。

まとめ・今後の展望

今回の研究では、抗 CD38 抗体および IL-4 により刺激した脾臓 B 細胞の IgG1 産生細胞への分化を誘導するグアノシン置換体として 8-メルカプトグアノシン (8-SGuo)、8-ブロモグアノシン (8-BrGuo) を同定した。ノックアウトマウスを用いた解析から 8-SGuo、8-BrGuo はいずれも TLR7 リガンドであることが明らかになった。8-SGuo は抗 CD38 抗体と共に生体に投与した場合も B 細胞の IgG1 産生細胞への分化を誘導した。

抗 CD38 抗体および 8-SGuo により抗体産生細胞への分化が誘導される場合には、Blimp-1 の発現が誘導される。B 細胞に 8-SGuo 刺激を単独で加えた場合にも Blimp-1 の発現が誘導されたことから、これは 8-SGuo の作用によるものであると考えられる。抗 CD38 抗体との共刺激において抗体産生細胞への分化を誘導する点からも 8-SGuo の機能は IL-5 と類似している。しかし、B-1 細胞に対する反応性という面からは IL-5 の機能とは相違点が見られた。

8-SGuo は抗 CD38 抗体、及び IL-4 との共刺激系で IgG1 へのクラススイッチ組み換えを誘導する。この系において 8-SGuo は主に AID を発現誘導する機能を担っていることが明らかになった。また、抗 CD38 抗体及び 8-SGuo の共刺激系においてはクラススイッチ組み換えが完了しないことが明らかとなったが、これはクラススイッチ組み換え特異的な DNA 修復機構が機能していないためであることが示唆された。

8-SGuo は TLR7 リガンドであるが、既知の TLR7 リガンドである Lox とは異なる性質を持つ。とりわけ、マクロファージや樹状細胞に単独で 8-メルカプトグアノシン刺激を与えた場合には Lox 刺激とは異なりシグナル伝達系の活性化が見られない。しかし、プラズマサイトイド樹状細胞や B 細胞においては 8-SGuo 単独刺激においてもサイトカインの産生や *Prdm1* の発現上昇が見られる。特に B 細胞においては、細胞の増殖をほとんど誘導せずに *Prdm1* の発現を上昇させるという極めてユニークな特徴を持つ。

B 細胞のクラススイッチ組み換えに必須となる因子を同定するために始めた研究が TLR7 リガンドの同定、そのユニークな機能の発見に至ったことは興味深い。獲得免疫系を構成する B 細胞は自然免疫系の機能も有効に使用しつつ生体防御に寄与していると言える。

DNA 修復が完了しないためクラススイッチ組み換えが欠損するという現象は高 IgM 症候群 IV 型においても見られる現象である。クラススイッチ組み換えと特異的な DNA の修復にかかわる分子は、その存在が複数の研究から示唆されているものの同定には至っていない。抗 CD38 抗体、IL-4、及び 8-SGuo を用いた研究を進めることでこの分子が同定できるのではないかと考えられる。刺激時の遺伝子発現プロファイル等の研究が修復因子の同定において力を発揮するであろう。

今回の研究において示された 8-SGuo と Lox の相違点の理由はまだ明らかになっていない。一つの可能性として、TLR7 のリガンド認識に必要な共転因子が 8-SGuo と Lox では相異なるということが考えられる。このような特性は今後、種々の免疫細胞における TLR7 の機能解析を進めて行くに当たって有用なツールとなると考えられる。

8-SGuo が抗 CD38 抗体や抗 IgM 抗体、IL-4 との共刺激下において IgG1 産生細胞への分化を誘導すること、また、B 細胞の単独刺激において *Prdm1* の発現を誘導することはいずれも TLR7 が自己抗体の産生に関与しているという先行研究と矛盾なく成立するものである。生体における B 細胞の機能を外来病原体の排除という面のみでなく自己抗体の産生という面からも理解するためには TLR7 を含む種々のシグナルの解析が重要になると考えられる。本研究はその一步を踏み出したものである。また TLR7 リガンド間でも細胞に与えるシグナルが異なる可能性を示したことは実際の生体内において B 細胞に種々の TLR7 リガンドから与えられるシグナルの複雑性を理解する一助となると考えられる。

材料と方法

マウス

実験には7～10週齢の雌のC57BL/6マウス（日本SLC株式会社、浜松）、TLR7ノックアウトマウス、TLR9ノックアウトマウス、MyD88ノックアウトマウス、Btkノックアウトマウスを用いた。東京大学医科学研究所の動物センター内で飼育し、実験動物指針に従って実験した。

抗体と試薬

抗マウスCD38抗体（クローン：CS/2）は、以前の報告どおりに作成したものを用いた(58)。抗マウスCD40抗体（クローン：1C10）はR&D Systems（Minneapolis, MN）から、抗マウスIgM F(ab')フラグメント抗体はImmunoresearch（West Grove, PA）からそれぞれ購入した。8-SGuoはSigma-Aldrich（St. Louis, MO）から、IL-4はR&D Systemsから、LoxはInvivogen（San Diego, CA）から、CpG-BはHycult Biotechnology（Uden, The Netherlands）から、Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)はMolecular Probes（Carlsbad, CA）からそれぞれ購入した。IL-5は以前の報告どおりに作製したものを用いた(61)。ストレプトアビジン結合磁気ビーズはMiltenyi Biotec（Bergisch Gladbach, Germany）から、ビオチン化抗CD43抗体（クローン：S7）はBD Pharmingen（San Diego, CA）からそれぞれ購入した。

FACS解析に用いた次の抗体群は全てBD Pharmingen（San Diego, CA）から購入した：ビオチン化抗CD43抗体（クローン：S7）、ビオチン化抗CD138抗体（クローン：281-2）、ビオチン化抗IL-4受容体 α 鎖抗体（クローン：mIL4R-M1）、ビオチン化抗CD38抗体（クローン：90）、PE結合抗CD5抗体（クローン：53-7.3）、PE結合抗マウスIgG1（クローン：A85-1）、ビオチン化抗CD49b抗体（クローン：DX5）、ビオチン化抗CD19抗体（クローン：1D3）、ビオチン化抗Mac-1抗体（クローン：M1/70）、PE結合抗CD11c抗体（クローン：HL3）。

次の抗体群は全てeBioscience（San Diego, CA）から購入した：FITC結合抗CD45R/B220抗体（クローン：RA3-6B2）、APC結合抗CD45R/B220抗体（クローン：RA3-6B2）、PE結合抗CD86抗体（クローン：GL1）、ビオチン化抗CD3e抗体（クローン：145-2C11）、APC結合抗PDCA-1抗体（クローン：JF05-1C2.4.1）。

FACS解析において死細胞を除外するために使用した7-アミノ・アクチマイシンDはSigma Fine Chemical Co.（St. Louis, MO）から購入した。

脾臓B-2細胞の精製

マウスから脾臓を取り出し、すりガラスを用いて脾臓をすりつぶした後、ナイロンメッシュ（BD Falcon, Bedford, MA）に通して脾臓細胞を精製した(26)。脾臓細胞をACK溶出緩衝液（0.15 M 塩化アンモニウム, 1.0 mM 炭酸水素カリウム, 0.1 mM EDTA）中に懸濁し、氷上に5分間置いて赤血球を取り除いた。さらに、Miltenyi BiotecのautoMACSを用い、抗マウスCD43-ビオチ

ン抗体とストレプトアビジン結合磁気ビーズとにより脾臓細胞からCD43⁺細胞を精製し、これを脾臓B細胞とした。FACSにより解析したところ、この方法で精製した細胞は95%以上がB220⁺を細胞表面に発現するB細胞であった。B細胞は8% FCS、50 μ M 2-メルカプトエタノール、50 U/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシンを加えたRPMI1640 培地 (Life Technologies, Grand Island, NY) 中で培養した。培養時の各抗体、サイトカインなどの至適濃度は以下のようにした。抗マウスCD38 抗体: 1 μ g/ml, IL-5: 100 U/ml, IL-4: 25 ng/ml, 8-SGuo: 0.1 mM

腹腔 B-1、B-2 細胞の精製

腹腔からB-1 細胞、B-2 細胞を精製するため、マウス腹腔に存在する細胞を 2.5%FCS-PBSにより洗浄し回収した。細胞をAPC結合抗CD45R/B220 抗体、PE結合抗CD5 抗体により染色し、B220⁺とCD5⁺の細胞表面上の発現によりCD5⁺ B220^{lo} を示す細胞群をB-1 細胞として、CD5⁺ B220^{hi} を示す細胞群をB-2 細胞としてFACS Aria (Becton Dickinson & Co.)により分離した(62)。

ELISA

抗体の分泌量を測定するため、脾臓B細胞を 96 穴プレートに 1×10^5 個/ウェル の密度で各刺激と共に 7 日間培養した(24)。培養液中の全IgM量、IgG1 量は、すでに述べられている方法を用いてELISAにより測定した(22)。簡単に説明すると、非標識抗マウスIgM抗体、もしくは非標識抗マウスIgG1 抗体をホウ酸緩衝塩化ナトリウム水溶液 (Boric Buffered Saline, BBS) により希釈し、96 穴プレート (Nalge Nunc International, Rochester, NY) に、各穴 100 μ lずつ入れ、4°C で1晩置くことにより固相化した。IgM、IgG1 の測定の際には固相化したプレートを 0.1 % ツイーン 20 を含むリン酸緩衝塩化ナトリウム水溶液 (Phosphate Buffered Saline - Tween20, PBS-T) により洗浄した後、各穴 100 μ lずつの培養上清を入れ、室温で 2 時間置いた。この後、プレートを洗い、PBS-Tに希釈したHRP結合抗マウスIgM抗体、もしくはビオチン結合抗マウスIgG1 抗体を各穴に 100 μ lずつ入れ、室温で 2 時間置いた。IgM測定の場合はこの後PBS-Tでプレートを洗った上で発光反応に進み、IgG1 測定の場合にはPBS-Tでプレートを洗った後、PBS-Tに希釈したストレプトアビジン結合HRPを各穴に 100 μ lずつ入れた。このまま室温で 1 時間 30 分置いた。

発色反応は OPD 及び過酸化水素を含むクエン酸緩衝液を各穴に 100 μ l ずつ入れ、室温で 10 分間放置した。2 N の硫酸を各穴に 50 μ l ずつ加えて発色 x 反応を止めた。

ELISAの測定にはVMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を使い、結果の解析にはSOFTmax (Molecular Devices) を用いた。

FACS 解析

FACSにより解析を行う場合には、 1×10^5 の細胞を 100 μ lのFACS用染色緩衝液 (0.5 % BSA – FACS Flow (BD Biosciences, San Jose, CA))に懸濁し、抗マウスFc γ 受容体 (クローン: 2.4G2) を加え氷上に 15 分間置き抗体がB細胞のFc受容体に結合するのをブロックした。FACS Flowによ

り洗浄後、各抗体を至適濃度となるよう希釈した染色緩衝液に細胞を懸濁し、氷上に 30 分間置いて染色した。FACS解析はFACS Calibur (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA)を用いて行い、解析用ソフトウェアはFlowJo (Treestar, San Carlos, CA) を用いた。

B細胞の分裂回数の測定する場合(63)には、脾臓B細胞をPBSに 1×10^7 個/mlの密度で懸濁し、終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるようにCFSE を加え、 37°C で 10 分間培養した。CFSEにより標識されたB細胞を培養液で洗浄した後、各種のサイトカインを加えた培養液中で必要な時間培養した。培養後、B細胞を回収し、 $2 \mu\text{g/ml}$ の 7 アミノアクチマイシンDを含むFACS用染色緩衝液 (0.5 % BSA – FACS Flow (BD Biosciences, San Jose, CA)) に懸濁し、FACSCaliburを用いて細胞分裂回数を測定、解析した。7 アミノアクチマイシンDにより染色される細胞は死細胞として解析から除いた。

細胞増殖の測定

細胞増殖は ^3H チミジンの取り込みにより測定した。マウスから精製した脾臓B細胞を 96 穴プレートに 5×10^5 個/mlの濃度で所定の刺激と共に培養した。72 時間後、B細胞を ^3H チミジン ($0.2 \mu\text{Ci}/\text{ウェル}$, Amersham Life Science, Little Chalfont, UK)によりパルスし、更に 6 時間培養を行った。その後、B細胞を Cell Harvester (Inotech, Rockville, MD)により回収し細胞内に取り込まれた ^3H チミジンを 1450 Microbeta Jet (Perkin Elmer, Walllesly, MA) を用い、添付の説明書に従って測定した(24)。

RT-PCR

RNAを精製する場合にはB細胞を 1×10^6 個/ウェルの割合で 24 穴プレートに 1 ml/ウェルずつ 3 日間培養した(胚細胞型 $\gamma 1$ の場合のみ 2 日間)。培養後B細胞を回収し、RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてRNAを精製した。500 ngから $1 \mu\text{g}$ のRNAを用いcDNAの合成を行った。cDNAの合成にはSuper Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用し、添付されている製品マニュアルに従った(24)。

準定量的 PCR を行う場合には、テンプレート DNA の 3 倍の希釈系列を作成し、PCR により増幅した。PCR 産物は 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロミド染色により可視化した。

定量的 PCR には、Lightcycler Faststart DNA Master Hybprobe (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)、及び Light Cycler ST300 (Roche Molecular Biochemicals)を使用した。手順は添付の説明文書に従った。

PCR プライマー、プローブ

準定量的 PCR におけるプライマーはそれぞれ以下に示すものを用いた。

胚細胞型 $\gamma 1$ センス鎖 5'-GGCCCTTCCAGATCTTTGAG-3';

アンチセンス鎖 5'-GGATCCAGAGTTCCAGGTCAGT-3'

Aicda センス鎖 5'-GATAGTGCCACCTCCTGCTC-3';
 アンチセンス鎖 5'-GAAATGCATCTCGCAAGTCA-3'

Prdm1 センス鎖 5'-TCCGGCTCCGTGAAGTTTCAA-3'
 アンチセンス鎖 5'-GGTGGAACCTCTCTTGGAAT-3'

TLR7 センス鎖 5'-AGCTCAAAGGCTCTGCGAGT-3';
 アンチセンス鎖 5'-CCCTCAGGGATTTCTGTCAA-3'

定量的 PCR におけるプライマー、プローブはそれぞれ以下に示すものを用いた。

Aicda センス鎖 5'- GAA CTT TCAAAG CCT GGG AA -3',
 アンチセンス鎖 5'- CCC AAC ATA CGAAAT GCA TC -3'
 Fluorescein プローブ 5'- AAT TCT GTC CGG CTA ACC AGA CAA CTT
 CG-3'-Fluorescein
 LcRed プローブ 5'-LCRed640- CGC ATC CTT TTG CCC TTG TAC GAA GTC
 -3'-phosphorylation

Prdm1 センス鎖 5'- TGG ACA GAG GCC GAG TTT G -3',
 アンチセンス鎖 5'- AGC GTG TTC CCT TCG GTA T -3'
 Fluorescein プローブ 5'- GTA CTT CTG TTC AAG CCG AGG CAT CCT
 TAC C -3'-Fluorescein
 LcRed プローブ 5'-LCRed640- CGC ATC CTT TTG CCC TTG TAC GAA GTC
 -3'-phosphorylation

定量的 PCR におけるプライマー、プローブは日本遺伝子研究所（仙台）に設計及び合成を依頼した(64)。

クロマチン免疫沈降法

Sy1 領域のアセチル化ヒストンH3 の検出にはクロマチン免疫沈降法を用いた(65)。マウスの脾臓B細胞を抗CD38 抗体（1 µg/ml）、IL-4（25 ng/ml）、及び 8-SGuo（0.1 mM）により刺激し 48 時間培養後細胞を回収した。細胞を 1 x 10⁶ 個/mlの濃度でPBSに懸濁後、新しい1.5 mlチューブに1 ml とり 100 µlの固定液（11% ホルムアルデヒド、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA、50 mM HEPES, pH 8.0）を加え 37 度、2 分間により固定した。固定後、100 µl の 1.5 M グリシン水溶液を添加し固定を止めた。PBSにより 2 回洗浄した後、SDS細胞溶解液（1 % SDS、10 mM EDTA、50 mM Tris-HCl、pH 8.0、10 µg/ml ロイペプチン、10 µg/ml アプロチニン、1 mM PMSF）に細胞を懸濁し氷上に 10 分間置いて細胞を溶解した。溶解後、Biorupter（コスモ・バイオ株式会社、東京）を使用し細胞を破碎した。破碎の際には超音波を 30 秒間当て 1 分間休止するステップを計 9 回行った。破碎後の細胞を 4 度、15000 rpmで 10 分間遠心し上清を新しい 2 mlチューブに移し、1.8 ml のChIP希釈バッファー（50 mM Tris-HCl、pH 8.0、167 mM 塩化ナトリウム、1.1 % TritonX-100、0.11 % NaDOC、10 µg/ml ロイペプチン、10 µg/ml アプロチ

ニン、1 mM PMSF) により希釈した。1/10 量にあたる 200 μ l をインプット DNA として別のチューブに保存し、残りのサンプルには 80 μ l の 50 % Slurry プロテイン G (Millipore, Billerica, MA) を加え、4 度で一時間ローテートしプロテイン G に非特異的に結合する蛋白質を除いた。その後、抗アセチル化ヒストン H3 抗体 (Millipore) を加え、4 度で 16 時間ローテートした。

ローテート後、60 μ l の 50 % Slurry プロテイン G を加え 4 度で 2 時間免疫沈降を行い、ビーズを RIPA 緩衝液 (150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1 % TritonX-100、0.1 % SDS、0.1 % NaDOC、50 mM Tris-HCl、pH 8.0) で一回、RIPA/500 mM 塩化ナトリウムで一回、塩化リチウム洗浄緩衝液 (0.25 M 塩化リチウム、0.5 % NP-40、0.5 % NaDOC、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl、pH 8.0) で一回、TE で 2 回洗浄し、終了後 200 μ l の直接溶出液に懸濁 (0.5 % SDS、5 mM EDTA、300 mM 塩化ナトリウム、10 mM Tris-HCl、pH 8.0)、ボルテックス後 10000 rpm、4 度により 10 秒間遠心し 65 度に 16 時間おきクロスリンクを解除した。

クロスリンク解除後、RN アーゼ A を 20 μ g/ml となるように加え 37 度で 30 分おき RNA を分解し、さらにプロテイナーゼ K を 50 μ g/ml となるように加え 55 度で一時間おき RNA、蛋白質を分解する。上清を新しいチューブに移し、フェノール・クロロホルム処理後エタノール沈殿を行い、20 μ l の TE に DNA を溶解した。

その後、PCR により目的配列を増幅、2%アガロースゲルに電気泳動後エチジウムブロミドによりバンドを可視化した。

プライマーは以下のものを用いた。

センス鎖：5'-CTAGGAGTGTAGGGGACCAAGCTGAGCA-3'

アンチセンス鎖：5'-AGCTCATCCCCTACACCCTAACCTG-3'

ウイルスベクターによる強制発現

pMY-IRES-EGFP ベクターとパッケージング細胞株である Plat-E は北村俊雄教授 (東京大学) から頂いたものを使用した。Aicda の全長 cDNA を Taq DNA ポリメラーゼ (Invitrogen) により増幅し、シークエンシングにより配列を確認した後 pMY-IRES-EGFP ベクターに挿入した (66)。ウイルスベクターの Plat-E への感染は Fugene6 Transfection Reagent (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) を使用し添付の説明文書に従って行った。24 時間後、培養メディアウムを B 細胞の培養メディアウムに置き換え、更に 24 時間後にウイルスを含む培養上清を回収した。

マウス脾臓 B 細胞は抗 CD38 抗体 (1 μ g/ml) 刺激を加え 24 時間培養し、回収後 10 μ g/ml DOTAP (Roche Molecular Biochemicals) を加えたウイルスを含む培養上清に懸濁した。細胞の濃度を 1×10^6 個/ml に調整し 12 穴プレートに入れ、プレートを 2000 rpm で 90 分間室温において遠心した。遠心後、抗 CD38 抗体を 1 μ g/ml となるように加え 24 時間培養後 IL-4 (25 ng/ml)、8-SGuo (0.1 mM) を加えた。FACS 解析は更に 48 時間培養した後に細胞を回収し行った。

γ 1- μ 環状 DNA (スイッチサークル) の検出

脾臓B細胞のゲノムDNAはBlood & Cell Culture DNA Mini Kit (QIAGEN) により抽出し、分光光度計により濃度を測定した。 γ 1- μ の組み換え産物を増幅するため、培養後、もしくは脾臓から精製した直後のB細胞から抽出したゲノムDNA (100 ng) をPCRにより増幅した。PCR産物は0.8 % のアガロースゲル内での電気泳動後、ナイロン膜 Genescreen (Perkin Elmer, Boston, MA) に転写し、 32 P付加したS γ 1 プローブを用いてハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後のナイロン膜は Fujix BAS1000 バイオイメージングアナライザー (富士フイルム, 東京)により 32 Pを可視化し、解析を行った(22)。

プライマーとプローブは以下のものを用いた。

5' プライマー 5'-CACTCCTGGGTATGGAAACACATCCTAC-3'

3' プライマー 5'-CTAACTTATCGAGCCTAGTTCAAC-3'

プローブ nucleotides 537-1674 (MUSIGHANB) 、
nucleotides 1210-1308 (MUSIGCD09)

Ligation-Mediated PCR (LM-PCR)

B 細胞を培養し 3 日後に回収し、フィコール・ウログラフィンによる密度勾配を用いて死細胞を除いた。死細胞除去後、トリパンブルー染色により生細胞が 90 %以上の割合を占めている事を確認した。生細胞を RPMI1640 により洗浄した後、ゲノム DNA を Blood & Cell Culture DNA Mini kit (Qiagen) により精製した。T4 DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) によりゲノム DNA の末端平滑化を行い、T4 DNA ligase (New England Biolabs) によりリンカーと結合させた。

リンカーに結合させた DNA の 40 ng を用い、ネスト PCR によりリンカーの結合した DNA S γ 1 部位を増幅した。ネスト PCR には Jumpstart Taq Polymerase (Sigma) を使用し、S γ 1 特異的なプライマーとリンカー特異的なプライマーにより増幅した。PCR 産物はアガロースゲル内に電気泳動し、ナイロン膜 Genescreen に転写後、S γ 1 特異的なオリゴプローブとハイブリダイゼーションさせた。オリゴプローブは Gene Images 3'-Oligolabelling Module (Amersham Life Science) を使用して蛍光ラベルし、ハイブリダイズしたプローブを ECL Plus Detection Reagents (Amersham Life Science)により検出した(67)。

増幅・検出に使用したプライマーとプローブの配列は以下の通りである。

S γ 1 nested #1 : 5'-CTC CCC TGT GTC TTC TTA GCT TGG T-3'

S γ 1 nested #2 : 5'-GCT CAG CCT GAC TTC TTAAAG TTC C-3'

S γ 1 オリゴプローブ、ロングオリゴリンカー : 5'-GCG GTG ACC CGG GAG ATC TGA ATT CAC-3'

ショートオリゴリンカー : 5'-GTG TTC AGA TC-3'

骨髄由来マクロファージ、樹状細胞の樹立

骨髄由来マクロファージは骨髄細胞を 10 cm径ディッシュを使用しリコンビナントマウス

M-CSF (100 ng/ml) を含む 10 % FCS-RPMI培養メディウム中で培養し樹立した。7 日間培養後、付着製の細胞を回収し 96 穴プレートに 5×10^5 個/mlの濃度で培養し種々のTLRリガンドを加え 24 時間刺激を行った(43)。

骨髓由来の古典的樹状細胞は骨髓細胞を 10 cm径ディッシュを使用しリコンビナントマウス GM-CSF (10 ng/ml) を含む 10 % FCS-RPMI培養メディウム中で培養した。7 日間培養後、付着製の細胞を回収し 96 穴プレートに 5×10^5 個/mlの濃度で培養し種々のTLRリガンドを加え 24 時間刺激を行った(68)。

骨髓由来のプラズマサイトイド樹状細胞は骨髓細胞を 10 cm径ディッシュを使用しリコンビナントヒトFlt-3L (100 ng/ml) を含む 10 % FCS-RPMI培養メディウム中で培養した(69)。7 日間培養後、付着製の細胞を回収し 96 穴プレートに 5×10^5 個/mlの濃度で培養し種々のTLRリガンドを加え 24 時間刺激を行った。

脾臓からの樹状細胞の精製

脾臓からプラズマサイトイド樹状細胞を精製するために、脾臓細胞をビオチン結合抗 Mac-1 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD3ε抗体、抗 CD49b 抗体により染色し MACS を用いてネガティブセレクションを行った。得られた細胞を FITC 結合抗 CD45R/B220 抗体、PE 結合抗 CD11c 抗体、APC 結合抗 PDCA-1 抗体により染色し、FACS Aria により CD11clo B220+ PDCA-1+の細胞をプラズマサイトイド樹状細胞とした(70)。

Western Blotting

脾臓細胞は溶解緩衝液 (1 % Triton-X100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 10 µg/ml アプロチニン、10 µg/ml ロイペプチン、1 mM PMSF, 1 mM オルソバナデート、50 mM フッ化ナトリウム)中に懸濁し氷中に 30 分間置いて溶解し、遠心分離により核を除いた。細胞溶解液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (10 %) により分離し、抗マウス IgM 抗体 (American Qualex, Calle Negocio San Clemente, CA)、抗マウス IgG 抗体 (American Qualex)、抗マウス Grb2 抗体 (Santa Cruz) によりブロットした。

骨髓細胞から樹立したマクロファージや樹状細胞は Lipid A (1 µg/ml)Lox (0.1 mM) 8-SGuo (0.1 mM)により所定の時間刺激し、細胞を回収、溶解緩衝液中に懸濁し、氷上で 30 分間かけ細胞を溶解し核を除去した。細胞溶解液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (12 %) により分離し、抗 IkBa 抗体 (Cell Signaling, Danvers, MA)、抗リン酸化 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling)、及び抗アクチン抗体 (Sigma) によりウェスタンブロッティングを行った(24)。

参考文献

1. Janeway, C., *Immunobiology 5 : the immune system in health and disease*. 5th ed. 2001, New York: Garland Pub. xviii, 732 p.
2. Turner, C.A., Jr., D.H. Mack, and M.M. Davis, *Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells*. Cell, 1994. **77**(2): p. 297-306.
3. Martins, G. and K. Calame, *Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 133-69.
4. Genestier, L., M. Taillardet, P. Mondiere, H. Gheit, C. Bella, and T. Defrance, *TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses*. J. Immunol., 2007. **178**(12): p. 7779-86.
5. Lin, K.I., Y.Y. Kao, H.K. Kuo, W.B. Yang, A. Chou, H.H. Lin, A.L. Yu, and C.H. Wong, *Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the TLR4/TLR2-mediated induction of transcription factor Blimp-1*. J. Biol. Chem., 2006. **281**(34): p. 24111-23.
6. Fischer, A., *Human primary immunodeficiency diseases: a perspective*. Nat. Immunol., 2004. **5**(1): p. 23-30.
7. Deenick, E.K., J. Hasbold, and P.D. Hodgkin, *Switching to IgG3, IgG2b, and IgA is division linked and independent, revealing a stochastic framework for describing differentiation*. J. Immunol., 1999. **163**(9): p. 4707-14.
8. Hasbold, J., A.B. Lyons, M.R. Kehry, and P.D. Hodgkin, *Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4*. Eur. J. Immunol., 1998. **28**(3): p. 1040-51.
9. Muramatsu, M., V.S. Sankaranand, S. Anant, M. Sugai, K. Kinoshita, N.O. Davidson, and T. Honjo, *Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(26): p. 18470-6.
10. Honjo, T., K. Kinoshita, and M. Muramatsu, *Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 165-96.
11. Zhang, K., *Accessibility control and machinery of immunoglobulin class switch recombination*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(3): p. 323-32.
12. Stavnezer, J., G. Radcliffe, and E. Severinson, *Specificity of immunoglobulin heavy chain switching by cultured I.29 B lymphoma cells*. Monogr Allergy, 1988. **24**: p. 197-207.
13. Rada, C., G.T. Williams, H. Nilsen, D.E. Barnes, T. Lindahl, and M.S. Neuberger, *Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice*. Curr Biol, 2002. **12**(20): p. 1748-55.

14. Manis, J.P., J.C. Morales, Z. Xia, J.L. Kutok, F.W. Alt, and P.B. Carpenter, *53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination*. Nat. Immunol., 2004. **5**(5): p. 481-7.
15. Bardwell, P.D., C.J. Woo, K. Wei, Z. Li, A. Martin, S.Z. Sack, T. Parris, W. Edelmann, and M.D. Scharff, *Altered somatic hypermutation and reduced class-switch recombination in exonuclease 1-mutant mice*. Nat. Immunol., 2004. **5**(2): p. 224-9.
16. Soulas-Sprauel, P., G. Le Guyader, P. Rivera-Munoz, V. Abramowski, C. Olivier-Martin, C. Goujet-Zalc, P. Charneau, and J.P. de Villartay, *Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination*. J. Exp. Med., 2007. **204**(7): p. 1717-27.
17. Reina-San-Martin, B., S. Difilippantonio, L. Hanitsch, R.F. Masilamani, A. Nussenzweig, and M.C. Nussenzweig, *H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation*. J. Exp. Med., 2003. **197**(12): p. 1767-78.
18. Pan-Hammarstrom, Q., A.M. Jones, A. Lahdesmaki, W. Zhou, R.A. Gatti, L. Hammarstrom, A.R. Gennery, and M.R. Ehrenstein, *Impact of DNA ligase IV on nonhomologous end joining pathways during class switch recombination in human cells*. J. Exp. Med., 2005. **201**(2): p. 189-94.
19. Enders, A., P. Fisch, K. Schwarz, U. Duffner, U. Pannicke, E. Nikolopoulos, A. Peters, M. Orłowska-Volk, D. Schindler, W. Friedrich, B. Selle, C. Niemeyer, and S. Ehl, *A severe form of human combined immunodeficiency due to mutations in DNA ligase IV*. J. Immunol., 2006. **176**(8): p. 5060-8.
20. Lumsden, J.M., T. McCarty, L.K. Petiniot, R. Shen, C. Barlow, T.A. Wynn, H.C. Morse, 3rd, P.J. Gearhart, A. Wynshaw-Boris, E.E. Max, and R.J. Hodes, *Immunoglobulin class switch recombination is impaired in Atm-deficient mice*. J. Exp. Med., 2004. **200**(9): p. 1111-21.
21. Reina-San-Martin, B., H.T. Chen, A. Nussenzweig, and M.C. Nussenzweig, *ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions*. J. Exp. Med., 2004. **200**(9): p. 1103-10.
22. Mizoguchi, C., S. Uehara, S. Akira, and K. Takatsu, *IL-5 induces IgG1 isotype switch recombination in mouse CD38-activated sIgD-positive B lymphocytes*. J. Immunol., 1999. **162**(5): p. 2812-9.
23. Takatsu, K., S. Takaki, and Y. Hitoshi, *Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation*. Adv Immunol, 1994. **57**: p. 145-90.
24. Horikawa, K., H. Kaku, H. Nakajima, H.W. Davey, L. Hennighausen, I. Iwamoto, T. Yasue, A. Kariyone, and K. Takatsu, *Essential role of Stat5 for IL-5-dependent IgH switch recombination in mouse B cells*. J. Immunol., 2001. **167**(9): p. 5018-26.
25. Wykes, M.N., L. Beattie, G.G. Macpherson, and D.N. Hart, *Dendritic cells and follicular*

- dendritic cells express a novel ligand for CD38 which influences their maturation and antibody responses.* Immunology, 2004. **113**(3): p. 318-27.
26. Kaku, H., K. Horikawa, Y. Obata, I. Kato, H. Okamoto, N. Sakaguchi, S. Gerondakis, and K. Takatsu, *NF-kappaB is required for CD38-mediated induction of C(gamma)1 germline transcripts in murine B lymphocytes.* Int. Immunol, 2002. **14**(9): p. 1055-64.
 27. Kikuchi, Y., T. Yasue, K. Miyake, M. Kimoto, and K. Takatsu, *CD38 ligation induces tyrosine phosphorylation of Bruton tyrosine kinase and enhanced expression of interleukin 5-receptor alpha chain: synergistic effects with interleukin 5.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. **92**(25): p. 11814-8.
 28. Goodman, M.G., *Cellular and biochemical studies of substituted guanine ribonucleoside immunostimulants.* Immunopharmacology, 1991. **21**(1): p. 51-68.
 29. Goodman, M.G., A.B. Reitz, R. Chen, M.D. Bobardt, J.H. Goodman, and B.L. Pope, *Selective modulation of elements of the immune system by low molecular weight nucleosides.* J Pharmacol Exp Ther, 1995. **274**(3): p. 1552-7.
 30. Goodman, M.G. and W.O. Weigle, *Derivatized guanine nucleosides: a new class of adjuvant for in vitro antibody responses.* J. Immunol., 1983. **130**(6): p. 2580-5.
 31. Goodman, M.G. and W.O. Weigle, *T cell-replacing activity of C8-derivatized guanine ribonucleosides.* J. Immunol., 1983. **130**(5): p. 2042-5.
 32. Goodman, M.G. and W.O. Weigle, *Enhancement of the human antibody response by C8-substituted guanine ribonucleosides in synergy with interleukin 2.* J. Immunol., 1985. **135**(5): p. 3284-8.
 33. Goodman, M.G. and W.O. Weigle, *Enhancement of T cell proliferation and differentiation by 8-mercaptoguanosine.* Adv Exp Med Biol, 1986. **195 Pt B**: p. 443-9.
 34. Lee, J., T.H. Chuang, V. Redecke, L. She, P.M. Pitha, D.A. Carson, E. Raz, and H.B. Cottam, *Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003. **100**(11): p. 6646-51.
 35. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira, *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.* Nat. Immunol., 2002. **3**(2): p. 196-200.
 36. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
 37. Pisitkun, P., J.A. Deane, M.J. Difilippantonio, T. Tarasenko, A.B. Satterthwaite, and S. Bolland, *Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication.* Science, 2006. **312**(5780): p. 1669-72.
 38. Yasuda, K., M. Rutz, B. Schlatter, J. Metzger, P.B. Luppa, F. Schmitz, T. Haas, A. Heit, S. Bauer, and H. Wagner, *CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal*

- translocation of "natural" phosphodiester DNA*. Eur. J. Immunol., 2006. **36**(2): p. 431-6.
39. Krieg, A.M. and J. Vollmer, *Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 251-69.
 40. Deane, J.A., P. Pisitkun, R.S. Barrett, L. Feigenbaum, T. Town, J.M. Ward, R.A. Flavell, and S. Bolland, *Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation*. Immunity, 2007. **27**(5): p. 801-10.
 41. Subramanian, S., K. Tus, Q.Z. Li, A. Wang, X.H. Tian, J. Zhou, C. Liang, G. Bartov, L.D. McDaniel, X.J. Zhou, R.A. Schultz, and E.K. Wakeland, *A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006. **103**(26): p. 9970-5.
 42. Christensen, S.R., J. Shupe, K. Nickerson, M. Kashgarian, R.A. Flavell, and M.J. Shlomchik, *Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 417-28.
 43. Nagai, Y., T. Kobayashi, Y. Motoi, K. Ishiguro, S. Akashi, S. Saitoh, Y. Kusumoto, T. Kaisho, S. Akira, M. Matsumoto, K. Takatsu, and K. Miyake, *The radioprotective 105/MD-1 complex links TLR2 and TLR4/MD-2 in antibody response to microbial membranes*. J. Immunol., 2005. **174**(11): p. 7043-9.
 44. Krieg, A.M., *The role of CpG motifs in innate immunity*. Curr. Opin. Immunol., 2000. **12**(1): p. 35-43.
 45. Shaffer, A.L., K.I. Lin, T.C. Kuo, X. Yu, E.M. Hurt, A. Rosenwald, J.M. Giltzane, L. Yang, H. Zhao, K. Calame, and L.M. Staudt, *Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program*. Immunity, 2002. **17**(1): p. 51-62.
 46. Shaffer, A.L., M. Shapiro-Shelef, N.N. Iwakoshi, A.H. Lee, S.B. Qian, H. Zhao, X. Yu, L. Yang, B.K. Tan, A. Rosenwald, E.M. Hurt, E. Petroulakis, N. Sonenberg, J.W. Yewdell, K. Calame, L.H. Glimcher, and L.M. Staudt, *XBPI, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation*. Immunity, 2004. **21**(1): p. 81-93.
 47. Shapiro-Shelef, M., K.I. Lin, L.J. McHeyzer-Williams, J. Liao, M.G. McHeyzer-Williams, and K. Calame, *Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 607-20.
 48. Tsukamoto, Y., S. Uehara, C. Mizoguchi, A. Sato, K. Horikawa, and K. Takatsu, *Requirement of 8-mercaptoguanosine as a costimulus for IL-4-dependent mu to gamma1 class switch recombination in CD38-activated B cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005. **336**(2): p. 625-33.
 49. Rush, J.S., M. Liu, V.H. Odegard, S. Unniraman, and D.G. Schatz, *Expression of*

- activation-induced cytidine deaminase is regulated by cell division, providing a mechanistic basis for division-linked class switch recombination.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. **102**(37): p. 13242-7.
50. Yang, R.B., M.R. Mark, A. Gray, A. Huang, M.H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W.I. Wood, A.L. Gurney, and P.J. Godowski, *Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling.* Nature, 1998. **395**(6699): p. 284-8.
 51. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira, *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.* Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
 52. Yasue, T., M. Baba, S. Mori, C. Mizoguchi, S. Uehara, and K. Takatsu, *IgG1 production by sIgD+ splenic B cells and peritoneal B-1 cells in response to IL-5 and CD38 ligation.* Int. Immunol, 1999. **11**(6): p. 915-23.
 53. Yasue, T., H. Nishizumi, S. Aizawa, T. Yamamoto, K. Miyake, C. Mizoguchi, S. Uehara, Y. Kikuchi, and K. Takatsu, *A critical role of Lyn and Fyn for B cell responses to CD38 ligation and interleukin 5.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94**(19): p. 10307-12.
 54. Morris, D.L. and T.L. Rothstein, *Abnormal transcription factor induction through the surface immunoglobulin M receptor of B-1 lymphocytes.* J. Exp. Med., 1993. **177**(3): p. 857-61.
 55. Weiss, A. and D.R. Littman, *Signal transduction by lymphocyte antigen receptors.* Cell, 1994. **76**(2): p. 263-74.
 56. Okazaki, I.M., H. Hiai, N. Kakazu, S. Yamada, M. Muramatsu, K. Kinoshita, and T. Honjo, *Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis.* J. Exp. Med., 2003. **197**(9): p. 1173-81.
 57. Imai, K., N. Catalan, A. Plebani, L. Marodi, O. Sanal, S. Kumaki, V. Nagendran, P. Wood, C. Glastre, F. Sarrot-Reynauld, O. Hermine, M. Forveille, P. Revy, A. Fischer, and A. Durandy, *Hyper-IgM syndrome type 4 with a B lymphocyte-intrinsic selective deficiency in Ig class-switch recombination.* J Clin Invest, 2003. **112**(1): p. 136-42.
 58. Ta, V.T., H. Nagaoka, N. Catalan, A. Durandy, A. Fischer, K. Imai, S. Nonoyama, J. Tashiro, M. Ikegawa, S. Ito, K. Kinoshita, M. Muramatsu, and T. Honjo, *AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors.* Nat. Immunol., 2003. **4**(9): p. 843-8.
 59. Barreto, V., B. Reina-San-Martin, A.R. Ramiro, K.M. McBride, and M.C. Nussenzweig, *C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion.* Mol. Cell., 2003. **12**(2): p. 501-8.
 60. Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto, *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.* J.

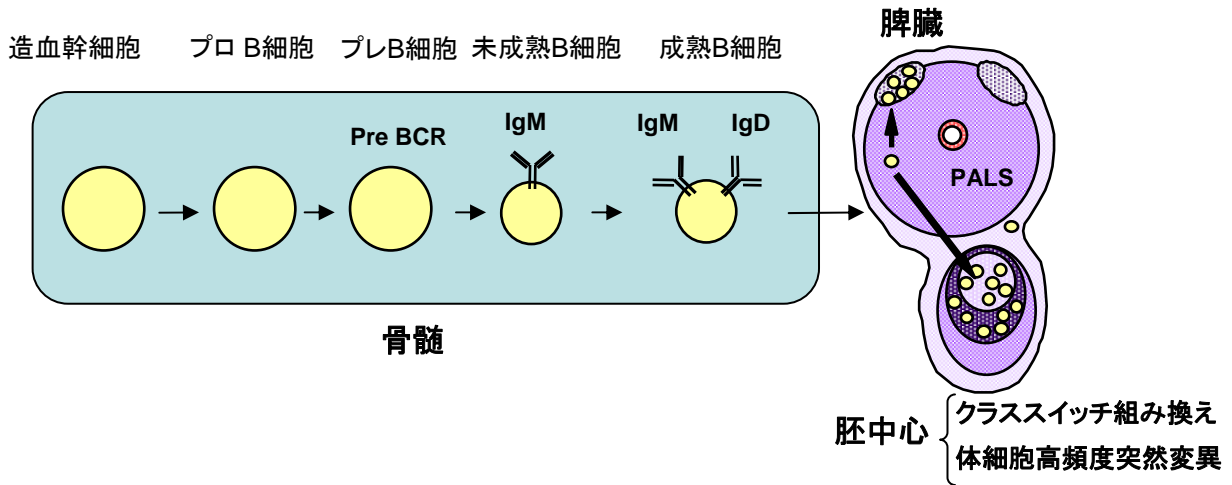
- Exp. Med., 1999. **189**(11): p. 1777-82.
61. Mita, S., A. Tominaga, Y. Hitoshi, K. Sakamoto, T. Honjo, M. Akagi, Y. Kikuchi, N. Yamaguchi, and K. Takatsu, *Characterization of high-affinity receptors for interleukin 5 on interleukin 5-dependent cell lines*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989. **86**(7): p. 2311-5.
 62. Hamaguchi, Y., J. Uchida, D.W. Cain, G.M. Venturi, J.C. Poe, K.M. Haas, and T.F. Tedder, *The peritoneal cavity provides a protective niche for B1 and conventional B lymphocytes during anti-CD20 immunotherapy in mice*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4389-99.
 63. Lyons, A.B. and C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **171**(1): p. 131-7.
 64. Ariga, H., Y. Shimohakamada, M. Nakada, T. Tokunaga, T. Kikuchi, A. Kariyone, T. Tamura, and K. Takatsu, *Instruction of naive CD4+ T-cell fate to Tbet expression and T helper 1 development: roles of T-cell receptor-mediated signals*. Immunology, 2007. **122**(2): p. 210-21.
 65. Agata, Y., T. Katakai, S.K. Ye, M. Sugai, H. Gonda, T. Honjo, K. Ikuta, and A. Shimizu, *Histone acetylation determines the developmentally regulated accessibility for T cell receptor gamma gene recombination*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 873-80.
 66. Horikawa, K. and K. Takatsu, *Interleukin-5 regulates genes involved in B-cell terminal maturation*. Immunology, 2006. **118**(4): p. 497-508.
 67. Rush, J.S., S.D. Fugmann, and D.G. Schatz, *Staggered AID-dependent DNA double strand breaks are the predominant DNA lesions targeted to S mu in Ig class switch recombination*. Int. Immunol, 2004. **16**(4): p. 549-57.
 68. Wakabayashi, Y., M. Kobayashi, S. Akashi-Takamura, N. Tanimura, K. Konno, K. Takahashi, T. Ishii, T. Mizutani, H. Iba, T. Kouro, S. Takaki, K. Takatsu, Y. Oda, Y. Ishihama, S. Saitoh, and K. Miyake, *A protein associated with toll-like receptor 4 (PRAT4A) regulates cell surface expression of TLR4*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1772-9.
 69. Gilliet, M., A. Boonstra, C. Paturel, S. Antonenko, X.L. Xu, G. Trinchieri, A. O'Garra, and Y.J. Liu, *The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 2002. **195**(7): p. 953-8.
 70. Sugiyama, T., K. Hoshino, M. Saito, T. Yano, I. Sasaki, C. Yamazaki, S. Akira, and T. Kaisho, *Immuno- adjuvant effects of polyadenylic:polyuridylic acids through TLR3 and TLR7*. Int Immunol, 2008. **20**(1): p. 1-9.

表1 各種刺激によりクラススイッチ組み換えに必須となる因子が誘導される

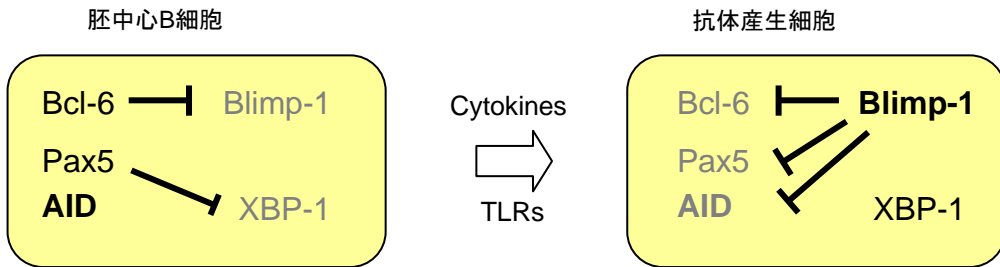
	αCD38 のみ	αCD38 +IL-5	αCD38 +IL-4	αCD38 +8-SGuo	αCD38 +IL-4 +8-SGuo	αCD40 のみ	αCD40 +IL-4
細胞増殖	○	○	○	○	○	○	○
アクセシビリティ上昇	○	○	○	○	○	×	○
AID発現	×	○	×	○	○	○	○
DNA組み換え (DNA切断、DNA修復)	×	○	×	○	○	×	○
スイッチサークル切り出し	×	○	×	×	○	×	○
IgG1産生	×	○	×	×	○	×	○

”○” は刺激により誘導されるもの、”×”は誘導されないものを表す。

A



B



C

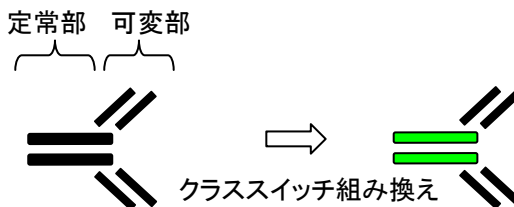


図1 B細胞は骨髄において分化し、外来抗原の認識によりクラススイッチ組み換えを経て抗体産生細胞へと分化する

A. B細胞は骨髄において分化し、脾臓において最終分化を遂げる

B細胞は骨髄で造血幹細胞から分化した後、脾臓などの2次リンパ組織に移行する。外来抗原を認識すると胚中心においてクラススイッチ組み換え、体細胞高頻度突然変異が惹起され抗体産生細胞へと最終分化を遂げる。

B. 胚中心B細胞、抗体産生細胞においては転写因子の発現が変化している

胚中心B細胞においては転写因子Bcl-6などがBlimp-1の発現を抑制しているが、クラススイッチ組み換えや体細胞高頻度突然変異が完了すると転写抑制因子Blimp-1が発現し抗体産生細胞へと分化する。

C. クラススイッチ組み換えは抗体の機能を変化させる

クラススイッチ組み換えは可変部を変化させず、定常部のみを組み替える仕組みである。

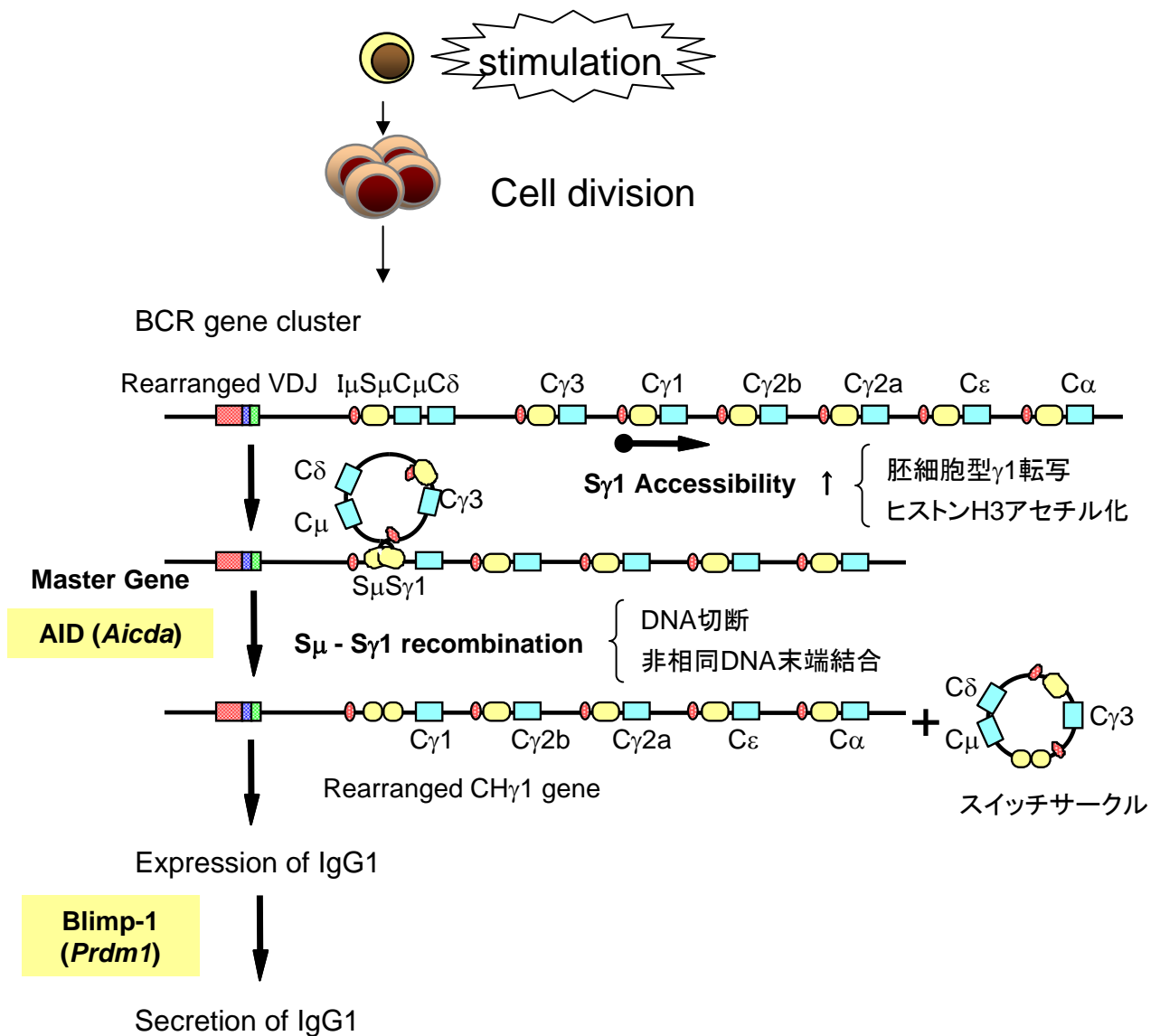


図2 クラススイッチ組み換えは段階的に進行する

IgG1へのクラススイッチ組み換えのメカニズムを示す。クラススイッチ組み換えは細胞分裂後、胚細胞型 $\gamma 1$ の転写及び $S\gamma 1$ 領域でのヒストンH3のアセチル化により $S\gamma 1$ 領域へのアクセシビリティが増大する。マスター遺伝子であるAIDが発現すると、DNA切断及び非相同DNA末端結合を伴う $S\mu - S\gamma 1$ 間でのゲノムDNA組み換えが誘導される。

組み換えが完了すると $S\mu - S\gamma 1$ 間はスイッチサークルとして切り出される。その後IgG1が細胞表面上に発現し、Blimp-1の発現により更にIgG1の分泌が可能になる。

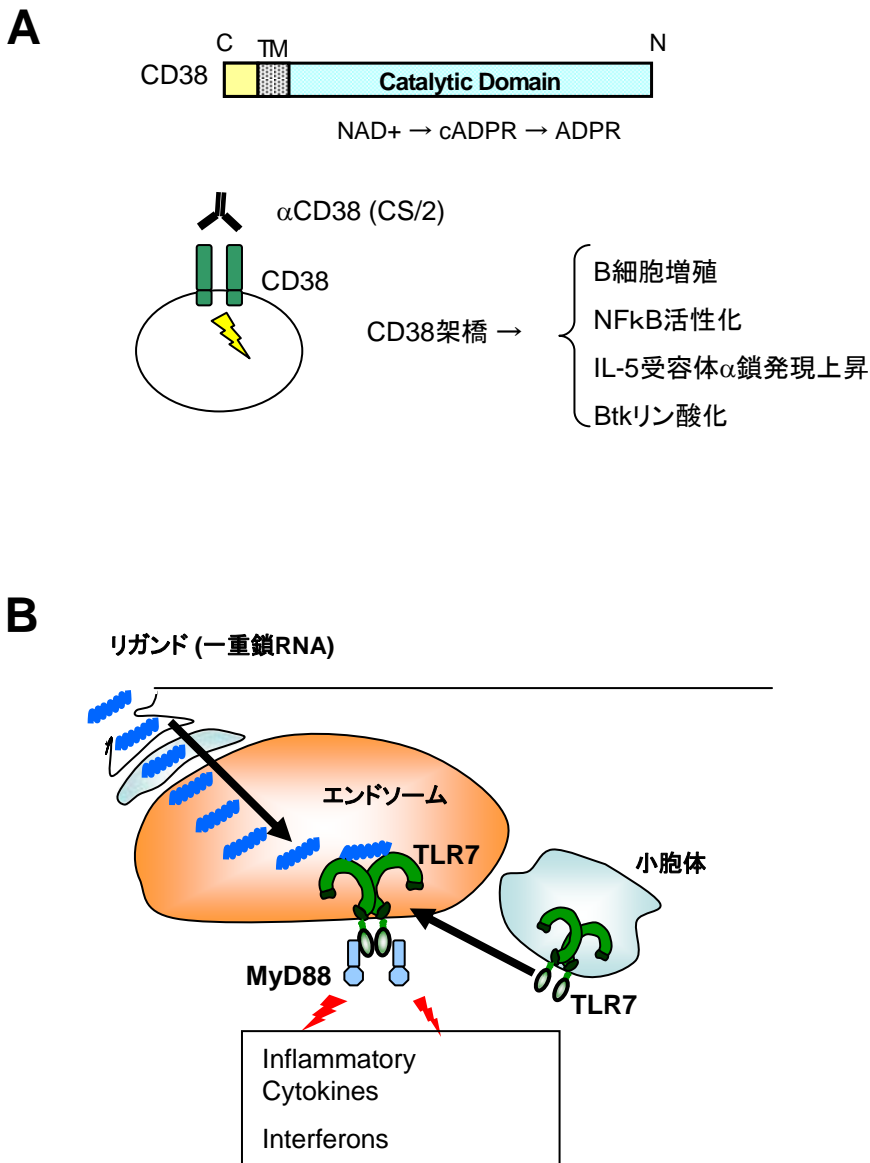


図3 CD38はB細胞の増殖などを誘導し、TLR7は炎症性サイトカイン、インターフェロンなどの発現を誘導する

A. CD38はB細胞の増殖などを誘導する

CD38は2型の膜蛋白質でありADPリボシルシクラーゼ活性を持つ(上段)。B細胞表面に発現しているCD38を αCD38 により架橋すると、B細胞の増殖、 $\text{NF}\kappa\text{B}$ の活性化、IL-5受容体 α 鎖の発現、Btkのリン酸化などの反応が見られる(下段)。

B. TLR7は炎症性サイトカインやインターフェロンの発現を誘導する

TLR7は細胞内のエンドソーム中でリガンドを認識し、MyD88を介してシグナルを伝達する。マクロファージ、樹状細胞などでTLR7が活性化された場合には炎症性サイトカインやI型インターフェロンが産生される。

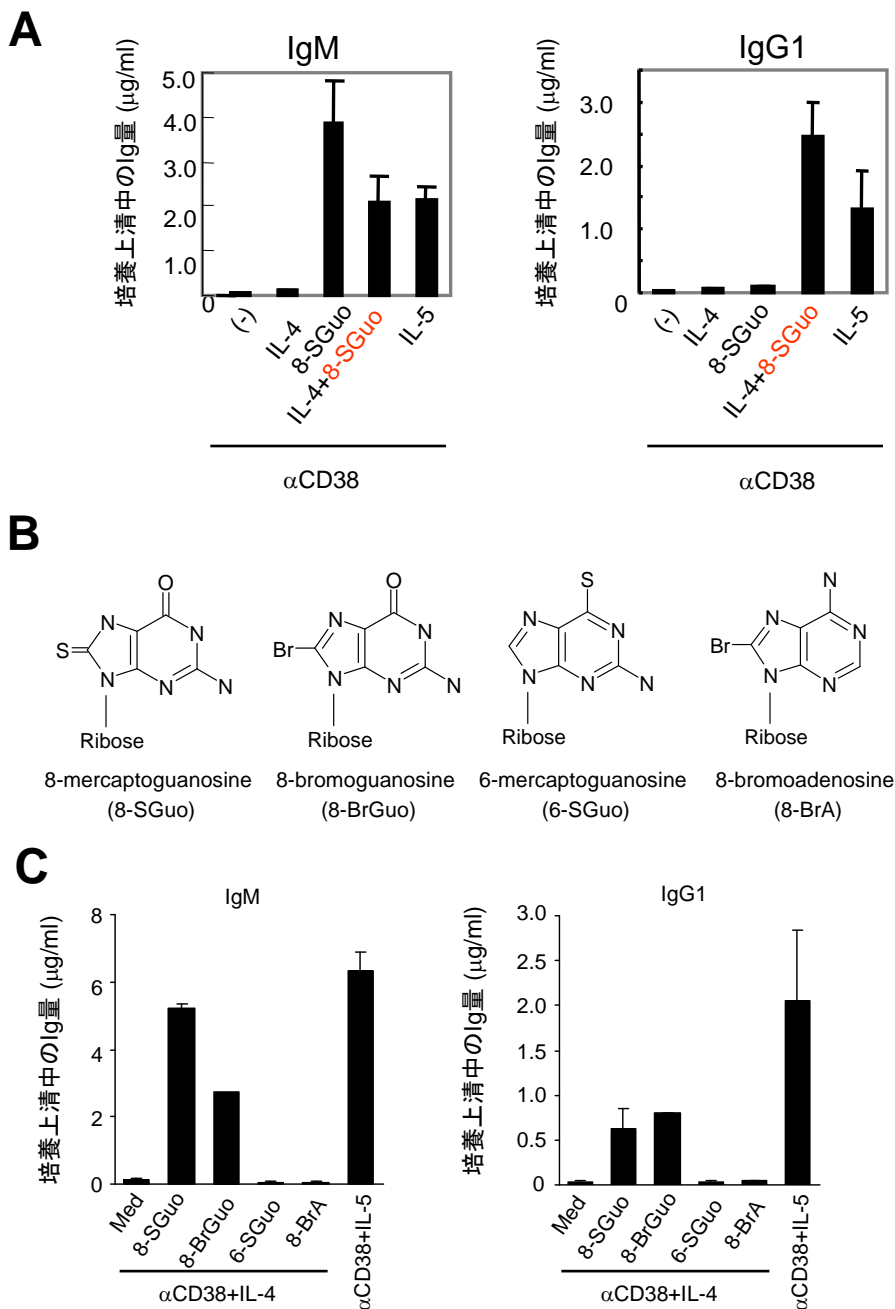


図4 グアノシンの8位置換体はIgG1産生を誘導する

A. 抗CD38抗体、IL-4、8-SGuoの共刺激によりIgG1産生を誘導する

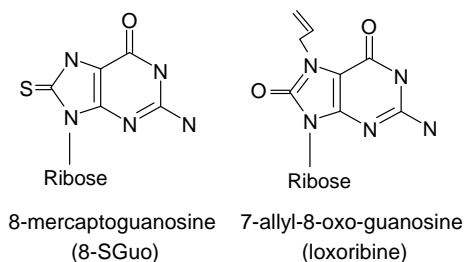
野生型マウス脾臓B細胞をαCD38 (1 μg/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), IL-5 (100 U/ml)及びそれらの組み合わせにより刺激し7日間培養後、細胞数 1×10^5 個あたりの上清中のIgM、IgG1濃度をELISA法により測定した。

B. 8-メルカプトグアノシン、8-ブロモグアノシン、6-メルカプトグアノシン、8-ブロモアデノシンの構造を示す

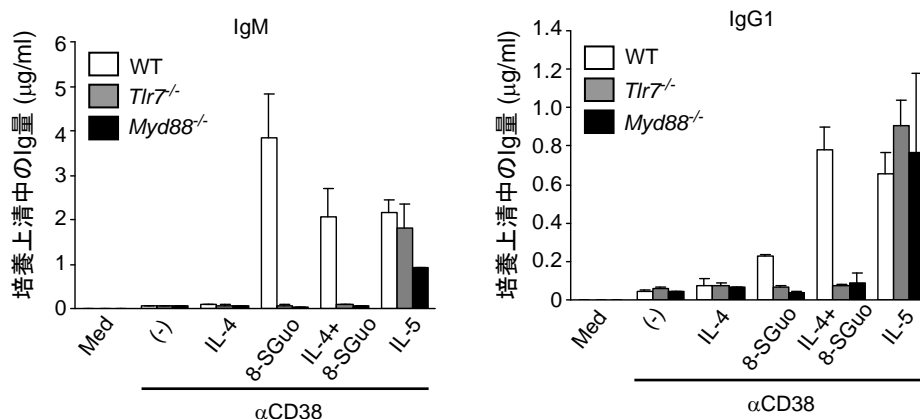
C. 8-BrGuoも抗CD38抗体、IL-4との共刺激によりIgG1産生を誘導する

野生型マウス脾臓B細胞をαCD38 (1 μg/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), 8-BrGuo (0.1 mM), 6-SGuo (0.1 mM), 8-BrA (0.1 mM), IL-5 (100 U/ml)及びそれらの組み合わせにより刺激し7日間培養後、細胞数 1×10^5 個あたりの上清中のIgM、IgG1濃度をELISA法により測定した。

A



B



C

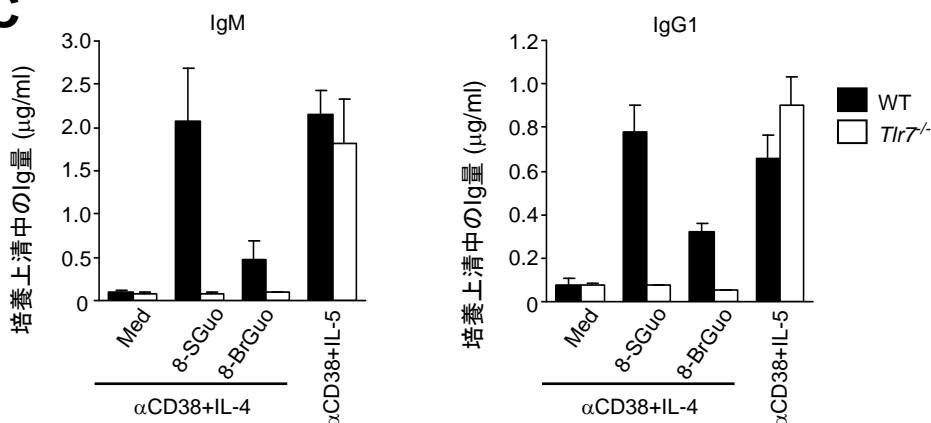


図5 8-SGuo、8-BrGuoはTLR7を介してシグナルを伝達する

A. 8-メルカプトグアノシン、7-アリル-8-オキソグアノシン(ロキソリビン)の構造を示す

B. 8-SGuoはTLR7、MyD88を介してIgG1産生を誘導する

野生型マウス(白バー)、MyD88ノックアウトマウス(灰色バー)、TLR7ノックアウトマウス(黒バー)の脾臓B細胞をαCD38 (1 mg/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), IL-5 (100 U/ml)及びそれらの組み合わせにより刺激し7日間培養後、細胞数 1×10^5 個あたりの上清中のIgM、IgG1濃度をELISA法により測定した。MyD88、TLR7ノックアウトマウスでは8-SGuoによるIgG1産生が見られなかった。

C. 8-BrGuoはMyD88を介してIgG1産生を誘導する

野生型マウス(黒バー)、TLR7ノックアウトマウス(白バー)脾臓B細胞をαCD38 (1 μg/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), 8-BrGuo (0.1 mM) IL-5 (100 U/ml)及びそれらの組み合わせにより刺激し7日間培養後、細胞数 1×10^5 個あたりの上清中のIgM、IgG1濃度をELISA法により測定した。MyD88ノックアウトマウスでは8-BrGuoによるIgG1産生が見られなかった。

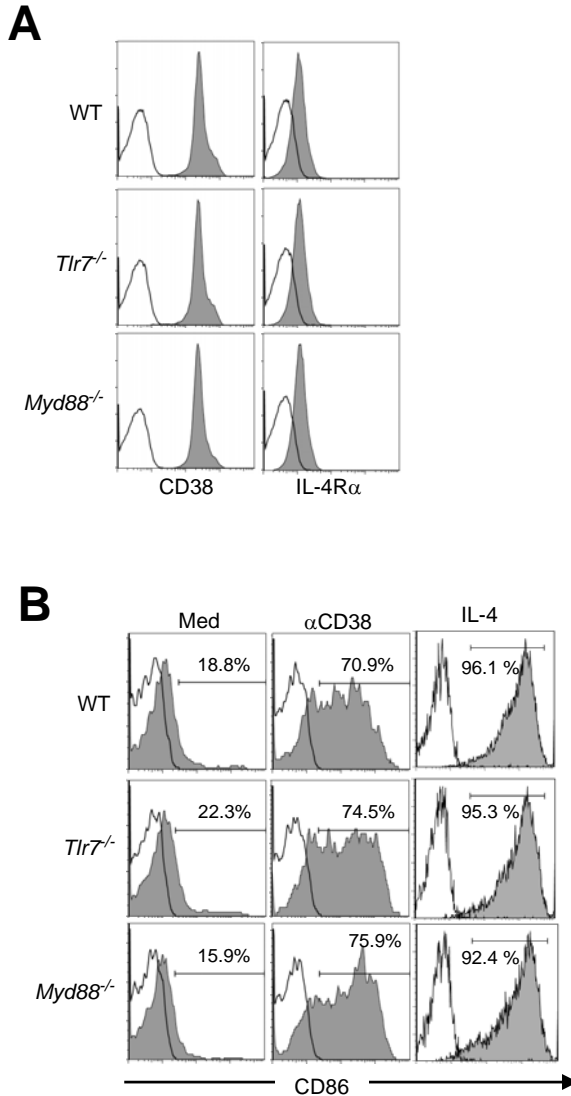


図6 CD38、IL-4受容体の発現量はTLR7ノックアウトマウスにおいても野生型マウスと同等に発現しており、 α CD38やIL-4刺激も野生型マウスと同等にTLR7ノックアウトマウスB細胞のCD86発現を誘導する

- A. 野生型マウス、各ノックアウトマウスにおけるCD38、IL-4受容体発現量に差は見られない
- 野生型マウス、TLR7ノックアウトマウス、MyD88ノックアウトマウスの脾臓B細胞におけるCD38、IL-4受容体 α 鎖の発現をFACSにより解析した。各ノックアウトマウスと野生型マウスで発現量に差は見られなかった。白いヒストグラムはアイソタイプコントロール、灰色のヒストグラムは α CD38、 α IL-4R α により染色した結果を示す。
- B. 野生型マウス、各ノックアウトマウスにおける α CD38、IL-4によるCD86発現誘導に差は見られない

野生型マウス、TLR7ノックアウトマウス、MyD88ノックアウトマウスの脾臓B細胞を α CD38 (1 mg/ml)、IL-4 (25 ng/ml) により刺激し24時間培養後、細胞表面上のCD86発現をFACSにより解析した。白いヒストグラムはアイソタイプコントロール、灰色のヒストグラムは α CD86による染色の結果を示す。各ノックアウトマウスと野生型マウスでCD86発現誘導に差は見られなかった。白いヒストグラムはアイソタイプコントロール、灰色のヒストグラムは α CD86により染色した結果を示す。

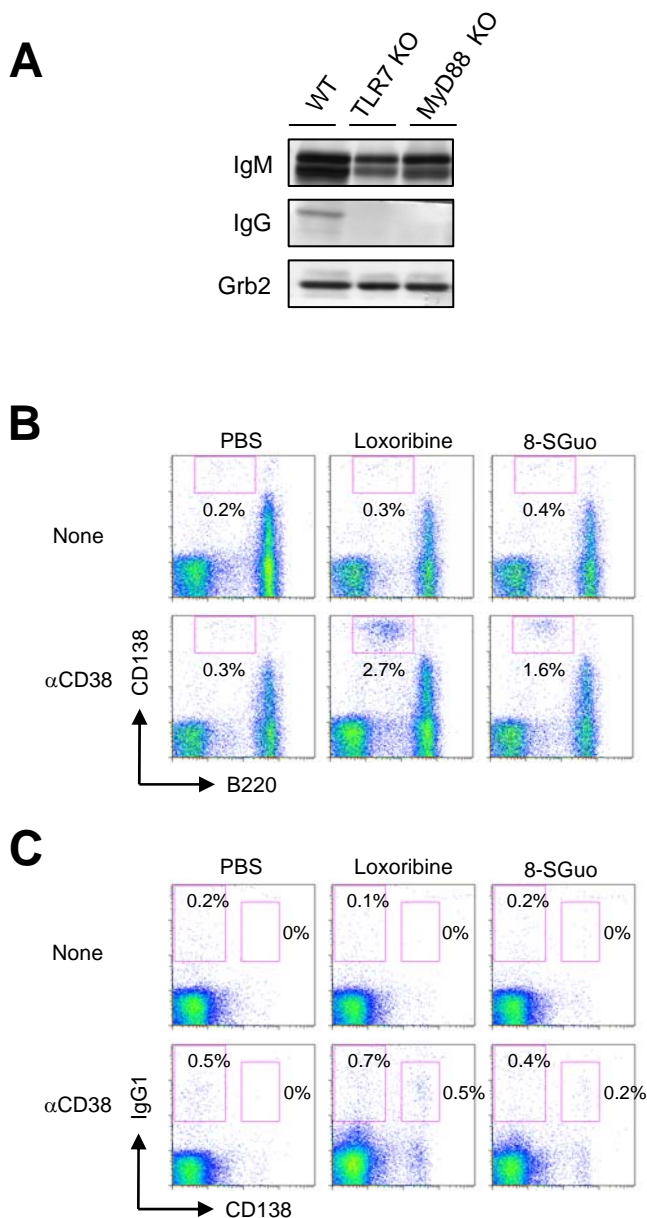


図7 αCD38及びTLR7リガンド刺激は生体内においてもCD138陽性細胞への分化を誘導する

A. TLR7、MyD88ノックアウトマウス脾臓においては、野生型マウスにおいて発現しているIgG1が検出されない

野生型マウス(18週齢)、TLR7 KO (17週齢)、MyD88 KO (16週齢)の脾臓細胞を溶解し、抗IgM抗体、抗IgG抗体によりウェスタンブロッティングを行った。ローディングコントロールとしてGrb2をプロットした。野生型ではIgG1が検出されたが、各ノックアウトマウスでは検出されなかった。

B., C. αCD38、TLR7リガンドは生体内においてもCD138陽性細胞への分化を誘導する

野生型マウス腹腔にαCD38 (1 mg), 8-SGuo (500 μg), lox (500 μg)を腹腔注射し、一週間後、マウス脾臓B細胞表面に発現したB220、CD138 (B) 及びIgG1 (C)の割合をFACSにより解析した。B220+CD138+、CD138+IgG1+、CD138-IgG1+の細胞の割合を枠内に示した。αCD38およびLoxの刺激によりCD138陽性細胞、IgG1陽性細胞への分化が見られた。

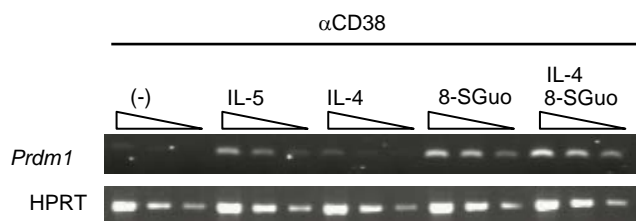


図8 α CD38及び8-SGuoの共刺激は*Prdm1*発現を惹起する

野生型マウスから精製した脾臓B細胞を抗CD38抗体 (1 μ g/ml)、IL-5 (100 U/ml)、IL-4 (25 ng/ml)、8-SGuo (0.1 mM)により刺激し、72時間後に細胞を回収、RT-PCRにより*Prdm1*の発現を検出した。 α CD38、8-Sguoの共刺激により α CD38、IL-5の共刺激と同様に*Prdm1*発現が確認された。サンプルは4倍ずつの希釈系列を取った。

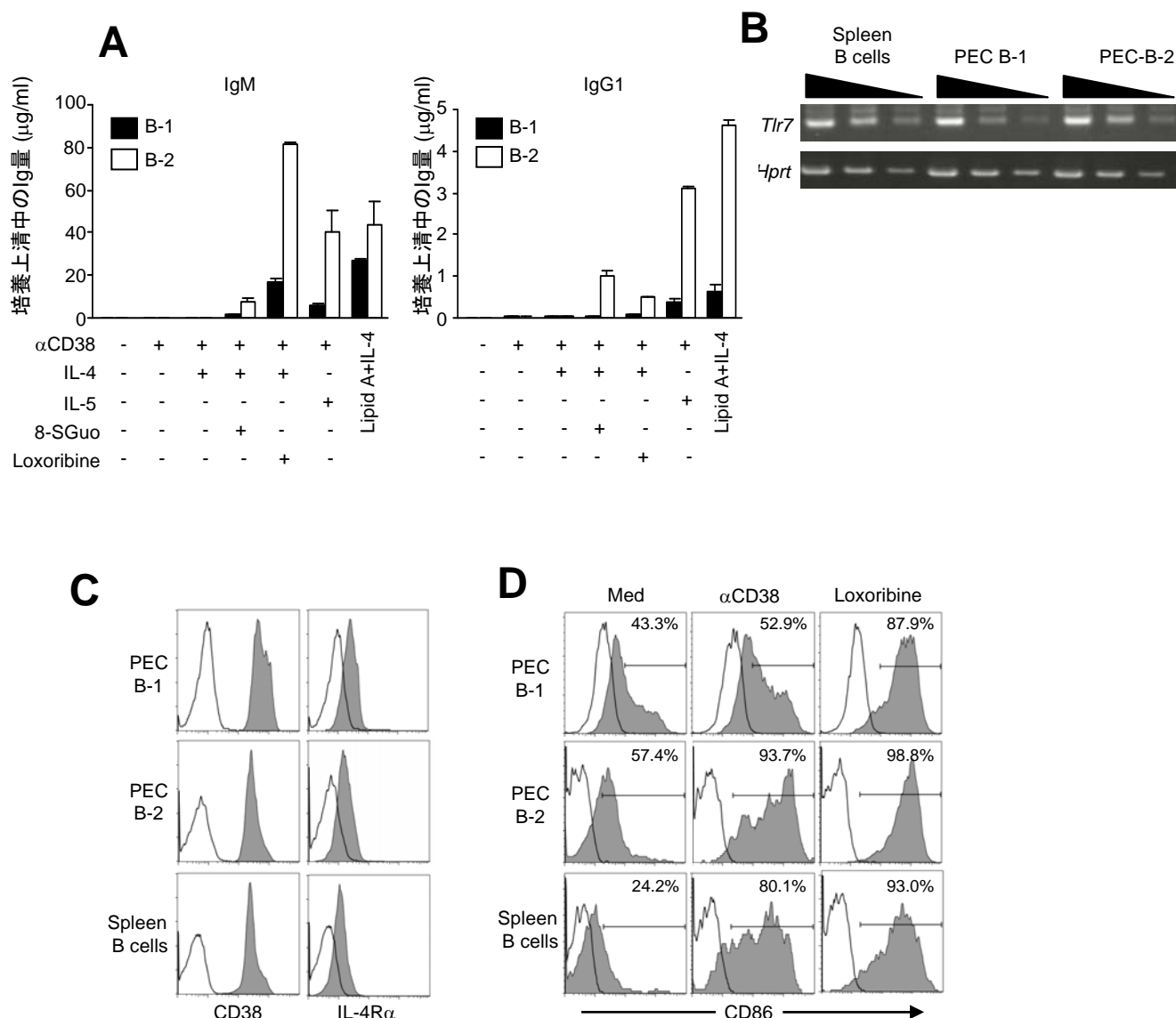


図9 腹腔B-1細胞はαCD38、IL-4、8-SGuo刺激でもIgG1を産生しない

A. αCD38、IL-4、8-SGuoによる刺激は腹腔B-1細胞のIgG1産生を誘導しない

野生型マウス腹腔から精製したB-1、B-2細胞をαCD38 (1 mg/ml), IL-5 (100 U/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), ロキシリビン (0.1 mM), Lipid A (1 mg/ml)及びそれらの組み合わせにより刺激し、7日後に細胞数 1×10^5 個あたりの培養上清中のIgM、IgG1をELISA法により測定した。

B. 腹腔B-1、B-2細胞および脾臓B細胞に発現しているTLR7の量に差は見られない

TLR7の発現量をRT-PCR法により解析した。4倍ずつの希釈系列をとった。

C. 腹腔B-1、B-2、及び脾臓B細胞表面上に発現しているCD38、IL-4受容体量に差は見られない

腹腔B-1、B-2細胞、脾臓B細胞の表面上に発現しているCD38、IL-4受容体量をFACSにより解析した。白いヒストグラムはアイソタイプコントロール、灰色のヒストグラムはαCD38、αIL-4Rαにより染色した結果を示す。

D. αCD38による腹腔B-1細胞の活性化は腹腔B-2細胞、脾臓B細胞と比較してやや低い

腹腔B-1、B-2、及び脾臓B細胞をαCD38 (1 µg/ml), ロキシリビン (0.1 mM)により刺激し24時間培養後のCD86発現量をFACSにより解析した。白いヒストグラムはアイソタイプコントロール、灰色のヒストグラムはαCD86により染色した結果を示す。

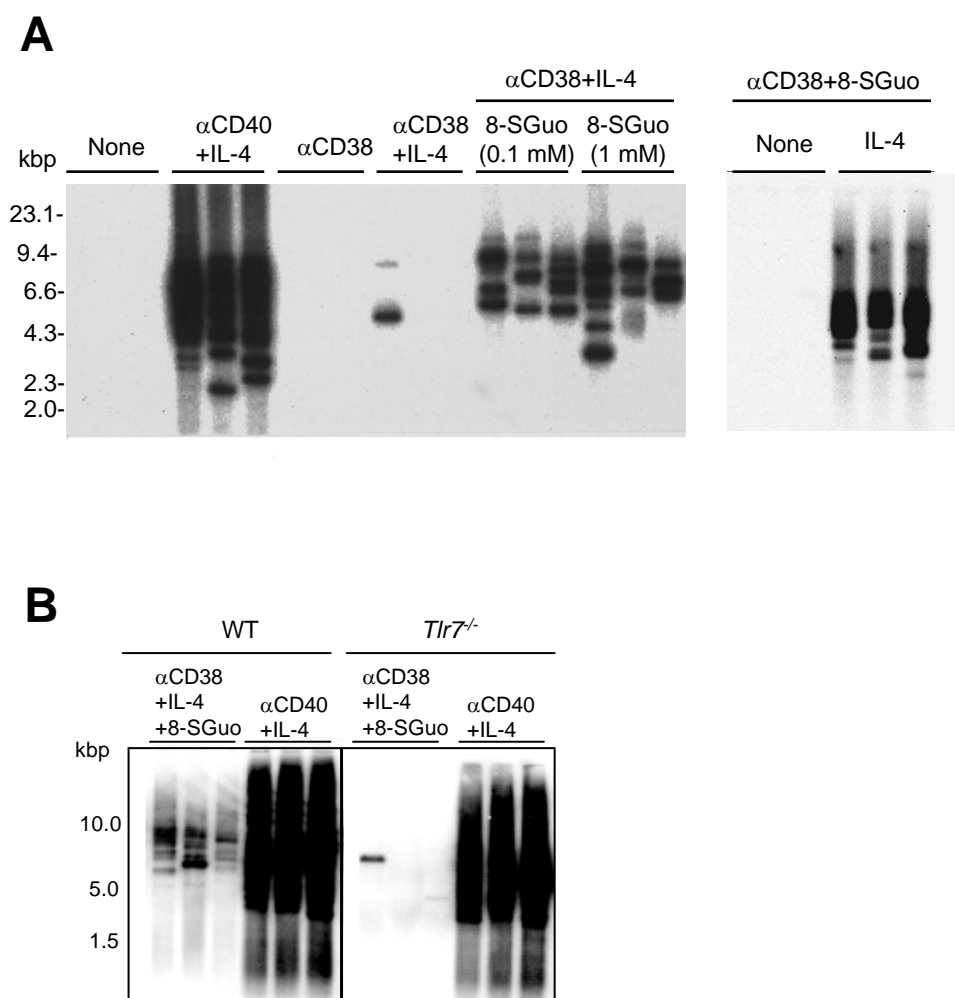


図10 α CD38、IL-4、8-SGuoの共刺激はスイッチサークルの検出を可能にする

- A. α CD38、IL-4、8-SGuoにより共刺激したB細胞においてはスイッチサークルが検出される
マウス脾臓B細胞を α CD38 (1 μ g/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM, 1 mM), α CD40 (1 μ g/ml)及びそれらの組み合わせにより刺激し、72時間後に細胞を回収、DNAを精製しスイッチサークルを検出した。 α CD38、IL-4、8-SGuoの共刺激ではスイッチサークルが検出されたが、 α CD38およびIL-4、もしくは α CD38および8-SGuoの共刺激ではスイッチサークルが検出されなかった。

- B. α CD38、IL-4、および8-SGuoの共刺激によるスイッチサークルの誘導はTLR7を介して行われる

野生型マウスとTLR7ノックアウトマウスの脾臓B細胞を用い、 α CD38 (1 mg/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM, 1 mM), α CD40 (1 mg/ml)及びそれらの組み合わせにより刺激し、72時間後に細胞を回収、DNAを精製しスイッチサークルを検出した。TLR7ノックアウトマウスでは α CD38、IL-4、8-SGuoによる共刺激によるスイッチサークルが検出されなかった。

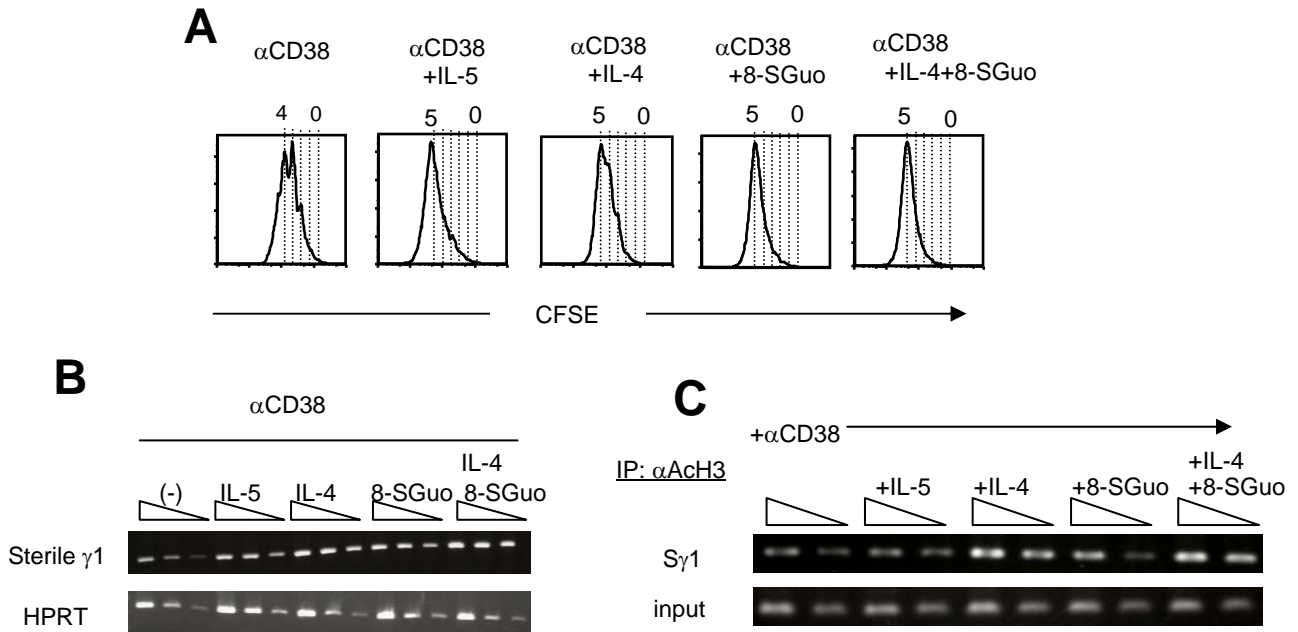


図11 αCD38及びIL-4、もしくは8-SGuoによる共刺激は細胞分裂、胚細胞型γ1転写、ヒストンH3アセチル化を誘導する

- A. αCD38、IL-4による共刺激、αCD38、8-SGuoによる共刺激はαCD38、IL-4、8-SGuoによる共刺激と同程度の細胞増殖を誘導する

野生型マウス脾臓B細胞をCFSEにより染色後、αCD38 (1 μg/ml), IL-5 (100 U/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), 及びそれらの組み合わせにより刺激し、72時間後に細胞を回収、細胞内のCFSE濃度をFACSにより測定し細胞分裂回数を解析した。上部の数字は分裂回数を示す。αCD38およびIL-4のみ、もしくは8-SGuoのみの共刺激はαCD38、IL-4、8-SGuoによる共刺激と同程度の細胞分裂を誘導した。

- B. αCD38、IL-4による共刺激、αCD38、8-SGuoによる共刺激はαCD38、IL-4、8-SGuoによる共刺激と同程度の胚細胞型γ1転写を誘導する

野生型マウス脾臓B細胞を αCD38 (1 mg/ml), IL-5 (100 U/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), 及びそれらの組み合わせにより刺激し、48時間後に細胞を回収、cDNAを合成し胚細胞型γ1の転写を検出した。αCD38およびIL-4のみ、もしくは8-SGuoのみの共刺激はαCD38、IL-4、8-SGuoによる共刺激と同程度の胚細胞型γ1転写を誘導した。

- C. αCD38、IL-4による共刺激、αCD38、8-SGuoによる共刺激はαCD38、IL-4、8-SGuoによる共刺激と同程度のヒストンH3アセチル化を誘導する

野生型マウス脾臓B細胞を αCD38 (1 mg/ml), IL-5 (100 U/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), 及びそれらの組み合わせにより刺激し、48時間後に細胞を回収、cDNAを合成し胚細胞型γ1の転写を検出した。αCD38およびIL-4のみ、もしくは8-SGuoのみの共刺激はαCD38、IL-4、8-SGuoによる共刺激と同程度のヒストンH3アセチル化を誘導した。

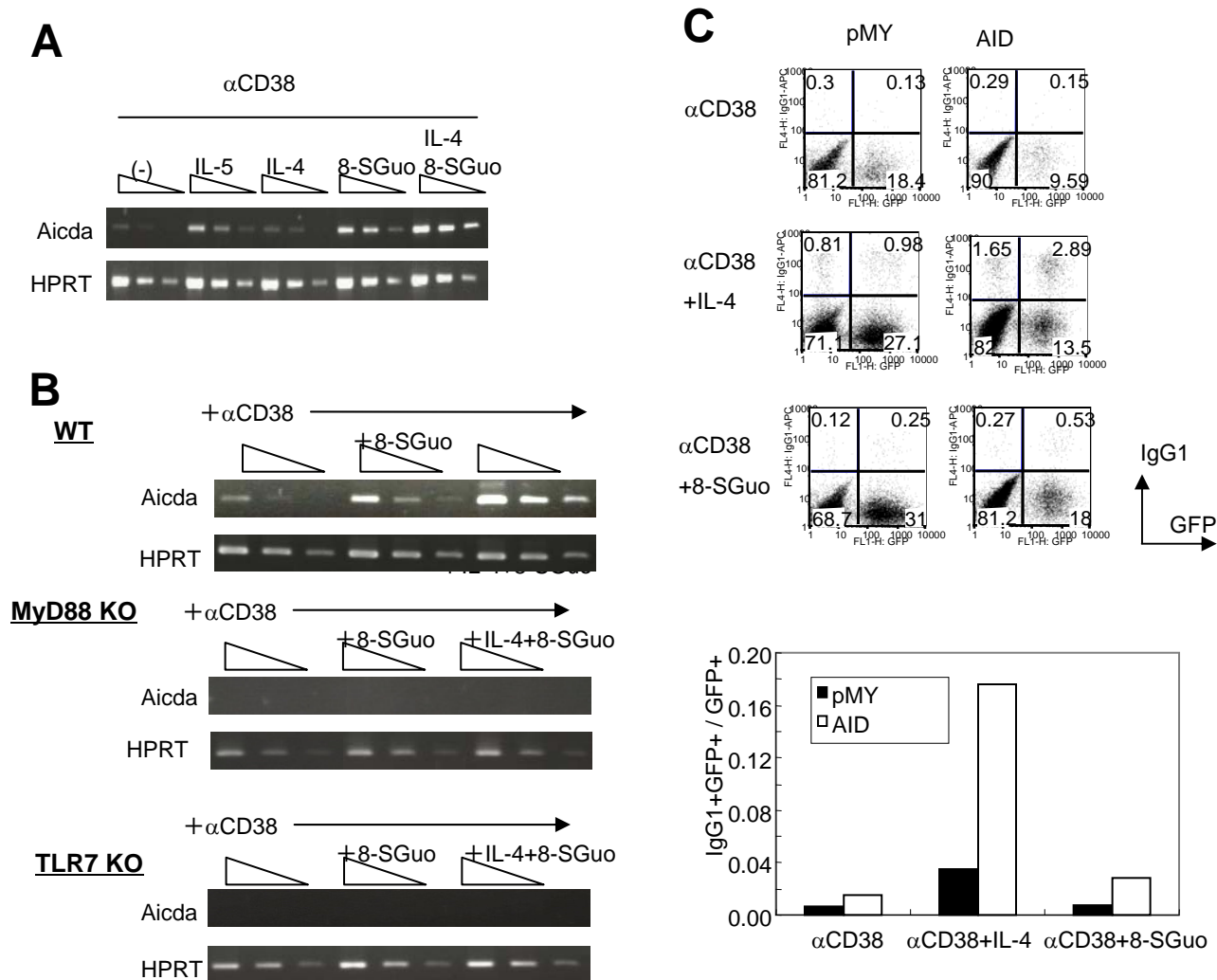


図12 αCD38及びIL-4の共刺激ではAID発現が惹起されないためクラススイッチ組み換えが欠損する

A. αCD38およびIL-4の共刺激ではAID発現が検出されない

野生型マウス脾臓B細胞をαCD38 (1 μg/ml), IL-5 (100 U/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), 及びそれらの組み合わせにより刺激し、72時間後に細胞を回収、cDNAを合成しRT-PCRによりAIDの発現を解析した。αCD38およびIL-4の共刺激ではAIDの発現が検出されなかった。

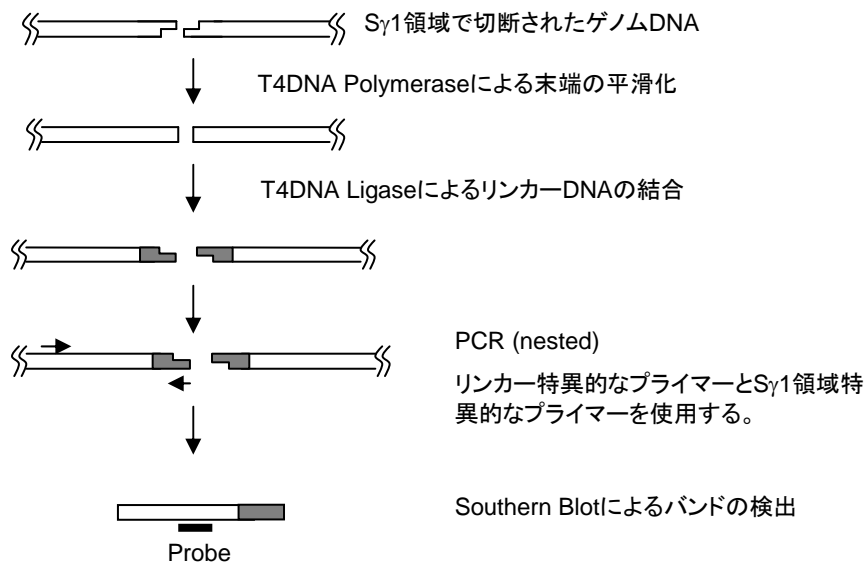
B. 8-SGuoによるAID発現はTLR7、MyD88を介して行われる

野生型マウス、MyD88ノックアウトマウス、TLR7ノックアウトマウスの脾臓B細胞をαCD38 (1 mg/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), 及びそれらの組み合わせにより刺激し、72時間後に細胞を回収、cDNAを合成しRT-PCRによりAIDの発現を解析した。各ノックアウトマウスでは8-SGuoによるAID発現が見られなかった。

C. AID強制発現によりαCD38、IL-4刺激B細胞にIgG1へのクラススイッチを誘導できる

野生型マウス脾臓B細胞にAID-IRES-GFPを強制発現させ、αCD38 (1 mg/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), 及びそれらの組み合わせにより刺激後48時間後の細胞表面のIgG1量をFACSにより解析した(上段)。GFP+の細胞におけるIgG1+GFP+の細胞の割合を下段の図に示した。AIDの発現によりαCD38およびIL-4刺激B細胞にクラススイッチを誘導が見られた。

A



B

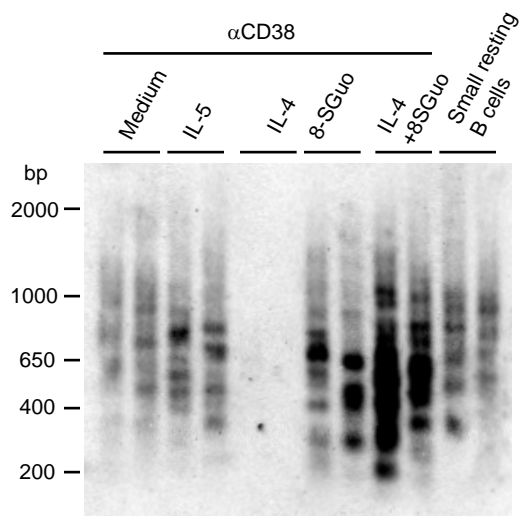


図13 αCD38及び8-SGuoの共刺激はS γ 1領域のDNA切断を誘導する

A. LM-PCRの原理を示す

B. αCD38および8-SGuoの共刺激においてもS γ 1領域でのDNA切断が検出される

野生型マウス、の脾臓B細胞を αCD38 (1 mg/ml), IL-5 (100 U/ml), IL-4 (25 ng/ml), 8-SGuo (0.1 mM), 及びそれらの組み合わせにより刺激し、72時間後に細胞を回収、ゲノムDNAを合成しLM-PCRによりS γ 1 領域でのDNA切断に関して解析を行った。αCD38および8-SGuoの共刺激においては無刺激時と比較してバンドが濃くなり、S γ 1領域でのDNA切断が検出された。

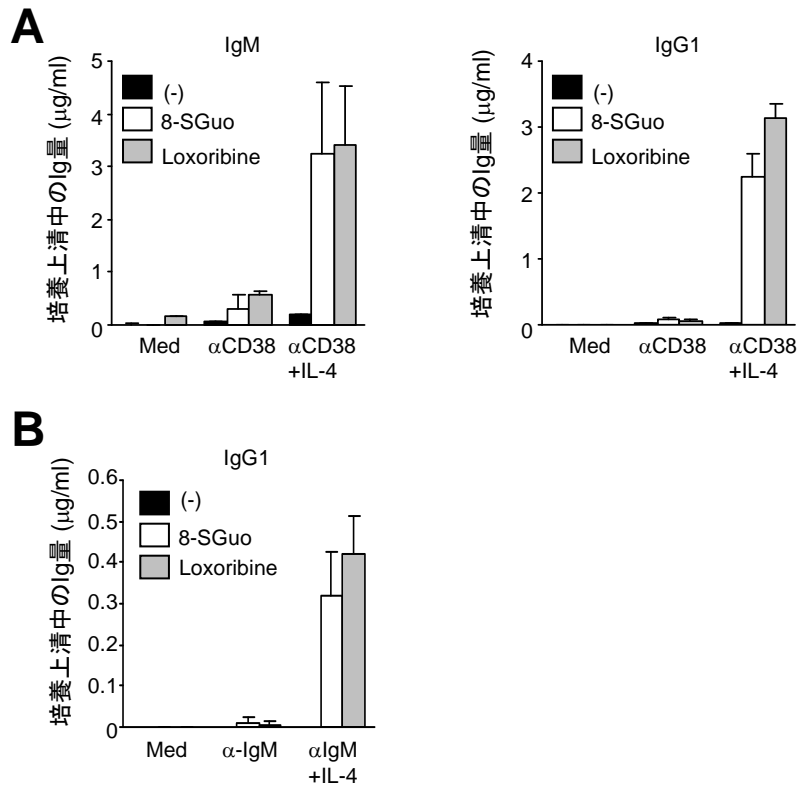


図14 LoxはIgG1産生を誘導する

A. αCD38、IL-4、Loxの共刺激はIgG1の産生を誘導する

野生型マウスの脾臓B細胞をαCD38 (1 μg/ml), Lox (0.1 mM), 8-SGuo (0.1 mM) により刺激7日後に培養上清を回収、細胞数 1×10^5 個あたりのIgM、IgG1の産生量を測定した。Lox刺激も8-SGuo刺激同様IgG1産生細胞への分化を誘導した。

B. αIgM、IL-4、Loxの共刺激はIgG1の産生を誘導する

野生型マウスの脾臓B細胞をαIgM (1 μg/ml), Lox (0.1 mM), 8-SGuo (0.1 mM) により刺激7日後に培養上清を回収、細胞数 1×10^5 個あたりのIgG1の産生量を測定した。Lox刺激も8-SGuo刺激同様IgG1産生細胞への分化を誘導した。

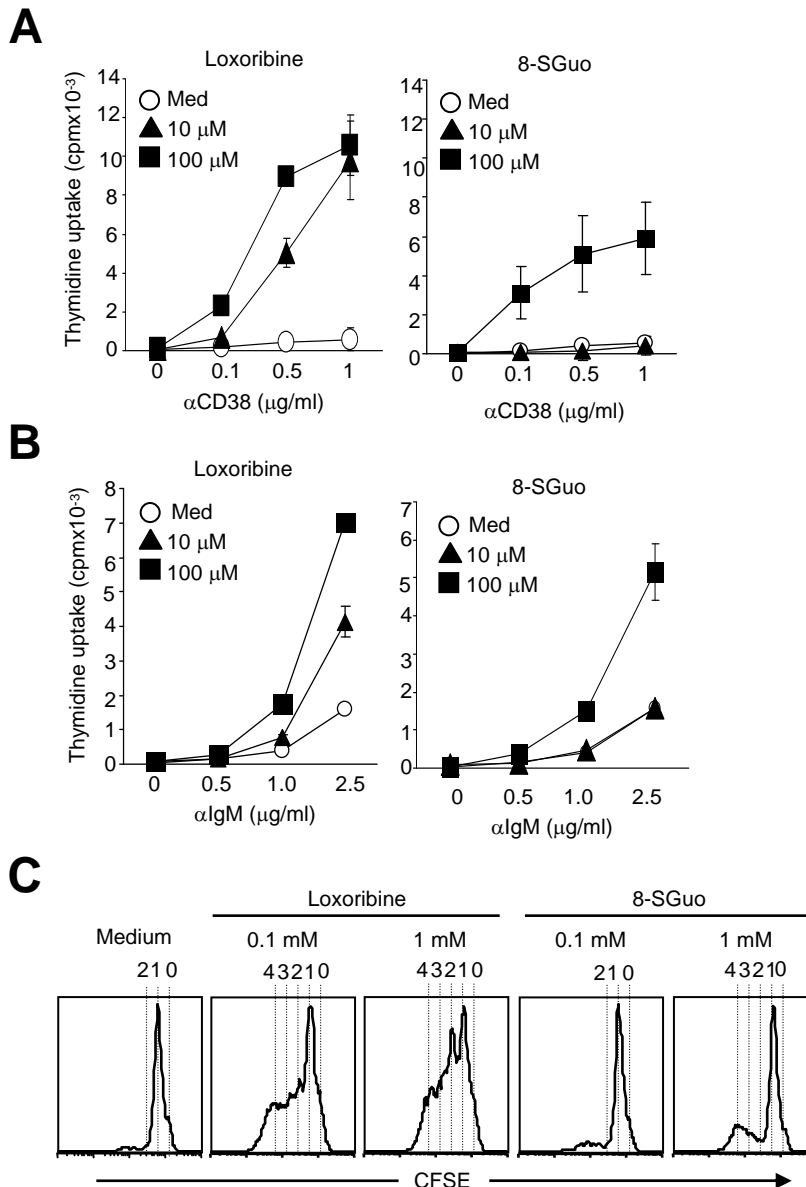


図15 Loxは8-SGuoよりも強くB細胞増殖を誘導する

A. α CD38刺激下ではLox刺激が8-SGuoよりも強くB細胞増殖を誘導する

野生型マウスの脾臓B細胞を α CD38, Lox, 8-SGuoにより刺激し72時間後に細胞を回収、細胞数 1×10^5 個辺りの $[3H]$ -チミジンの取り込みを測定し細胞増殖を解析した。刺激濃度は図中に示した。同一濃度の刺激ではLoxの方が8-SGuoよりも強く細胞増殖を誘導した。

B. α IgM刺激下ではLox刺激が8-SGuoよりも強くB細胞増殖を誘導する

野生型マウスの脾臓B細胞を α CD38, Lox, 8-SGuoにより刺激し72時間後に細胞を回収、細胞数 1×10^5 個辺りの $[3H]$ -チミジンの取り込みを測定し細胞増殖を解析した。刺激濃度は図中に示した。同一濃度の刺激ではLoxの方が8-SGuoよりも強く細胞増殖を誘導した。

C. 単独刺激において、Loxは8-SGuoよりも強く細胞分裂を誘導する

野生型マウスの脾臓B細胞をCFSE染色後 Lox, 8-SGuoにより刺激し72時間後に細胞を回収、CFSE濃度をFACSにより測定し細胞分裂回数を解析した。刺激濃度、細胞分裂回数は図中に示した。Loxの方が8-SGuoよりも強く細胞増殖を誘導した。

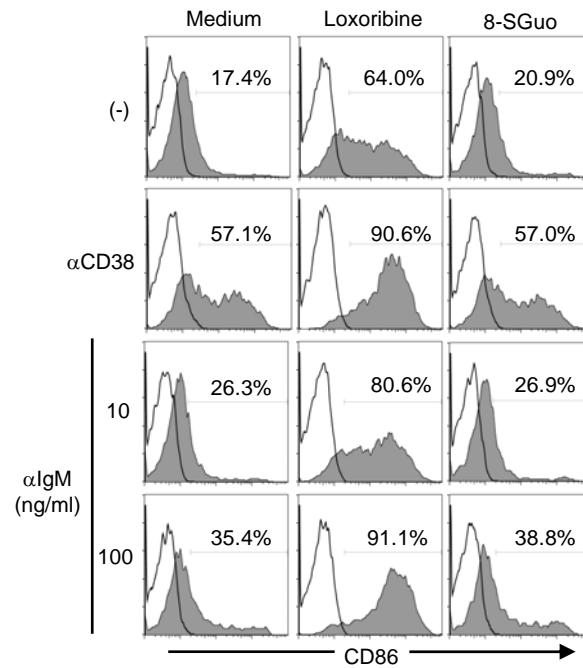


図16 8-SGuoはCD86の発現増強を誘導しない

野生型マウスの脾臓B細胞をLox (0.1 mM)、8-SGuo (0.1 mM)により刺激し72時間後に細胞を回収、細胞表面上のCD86の発現をFACSにより解析した。LoxはCD86の発現上昇を誘導したが、8-SGuoによるCD86の発現上昇は見られなかった。白いヒストグラムはアイソタイプコントロール、灰色のヒストグラムは α CD86により染色した結果を示す。

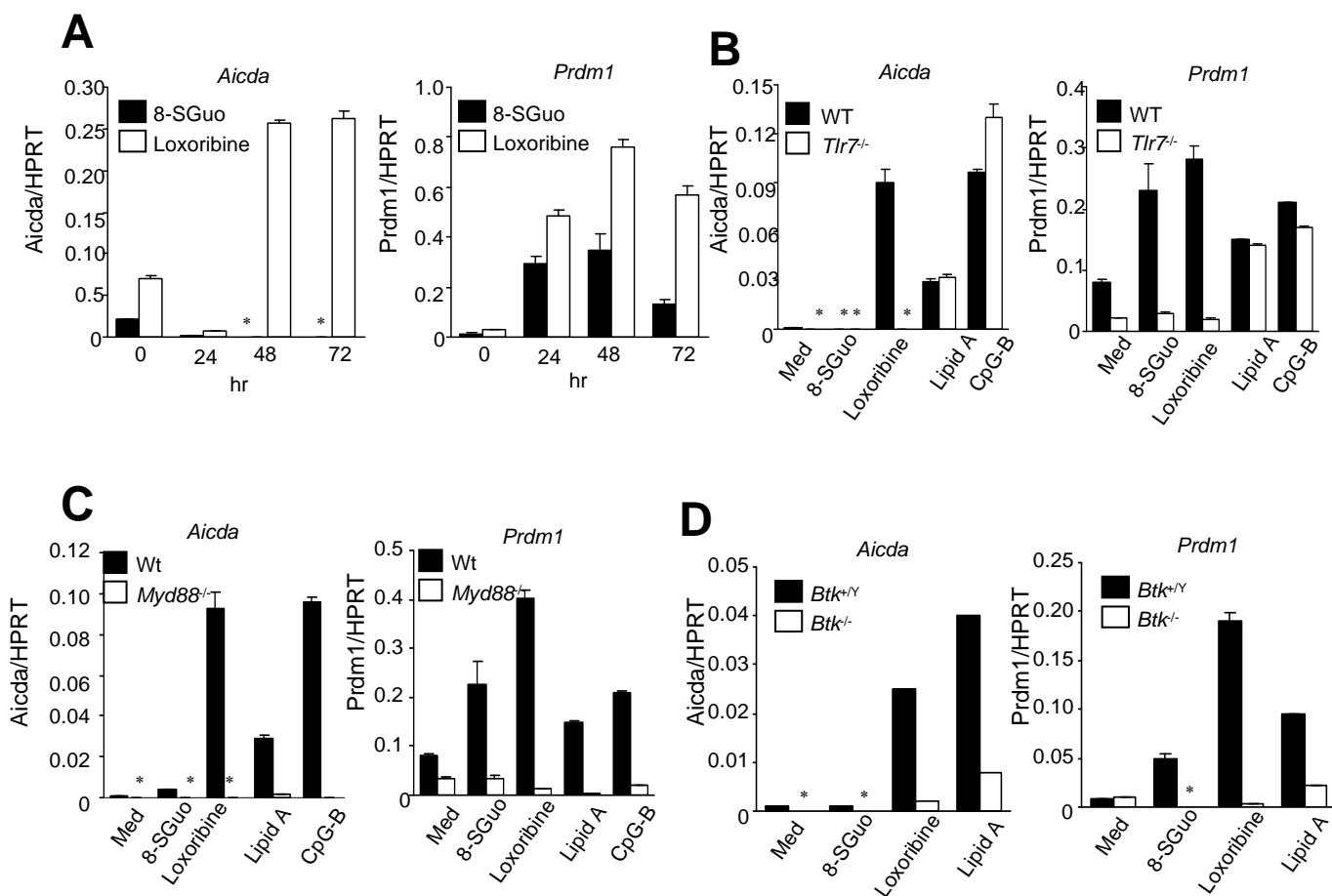


図17 8-SGuoは*Prdm1*の発現を惹起する

A. Loxは*Aicda*、*Prdm1*発現を誘導するが8-SGuoは*Prdm1*刺激のみ誘導する

野生型マウスの脾臓B細胞をLox (0.1 mM)、8-SGuo (0.1 mM)により刺激し24時間後、48時間後、72時間後に細胞を回収、*Aicda*、*Prdm1*の発現をリアルタイムPCRにより解析した。Loxは*Aicda*、*Prdm1*発現を誘導したが8-SGuoは*Prdm1*刺激のみ誘導した。

B. 8-SGuo、Loxによる遺伝子発現はTLR7を介して行われる

野生型マウス、TLR7ノックアウトマウスの脾臓B細胞をLox (0.1 mM)、8-SGuo (0.1 mM)、Lipid A (1 µg/ml)、CpG-B (100 nM)により刺激し72時間培養後細胞を回収、cDNAを合成し*Aicda*、*Prdm1*の発現をリアルタイムPCRにより解析した。ノックアウトマウスでは野生型マウスにおいて見られる*Aicda*、*Prdm1*発現が見られなかった。

C. 8-SGuo、Loxによる遺伝子発現はMyD88を介して行われる

野生型マウス、MyD88ノックアウトマウスの脾臓B細胞をLox (0.1 mM)、8-SGuo (0.1 mM)、Lipid A (1 µg/ml)、CpG-B (100 nM)により刺激し72時間培養後細胞を回収、cDNAを合成し*Aicda*、*Prdm1*の発現をリアルタイムPCRにより解析した。ノックアウトマウスでは野生型マウスにおいて見られる*Aicda*、*Prdm1*発現が見られなかった。

D. 8-SGuo、Loxによる遺伝子発現はBtkを介して行われる

野生型マウス、Btkノックアウトマウスの脾臓B細胞をLox (0.1 mM)、8-SGuo (0.1 mM)、Lipid A (1 mg/ml)により刺激し72時間培養後細胞を回収、cDNAを合成し*Aicda*、*Prdm1*の発現をリアルタイムPCRにより解析した。ノックアウトマウスでは野生型マウスにおいて見られる*Aicda*、*Prdm1*発現が見られなかった。

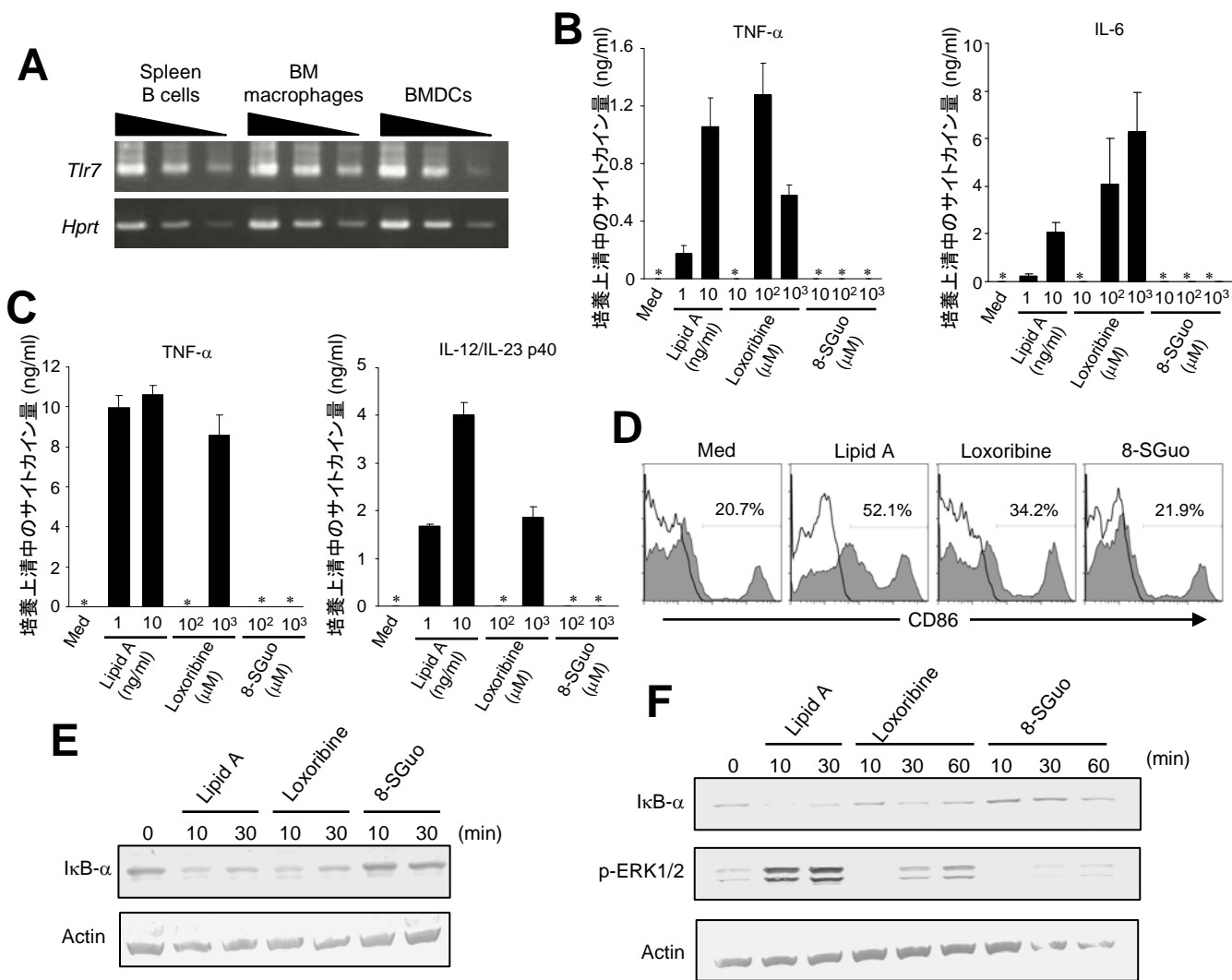


図18 8-SGuoはマクロファージ、樹状細胞を活性化しない

A. B細胞、樹状細胞、マクロファージにおけるTLR7発現量の比較

野生型マウスの脾臓B細胞、骨髄から樹立した樹状細胞、マクロファージに発現しているTLR7をRT-PCRにより解析した。

B. 8-SGuoはマクロファージのサイトカイン産生を誘導しない

野生型マウスの骨髄から樹立したマクロファージをLipid A、Lox、8-SGuoにより刺激し24時間培養後、培養上清中のTNF- α 、IL-6量をELISA法により測定した。

C. 8-SGuoは樹状細胞のサイトカイン産生を誘導しない

野生型マウスの骨髄から樹立した樹状細胞をLipid A、Lox、8-SGuoにより刺激し24時間培養後、培養上清中のTNF- α 、IL-12/IL-23p40量をELISA法により測定した。

D. 8-SGuoは樹状細胞のCD86発現上昇を誘導しない

野生型マウスの骨髄から樹立した樹状細胞をLipid A (1 μ g/ml)、Lox (0.1 mM)、8-SGuo (0.1 mM)により刺激し24時間培養後、細胞表面上に発現したCD86量をFACSIにより測定した。白いヒストグラムはアイソタイプコントロール、灰色のヒストグラムは α CD86により染色した結果を示す。

E. 8-SGuoはマクロファージのシグナル伝達経路を活性化しない

野生型マウスの骨髄から樹立したマクロファージをLipid A (1 μ g/ml)、Lox (0.1 mM)、8-SGuo (0.1 mM)により刺激し、*IkB- α* の分解をウェスタンブロットングにより解析した。

F. 8-SGuoは樹状細胞のシグナル伝達経路を活性化しない

野生型マウスの骨髄から樹立した樹状細胞をLipid A (1 mg/ml)、Lox (0.1 mM)、8-SGuo (0.1 mM)により刺激し、ERKのリン酸化をウェスタンブロットングにより解析した。

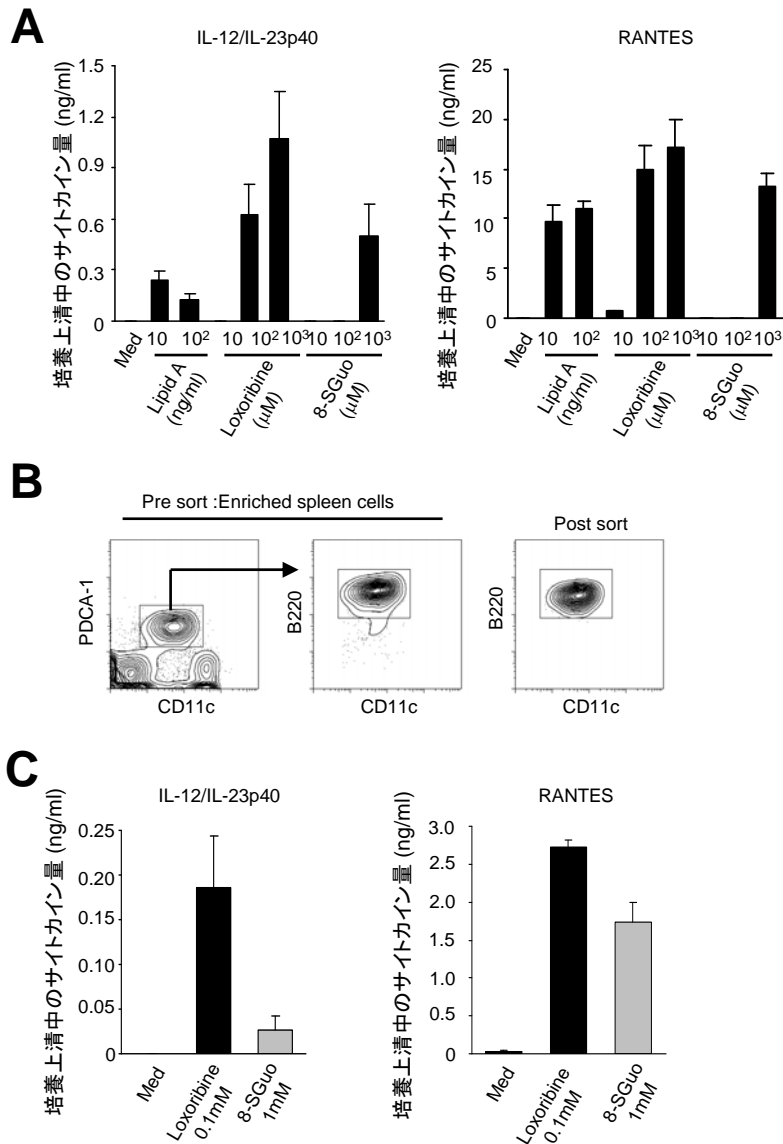


図19 8-SGuoはプラズマサイト樹状細胞においてはサイトカイン産生を誘導する

A. 8-SGuoはプラズマサイト樹状細胞のサイトカイン産生を誘導する

野生型マウスの骨髄から樹立したプラズマサイト樹状細胞をLipid A、Lox、8-SGuoにより刺激し24時間後、細胞数 1×10^5 個辺りの培養上清中のIL-12/IL-23p40、RANTESの濃度をELISA法により測定した。8-SGuoは骨髄由来プラズマサイト樹状細胞において 1×10^5 個の細胞あたりのサイトカイン産生を誘導した。

B. 脾臓からのプラズマサイト樹状細胞の精製

野生型マウスの脾臓からPDCA1+B220+CD11c+のプラズマサイト樹状細胞をFACS Ariaにより精製した。

C. 8-SGuoは脾臓プラズマサイト樹状細胞のサイトカイン産生を誘導する

B.のプラズマサイト樹状細胞をLox(0.1 mM)、8-SGuo (0.1 mM)により刺激し24時間後、細胞数 1×10^5 個辺りの培養上清中のIL-12/IL-23p40、RANTESの濃度をELISA法により測定した。8-SGuoは脾臓プラズマサイト樹状細胞においてもサイトカイン産生を誘導した。

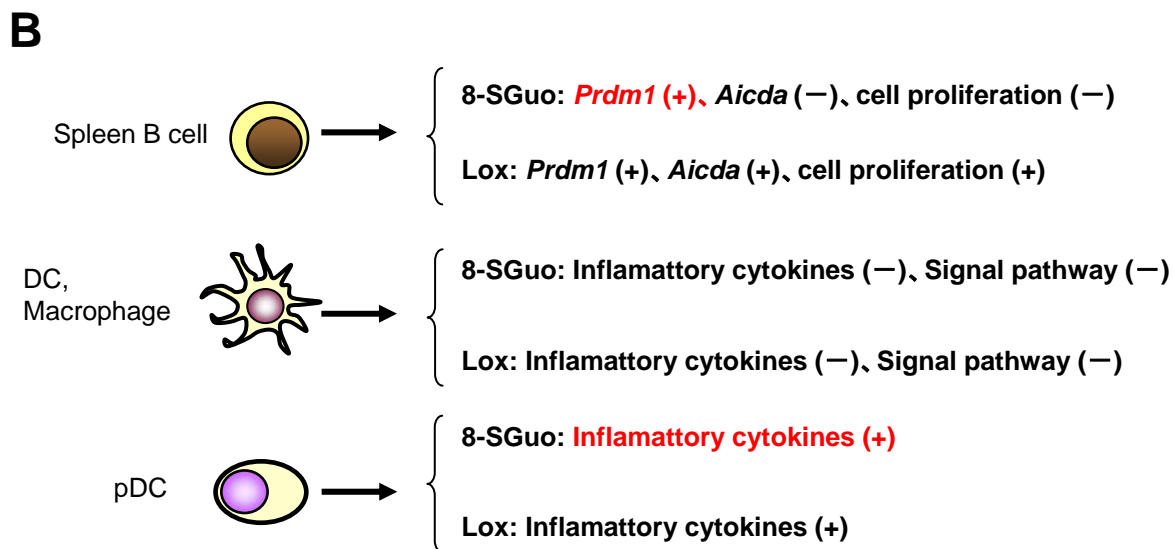
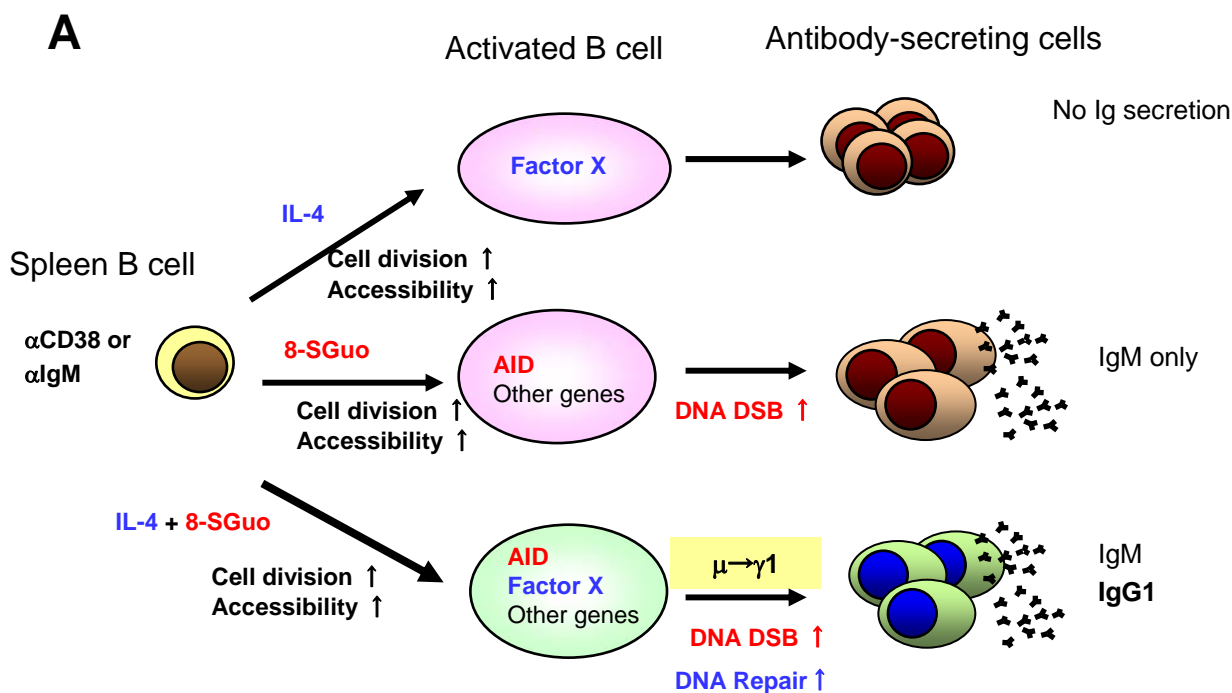


図20 まとめ

A. クラススイッチ組み換えにおける8-SGuo、IL-4の機能のまとめ

クラススイッチ組み換えにおける8-SGuo、IL-4の機能を纏めた。8-SGuoはAID発現、IL-4はDNA修復の促進を担っていると考えられる。

B. 各種細胞における8-SGuo、Loxの機能のまとめ

各種細胞における8-SGuo、Loxの機能比較を纏めた。8-SGuoはB細胞、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化するがDCやマクロファージには刺激を与えない。

謝辞

博士課程において研究を行うにあたって、多くの方々に助けていただきました。

研究に取り組み、膨らませる時期であった 1、2 年次には東京大学医科学研究所の高津聖志教授の御指導を仰ぎ、研究を発展させ、纏める時期に当たった 3、4 年次には三宅健介教授の御指導を頂きました。高津研究室、三宅研究室の両研究室の皆様には実験手技、研究の進め方、プレゼンテーションの仕方などについてディスカッションや日々の研究を通じて教えていただきました。

本研究の一部は平成 19 年度より日本学術振興会研究課題「クラススイッチ組み換えと B 細胞分化の分子機構に関する研究」として採択され、研究助成を受けたことをここに記します。

また、両親を初めとする様々な人たちから有形無形の支援を頂き、充実した大学院生活を送りこの研究を纏めることができました。この場を借りて御礼申し上げます。